การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นางสาวภารวิณี ยังเจริญยืนยง
นางสาวศศวรรณ ศรีบุญทรง
นางสาวศิริวรรณ แซ่โง้ว

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Survival of acid-adapted and microencapsulated probiotic bacteria in salad dressing during refrigerated storage

Miss Paravinee Yangjaroenyuenyong

Miss Sasawan Sribunsong

Miss Siriwan Sae-ngow

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นักศึกษา นางสาวภารวิณี ยังเจริญยืนยง
นางสาวศศวรรณ ศรีบุญทรง
นางสาวศิริวรรณ แซ่โง้ว

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	.....
กรรมการ	ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ	.....
กรรมการ	ผศ.ลินจง สุขลำภู	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ
นักศึกษา	นางสาวภารวิณี ยังเจริญยืนยง
	นางสาวศศวรรณ ศรีบุญทรง
	นางสาวศิริวรรณ แซ่โง้ว
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2547
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาผลของการปรับตัวต่อกรดต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก 3 ชนิด ได้แก่ *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับให้มีพีเอช 4.5 ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์ของ *B. lactis*, *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดมีการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว ชนิดของกรดอินทรีย์มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งแบคทีเรียทั้งสามชนิดสามารถอยู่รอดได้ดีที่สุดในอาหารที่มีกรดแลคติก ตามด้วยอาหารที่มีกรดซิตริกและกรดแอซีติก หลังจากการบ่มนาน 7 วัน พบว่า *L. casei* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกรดทั้งสามชนิด โดยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ขณะที่ *B. lactis* และ *L. acidophilus* มีจำนวนเซลล์ลดลง โดย *B. lactis* อยู่รอดได้ดีกว่า *L. acidophilus* จึงได้คัดเลือกเชื้อ *L. casei* และ *B. lactis* มาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การศึกษาผลของการปรับตัวต่อกรดร่วมกับเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (ในอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2) ต่อการอยู่รอดของ *L. casei* และ *B. lactis* ในน้ำสลัดที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ โดยทำการเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของเซลล์ *L. casei* และ *B. lactis* ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการใดๆ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรด เซลล์ที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน และเซลล์ที่ผ่านทั้งการปรับตัวต่อกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน จากการทดลองพบว่าหลังจากการเก็บรักษาน้ำสลัดนาน 4 สัปดาห์ เซลล์ของ *L. casei* และ *B. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันมีปริมาณการอยู่รอดมากที่สุด (ร้อยละ 103.8 และ 95.2 ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านกระบวนการแบบอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L. casei สามารถต้านทานต่อสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำในน้ำสลัดได้ดีกว่า *B. lactis* โดย *L. casei* มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า *B. lactis* ดังนั้น *L. casei* จึงเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเติมในน้ำสลัด จากนั้นจึงได้ทำการผลิตน้ำสลัดที่เติม *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส 7 ลักษณะ ได้แก่ สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว ความหวาน ลักษณะปรากฏ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม ของน้ำสลัดที่ไม่เติม *L. casei* (ชุดควบคุม) และน้ำสลัดที่เติม *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดร่วมกับผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน โดยใช้ผู้ทดสอบชิม 20 คน ทำการประเมินโดยใช้ hedonic scale พบว่าคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสส่วนใหญ่ ยกเว้นกลิ่นรสและความเปรี้ยว ของน้ำสลัดชุดควบคุม ได้คะแนนสูงกว่าน้ำสลัดที่เติม *L. casei* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ผู้ประเมินชอบน้ำสลัดที่ไม่มีการเติมเชื้อมากกว่า

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Survival of acid adapted and microencapsulated probiotic bacteria in salad dressing during refrigerated storage
Name	Miss Paravinee Yangjaroenyuenyong Miss Sasawan Sribunsong Miss Siriwan Sae-ngow
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2004
Special Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Suree Nanasombat

Abstract

Effect of acid adaptation on survival of three species of probiotic bacteria (*Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei*) in acidified MRS broth (pH 4.5) with citric acid, lactic acid and acetic acid at 37 °C was studied. Acid-adapted cells of *B. lactis, L. acidophilus* and *L. casei* exhibited greater survival than their non-adapted counterparts. Types of organics acids affected the viability of probiotic bacteria. Three probiotic bacteria showed the greatest survival in acidified MRS broth with lactic acid followed by those added with citric acid and acetic acid. After 7 days of incubation, *L. casei* was able to grow in MRS broth added with three types of acids, showing increased cell population while the number of *B. lactis* and *L. acidophilus* cells decreased. *B. lactis* had greater survival than *L. acidophilus*. Thus, *L. casei* and *B. lactis* were selected to use in the next step of experiments.

Effect of acid adaptation in combination with microencapsulation (in 2% alginate) on survival of *L. casei* and *B. lactis* in salad dressing stored at 5 °C for 4 weeks was investigated. Survivals of *L. casei* and *B. lactis* cells without any treatment, with acid adaptation, with microencapsulation, and with both acid adaptation and microencapsulation were compared. After 4 weeks of storage, acid-adapted cells of *L. casei* and *B. lactis* with microencapsulation showed the greatest survival in salad dressing (103.8% and 95.2% respectively) as compared with other treatments. *L. casei* displayed greater resistance to low pH condition in salad dressing, showing higher viable counts compared to those of *B. lactis*. Thus, *L. casei* was the most suitable probiotic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bacteria for adding in salad dressing. Salad dressing added with acid-adapted and microencapsulated *L. casei* were then prepared for sensory evaluation. Seven sensory characteristics, including color, flavor, sourness, sweetness, appearance, texture and overall acceptance of salad dressing without *L. casei* (control) and salad dressing added with acid-adapted and microencapsulated *L. casei* were evaluated by 20 panelists using hedonic scale test. Most sensory characteristics except flavor and sourness of the control sample received significantly higher scores than salad dressing with *L. casei* . This indicated that the panelists prefered control sample more than the one with *L. casei*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาการปรับปรุงการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน โครงงานพิเศษนี้ไม่สามารถลุล่วงไปด้วยดีหากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทำการทดลอง "การศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ"(Survival of acid-adapted and microencapsulated probiotic bacteria in salad dressing during refrigerated storage) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลของการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ และเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆ ทำให้การทำโครงงานพิเศษเป็นไปได้ด้วยดี

ของกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังในและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานที่จัดทำขึ้นฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษฉบับนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัย ณ ที่นี้ด้วย

ภารวิณี ยังเจริญยืนยง

ศศวรรณ ศรีบุญทรง

ศิริวรรณ แซ่โง้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ของเขตของการวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	38
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	69
ภาคผนวก ค	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร	7
2	สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ	8
3	การเอนแคปซูเลชันแบคทีเรียแลกติกโดยเทคนิคเอกทรูชัน	30
4	การเอนแคปซูเลชันแบคทีเรียแลกติกโดยใช้เทคนิคอิมัลชัน	31
5	ข้อดีข้อเสียของเทคนิคเอกทรูชันและเทคนิคอิมัลชัน	32
6	ผลของการปรับตัวต่อกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. lactis* และ *L. casei* ในน้ำสลัดที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	46
7	ค่าพีเอชของน้ำสลัดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์	47
8	คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดที่ไม่มีเชื้อ *L. casei* และที่มีเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน	49
9	ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *B. lactis* , *L. acidophilus* และ *L. casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 1	71
10	ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *B. lactis* , *L. acidophilus* และ *L. casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 2	72
11	ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *B. lactis* , *L. acidophilus* และ *L. casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 3	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12	การศึกษาการปรับตัวด้วยกรดและการไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำทั้ง 2 ซ้ำ	74
13	ค่าพีเอชของน้ำสลัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ทั้ง 2 ซ้ำ	74
14	ข้อมูลการทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 ซ้ำโดยใช้ผู้ชิม 20 คน	75

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิด	12
2	การเอนแคปซูเลชันโดยใช้เทคนิคเอกทรูชันและเทคนิคอิมัลชัน	26
3	ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *B. lactis* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	41
4	ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *L. acidophilus* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	42
5	ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *L. casei* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	43
6	การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเหลว MRS ที่พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

โพรไบโอติก (probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงในอาหาร ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอโดยจะเป็นตัวควบคุมความสมดุลของจุลินทรีย์ที่ภายในลำไส้ (FAO/WHO, 2001; Fuller, 1989) และยังป้องกันความผิดปกติในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ เช่น ท้องร่วง (Arvola และคณะ, 1999) ท้องเดิน (Oksanen และคณะ, 1990) อีกทั้งยังลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นของยาปฏิชีวนะที่มีต่อลำไส้ อาการแพ้อาหาร รวมทั้งโรคผิวหนังอักเสบในเด็ก (Gorbach, 2002) และยังสามารถป้องกันโรคลำไส้อักเสบได้ เช่น โรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Shanahan, 2000) นอกจากนี้ โพรไบโอติกยังมีประโยชน์ในการรักษาผู้ที่มีระดับไขมันในเลือดสูง Kopp-Hoolihan (2001) รายงานว่า ร้อยละ 32 ของผู้ป่วยที่รับประทานโพรไบโอติก จะมีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลง และมีปริมาณของ low density lipoprotein (LDL) ลดลงร้อยละ 8.4 แบคทีเรียโพรไบโอติกที่รู้จักกันดี คือ *Lactobacillus acidophilus* และ bifidobacteria เมื่อเร็ว ๆ นี้ยังพบว่าบิฟีโดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์ มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันที่มีชื่อว่า cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง (Coakley, 2003) ในการศึกษาพบว่า มี *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะของกรดและน้ำดี (Lankaputhra และ Shah, 1995) จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และช่วยในการย่อยอาหาร กระตุ้นภูมิคุ้มกันและยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ใหญ่ (Ziemer และ Gibson, 1998)

ในการที่จะให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพนั้น จะมีความเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ มีผู้กล่าวว่าควรจะบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเซลล์ของโพรไบโอติกอย่างน้อย 10^5-10^6 CFUต่อกรัม จึงเป็นผลดีต่อสุขภาพ (Kurmann, 1991; Robinson, 1987) และจุลินทรีย์นี้ควรที่จะมีชีวิตอยู่ในลำไส้หลังจากรับประทานเข้าไปแล้วเป็นเวลา 1-3 วัน (Gorbach, 2002) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ เป็นแบคทีเรียในลำไส้ที่เจริญเติบโตได้ช้าในนม และเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะค่อยๆลดลง (Dave และ Shah, 1997; Godward และคณะ, 2000) สำหรับสิ่งที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ ความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์ ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บภายในตู้เย็น ระดับออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ ปริมาณการซึมผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาชนะบรรจุของออกซิเจน ความไวต่อสารฆ่าเชื้อซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียโยเกิร์ต และการขาดแคลนสารอาหารบางชนิด (Lankaputhra และ Shah, 1997)

ในการที่จะทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีชีวิตอยู่รอดได้มากขึ้นนั้น สามารถทำได้หลายวิธี สำหรับวิธีที่นิยมใช้ได้แก่ 1) การใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากการตรึงเซลล์ ซึ่งจะใช้แคลเซียมอัลจิเนตเจลแคปซูล แคปปา-คาราจีแนน เจแลนกัม หรือ เจลาติน เทคนิคนี้เป็นกระบวนการที่เซลล์ถูกรักษาไว้ภายในวัสดุที่ห่อหุ้ม เพื่อลดการบาดเจ็บ และการตายของเซลล์ (Champagne และ Cote, 1987) ทำให้เซลล์มีความสามารถที่จะทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และ มีความทนต่อน้ำดีมากขึ้น (Ravula และ Shah, 1999; Sultana และคณะ, 2000) ในปัจจุบันเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน ไม่สามารถที่จะผลิตแคปซูลขนาดเดียวกันในปริมาณมากได้ (Kailasapathy, 2002) 2) การปรับตัวโดยใช้กรด เทคนิคนี้เป็นการทำให้เซลล์เกิดการปรับตัวต่อสภาวะที่เป็นกรดไม่สูงมากนัก ซึ่งจะมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนซึ่งช่วยป้องกันและช่วยซ่อมแซม macromolecule ของเซลล์ (Bearson และคณะ, 1997) โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมานี้เรียกว่า acid shock inducible proteins (Asps) เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวจะมีความต้านทานต่อสภาวะที่เป็นกรดสูงขึ้นหรือสภาวะเครียดอื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการจะนำมาทำการทดลองเพื่อเพิ่มอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก เมื่อนำไปเติมลงในอาหารโพรไบโอติก

เนื่องจากสภาวะการณ์ในปัจจุบันผู้คนได้หันมาใส่ใจในสุขภาพ และดูแลเรื่องอาหารการกินกันมากขึ้น จึงทำให้อาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเป็นที่นิยม ซึ่งสลัดก็เป็นหนึ่งในอาหารเพื่อสุขภาพที่ผู้บริโภคเลือกรับประทาน เนื่องจากสลัดผักและผลไม้ที่อุดมไปด้วยใยอาหารวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ ที่ผู้บริโภคต้องการ และสิ่งที่ขาดไม่ได้นั้นก็คือ น้ำสลัด ซึ่งจะช่วยเพิ่มรสชาดให้กับสลัดจานนั้นอย่างมาก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการพัฒนาน้ำสลัดเพื่อสุขภาพ ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก ในการที่จะให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพจุลินทรีย์ชนิดนี้ควรมีอัตราการรอดชีวิตสูงในระหว่างการเก็บรักษา สำหรับผลิตภัณฑ์น้ำสลัดโพรไบโอติกยังไม่มีผู้ในผลิตมาก่อน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการพัฒนาสูตรน้ำสลัดเพื่อสุขภาพที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันและการปรับตัวด้วยกรด รวมทั้งมีการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำสลัดโพรไบโอติกที่ผลิตขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรดของแบคทีเรียโพรไบโอติก ในอาหารเหลวที่ปรับพีเอชให้เป็นกรด

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรด และกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยวิธีการปรับตัวด้วยกรดและวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน โดยนำเชื้อมาประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำสลัดโพรไบโอติกเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำสลัด

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1.4.1 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก 3 ชนิด ได้แก่ *Bifidobacterium lactis* และ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดในอาหารเหลว (MRS broth) ที่ปรับพีเอชให้ได้ 4.5 ด้วยกรด 3 ชนิด ได้แก่ กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก

1.4.2 ศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Bifidobacterium lactis* และ *Lactobacillus casei* ที่ได้ผ่านการปรับตัวด้วยกรด เปรียบเทียบกับเชื้อที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันอย่างเดียว และเชื้อที่ผ่านกระบวนการทั้งสองชนิดในน้ำสลัดเพื่อสุขภาพ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่รอดในกระเพาะและลำไส้ และเมื่อนำมาเติมลงในน้ำสลัด จะทำให้น้ำสลัดมีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น ซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากการบริโภคน้ำสลัดโพรไบโอติกเพื่อสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 จุลินทรีย์โพรไบโอติก

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์มีชีวิตที่เติมลงในอาหาร ซึ่งจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค โดยปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร (Fuller, 1922) จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้กันส่วนใหญ่คือพวก Lactobacilli และ Bifidobacteria ซึ่งจะใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก หรือจะนำไปทำให้อยู่ในรูปผง ผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต หรือนมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* และ*Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricus* แต่แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดและในน้ำดีที่มีสภาพเป็นด่างเข้มข้นเมื่อผ่านทางเดินอาหาร ซึ่งการที่แบคทีเรียจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพได้นั้นแบคทีเรียจะต้องมีชีวิตรอดเมื่อผ่านเข้าไปยังภายในลำไส้ จึงได้มีการนำแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ซึ่งมีความสามารถทนต่อกรดและน้ำดีในทางเดินอาหารมาใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีประโยชน์และจะทำให้เกิดการย่อย กระตุ้นภูมิคุ้มกันและยับยั้งเชื้อโรค ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายที่พบอยู่ในลำไส้ ได้แก่จุลินทรีย์พวก *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostidium* และ *Proteus* (Ziemer และ Gibson, 1998) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถในการผลิตสารที่เป็นอันตรายรวมทั้ง เอมีน อินโดล ไฮโดรเจนซัลไฟด์และฟีนอลจากส่วนประกอบของอาหาร (Ishibashi และ Shimamura, 1993) แบคทีเรียที่เป็นอันตรายในลำไส้ จะนำไปสู่การทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น เกิดมะเร็ง การอักเสบในลำไส้ใหญ่ที่เป็นแผลเปื่อยและเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อของจุลินทรีย์ที่เป็นพิษในลำไส้ เช่น *Salmonella*, *Camphylobacter* (Macfarlane และ Gibson, 1994; Fook และคณะ, 1999)

2.1.1 ชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.1.1.1 <u>ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus*</u>

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เป็นพวกแฟคัลเตตีฟแอนแอโรบ เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอดอีกด้วย เจริญได้ในสภาวะกรด Lactobacilli สามารถใช้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 85 ในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ หรือได้กรดแลคติกร้อยละ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดแอซีติก ในการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เจริญได้ที่พีเอช 4.0 - 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30 - 40 องศาเซลเซียส

2.1.1.2 ลักษณะของเชื้อ Bifidobacteria

Bifidobacteria ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Tissier ในปี ค.ศ. 1900 ซึ่งแยกได้จากอุจจาระของเด็กทารก และตั้งชื่อว่า *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นพวกไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง มีรูปร่างเป็นแท่งคล้ายตัว Y ไม่ผลิตก๊าซ bifidobacteria ที่มีลักษณะเป็นสองส่วนเท่ากันหรือเป็นแท่งต่อกันเป็นกิ่งก้านอย่างซับซ้อน ซึ่งจะแสดงออกเป็นรูปร่างต่างๆ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้มีกิ่งก้านมากมายในอาหารที่ขาดเบต้า-เมทิล-ดี-กลูโคซามีน เซลล์ที่มีลักษณะเป็นสองส่วนเท่ากันจะเกิดรูปร่างที่แตกแขนงมากขึ้น (Glick และคณะ, 1960) และเมื่อมีการเติมกรดอะมิโน เช่น เซรีน อะลานีน กรดแอสพาร์ติก เพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่เป็นกิ่งก้านมากมายจะเปลี่ยนเป็นแท่งโค้ง bifidobacteria นี้พบได้ในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และช่องคลอด ผลิตวิตามินบี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37 - 41 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5 – 7.0 ผลิตกรดแอซีติก กรดแลคติก ทำให้เพิ่มความเป็นกรดในลำไส้ ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการมีจำนวนลดลง Reuter (1963) ได้แยกเชื้อ bifidobacteria 7 ชนิด ได้จากอุจจาระของเด็กและผู้ใหญ่ วัยรุ่น คือ *B. infantis, B. parvulorum, B. breve, B. liberorum, B. lactentis, B. adolescentis* และ *B. longum*

2.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก

สิ่งสำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก คือ จะต้องมีความสามารถในการมีชีวิตรอดในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดในผลิตภัณฑ์ต่างๆ หรือในกระเพาะอาหารที่มีพีเอชต่ำๆ และจะต้องมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีน้ำดีอยู่หรือเป็นด่างเมื่อผ่านลำไส้ (Lankaputhra และ Shah, 1995) Clark และคณะ(1993) ได้แสดงให้เห็นว่า *Bifidobacterium longum* มีชีวิตรอดได้ดีในสภาวะกรดและสามารถทนสภาวะที่เป็นด่างในน้ำดีได้สูงถึงร้อยละ 4 ซึ่งความสามารถในการทนกรดและน้ำดีนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย Shah และคณะ (1995) รายงานว่า *Bifidobacterium animalis* (ได้นำกลับมาจัดจำแนกใหม่เป็น *B. lactis*) ที่ใช้ในการทำโยเกิร์ตในหลายๆประเทศนั้น สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ โพรไบโอติกยังมีความสามารถในการเกาะติดที่ผนังและเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้ ซึ่งทำให้เกิดการแข่งขันและยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นอันตรายซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.1.3.1 การเพิ่มคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์นมหมัก

ในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์นมหมักจะเกิดการย่อยโปรตีน โดยที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกทำให้โยเกิร์ตมีปริมาณกรดอะมิโนสูงขึ้น (Breslaw และ Kleyn, 1973; Alm, 1982a) เมื่อนำผลิตภัณฑ์นมหมักหลายชนิด เช่น นมอะซิโดฟิลัส คีเฟอร์ โยเกิร์ตและคัลเจอร์บัตเตอร์มิลค์ ไปใช้เลี้ยงสัตว์จะมีผลในการช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มคุณค่าให้กับอาหารสัตว์มากกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการหมัก (Hargrove และ alford, 1978; Friend และ Shahani, 1984) นอกจากนี้ McDonough และคณะ (1983) ได้รายงานว่าโยเกิร์ตมีปริมาณของแคลเซียม เหล็ก สังกะสี แมงกานีส ทองแดงและฟอสเฟต มากกว่าในน้ำนม ซึ่งหนูที่รับประทานโยเกิร์ตมีการเจริญดีกว่าเมื่อเทียบกับหนูที่ดื่มนม การใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร แสดงดังตารางที่1

เชื้อ Lactobacilli ต้องการวิตามินบีในการเจริญ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินได้ ในการศึกษาพบว่า ไรโบฟลาวินและไนอาซินจะเพิ่มขึ้น ในโยเกิร์ต มีวิตามินบี6 กรดแพนโททีนิคในเชดดาชีส และวิตามินบี12 ในคอทเทตชีส (Alm, 1982; Deeth และ Tamine, 1981) และกรดโฟลิกในผลิตภัณฑ์หลายชนิดรวมทั้งโยเกิร์ต นมบิฟีดัส และคีเฟอร์ (Shahani และ Chandan, 1979) ไรโบฟลาวินและไทอามีนก็จะเพิ่มขึ้นระหว่างการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่หมักด้วยแลคโตบาซิลลัส (Rajalakshmi และ Vanaji, 1967)

2.1.3.2 การผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆภายในลำไส้ มีรายงานอยู่มากมาย (Axelsson และคณะ, 1987; Silva และคณะ, 1987) เกี่ยวกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผลิตสารเหล่านี้ ซึ่งลักษณะของการยับยั้งจะเกิดขึ้นโดย 1) การลดพีเอชโดยการผลิตกรดแลคติกของจุลินทรีย์โพรไบโอติก เช่น *L. acidophilus* และ *L. casei* ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งเป็นตัวหลักในกระบวนการหมัก ส่วน Bifidobacteria จะผลิตกรดแอซีติกและกรดแลคติกในอัตราส่วน 3:1 ซึ่งนอกจากผลิตกรดแลคติกและกรดแอซีติกแล้วยังสามารถผลิตกรดชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น กรดซิตริก กรดฮิปปูริก นอกจากนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล และสารอื่นๆ ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกด้วย 2) การลดระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน 3) การผลิตสารประกอบที่มีความจำเพาะในการยับยั้ง เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้มากมาย และยังมีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นๆได้ (Tagg และคณะ, 1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร

ชนิดของจุลินทรีย์	การใช้ประโยชน์
Saccharomyces boulardii	เป็นยีสต์ที่ไม่เป็นอันตรายใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง
Lactobacillus acidophilus	ใช้เป็นอาหารเสริมในผลิตภัณฑ์นม และใช้ในการหมัก; จะให้ประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก
L. plantarum	ใช้ในผลิตภัณฑ์นม
Lactobacillus GG	ในโยเกิร์ตและเครื่องดื่มหางนม จะให้ประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก
L. casei subsp. *Rhamnosus*	ใช้ในผลิตภัณฑ์นมและอาหารสัตว์
L. brevis	ใช้ในผลิตภัณฑ์นมและอาหารสัตว์
L. delbrueckii subsp. *Bulgaricus*	ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต
Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus*	ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต
Bifidobacterium bifidum	เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์นมใหม่ๆ และนำไปใช้กับเด็กแรกเกิด
B. Infants	มีลักษณะคล้าย *B. bifidum*
Enterococcus faecium	ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ
Lactococcus lactis subsp. *lactis And cremoris*	ใช้ในการผลิตบัตเตอร์มิลค์และชีส

ที่มา: Goldin และ Gorbach(1992)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันที่สุดคือ ไนซิน ซึ่งผลิตจาก *Lactococcus lactis* และ 4) การผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ) ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการรายงานอย่างมากมายที่บอกถึงสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่สามารถผลิตสารประกอบที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังตารางที่ 2

2.1.3.3 <u>การใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในการบำบัดโรค</u>

- การยับยั้งการเกิดมะเร็ง

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่ชักนำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ จากการศึกษาพบว่า *L. acidophilus* ที่สามารถทนต่อน้ำดีได้มีผลในการยับยั้งการเกิดเนื้องอก ซึ่งจะลดปริมาณเอนไซม์ 3 ชนิด จากแบคทีเรียที่อยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุจจาระได้ทั้งในคนและหนู (Goldin และ Gorbach, 1977, 1984a) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ คือ เบตา-กลูโคโรนิเดส อะโซรีดักเทสและไนโตรรีดักเทส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะเปลี่ยนสารที่สามารถเกิดเป็นสารก่อมะเร็ง (procarcinogen) ไปเป็นสารที่พร้อมจะเกิดเป็นมะเร็ง (proximal carcinogen) ที่บริเวณลำไส้ใหญ่ สารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ คือ 1,2-ไดเมทิลไฮดราซีน (1,2-dimethyl hydrazine, DMH) การกระตุ้น DMH ให้เกิดสารที่พร้อมจะเกิดเป็นมะเร็ง จะเกิดที่ลำไส้ใหญ่ ในการลดเอนไซม์เบตา-กลูโคโรนิเดส อาจมีผลในการลดการกระตุ้น DMH และการเกิดเซลล์เนื้องอกภายหลัง (Goldin และ Gorbach, 1980) ตัวอย่างของสารประกอบที่ก่อให้เกิดมะเร็งที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียในลำไส้ มีดังนี้ คือ Fecapentaenes, Nitrosamines, Heterocyclic amine, Various aglycones, Phenolic compounds, Azo dyes, Nitrate polycyclic aromatic hydrocarbon, Ammonia, Amines, Indolic compounds, Diacylglycerol, Secondary bile acids (Macfarlane และ Gibson, 1994; Rowland, 1995)

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สารยับยั้งที่ผลิต
L. acidophilus	acidolin
	acidophilin
	lactacin B
L. bulgaricus	bulgaricin
L. helveticus	lactocin 27
	helvecitin J
L. plantarum	plantacin B
	plantaricin A
	plantaricin SIK 83
L. reuteri	reutein
L.sake	sakacin A
	lactocin S

ที่มา: Robert และคณะ(1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shahani และคณะ (1983) รายงานว่าการให้นมและน้ำนมที่หลั่งออกมาครั้งแรกที่ผ่านการหมักด้วย *L. acidophilus* สามารถลดการขยายของเซลล์มะเร็งได้ถึงร้อยละ 16 – 41 Kinouchi และคณะ (1998) รายงานว่า *L. acidophilus* และ *B. adolescentis* ที่เกาะอยู่บนผิวลำไส้ จะยับยั้งการเกิดแผลเปื่อยบริเวณส่วนปลายของลำไส้เล็กได้ Goldin และ Gorbach (1984b) ได้ให้อาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับ *L. acidophilus* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ เบต้า-กลูคูโรนิเดส ไนโตรรีดักเตส และ เอโซรีดักเทส ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดลองให้ผู้สูงอายุบริโภคน้ำตาลที่ย่อยสลายไม่ได้โดยมนุษย์ วันละ 8 กรัม ติดต่อกันนาน 14 วัน พบว่ามีบิฟีโดแบคทีเรียมสูงขึ้นกว่าปกติ 10 เท่า และพบปริมาณสารพิษ ครีซอลและอินโดลน้อยลง รวมทั้งปริมาณแอมโมเนียลดลงเกือบสองเท่า ตลอดจนเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสารพิษหรือสารก่อมะเร็งก็ลดกิจกรรมลง (Hikada และคณะ, 1986; Hayakawa และคณะ, 1990)

- การรักษาการติดเชื้อในลำไส้

Gotz และคณะ (1979) พบว่า กล้าเชื้อผงสำเร็จรูปที่ใช้ในทางการค้าที่ประกอบด้วยแลคโตบาซิลลัสจะมีผลในการลดอัตราการเกิดโรคท้องร่วงได้ ร้อยละ 14 ซึ่งได้ทำการบันทึกจากคนไข้ที่มีความผิดปกติจากการรักษาโดยยาแอมพิซิลลิน พบว่าอัตราการลดลงของโรคท้องร่วงของคนไข้ที่ได้รับประทานเชื้อ *Lactobacillus* มีความแตกต่างกับอัตราการลดลงของโรคท้องร่วงของคนไข้ที่ไม่ได้รับประทานเชื้อ *Lactobacillus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Hitchins และคณะ (1985) ได้รักษาหนูที่ติดเชื้อ *Salmonella enteritidis* ด้วยนมและโยเกิร์ต ผลคือหนูที่ได้รับประทานโยเกิร์ตมีอัตราการตายลดลงและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น Zychowicz และคณะ (1974, 1975) ได้ใช้นมอะซิโดฟิลัส ในการรักษาเด็กที่มีอาการท้องร่วงจากเชื้อ *Salmonella* หรือ *Shigella* พบว่า เด็กร้อยละ 43 ที่ติดเชื้อ *Salmonella* และร้อยละ 67 ของเด็กที่ติดเชื้อ *Shigella* จะหายจากอาการท้องร่วงในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากได้รับนมอะซิโดฟิลลัส นอกจากนี้ Niv และคณะ (1963) ได้ทดลองใช้โยเกิร์ตรักษาทารก 54 คน ที่เป็นโรคท้องร่วง โดยแบ่งทารกเป็น 2 กลุ่ม ในกลุ่มแรกรักษาด้วย นีโอมัยซิน/คาโอลิน/เพกติน และอีกกลุ่มหนึ่งจะรักษาโดยการให้กินโยเกิร์ต พบว่ากลุ่มที่ได้รับโยเกิร์ตร้อยละ 50 จะหายในช่วงเวลาสั้นเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น

- การรักษาภาวะสมองทำงานผิดปกติที่เกี่ยวกับตับ

ภาวะสมองทำงานผิดปกติที่เกี่ยวกับตับ เป็นความผิดปกติทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของตับ และระดับแอมโมเนียในเลือดเพิ่มขึ้น โดยปกติแล้วแอมโมเนียผลิตขึ้นจากยูเรียในลำไส้ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ยูรีเอสจากแบคทีเรีย แอมโมเนียจะถูกดูดซึมและเข้าไปกำจัดที่ตับ ในคนไข้ที่มีความผิดปกติของตับกลไกกำจัดพิษจะเสียหาย และระดับแอมโมเนียจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นในกระแสเลือด ในการรักษาโดยให้ *L. acidophilus* และ/หรือ นีโอมัยซิน มีผลทำให้เอนไซม์ยูรีเอสในอุจจาระลดลง และระดับแอมโมเนียของคนไข้ลดลงด้วย (Read และคณะ, 1966)

- การรักษาอาการคอเลสเทอรอลสูงผิดปกติ

คอเลสเทอรอลในเลือดที่เพิ่มขึ้นจะมีผลเกี่ยวข้องกับอัตราการเกิดโรคหัวใจ มียาหลายชนิดมีสามารถลดคอเลสเทอรอลในเลือดได้ Rao และคณะ (1981) ได้ทดลองให้หนูบริโภคนมหมักที่มี *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* เป็นส่วนประกอบ และนำมาผสมกับอาหารสัตว์ พบว่าปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือดของหนูได้ลดลง เมื่อเทียบกับหนูที่บริโภคหางนมที่ได้สกัดเอาไขมันออกแล้ว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gruneward (1982) ซึ่งได้ให้ลูกหนูบริโภคนมหมักที่มี *L. acidophilus* โดยนำมาผสมกับอาหารสัตว์ พบว่าระดับคอเลสเทอรอลในลูกหนูลดลงเช่นเดียวกัน *L. acidophilus* มีความเกี่ยวข้องกับคอเลสเทอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนำไปสู่การพิจารณาที่ว่าจุลินทรีย์จะจับกับคอเลสเทอรอลในช่องว่างภายในลำไส้ ดังนั้นจึงลดการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด

- การป้องกันการแพ้แลคโตส (Lactose Intolerance)

แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในนมและในบางคนจะเกิดอาการอึดอัดในท้องเมื่อดื่มนมเข้าไปเนื่องจากขาดเอนไซม์ย่อยแลคโตสที่อยู่ในลำไส้คือ เอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส (แลคเตส) ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นมหมัก lactobacilli จะผลิตเอนไซม์แลคเตส มาย่อยแลคโตสในนม ได้เป็นกลูโคสและกาแลคโตสมากกว่าร้อยละ 50 ในนมอะซิโดฟิลัสและโยเกิร์ต แลคโตสถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการหมัก การผลิตเอนไซม์แลคเตสมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในการหมักโยเกิร์ต ซึ่งเอนไซม์แลคเตสจะถูกปล่อยออกมาจากเชื้อแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมัก แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเตสจากแบคทีเรียจะมีอยู่ในลำไส้ของคนที่ทานโยเกิร์ต (Kilara และ Shahani, 1976)

2.2 พรีไบโอติก

พรีไบโอติก เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งจะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยการกระตุ้นการเจริญเติบโต และกิจกรรมของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดในลำไส้ใหญ่ (Gibson และ Roberfroid, 1995) สารพรีไบโอติกจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่หลั่งสารที่เป็นประโยชน์ที่อยู่ในลำไส้ แต่ไม่ส่งเสริมพวกจุลินทรีย์เชื้อโรค เช่น clostidia ที่ผลิตสารพิษ proteolytic bacteroides และ *E. coli* ที่ผลิตสารพิษ แบคทีเรียในลำไส้จะได้รับอาหารซึ่งไม่สามารถย่อยได้ในส่วนของทางเดินอาหารส่วนบน สิ่งเหล่านี้จะประกอบด้วย resistant starch ใยอาหาร น้ำตาล โปรตีน เพปไทด์ และกรดอะมิโน ผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ คือ กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) ได้แก่ แอซีเตท โพรพิโอเนตและบิวทิเรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ตัวอื่นที่ได้จากการหมัก ประกอบด้วย เอทานอล แลคเตท ซักซิเนต ฟอร์เมต วาลิเลต และคารโพรเอต และกรดไขมันที่มีกิ่งก้าน เช่น ไอโซบิวทีเรต 2-เมทิล-บิวทีเรต และไอโซเวราเลต ซึ่งกรดอะมิโนสายสั้นที่เกิดขึ้น จะถูกดูดซึมและนำไปเผาผลาญสร้างเป็นพลังงานให้แก่ผู้บริโภคต่อไป (Cummings, 1995)

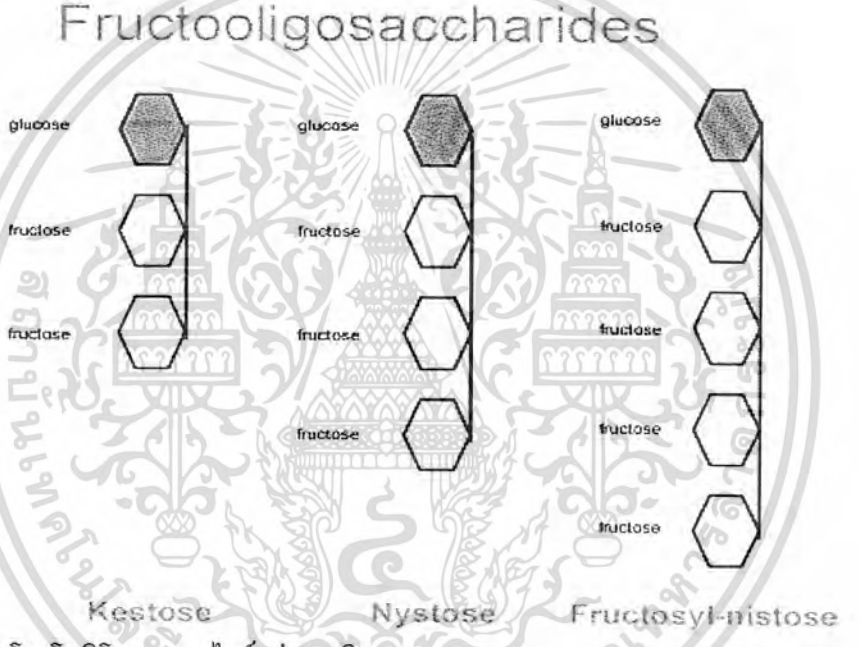
สารที่จัดเป็นพรีไบโอติก ต้องมีลักษณะดังนี้ คือ 1) สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมที่บริเวณกระเพาะหรือลำไส้เล็ก 2) ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Bifidobacterium* 3) กระบวนการหมักสารอาหารต้องเหนี่ยวนำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภค ประเภทของอาหารที่ใช้ในการหมักสำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ เช่น resistant starch จะมีความสำคัญอย่างมาก (Cummings และ Macfarlane, 1991) พอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (non-starch polysaccharide) ได้แก่ เพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไซแลน น้ำตาลและโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น แลคโคส แลคทูโลส ราฟฟิโนส สตาชิโอส และ ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์ จะไม่ถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก และจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในลำไส้ใหญ่ ซึ่งโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยน้ำตาลระหว่าง 2-2๐ หน่วยมาต่อกัน จะพบมากในผักและผลไม้ซึ่งสามารถนำมาสกัดได้ ผลิตโดยการย่อยโพลีแซคคาไรด์ หรือโดยการใช้เอนไซม์ (Gibson และคณะ, 2000) โอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดที่จัดเป็นพรีไบโอติก ดังนี้

2.2.1 Fructo-oligosaccharides

Fructo-oligosaccharides หรือ FOS หมายถึงโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ พบได้ในหัวหอม หน่อไม้ฝรั่ง อาติโชค มะเขือเทศ (Bornet, 1994; Crittenden และ Playne, 1996) โครงสร้างประกอบด้วย ดี-ฟรุกโตส และ ดี-กลูโคส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาต่อกัน 3-5 หน่วย เพื่อผลิตเคสโตส นิสโตส และ ฟรูโตซิล-นิสโตส การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจากบีทรูทโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* คือ ฟรุคโตซิลฟิวราโนซิเดสต่อโมเลกุลของฟรุกโตสโดยปฏิกิริยาทรานสฟรุกโตซิเลชัน FOS จะไม่ถูกย่อยที่ทางเดินอาหารส่วนบนโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แซคคาเลส มอลเตส และเอนไซม์จากลำไส้และตับอ่อนในลำไส้เล็กของคน (Anderson และคณะ, 1999) จากนั้นจะสามารถผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ โดยการย่อยจะเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน (Bouhnik และคณะ, 1991) ในขั้นแรกจะถูกย่อยโดยเอนไซม์เบตา-ออกซิเดสจากแบคทีเรีย ขั้นที่ 2 จะถูกหมักในสภาพที่ไม่มีอากาศเพื่อผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCF) ได้แก่ แอซีเตต โพรพิโอเนต และบิวทิเรต ส่วนก๊าซ ได้แก่ ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และ มีเทน จะมีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium,* Lactobacilli และแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ Perrin และคณะ (2000) ได้รายงานว่า FOS เพิ่มความสามารถในการทนต่อน้ำดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเพิ่มการเจริญของ bifidobacteria ด้วย Oyarzabal และ Conner (1995) ได้รายงานว่า FOS สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้มนุษย์ เช่น *Salmonella* ส่วน Bifidobacteria สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella, Camphylobacter* และ *E. coli* ได้ (Gibson และ Wang, 1994) ในการศึกษาผลของ FOS ที่มีต่อแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ พบว่า bifidobacteria และ lactobacilli จะเพิ่มขึ้น กรดไขมันสายสั้นจะเพิ่มขึ้น และลดจำนวนของ Clostidia, Fusobacteria, Bacteroides และพีเอชลดลง (Fuller และ Gibson, 1997; Gibson และ Roberfroid, 1995; Gibson และคณะ, 1996; O'Sullivan, 1996)



รูปที่ 1 ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิด
ที่มา: Montserrat และ Alicia (2001)

2.2.2 Innulins

Innulins คือ กลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฟรุกโตสเป็นองค์ประกอบที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ จัดอยู่ในพวกคาร์โบไฮเดรต เป็นโพลิเมอร์ของกลูโคส-ฟรุกโตส รู้จักกันในชื่อของ ฟรุกแตน ในทางการค้าสกัดได้จากรากของต้นชิคอรี (*Cichorium intybus*) (Roberfroid, 1997) และหน่อไม้ฝรั่ง อินนูลินประกอบด้วยหน่วยของฟรุกโตสและมีส่วนปลายเป็นกลูโคส พันธะระหว่างหน่วยของฟรุกโตสในอินนูลินคือ เบตา(2,1)ไกลโคซิดิก และจะส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 Isomalto-oligosaccharides

Isomalto-oligosaccharides ประกอบด้วยการรวมกันของพันธะ แอลฟา-ดี(1,6) ของโอลิโกเมอร์ของกลูโคส รวมถึง ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตเตตระโอส ไอโซมอลโตเพนตะโอส ฮิเกโรส โคจิไบโอส ไอโซพาโนส และโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ที่มีกิ่งก้านสาขามากๆ Isomalto-oligosaccharides ผลิตโดยกระบวนการใช้เอนไซม์หลายๆชนิด มีหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพมากในการกระตุ้นแบคทีเรียกรดแลคติกให้ผลิตบิวทิเรตได้มากขึ้น ซึ่งเป็นที่ต้องการในกระบวนการสันดาปในลำไส้ (Hayakawa และคณะ, 1990)

2.2.4 Lactosucrose

Lactosucrose เป็นไตรแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย ดี-กาแลคโตส ดี-กลูโคส และ ดี-ฟรุกโตส แลคโตซูโครส ผลิตโดยอาศัยเอนไซม์ เบตา-ฟรุกโตฟิวราโนซิเดสในการขนย้ายหมู่กาแลคโตซิลจากแลคโตส ไปซูโครส (Playne และ Crittenden, 1996) แลคโตซูโครสจะไม่ถูกย่อยที่กระเพาะและลำไส้เล็ก จะถูกใช้โดยสายพันธุ์ของ *Bifidobacterium* ในลำไส้ใหญ่ มีผลในการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ในลำไส้ใหญ่ รู้จักกันอีกชื่อหนึ่งคือ 4G-β-D-galactosylsucrose

2.2.5 Lactulose

Lactulose เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่กึ่งสังเคราะห์ ประกอบด้วยน้ำตาล ดี-แลคโตส และ ดี-ฟรุกโตส น้ำตาลพวกนี้จะต่อกันโดยพันธะเบตา-ไกลโคซิดิก ทำให้เกิดการทนต่อการย่อยของเอนไซม์ในคน อย่างไรก็ตาม แลคทูโลส จะถูกหมักได้โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ในจำนวนจำกัด จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เป็นพวกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น lactobacilli และ bifidobacteria ซึ่งจะให้ประโยชน์แก่ร่างกาย โดยแลคทูโลสจะมีการนำมาใช้เป็นยาระบายซึ่งจะไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็ก (Tamura, 1983)

2.2.6 Soy-oligosaccharides

Soy-oligosaccharides หมายถึง โอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในถั่วเหลืองและถั่วอื่นๆ สองอันดับแรกของ Soy-oligosaccharides คือ ไตรแซคคาไรด์ราฟฟิโนส และ เตตระแซคคาไรด์สตาชิโอส ซึ่งราฟฟิโนสประกอบด้วย ดี-กาแลคโตส ดี-กลูโคส และดี-ฟรุกโตส อย่างละ 1 โมเลกุล และสตาชิโอส ประกอบด้วย 2 โมเลกุลของ ดี-กาแลคโตส และ 1 โมเลกุลของ ดี-กลูโคส และ ดี-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟรุกโตส ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญในลำไส้ใหญ่ ซึ่งได้มีการทดลองสำเร็จในคนแล้ว จึงถือว่า Soy-oligosaccharides มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Gibson และคณะ, 2000)

2.2.7 Transgalacto-oligosaccharides

Transgalacto-oligosaccharides (TOS) ประกอบด้วย ดี-กาแลคโตส และ ดี-กลูโคส ซึ่ง TOS ผลิตจากดี-แลคโตส โดยปฏิกิริยาทรานกาแลคโตซิเลชันของเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตซิเดส จาก *Aspergillus oryzae* และ TOS จะไม่สามารถย่อยที่ส่วนบนของทางเดินอาหาร และกระตุ้นการเจริญของ *bifidobacterium* ในลำไส้ใหญ่ได้ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ ATP กรดไขมันสายสั้น และความเข้มข้นของแอซีเตตลดลง (Bouhnik และคณะ, 1991) ในการตรวจสอบผลของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่มีอยู่ในอุจจาระจะแสดงให้เห็นว่าพรีไบโอติกทำให้ bifidobacteria และ lactobacilli เพิ่มขึ้น ในขณะที่ *Bacteroides* sp. และ *Candida* sp. น้อยลง (Ito และคณะ, 1993)

2.2.8 Xylo-oligosaccharrides

Xylo-oligosaccharrides เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยไซโลสมาต่อกันด้วยพันธะเบตา 1,4 และ XOS ได้จากการย่อยโพลิแซคคาไรด์ ไซแลน ด้วยเอนไซม์

พรีไบโอติกส่วนใหญ่มีพื้นฐานในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก สารพรีไบโอติกที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์ แลคทูโลส ในการศึกษากับมนุษย์ในช่วงเวลาสั้นๆ พบว่า ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์ สามารถส่งเสริมการเจริญของ bifidobacteia ในลำไส้ส่วนล่าง ในทำนองเดียวกัน แลคทูโลสก็เป็นสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ ในยุโรปได้มีการอ้างอิงถึงความสามารถของสารพรีไบโอติกทั้ง 2 ชนิดนี้ ในการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในลำไส้หลังจากการใช้สารพรีไบโอติกในระยะเวลาสั้นๆ ผลที่ได้จากพรีไบโอติก คือ

ผลที่มีต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากพรีไบโอติกช่วยส่งเสริมการเจริญของ bifidobacteria และ lactobacilli ทำให้เชื้อทั้งสองมีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ ไวรัส โปรโตซัว ฟังไจและแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงได้ (Fuller และ Gibson, 1997) สารผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น กรดที่หลั่งออกมาจากแบคทีเรียเหล่านี้อาจทำให้พีเอชในลำไส้ลดลง และจะมีผลต่อเชื้อก่อโรคพวก Lactobacilli และ Bifidobacteria บางสายพันธุ์สามารถหลั่งสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติได้ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดี Buddington และคณะ(2002) พบว่า FOS และอินนูลิน สามารถป้องกันเชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และป้องกันการเกิดมะเร็งได้ รวมทั้งป้องกันสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตสารพิษต่อเซลล์คือ *E. coli* O157: H7 และ *Camphylobacter* ได้ด้วย

การปรับปรุงการดูดซึมแคลเซียม ในการบริโภคพรีไบโอติกจะทำให้มีการดูดซึมแร่ธาตุได้มากขึ้น โดยเฉพาะแคลเซียม ถึงแม้ว่าลำไส้เล็กเป็นบริเวณหลักในการดูดซึมแคลเซียมในคน แต่ยังมีอีกจำนวนหนึ่งที่ถูกดูดซึมไปตลอดความยาวของลำไส้ Fairweather และ Johnson (1999) ได้ยืนยันว่าการดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มพรีไบโอติก ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสิ่งต่อไปนี้ คือ 1) การหมักของพรีไบโอติก เช่น อินนูลิน มีผลในการผลิตไขมันสายสั้น ซึ่งจะทำให้พีเอชลงลงภายในช่องว่างของลำไส้ เป็นไปได้ที่จะทำให้แคลเซียมละลายได้มากขึ้น 2) การเปลี่ยนแปลงกลไกการดูดซึมของแคลเซียมขึ้นในลำไส้ใหญ่ คือกรดไขมันสายสั้นเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ในรูปของประจุบวกและจากนั้นจะแยกตัวออกภายในลำไส้ โปรตอนที่อยู่ในรูปอิสระจะเข้าไปในช่องว่างภายในลำไส้เพื่อแลกเปลี่ยนแคลเซียมไอออน Greger (1999) ได้ศึกษาในสัตว์พบว่าพรีไบโอติกจะช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ และช่วยลดการสูญเสียเนื้อเยื่อกระดูก ในอีกการทดลองหนึ่ง เมื่อให้คนบริโภคอินนูลิน 40 กรัมต่อวัน นาน 28 วัน พบว่ามีการดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้น (Coudray และคณะ, 1997)

2.3 การปรับปรุงการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก

เนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีในผลิตภัณฑ์จะมีจำนวนลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติก ในการที่จะทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีชีวิตรอดอยู่ได้มากขึ้นนั้น ทำได้หลายวิธี คือ การเติมสารอาหารบางชนิดลงไปซึ่งมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การปรับตัวต่อสภาวะเครียดและการใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

2.3.1 การเติมสารอาหารบางชนิดลงไปเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

ในการเติมสารอาหารบางชนิดลงไปเพื่อเพิ่มการเจริญให้แบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งอาหารที่เติมลงไปเรียกว่า พรีไบโอติกดังที่กล่าวมาแล้ว หรืออาจเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า ซินไบโอติก (synbiotic) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีทั้งพรีไบโอติกและโพรไบโอติก จะเป็นการเติมสารอาหารลงไปเพื่อให้จุลินทรีย์สุขภาพในลำไส้ใหญ่มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ ทำให้สุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เป็นการป้องกันและรักษาโรคของระบบทางเดินอาหาร

Asahara และคณะ (2001) ศึกษาผลของซินไบโอติกในการป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* ในหนู โดยใช้ *Bifidobacterium breve* Yakult ร่วมกับกาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งหนูจะถูกให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาสเตรปโตมัยซินเพื่อขจัดจุลินทรีย์ในลำไส้คือ bifidobacteria lactobacilli และ enterobacteria ที่ไม่ทราบจำนวนออกไป จากนั้นให้ *B. breve* จำนวน 10^8 CFUต่อวันต่อหนู 1 ตัว หรือซินไบโอติกที่เตรียมไว้ ซึ่งได้เพิ่มกาแลคโต-โอลิกแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 2 – 50 มิลลิกรัมต่อวันต่อหนู 1 ตัว จะทำให้เกิดการเจริญของ *B. berve* ขึ้นใหม่อีกครั้งหนึ่งบริเวณทางเดินอาหาร พบว่าหนูที่ได้รับทั้งพรีไบโอติกและซินไบโอติกจะลดการหลั่งอุจจาระหลังจากได้รับเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

2.3.2 การปรับตัวต่อสภาวะเครียดของจุลินทรีย์ (Adaptation)

ในการผลิตอาหาร สภาวะแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีผลทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะเครียด เกิดการบาดเจ็บและตายได้ สภาวะดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากความร้อนจากแสง กรดจากการหมัก ความเค็มของน้ำทะเล ความแห้งแล้ง สิ่งต่างๆเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียเกิดสภาวะเครียด นอกจากนี้สภาวะเครียดอาจเกิดจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ การขาดแคลนอาหาร (สำหรับการเจริญและการรอดชีวิต) และอาจเกิดขึ้นในระหว่างเกิดกระบวนการผลิตอาหาร ได้แก่ 1) Physical treatment เช่น ความร้อน ความดัน แรงกระตุ้นไฟฟ้า (electric pulses) คลื่น ultrasonic แสง/รังสี และความดันออสโมติก (osmotic shock) 2) การเติมสารเคมี เช่น กรด เกลือ และตัวออกซิแดนซ์ และ 3) Biological stress เช่น การแข่งขัน เมแทบอไลท์ของจุลินทรีย์ และภาวะปฏิปักษ์ (antagonism) (Yousef และ Courtney, 2003)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดนี้ จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อการปรับตัวและอยู่รอดได้ดีขึ้นในสภาวะนี้ ในช่วงเวลาหลาย 10 ปีที่ผ่านมา มีนักวิจัยจำนวนมากที่ให้ความสนใจศึกษาถึงการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมหรือสภาวะเครียด การปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสภาวะเครียดที่ไม่รุนแรง ทำให้จุลินทรีย์ทนต่อปัจจัยที่เป็นอันตรายต่าง ๆ มากขึ้นและสามารถฟื้นคืนเป็นเซลล์ที่แข็งแรง (Yousef และ Courtney, 2003) ดังการรายงานของ Fay (1934) กล่าวว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะเครียดเนื่องจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) นั้นทนต่อความร้อนมากขึ้น Mackey และ Derrick (1987) ได้ทดลองให้ความร้อน (heat shock) กับเซลล์ของ *Salmonella enterica* serovar Thompson พบว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้มากขึ้น ส่วน Farber และ Brown (1990) ได้นำ *Listeria monocytogenes* ที่แยกจากไส้กรอกไปทำให้เกิดการปรับตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที ก่อนจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส พบว่า *Listeria monocytogenes* สามารถทนต่อความร้อนได้มากขึ้น นอกจากนี้ Leyer และ Johnson (1992) ได้ศึกษาผลของการปรับตัวต่อกรด (พีเอช 5.8) ของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ต่อการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในนมหมัก ซึ่งจากการทดลองพบว่าเซลล์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านการปรับตัวโดยใช้กรดจะมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว นอกจากนั้นการปรับตัวโดยใช้กรดยังช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ในเนยแข็ง

การปรับตัวต่อกรด(Acid adaptation)

- การปรับตัวแบบ acid shock ในช่วง exponential phase

เมื่อนำเซลล์ในช่วงกลางของ exponential phase ไปเลี้ยงในสภาวะเป็นกรดระดับหนึ่ง ระหว่างการบ่ม เซลล์จะเกิดการตอบสนองโดยเกิดการปรับตัวต่อกรด ซึ่งการปรับตัวนี้เป็นการตอบสนองแบบชั่วคราวภายในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นกระบวนการต่าง ๆ เช่น การปั่นเหวี่ยง และการล้างเซลล์ ควรทำอย่างรวดเร็วและภายใต้อุณหภูมิต่ำ เพื่อรักษาสภาพการปรับตัว เทคนิคนี้จะเห็นความแตกต่างได้อย่างรวดเร็วระหว่างเซลล์ที่ผ่านการปรับตัว โดยใช้กรดกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว อย่างไรก็ตามการปรับตัวด้วยกรดนี้ก็เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นชั่วคราวและถูกทำลายได้เร็วจนบางครั้งไม่สามารถวัดความแตกต่างได้ โดยเฉพาะในกรณีที่ทำอย่างผิดวิธี สำหรับการเจริญของเชื้อควรทำการตรวจสอบโดยเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการบ่มในระยะเวลาที่แตกต่างกันและสร้างกราฟการเจริญ ทำการประมาณจำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยอาศัยความสัมพันธ์ของจำนวนจุลินทรีย์กับค่าความขุ่นที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ก่อนทำการทดลอง โดยมีผู้ที่ประสบความสำเร็จในการนำสภาวะความเครียดจากกรดมาใช้ในการทำให้เกิดการปรับตัวทำให้จุลินทรีย์รอดชีวิตได้มากขึ้น ได้แก่ Foster และ Hall (1990); Leyer และ Johnson (1992); Lou และ Yousef (1997)

- การปรับตัวโดยปริมาณกรดเพิ่มขึ้นทีละน้อย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดเป็นผลพลอยได้ของเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อย ๆ ลดลง การที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นทีละน้อยทำให้เกิดการตอบสนอง โดยเกิดการทนต่อกรดในระยะ stationary phase (Buchanan และ Edelson, 1999) การที่กรดเพิ่มขึ้นทีละน้อยนั้นทำให้เซลล์เกิดการปรับตัว การปรับตัวต่อสภาวะที่มีอันตรายส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นใน stationary phase ดังนั้นการทนต่อกรดใน stationary phase นั้นสามารถเห็นได้ชัดเจนโดยการหมักของคาร์โบไฮเดรต สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวต่อกรดจะเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีการหมักของคาร์โบไฮเดรต และมีการสร้างพลังงาน โดยผ่านทางเลือกอื่น เซลล์ชนิดนี้จะไวต่อกรดหรือไวต่อการตอบสนองในสภาวะขาดอาหาร ในอาหารที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต การทำให้เซลล์เกิดการปรับตัวต่อกรดทีละน้อยทำได้โดยค่อยๆเติมกรดลงในอาหาร อีกทางเลือกหนึ่ง คือ chemostat อาจทำให้อาหารสำหรับการเจริญมีสภาวะกรด (ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเครียด) ทีละน้อย ซึ่งวิธีการสุดท้ายมักนิยมใช้มากที่สุดในการทดสอบจุลินทรีย์ที่ไม่ผลิตกรดระหว่างการเจริญ (Watson, 1990)

สำหรับการปรับตัวโดยใช้กรดนั้น มีการเลือกใช้ทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ ในการจะใช้กรดอินทรีย์สายสั้น ๆ กรดที่ใช้คือ กรดแลคติก กรดแอซีติก และเกลือของกรดแอซีติก (แอซีเตท และไดแอซีเตท) กรดแลคติกและแลคเตท กรดซิตริกและซิเตรท ซึ่งเป็นกรดที่นำไปใช้ประโยชน์ในอาหารหลายชนิด ใช้เป็นสารกันเสีย (ป้องกันจุลินทรีย์) และacidulants (Doores, 1993) โดยอาจใช้กรดเหล่านี้เติมลงไปโดยตรง หรือในกรณีของกรดแอซีติกและกรดแลคติกอาจใช้วิธีพ่นหรือจุ่มที่บริเวณผิวนอกของเนื้อสัตว์ (เช่น วัว หมู) และสัตว์ปีก (เช่น เป็ด ไก่) กรดอินทรีย์ (กรดอ่อน) ในรูปที่มีประจุบวก (พร้อมให้โปรตอน) สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (lipid bilayer) โดยกรดจะแตกตัวออกภายในเซลล์ เนื่องจากค่าความเป็นกรดภายในเซลล์ (pH_i) มีมากกว่าความเป็นกรดภายนอกเซลล์ (pH_o) จุลินทรีย์ทำการปรับค่าความเป็นกรดภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกลาง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิปิด โปรตอนที่สร้างขึ้นจากการแตกตัวออกจากกรดจะถูกผลักออกจากเซลล์โดยใช้พลังงาน ATP เมื่อความเป็นกรดภายนอกเซลล์ (pH_o) มากขึ้นจากการไหลของโปรตอน ซึ่งเมื่อเกิดการไหลจนถึงในระดับหนึ่ง (ค่าคงที่) จะทำให้การสร้างพลังงานของเซลล์หยุดลง (Bearson และคณะ, 1997) ความทนของจุลินทรีย์ต่อกรดอินทรีย์หรือค่าพีเอชที่ต่ำต้องตอบสนองต่อกลไกที่กล่าวมานี้

เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารบางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ โดยการเติมกรดอินทรีย์หรือกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก เชื้อจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงซึ่งอาจทนได้หลายระดับเนื่องจากเชื้อเกิดการปรับตัว มีนักวิจัยหลายท่านอธิบายกลไกความเครียดที่เกิดเนื่องจากกรดและการตอบสนองใน stationary phase ของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารจำนวนมาก อันได้แก่ Ress และคณะ (1995); Bearson และคณะ (1997); Abee และ Wouters (1999) และ Foster (1999)

- การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสภาพความเป็นกรด

จุลินทรีย์ในอาหารสามารถถูกทำลายได้ด้วยกรดอินทรีย์ กรดอนินทรีย์ รวมทั้งสภาวะกรดในกระเพาะอาหารของผู้บริโภค ซึ่งสภาพเหล่านี้ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการตอบสนองในทางที่จะทำให้เซลล์ทนต่อกรดได้ดีขึ้น (Acid Tolerance Response, ATR) โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ การเพิ่มอัตราการไหลออกของโปรตอน การเพิ่มแคแทบอลิซึมของกรดอะมิโน และการชักนำเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ โดยจากการศึกษาแบคทีเรียจำนวนมากพบว่า ATR เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดปานกลางเป็นระยะเวลาหนึ่ง เซลล์จะเกิดการตอบสนองโดยเกิดการชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะช่วยให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอดเมื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง โดย ATR นี้จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการที่ให้เซลล์เกิดการปรับตัว ATR นี้จะแตกต่างกันใน exponential phase และ stationary phase ซึ่งความแตกต่างนี้จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย สำหรับสัญญาณที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนนั้น อาจจะมาจากค่าความเป็นกรดภายนอกและภายในเซลล์ ค่าความเป็นกรดภายนอกนั้นจะมีโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นตัวรับสัญญาณ (Foster, 1999) ส่วนค่าความเป็นกรดภายในอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน (gene) โดยตรง หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเซลล์ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของยีน

ใน exponential phase การตอบสนองต่อกรดของ *Salmonella typhimurium* ถูกควบคุมโดยโปรตีนที่กระตุ้นให้สร้างขึ้นมาโดยสภาวะกรด โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อย รวมทั้งซิกมาแฟคเตอร์ (σ^s) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสัญญาณในระบบ PhoPQ , Fur (Foster, 1999, 2000) σ^s จะขึ้นอยู่กับ ATR gene ซึ่งแยกได้เป็นโปรตีนจำนวนมากที่ไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด และเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ไดมิวเทส ส่วนใหญ่การทำงานของ PhoPQ ไม่ทราบการทำงานที่แน่ชัด Adam และคณะ (2001) รายงานถึงการแสดงออกของโปรตีนแฟคเจลลิน (flagellin) ในแฟคเจลลา และการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ลดลงเนื่องจากระบบ PhoPQ ที่ถูกกระตุ้นโดยกรด มีหลายคนกล่าวว่าในกระบวนการรอดชีวิตที่ค่าพีเอชต่ำ flagellar repression จะมีค่าที่ตรงกันข้ามกับ ATP และช่วยจำกัดปริมาณการไหลเข้าของโปรตอนเข้าสู่ไซโตซอล (cytosol) การควบคุมการแสดงออก Fur ที่ควบคุมโดยกรดใน *Salmonella* นั้นไม่สามารถระบุชี้แจงได้ (Foster, 2000) แต่จะปรับการแสดงออกของเอนไซม์ยูเรียเอส (urease expression) ใน enterohemorrhagic *E. coli* ดังนั้นจึงอาจเกี่ยวข้องกับการทนกรดของเซลล์ (Heimer และคณะ, 2002) เอนไซม์ยูรีเอสจะย่อยยูเรียให้ได้เป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ผลจากการย่อยนั้นจะได้แอมโมเนียมไอออนซึ่งอาจเกิดการสะสม และเปลี่ยนเป็นค่าความเป็นกรดภายนอกและ/หรือภายใน

นอกจากนี้เอนไซม์ cyclopropane fatty acid (CFA) synthase กระตุ้นการสร้าง CFAs จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ใน *E. coli* ซึ่งพบการแสดงออกของยีน CFA synthase เมื่อเปลี่ยนค่าความเป็นกรดเป็นพีเอช 5.0 และการเพิ่มการแสดงออกของ cfa gene ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่พีเอช 3.0 (Chang และ Cronan, 1999)

แบคทีเรียแกรมบวกควบคุมค่าความเป็นกรดภายในโดยเอนไซม์ F_0F_1 ATPase ซึ่งสามารถเพิ่มการสังเคราะห์หรือกิจกรรมของ ATPase ได้โดยการลดพีเอช และเพิ่มการไหลออกของโปรตอนให้มากขึ้น (Foster, 2000) ใน *Lactobacillus acidophilus* สามารถเพิ่มเอนไซม์ F_0F_1 ATPase ได้ด้วยกรด (Kullen และ Klaenhammer, 1999) ในขณะที่ *Streptococcus* spp. หรือ *Enterococcus* spp. นั้นกิจกรรมของ ATPase ถูกควบคุมโดย subunit assembly stage (Foster, 2000) ไซโตพลาสมิดที่มีพีเอชต่ำๆ สามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ สำหรับ acid - inducible DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

repair enzyme สามารถแยกได้จาก *Streptococcus mutans* (Hahn และคณะ, 1999) การซ่อมแซมดีเอ็นเอใน *Salmonella* ที่เกิดสภาวะเครียดเนื่องจากกรด ถูกควบคุมโดย ada gene ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ (Foster, 2000)

การทำให้เกิดความคุ้นเคยในกรด อาจทำได้โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดปานกลาง (พีเอช 4.5 - 6.0) หลังจากนั้นนำไปบ่มต่อในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดสูง (พีเอช $\leq$ 2.5) (Buchanan และ Edelson, 1999; Rowbury, 1995) ATR คือ การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่พีเอช 2.5 - 4.0 หลังจากผ่านการปรับตัวที่ค่าความเป็นกรดปานกลาง (Buchanan และ Edelson, 1999) ATR แบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ stationary phase ATR และ exponential (log) phase ATR (Rowbury, 1995; Bearson และคณะ, 1997; Foster, 1999) stationary phase ATR เป็นผลมาจาก rpoS – regulated และค่าพีเอชชักนำให้เกิดการปรับตัวต่อกรด (Abee และ Wouters, 1999; Rowbury, 1995) rpoS ควบคุมการแสดงออกของยีนหลายยีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นจากกรดใน *E. coli* , *Salmonella* และ *Shigella* (Abee และ Wouters, 1999)

Log phase ATR ใน *Salmonella* มี 2 ระยะ คือ Pre-acid-shock และ Post-acid-shock ซึ่ง Pre-acid-shock เกี่ยวข้องกับพลังงาน ระบบ pH homeostasis ในเอนไซม์ amino acid decarboxylases ถูกชักนำโดยการที่โปรตอนภายในเซลล์ถูกใช้ ส่วน Post-acid-shock ถูกชักนำโดย rpoS และชักนำการสร้างโปรตีน ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะกรด (acid shock proteins) ซึ่งช่วยป้องกันและซ่อมแซม macromolecule ของเซลล์ (Bearson และคณะ, 1997) สำหรับตัวควบคุมตัวอื่น คือ PhoPQ (2 ส่วนประกอบของสัญญาณในระบบทรานสดักชั่น (transduction)) และ Fur (ferric uptake regulators) ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่เกิดขึ้น (acid shock proteins) ชนิดต่างๆ (Foster, 1999; Bearson และคณะ, 1997) Stationary phase ATR ของ *E. coli* ต่างจาก *Salmonella* และมี 3 ระบบ ในการชักนำให้เกิดการตอบสนองต่อกรด (Foster, 1999) Glutamate – dependent system ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส ในการทำให้โปรตอนเป็นกลาง ซึ่งระบบนี้เป็นระบบเด่น เป็นระบบที่มีความสำคัญในการบันทึก โดย Foster (1999) ได้รายงานถึงความต่างในการตอบสนองต่อกรด (ความทน) ของ *Salmonella* ในกรดอนินทรีย์และกรดอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น ระบบ PhoP มีผลทำให้ *Salmonella typhimurium* เกิดความทนต่อกรดอนินทรีย์ แต่ไม่ทนต่อกรดอินทรีย์ ดังนั้นการทนต่อกรดอาจอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกรดที่ใช้ (กรดอนินทรีย์และกรดอินทรีย์) ในการชักนำให้เกิดการทนต่อกรด

การปรับตัวและการทนต่อกรดมีผลทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น ซึ่งมีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร โดยที่กระบวนการต่างๆที่ใช้ในการผลิตอาหารมีหลายกระบวนการที่ทำให้เกิดการปรับตัว การทำให้อาหารหรือส่วนประกอบของอาหารเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำให้เกิดการ shock ของ microflora และกลายเป็นเซลล์ที่ทนต่อกรด ตัวอย่างเช่น การเติมกรดแลคติกเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสและคุณภาพของชีส (cheese curd) เนยจืด ไข่ขาว ไข่แดง เบียร์ โดขนมปัง (bread dough) โอลีฟ (olives) ของดอง เครื่องปรุงรส และอาหารเด็กทารกที่มีนมผงเป็นส่วนประกอบ (Shelef, 1994) นอกจากนี้ยังมีกรดอินทรีย์อีกหลายชนิดที่ใช้ในการปรุงคุณภาพรส สัมผัสและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารหลายชนิด (Doores, 1993) แต่ในอาหารหมักมีบางส่วนที่แตกต่าง แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะค่อยๆ ทำให้พีเอชของอาหารลดลง เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชโดยฉับพลันเหมือนการเติมกรดลงไปโดยตรง ในการใช้กรดอินทรีย์พ่นเพื่อฆ่าเชื้อเนื้อสัตว์อาจเป็นสาเหตุให้เกิด acid shock หรือการทนต่อกรดของ microflora ในเนื้อสัตว์ (Dickson, 1995)

มีการทดลองอีกมากที่ทำการศึกษาการปรับตัวในสภาวะกรด หรือการทนต่อกรดของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารหมักหรืออาหารที่มีการเติมกรดอินทรีย์ Leyer และคณะ (1995) พบว่า *E. coli* O157: H7 ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดที่พีเอช 5.0 มีอัตราการรอดชีวิตในอาหารที่เป็นกรด เช่น salami (ไส้กรอกเครื่องเทศ) และ apple cider (ไซเดอร์) มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวต่อกรด ในทำนองเดียวกันTsai และ Ingham (1997) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *E. coli* O157: H7 และ *Salmonella* serovars 3 สายพันธุ์ ในซอสมะเขือเทศมีมากขึ้น แต่ไม่ให้ผลทำนองเดียวกันใน mustard sweet relish Cheng และ Chou (2001) พบว่า ในขณะที่เซลล์ของ *E. coli* O157: H7 สายพันธุ์ ATCC 43889 และ ATCC 43895 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดที่พีเอช 5.0 สามารถทนกรดในน้ำมะม่วงและน้ำหน่อไม้ฝรั่งได้ แต่เซลล์ที่ปรับตัวด้วยกรดนี้สามารถอยู่รอดได้น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับตัวด้วยกรด เมื่ออยู่ในยาคูลท์และโยเกิร์ต นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ำ ความแตกต่างในการทนต่อกรดของเซลล์ที่ปรับตัวและไม่ปรับตัวด้วยกรดจะน้อย

ในการทดลองของ Gahan และคณะ (1996) พบว่า การปรับตัวโดยใช้กรดช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารที่มีความเป็นกรด เช่น โยเกิร์ต น้ำส้ม และน้ำสลัด ในทำนองเดียวกันสมมติฐานอีกข้อหนึ่งกล่าวว่าสภาวะของกระบวนการผลิตเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการปรับตัว เช่น การใช้กรดและเกลือในการผลิตไส้กรอกทำให้เกิดการปรับตัวด้วยกรดและแรงดันออสโมติกของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

การปรับตัวด้วยกรด (acid adaptation) ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก เช่น *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus* ในอาหารหมัก เช่น โยเกิร์ต แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารที่มีพีเอชต่ำอาจลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการเก็บรักษา จากการทดลองของ Shan (2000) พบว่าการปรับตัวโดยใช้กรดช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในนมหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmonella serovars Typhimurium, *S. enteritidis, S. heideberg* และ *S. javiana* ซึ่งผ่านการปรับตัวที่พีเอช 5.8 (ด้วยกรดไฮโดรคลอริก) มีความทนต่อสารป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์พวกกรดแลคติก กรดโพรพิโอนิค และกรดแอซีติกมากขึ้น (Leyer และ Johnson, 1992) นอกจากนี้ยังทำให้อัตราการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์นมหมักและชีสชนิดต่างๆ ได้แก่ เชดดาชีส สวิสชีส มอสซาเลลาชีส มีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว Gahan และคณะ (1996) แสดงถึง *L. monocytogenes* LO28 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดโดยบ่มที่พีเอช 5.5 (ใช้กรดแลคติกในการปรับ) 60 นาที มีปริมาณการรอดชีวิตในโยเกิร์ต คอตเตจชีส น้ำส้มและน้ำสลัดมากขึ้น แต่สำหรับอาหารที่มีพีเอชสูง เช่น เชดดาชีส (พีเอช 5.16) มอสซาเลลาชีส (พีเอช 5.6) ปริมาณการรอดชีวิตระหว่างเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวและไม่ได้ผ่านการปรับตัวจะต่างกันเล็กน้อยหรือไม่ต่างกันเลย Ravishankar และ Harrison (1999) พบว่าเมื่อนำ *L. monocytogenes* มาผ่านกระบวนการปรับต่อตัวกรดด้วยกรดแลคติกที่พีเอช 5.5 แล้วนำไปเลี้ยงที่หางนมที่มีความเป็นกรด (พีเอช 3.5 และ พีเอช 4.0) โดยเชื้อนี้จะเกิดการตอบสนองต่อกรด (ATR) แต่เมื่อนำไปทำให้เกิดการปรับตัวที่พีเอช 4.5 ปรากฏว่าไม่เกิดการปรับตัว ATR เพราะค่าพีเอช 4.5 นี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าพีเอชของหางนมเกินไป ซึ่งจากหลายๆ การทดลองที่ผ่านมาสรุปได้ว่าการชักนำให้เกิดการทนต่อกรดตามทฤษฎีนี้ ทำให้เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมีปริมาณการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นได้จริง

สำหรับจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในอาหารหมัก คือ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria : LAB) โดยเฉพาะในนมหมัก ซึ่งจะใช้ในการสร้างกลิ่นรสที่ต้องการและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Gilliland, 1985) ในระหว่างการหมัก LAB ต้องสามารถทนการสะสมสารพิษที่เกิดจากการเจริญของตัวมันเอง เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อีกทั้งต้องทนต่อสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งผลิตจากเชื้อชนิดอื่นที่อยู่ในอาหารนั้นๆ และต้องทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อที่ให้สามารถนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ นอกจากนี้ LAB ที่เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotic bacteria) นั้นยังต้องสามารถปรับตัวต่อสภาวะที่รุนแรง เช่น สภาวะกรดในกระเพาะอาหารในระหว่างการย่อย อุณหภูมิที่ต่ำในการแช่เยือกแข็งก่อนที่จะนำไปทำการเก็บรักษา ซึ่งในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมามีการให้ความสนใจในเรื่องการตอบสนองต่อความเครียดของ LAB เป็นอย่างมาก

จากความรู้ในเรื่องการทนต่อกรดและการปรับตัวของ LAB ทำให้คาดได้ว่า จุลินทรีย์ชนิดนี้จะมีการเพิ่มอัตราการอยู่รอดในส่วนของกระเพาะอาหารและลำไส้ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงความสามารถในการเจริญของเชื้อเริ่มต้น การเจริญของเชื้อพวกนี้จะเกิดควบคู่ไปกับการสะสมกรดแลคติก (ที่เชื้อสร้างขึ้นพร้อมกับการเจริญ) กรดแลคติกมีความสำคัญในการทำให้เกิดผลกระทบกับการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ (ที่พีเอชต่ำ) เพราะกรดอินทรีย์จะให้โปรตอนซึ่งสามารถผ่านเข้าออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยง่าย ที่บริเวณภายนอกเซลล์จะมีความเป็นกรด เนื่องมาจากกรดแก่ (กรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก) จะแตกตัวให้โปรตอน แต่จะไม่แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Kashket, 1987) โดยการที่พีเอชภายในของ *L. lactis* และ *S. bovis* จะลดลงได้มาก เมื่อพีเอชภายนอกต่ำจากการทำให้เกิดการปรับตัวด้วยกรดแลคติก ซึ่งค่าพีเอชจะลดลงได้ดีกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริก (Poolman และคณะ, 1987; Cook และ Russel, 1994)

การกระตุ้นกลไกเหล่านี้เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน เมื่อแบคทีเรียต้องอยู่ในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไป (ตรวจสอบอีกครั้งโดย Olson, 1993) การแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับการปรับตัว ซึ่งแสดงหลักฐานโดยการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดแยกได้โดยเจลอิเลคโตรโฟเลซิสแบบ 2 มิติ (two-dimensional gel electrophoresis) การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีน ซึ่งสังเกตได้ในระหว่างการปรับตัวในสภาวะกรดใน *E. coli* , *Salmonella typhimurium*, *Aeromonas hydrophila* และ *Listeria monocytogenes* เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวแสดงปริมาณการรอดชีวิตที่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการบ่รับตัว (Goodson และ Rowbury, 1989; Foster และ Hall, 1990; Davis และคณะ, 1996; O'Dricoll และคณะ, 1996) การชักนำให้เกิดการปรับตัวนี้จะอยู่ในรูป acid tolerance response (ATR; Foster และ Hall, 1990) และขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์โปรตีน (Foster, 1991; Raja และคณะ, 1991; Karem และคณะ, 1994; O'Hara และ Glenn, 1994; Davis และคณะ, 1996) ATR สามารถสังเกตได้ใน LAB หลายชนิด เช่น *Lc. mesenteroides* (McDonald และคณะ, 1990), *Lb. plantarum* (McDonald และคณะ, 1990), *S. mutans* (Belli และ Marquis, 1991), *Enterococcus hirae* (Belli และ Marquis, 1991) และ *L. lactis* (Hartke และคณะ, 1996; Rallu และคณะ, 1996; O'Sullivan และ Condon, 1997) ATR ที่แสดงออกใน *L. lactis* นั้นตอบสนองต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก รังสีอัลตราไวโอเลต นอกจากนั้นเซลล์ที่อยู่ในระยะพักจะเกิดการปรับตัวที่พีเอชต่ำได้ดีกว่าเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว ถึงแม้ว่า ATR จะเกิดได้ดีใน *L . lactis* แต่ยังมีข้อขัดแย้งในการสร้างโปรตีน โดยที่ *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 แสดงการปรับตัวด้วยกรดโดยการมีการสร้างคลอแรมฟีนิคอล (Hartke และคณะ, 1996) ในขณะที่ *L. lactis* subsp. cremoris MG1363 (Rallu และคณะ, 1996) และ *L. lactis* subsp. cremoris 712 (O'Sullivan และ Condon, 1997) ไม่มีการสร้างเกิดขึ้น ATR ใน *L. lactis* subsp. cremoris 712 เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความทนต่อความร้อน เอทานอล เกลือ (sodium chloride: NaCl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ก็มีขัดแย้งของความร้อนคือปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดอื่น ๆ ที่เป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการปรับตัวไม่สามารถชักนำให้เกิดการทนต่อกรดได้ (O'Sullivan และ Condon, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการจัดจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อกรด ได้มีการกล่าวถึง *L .lactis* ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ insertion ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดยใช้ pG+host9IS*S1* plasmid (Maguin และคณะ, 1996) สายพันธุ์กลาย 21 สายพันธุ์จากการเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และพีเอชต่ำ ซึ่งในสภาวะนี้ wild type *L. lactis* จะเจริญได้ไม่ดี (Rallu และคณะ, 2000) จากการทดลองพบว่าทุกสายพันธุ์ของสายพันธุ์กลายจะทนต่อกรด และมี 11 สายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะเครียดที่หลากหลาย การเกิด insertion นี้เกิดในยีนที่เกี่ยวข้องกับตัวขนส่งกลูตาเมท / กลูตามีน (glutamate / glutamine transporters) ตัวขนส่งฟอสเฟต (high-affinity phosphate transporters) และเมแทบอลิซึมของพิวรีน ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบว่ากลไกการตอบสนองต่อความเครียดกับวิถีในการเกิดเมแทบอลิซึมของเซลล์ใน *L. lactis* มีความสัมพันธ์กัน (Rallu และคณะ, 2000)

2.3.3 เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation techniques)

ไมโครเอนแคปซูเลชันเป็นกระบวนการเก็บรักษาเซลล์ไว้ภายในเยื่อหุ้มเพื่อลดการบาดเจ็บหรือการสูญหายของเซลล์ เทคนิคเอนแคปซูเลชันที่นำไปประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์นมหมักหรือการผลิตชีวมวล สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการทำให้เกิดเม็ดบีท (bead) ได้แก่ วิธีเอกทรูชัน (extrusion) และวิธีอิมัลชัน (emulsion) ทั้งเทคนิคเอกทรูชันและอิมัลชันสามารถเพิ่มการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ถึงร้อยละ 80 - 90 (Audet และคณะ, 1988; Rao และคณะ, 1989; Sheu และ Marshall, 1991)

2.3.3.1. <u>เทคนิคเอกทรูชัน (extrusion technique)</u>

เป็นเทคนิคที่เก่าแก่ และใช้บ่อยที่สุดในการทำแคปซูลที่เป็นไฮโดรคอลลอยด์ การเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์เตรียมได้โดยเติมจุลินทรีย์ลงไปในสารละลายคอลลอยด์ และฉีดเซลล์แขวนลอยนี้ผ่านเข็มฉีดยาในลักษณะที่หยดเป็นหยด แล้วปล่อยให้ตกลงอย่างอิสระในสารละลายที่ทำให้หยดเซลล์แข็งขึ้น (รูปที่ 2) ขนาดและรูปร่างของเม็ดบีทขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มและระยะทางในการตกตามลำดับ (ตารางที่ 3) วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก ราคาถูกและสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง ทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์สูง (King, 1995)

- สารละลายไฮโดรคอลลอยด์

สารละลายไฮโดรคอลลอยด์ของอัลจิเนต ซึ่งเป็นเฮทเทอโรโพลิแซคคาไรด์แบบเส้นตรง (Linear polysaccharide) ของกรดดีแมนนูโรนิก (D-mannoronic acid) และกรดแอล-กลูลูโรนิก (L-guluronic acid) ที่สกัดได้จากสาหร่ายหลายสายพันธุ์ ในการทำให้เกิดเม็ดบีท เซลล์แขวนลอยจะถูกผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต หยดส่วนผสมนี้ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยมัลติวาเลนต์แคทไอออน (multivalent cation, Ca^{2+}) หยดสารละลายจะเกิดเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นทรงกลมทันที (Smidrod และคณะ, 1972)

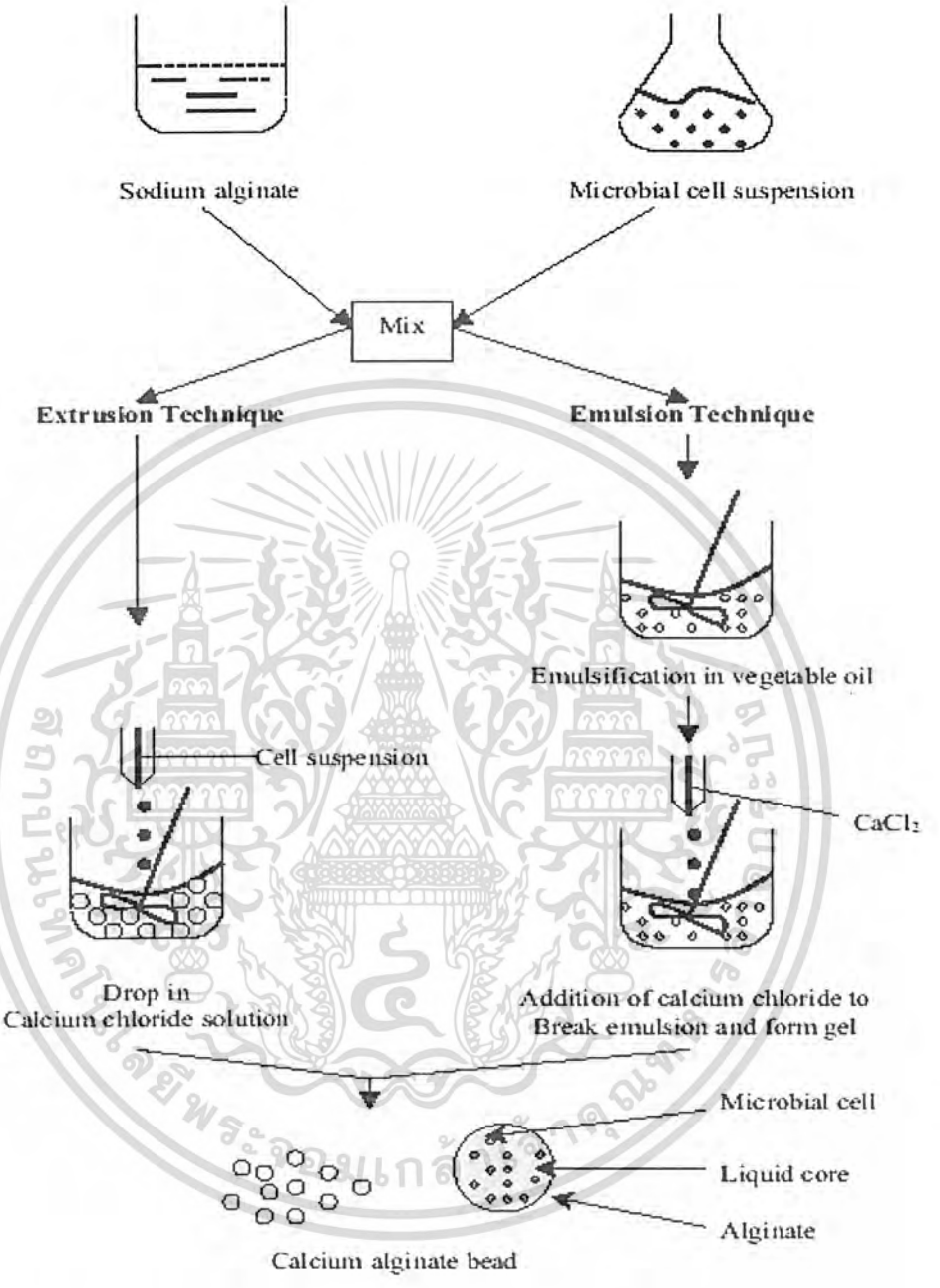
ได้มีผู้ทดลองใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ต่างกันในการทำให้เกิดเจล Jankowski และคณะ (1997) ได้ใช้สารละลายอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.6 เพื่อทำให้เกิดเจลกับแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ มีบางรายงานใช้ความเข้มข้นอัลจิเนตร้อยละ 1 – 2 และความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 – 1.5 โมลาร์ เม็ดบีทที่ได้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามขนาดและรูปทรงของเม็ดบีทขึ้นอยู่กับความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และระยะห่างระหว่างเข็มฉีดกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Smidarod และ Skjak-Braek, 1990) ขณะที่ความเข้มข้น และความหนืดของโซเดียมอัลจิเนตเพิ่มขึ้นขนาดของเม็ดบีทก็จะลดลงตามไปด้วย ส่วนประกอบของอัลจิเนตก็มีผลต่อขนาดของเม็ดบีท โดยเม็ดบีทขนาดเล็กเป็นผลมาจากอัลจิเนต ที่มีกลูลูโรนิกต่ำ (Martinsen และคณะ, 1989)

2.3.3.2 <u>เทคนิคอิมัลชัน (emulsion technique)</u>

เทคนิคนี้สารแขวนลอยของเซลล์กับพอลิเมอร์ (cell-polymer suspension) ที่มีจำนวนน้อย (เฟสไม่ต่อเนื่อง) จะถูกเติมลงไปในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมาก (เฟสต่อเนื่อง) น้ำมันพืชที่ใช้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด จากนั้นจะโฮโมจีไนส์ส่วนผสมนี้เพื่อที่จะทำให้เกิดอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) เมื่อใดก็ตามที่อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันเกิดขึ้น พอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้จะไม่ละลายเพื่อที่จะเกิดเป็นอนุภาคของเจลขนาดเล็กภายในน้ำมัน (รูปที่ 2) ถ้าขนาดของอนุภาคภายในของอิมัลชันยิ่งเล็กเท่าใดก็จะได้อนุภาคสุดท้ายของเม็ดบีทเล็กลงเท่านั้น การเลือกวิธีการทำให้ไม่ละลายขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุค้ำจุนที่ใช้ เม็ดบีทจะถูกเก็บเกี่ยวภายหลังด้วยวิธีกรอง ขนาดของเม็ดบีทอาจอยู่ระหว่าง 25 ไมครอน ถึง 2 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับความเร็วของการเขย่า เทคนิคนี้ได้ใช้อย่างประสบผลสำเร็จเพื่อห่อหุ้มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) สำหรับการหมัก (Lacroix และคณะ, 1990)

เทคนิคนี้ใช้น้ำมันพืชเป็นเฟสต่อเนื่องสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร บางรายงานใช้น้ำมันพาราฟิน (white light paraffin oil) (Rao และคณะ, 1989) และน้ำมันแร่ (mineral oil) (Groboillot และคณะ, 1993) ในบางกรณีมีการเติมอิมัลซิไฟเออร์ลงไปเพื่อทำให้เกิดอิมัลชันที่ดีขึ้น เพราะว่าอิมัลซิไฟเออร์จะไปลดแรงตึงผิวเป็นผลให้เม็ดอัลจิเนตมีขนาดเล็กลง (Adamson, 1982) อิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้บ่อยที่สุด คือ ทวีน 80 (tween 80) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (Sheu และ Marshall, 1993) Sheu และคณะ (1993) ใช้ทวีน 80 กับโซเดียมลอริลซัลเฟตในการผลิตเม็ดอัลจิเนตขนาด 25 – 35 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 การเอนแคปซูเลชันโดยใช้เทคนิคเอกทรูชันและเทคนิคอิมัลชัน

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

วัสดุค้ำจุนที่ใช้สำหรับเทคนิคนี้มีหลายชนิด ได้แก่ ส่วนผสมของแคปปาคาราจีแนน (k-carageenan) และโลคัสบีนกัม (locust bean gum) เซลลูโลสแอซีเตทพาทาเลต (cellulose acetate phthalate) อัลจิเนต ไคโตซาน และเจลาติน (Sheu และ Marshall,1991, 1993; Sheu และคณะ, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- คาราจีแนน (carageenan)

แคปปาคาราจีแนนเป็นพอลิแซคคาไรด์ธรรมชาติที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเล ปกติใช้เติมลงในอาหาร โดยต้องเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น (60 – 80 องศาเซลเซียส) เพื่อละลายคาราจีแนนที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 5 การเกิดเป็นเจลคาราจีแนนจะถูกเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ เซลล์ที่ข้น (cell slurry) จะถูกเติมลงไปในสารละลายคาราจีแนนที่มีอุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแล้ว จากนั้นทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จะเกิดเจลและเม็ดบีทขึ้น เติมโพแทสเซียมไอออน (ในรูปของโพแทสเซียมคลอไรด์) ลงไปเพื่อทำให้เจลคงตัวและป้องกันการบวม หรือเพื่อเหนี่ยวนำการเกิดเจล การใช้โลคัสบีนกัมในอัตราส่วนของคาราจีแนนต่อโลคัสบีนกัมเป็น 2 ต่อ 1 จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลโดยผ่านปฏิกิริยาจำเพาะของสายกาแลคโตแมนแนนกับคาราจีแนน (Takata และคณะ, 1997)

- เซลลูโลสแอซีเตทพาทาเลต (cellulose acetate phthalate ,CAP)

พอลิเมอร์ชนิดนี้มีหมู่พาทาเลตที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ทำให้ไม่ละลายในอาหารที่เป็นกรดที่พีเอชเท่ากับ 5 หรือต่ำกว่า แต่สามารถละลายได้เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นถึง 6 หรือสูงกว่า (Malm และคณะ, 1951) นอกจากนี้ CAP จะมีโครงสร้างที่เฉื่อยเมื่อนำมาใช้ในร่างกาย ดังนั้นจึงได้มีการใช้อย่างกว้างขวางเป็นวัสดุเคลือบภายในสำหรับยาและสารทางด้านเภสัชอื่นๆ ที่ใช้ในลำไส้

- ไคโตซาน (chitosan)

เป็นพอลิแซคคาไรด์เส้นตรงที่มีประจุบวก เกิดโดยการดึงหมู่แอซีติลออกจากไคตินที่สกัดได้จากเปลือกแข็งของสัตว์ สามารถละลายน้ำได้ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6 และเหมือนกับอัลจิเนตซึ่งจะเกิดเป็นเจลโดยการแลกเปลี่ยนไอออน ไคโตซานให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกหลายชนิด เพื่อที่จะขจัดปัญหานี้ Zhou และคณะ (1998) ได้ใช้พอลิเมอร์นี้สำหรับเซลล์ที่ผ่านการห่อหุ้มแล้วเพื่อเคลือบเม็ดอัลจิเนตโดยการแช่เม็ดบีทในสารละลายไคโตซาน (ความเข้มข้นร้อยละ 4) พร้อมกับเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 40 นาที

- เจลาติน (gelatin)

เจลาตินเป็นโปรตีนที่มีประโยชน์คือเป็นตัวที่ทำให้เกิดเจลที่สามารถเปลี่ยนกลับได้สำหรับการทำเอนแคปซูเลชัน เพราะว่ามีคุณสมบัติที่เป็นได้ทั้งกรดและด่าง และยังเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการร่วมกันกับพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นแอนไอออนเหมือนเจลแลนกัม (gellan gum) ไฮโดรคอลลอยด์เหล่านี้สามารถละลายผสมกันได้ดีที่พีเอชมากกว่า 6 เพราะว่าประจุของทั้งสองจะเป็นลบและจะผลักกับอีกตัวหนึ่ง อย่างไรก็ตามเมื่อค่าพีเอชถูกปรับให้ต่ำกว่าค่าไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ของเจลาติน ประจุของรวมของเจลาตินจะกลายเป็นบวก ทำให้เกิดปฏิกิริยากับเจลแลนกัมที่มีประจุลบ (King, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อัลจิเนต (alginate)

ในเทคนิคอิมัลชัน จะเติมอัลจิเนตลงไปก่อนการทำให้เป็นอิมัลชัน การเติมกรดที่สามารถละลายได้ในน้ำมัน เช่น กรดแอซีติก จะลดค่าพีเอชของอัลจิเนตจาก 7.5 ไปเป็น 6.5 โดยประมาณ และเริ่มการเกิดเป็นเจลกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เม็ดบีทที่ได้จะถูกแยกออกมาใส่ลงในน้ำ และล้างเพื่อเอาน้ำมันที่ติดอยู่ออกไป

2.3.3.3 <u>การแก้ปัญหาความไม่เสถียรของอัลจิเนต</u>

การตรึงโดยใช้อัลจิเนตมีข้อจำกัดบางประการ เพราะอัลจิเนตจะมีความเสถียรต่ำในสภาวะที่มีสารคีเลทติง (chelating agent) เช่น ฟอสเฟต แลคเตทและซิเตรท สารคีเลทติงจะใช้ อิเลกตรอนร่วมกับแคลเซียม และทำให้เจลไม่เสถียร (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990) ดังนั้นจึงเกิดปัญหาเรื่องความเสถียรระหว่างการหมักกรดแลคติค และเป็นสาเหตุให้เซลล์หลุดออกจากเม็ดบีท ในกรณีของวัสดุตรึงชนิดอื่นๆ เช่น ไคโตซาน เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่สามารถหลุดออกจากเม็ดบีทในระหว่างการหมักได้ซึ่งเป็นเหตุให้เซลล์เริ่มต้นในการหมักครั้งต่อไปต่ำ ซึ่งอาจใช้ทรีทเมนต์พิเศษช่วยปรับปรุงความเสถียรของเม็ดบีทได้ ดังนี้

- การเชื่อมไขว้ด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นไอออนบวก (cross-linking with cationic polymers)

การเชื่อมไขว้ด้วยพอลิเมอร์ที่เป็นไอออนบวก เช่น พอลิเอทธิลลีนอิมมีนและพอลิโพรพิลีนอิมมีน หรือ พอลิเอทธิลลีนอิมมีนและกลูตารัลดีไฮด์ จะช่วยทำให้เม็ดอัลจิเนตเสถียรมากขึ้น (Marx, 1989) การสร้างเยื่อหุ้มรอบเม็ดบีทและการพ่นเม็ดบีทด้วยกลูตารัลดีไฮด์เป็นเทคนิคที่ทำให้เม็ดบีทเสถียร โดยจะป้องกันเซลล์ที่มีขนาดเล็กหลุดออกมา (Kolot, 1988) Groboillot และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มที่สร้างจากไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 4 เชื่อมไขว้กับเฮกซะเมทธิลลีนไดไอโซไซยาเนตหรือกลูตารัลดีไฮด์ทำให้ได้เม็ดบีทที่มีความแข็งแรงขึ้น ปฏิกิริยาของสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (bifunctional reagent) กับไคโตซานเป็นผลให้เกิดการสร้างสะพานเชื่อมกับโมเลกุลของไคโตซาน ความยาวของสะพานเชื่อมจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารเชื่อมไขว้ Hyndman และคณะ (1993) ทำการทดลองได้ผลเช่นเดียวกัน โดยใช้โทลูอีนไดไอโซไซยาเนตเชื่อมไขว้กับเจลาติน เม็ดบีทจะสามารถทนการถูกทำลายได้ที่ความเข้มข้นสูง

- การเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดอื่น (coating with other polymers)

Overgaard และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิตอัลจิเนตที่เคลือบด้วยไคโตซาน โดยการหยดสารละลายอัลจิเนตลงในสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และไคโตซาน Mcknight และคณะ (1988) รายงานถึงการเคลือบเม็ดอัลจิเนตด้วยไคโตซานขณะที่ Zhou และคณะ (1998) พบว่าเม็ดอัลจิเนตที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะเกิดการสร้างเป็นเยื่อหุ้มขึ้นซึ่งลดการหลุดออกของเซลล์ถึงร้อยละ 40 ไคโตซานเป็นพอลิเอมีนที่มีประจุบวกโดยจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างเป็นเยื่อเลือกผ่านรอบพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ เช่น อัลจิเนต เยื่อหุ้มนี้จะไม่ละลายในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนหรือสารต้านการเกิดเจล (antigelling agent) ดังนั้นจึงช่วยเพิ่มความเสถียรของเม็ดเจล (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990) เป็นปราการป้องกันการหลุดออกของเซลล์

Tanaka และคณะ (1989) ได้รายงานการเคลือบเม็ดเจลด้วยอัลจิเนต มากกว่านั้นการเคลือบเม็ดบีทด้วยกรดโพลิอะมิโน เช่น พอลิแอลไลซีน (poly-L-lysine) ก็ได้รับความสนใจเนื่องจากความเหมาะสมทางด้านชีวภาพที่ดีกว่า และศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตโยเกิร์ต Champagne และคณะ (1992a) แสดงให้เห็นว่าเม็ดบีทที่เคลือบด้วยพอลิแอลไลซีนเพียงชั้นเดียว ไม่สามารถลดการหลุดออกของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่การเคลือบด้วยพอลิแอลไลซีน 2 ชั้นและอัลจิเนตจะช่วยลดการหลุดออกของเซลล์ได้ถึงร้อยละ 50 โดยประมาณ

- การผสมด้วยแป้ง (Mixing with starch)

เม็ดบีทที่มีทั้งอัลจิเนตและแป้งจะให้คุณสมบัติในการตรึง *Lactobacillus acidophilus* โดยที่เซลล์ยังสามารถอยู่รอดได้และยังคงมีคุณสมบัติในการหมักอยู่ เยื่อหุ้มเม็ดบีทยอมให้สารอาหารและสารเมแทบอไลท์ผ่านได้เพื่อที่เซลล์จะสามารถเจริญเติบโตได้

- การเติมสารร่วมบางตัว (Incorporation of addditives)

การผสมสารไครโอโพรเทคแทนต์ (cryoprotectants) เช่น กลีเซอรอล ทำให้การอยู่รอดของเซลล์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันหลังจากผ่านการแช่เยือกแข็ง (lyophilisation) และการดึงน้ำออก (rehydration) เพิ่มมากขึ้นเพราะว่าสารเหล่านี้จะไปช่วยป้องกันเซลล์ (Kearney และคณะ, 1990) การอยู่รอดของ bifidobacteria เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญถึงร้อยละ 88.5 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ถึงร้อยละ 90 (Sheu และคณะ, 1993) เพราะว่าสารที่เติมลงไปเหล่านี้ช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยการสร้างพันธะกับน้ำ เม็ดบีทที่มีกลีเซอรอลยังมีขนาดลดลงถึงร้อยละ 43 เนื่องจากความเข้มข้นของอัลจิเนตต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของเม็ดบีทที่มีกลีเซอรอลที่ไปสร้างพันธะกับน้ำนั้นสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเอนแคปซูเลชันแบคทีเรียแลคติกโดยเทคนิคเอกทรูชัน

แบคทีเรีย	วัสดุค้ำจุน	ความเข้มข้นอัลจิเนต(%)	ความเข้มข้น $CaCl_2$	ทรีทเมนต์พิเศษ	เส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดบีท(mm)	ประยุกต์ใช้
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* *Streptococcus thermophilus*	อัลจิเนต	1.875	1.5	ไม่มี	2.5	โยเกิร์ต
Str. lactis ssp. *diacetylactis* *Str. cremoris*	อัลจิเนต	1.875	1.5	ไม่มี	2.6	ชีส
Str. cremoris	อัลจิเนต	1	0.1	ไม่มี	-	ป้องกันฟาจ
Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus* *Str. thermophilus*	อัลจิเนต	1.875	1	ไม่มี	2.5	โยเกิร์ต
Lb. plantarum	อัลจิเนต	2	0.1	เติมกลีเซอรอล	2	ผลิตชีวมวล
Lactococcus lactis ssp. *cremoris*	อัลจิเนต	2	0.05	เคลือบไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ	2	ผลิตชีวมวล
Lc. lactis ssp.*lactis* bv. *Diacetylactis*	อัลจิเนต	1.5	0.2	เคลือบอัลจิเนต	-	ครีม
Lc. lactis ssp. *cremoris*	อัลจิเนต	2	0.1	ไม่มี	-	ผลิตชีวมวล
Str. thermophilus	อัลจิเนต	2	0.1	ไม่มี	-	ผลิตชีวมวล

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การเอนแคปซูเลชันแบคทีเรียแลคติกโดยใช้เทคนิคอิมัลชัน

แบคทีเรีย	วัสดุค้ำจุน	เฟสต่อเนื่อง	ทรีทเมนต์พิเศษ	เส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดบีท	ประยุกต์ใช้
Streptococcus thermophilus *lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*	3%K-คารา-จีแนนและโลคัสบีนกัม (2:1)	น้ำมันถั่วเหลือง	ไม่มี	0.5-2 mm	โยเกิร์ต
Lc.lactis ssp. *cremoris*	ไคโตซาน(4%)	น้ำมันแร่	เชื่อมไขว้กับกลูตัลดีไฮด์	150 μm	ผลิตชีวมวล
Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus*	3.6%อัลจิเนต	น้ำมันพืช +0.2%ทวีน 80	6%กลีเซอรอลหรือเติมแมนนิทอล	30 μm	frozen dessert
Lb. delbrueckii ssp. *bulgaricus*	3%อัลจิเนต	น้ำมันพืช +0.2% ทวีน 80	เติม0.5% โซเดียมลอริลซัลเฟต	25-35 μm	ไอศกรีมแช่แข็ง

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.4 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคเอกทรูชันและอิมัลชัน

ได้มีการนำทั้งสองเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการทำเอนแคปซูเลชันแบคทีเรียโพรไบโอติก เทคนิคเอกทรูชันเป็นเทคนิคที่ทำได้ค่อนข้างง่าย แต่จะทำการขยายสเกลการผลิตได้ยากเพราะเม็ดบีทฟอร์มตัวได้ช้าเมื่อเทียบกับเทคนิคอิมัลชัน ในทางกลับกันเทคนิคอิมัลชันค่อนข้างจะเป็นเทคนิคที่ใหม่ในอุตสาหกรรมอาหารและสามารถขยายสเกลการผลิตได้ง่าย ขนาดเม็ดบีทที่ได้จากเทคนิคอิมัลชัน (2 - 5 มิลลิเมตร) จะมีขนาดเล็กกว่าเม็ดบีทที่ได้จากเทคนิคเอกทรูชัน (25 ไมครอน – 2 มิลลิเมตร) ซึ่งขนาดเม็ดบีทที่ได้จากเทคนิคเอกทรูชันจะขึ้นอยู่กับขนาดของที่ใช้ฉีดอัลจิเนต ขณะที่ในเทคนิคอิมัลชันขนาดเม็ดบีทจะขึ้นอยู่กับความเร็วของการเขย่าและชนิดอิมัลซิไฟเออร์ เนื่องจากเทคนิคอิมัลชันต้องใช้น้ำมันพืชด้วยจึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงกว่าเทคนิคเอกทรูชัน

ตารางที่ 5 ข้อดีข้อเสียของเทคนิคเอกทรูชันและเทคนิคอิมัลชัน

	เอกทรูชัน	อิมัลชัน
ความเป็นไปได้ด้านเทคนิค	ขยายสเกลการผลิตยาก	ขยายสเกลการผลิตง่าย
ราคา	ต่ำ	สูง
การอยู่รอดของแบคทีเรีย	ร้อยละ 80 – 95	ร้อยละ 80 - 95
ขนาดเม็ดบีท	2 – 5 มิลลิเมตร	25 ไมครอน – 2 มิลลิเมตร

ที่มา: Krasaekoopt และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 , *Lactobacillus jensennii* TISTR 1342 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Lactobacillus casei* BCC 4308, *Lactobacillus fermentum* BCC 4398 ได้มาจาก BIOTECH Culture Collection ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ , *Bifidobacterium lactis* Bb-12 ได้มาจาก The East Asiatic (Thailand) Public company limited.

3.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ น้ำมันพืช น้ำมะนาว ไข่ไก่ น้ำส้มสายชู น้ำตาลมัสตาร์ด นมข้นหวาน เกลือ และ Hi-maize resistant starch ได้มาจาก National Starch and Chemical (Thailand) Ltd.

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ deMan Rogosa Sharpe Medium (MRS) พีเอช 6.5 ± 0.2 ได้มาจาก Difco Laboratories

3.1.4 สารละลายที่ใช้ทำการเจือจาง ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 (ภาคผนวก ข)

3.1.5 สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 กรดซิตริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ กรดแอซีติก ความเข้มข้น 8.3 โมลาร์ โซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์

3.1.6 เครื่องมือ ได้แก่ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องปั่นเหวี่ยง ตู้บ่มเชื้อ เครื่องตีป่น ตู้ปลอดเชื้อ ตู้อบลมร้อน เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องชั่งชนิดละเอียด และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.1.7 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ที่จำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เป็นกรดด้วยกรดแอซีติก กรดซิตริก และกรดแลคติก

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรด

เขี่ยเชื้อ *L. acidophilus*, *B. lactis* และ *L. casei* แต่ละชนิดจากอาหารแข็ง MRS 1 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีแล้วเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยในการล้างแต่ละครั้ง ปิเปตสารละลายเปปโตนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป หลังจากล้างเซลล์ทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดมาทำการปรับความขุ่นให้เท่ากันโดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้เซลล์แต่ละชนิดที่ไม่ปรับตัวด้วยกรด

3.2.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรด

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดจนกระทั่งได้สารแขวนลอยของเชื้อที่มีความขุ่นเท่ากันด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดแลคติก (ชนิดละ 1 หลอด) นำหลอดอาหารเหลว MRS ทั้ง 3 หลอดที่ใส่เชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ปรับให้มีพีเอชให้เท่ากับ 5.5 จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดมาปรับความขุ่นให้เท่ากันด้วย McFarland Standard เบอร์ 3

3.2.1.3 การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรด และผ่านการปรับตัวด้วยกรดในอาหารเหลวที่ปรับพีเอชด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก

ปิเปตเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรด และเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ไม่มีกลูโคสเป็นส่วนประกอบ (ชนิดละ 1 หลอด) ซึ่งปรับให้มีพีเอชเป็น 4.5 ด้วย กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก นำหลอดอาหาร MRS ที่ใส่เชื้อแล้วทั้ง 18 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหาร MRS ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 และคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดที่การปรับตัวด้วยกรดมีผลในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งเสริมการอยู่รอดได้ดีในสภาวะกรด 2 ชนิดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.2 การศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เหมาะสม 2 ชนิดที่คัดเลือกได้มาใช้ในการทดลองขั้นนี้ โดยแบ่งเป็น 4 ทรีตเมนต์ย่อยสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

ทำการเตรียมเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 (ปรับความขุ่นโดยเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 5) จากนั้นนำมาผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชันดังนี้

วิธีการปรับปรุงการอยู่รอดด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

เติมสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดที่ปรับความขุ่นให้เท่ากันแล้วลงในสารละลายที่ประกอบด้วยอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ผสมรวมกับแป้ง Hi-maize resistant starch ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยเติมเซลล์ลงไปให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 10 คนสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเทน้ำมันที่มี ทวีน 80 อยู่ร้อยละ 0.02 ลงไป คนอย่างรวดเร็วจนอัลจิเนตกระจายเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่ในน้ำมันจากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไป แล้วคนตลอดเวลาจนเกิดเป็นเม็ดแข็งๆ สีขาวขนาดเล็กของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ จากนั้นทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เม็ดเซลล์ดังกล่าวตกลงมาด้านล่าง และชั้นของน้ำมันลอยอยู่ด้านบน เทชั้นที่เป็นน้ำมันทิ้ง ทำการเก็บเม็ดของเซลล์ที่ได้โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็วรอบ 350 x g นาน 15 นาที ล้างเม็ดของเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Sheu และ Marshall, 1993)

ทรีตเมนต์ที่ 2 เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

ทำการเตรียมเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2 (ปรับความขุ่นโดยเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 5) หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันด้วยวิธีการเช่นเดียวกับทรีตเมนต์ที่ 3

ทรีตเมนต์ที่ 3 เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

ทำการเตรียมเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 (ปรับความขุ่นโดยเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีตเมนต์ที่ 4 เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

ทำการเตรียมเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1.2 (ปรับความขุ่นโดยเทียบกับ McFarland Standard เบอร์ 5)

3.2.2.2 การอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ทำการเตรียมน้ำสลัดซึ่งประกอบด้วย ไข่แดงร้อยละ 9.25 เกลือร้อยละ 0.46 น้ำตาลทรายร้อยละ 1.39 มัสตาร์ดร้อยละ 0.93 น้ำมะนาวร้อยละ 6.02 น้ำส้มสายชูร้อยละ 2.78 นมข้นร้อยละ 41.67 และ น้ำมันพืชร้อยละ 37.50 โดยตีไข่แดงกับเกลือ น้ำตาล มัสตาร์ดให้ขึ้นฟู และเติมน้ำมันพืชสลับกับน้ำส้มสายชู น้ำมะนาวและนมข้นหวานตีจนเข้ากัน เมื่อได้น้ำสลัดแล้วแบ่งเป็น 8 ส่วนเท่าๆ กันในภาชนะที่เตรียมไว้ จากนั้นนำน้ำสลัดแต่ละส่วนมาเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวขั้นต้น โดยน้ำสลัดส่วนที่ 1) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (NN_1) ส่วนที่ 2) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (AN_1) ส่วนที่ 3) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (NE_1) ส่วนที่ 4) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 1 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (AE_1) ส่วนที่ 5) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 2 ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (NN_2) ส่วนที่ 6) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 2 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (AN_2) ส่วนที่ 7) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 2 ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (NE_2) ส่วนที่ 8) เติมแบคทีเรียชนิดที่ 2 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน (AE_2) นำน้ำสลัดทั้ง 8 ส่วนไปเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน โดยสุ่มตัวอย่างมาวัดค่าพีเอชและตรวจนับจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตในสัปดาห์ที่ 0, 1, 2 และ 4 โดยจะต้องทำการละลายเม็ดอัลจิเนตที่ห่อหุ้มเซลล์ให้แตกออกเสียก่อนด้วยวิธีการดังนี้

นำน้ำสลัด 5 กรัมลงในถุงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องตีป่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจนับจำนวนเซลล์โดยวิธี pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันนั้นให้ตักน้ำสลัดในปริมาณเท่ากัน แต่เปลี่ยนจากฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Sheu และคณะ, 1993) โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน

เตรียมน้ำสลัดด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 3.2.2.2 แบ่งน้ำสลัดที่ได้เป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้เป็นชุดควบคุมโดยไม่มีการเติมเชื้อ (control) ส่วนที่ 2 จะทำการเติมเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน ซึ่งได้จากการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.2.2.2 ที่เชื้อมีอัตราการอยู่รอดในน้ำสลัดได้ดีที่สุด ซึ่งทดสอบด้วย nine point hedonic scale โดยใช้ผู้ประเมิน 20 คน ผู้ทดสอบชิมจะได้รับตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง คือน้ำสลัดชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ และน้ำสลัดที่มีการเติมเชื้อ *L. casei* ที่ได้ผ่านการปรับตัวด้วยกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน ซึ่งผู้ทดสอบชิมแต่ละคนจะต้องตอบแบบสอบถามที่ให้ผู้ทดสอบชิมให้คะแนน ซึ่งจะทำการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ในด้าน ลักษณะปรากฏ สี ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น ความเปรี้ยว ความหวาน ความชอบรวม มีระดับการให้คะแนนดังนี้ คะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด 8 ชอบมาก 7 ชอบปานกลาง 6 ชอบเล็กน้อย 5 บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ 4 ไม่ชอบเล็กน้อย 3 ไม่ชอบปานกลาง 2 ไม่ชอบมาก และ 1 ไม่ชอบมากที่สุด ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสทั้งหมด 2 ซ้ำ

3.2.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2.1.3 และ 3.2.2.2 มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of Variance และ Duncan Multiple Range test สำหรับผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ t-test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการปรับตัวในสภาวะกรดต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เป็นกรดด้วย กรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก

จากการศึกษาการเจริญของ *B. lactis* ในอาหารที่ปรับพีเอชให้ได้ 4.5 ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก (รูปที่ 3) พบว่า เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวและเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดซึ่งเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก (รูปที่ 3(ก)) และกรดแลคติก (รูปที่ 3(ข)) มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ 10^6-10^7 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นจำนวนเซลล์ในอาหารที่มีกรดทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนใกล้เคียงกันซึ่งค่อนข้างคงที่หลังบ่มนาน 3 วัน จากนั้น ในอาหารที่มีกรดซิตริกจำนวนเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจะมีแนวโน้มคงที่ต่อไปจนถึงวันที่ 5 คือมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อบ่มครบ 7 วัน เซลล์ที่ปรับตัวต่อกรดมีจำนวนลดลง แต่เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น สำหรับในอาหารที่มีกรดแลคติก เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวและไม่ปรับตัวมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ที่ไม่ต่างกันมากนัก (รูปที่ 3(ข)) จนถึงในวันที่ 7 เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวนั้นมีจำนวนเซลล์มากกว่าเซลล์ที่ปรับตัวประมาณ 1.5 log cycle ส่วนการเจริญของ *B. lactis* ในอาหารที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดแอซีติก (รูปที่ 3(ค)) พบว่า มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1.0×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวมีการเจริญเพิ่มขึ้นเป็น 6.1×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการบ่ม ขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว จำนวนลดลงเหลือ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อบ่มจนครบ 7 วันทั้งเซลล์ที่ปรับตัวและไม่ปรับตัวด้วยกรดมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วจนตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต

การเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหารที่ปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ด้วยกรดซิตริก (รูปที่ 4(ก)) และกรดแลคติก (รูปที่ 4(ข)) จะมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ซึ่งในวันที่ 0 จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6-10^7 CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าจำนวนเซลล์ทั้งที่ปรับและไม่ปรับตัวในวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 มีจำนวนใกล้เคียงกันและเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเริ่มต้น จากนั้นเมื่อบ่มต่อจนครบ 7 วันพบว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวในอาหารเหลวที่มีกรดซิตริกและกรดแลคติกมีปริมาณลดลง (เหลือ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร) มากกว่าเซลล์ที่ผ่านการปรับตัว สำหรับเชื้อที่บ่มในอาหารที่ปรับให้มีพีเอช 4.5 ด้วยกรดแอซีติกนั้น (รูป 4(ค)) มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6-10^7 CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นจำนวนเซลล์ได้ลดลงเรื่อยๆ จนถึง 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร หลังบ่มนาน 5 วัน และตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เมื่อบ่มจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครบ 7 วัน จากผลการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS ที่มีกรดทั้ง 3 ชนิด พบว่า กรดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดนี้มากที่สุดคือ กรดแอซีติก รองลงมาคือกรดแลคติกและกรดซิตริก ตามลำดับ และเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวจะมีอัตราการอยู่รอดมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว

สำหรับการเจริญของเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวและไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับพีเอชให้เป็น 4.5 ด้วยกรดซิตริก (รูปที่ 5(ก)) เซลล์เริ่มต้นของเชื้อทั้งสองชนิดมีจำนวนที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย โดยเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวจะมีการเจริญได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว คือ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวจะมีการเพิ่มจำนวนจาก 7.5×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 8.6×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร และในเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัวจะมีการเพิ่มจำนวนจาก 5.8×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 7.3×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ในทำนองเดียวกันการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับพีเอชให้ได้ 4.5 ด้วยกรดแลคติก (รูปที่ 5(ข)) และกรดแอซีติก (รูปที่ 5(ค)) จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ของปริมาณเชื้อที่ผ่านการปรับตัวและไม่ผ่านการปรับตัว (ของทั้ง 3 สายพันธุ์) ในอาหารที่มีกรดทั้ง 3 ชนิด จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ชนิดของกรดอินทรีย์มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด โดยกรดชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด คือ กรดซิตริก ตามด้วยกรดแลคติก ส่วนที่เป็นพิษหรือมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มากที่สุดคือ กรดแอซีติก และเมื่อพิจารณาชนิดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ทดลอง พบว่า *L. casei* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการปรับพีเอชด้วยกรดทั้งสามชนิดนี้ ขณะที่เชื้อ *B. lactis* และ *L. acidophilus* ลดจำนวนลงโดย *B. lactis* อยู่รอดได้ดีกว่า *L. acidophilus* ดังนั้นจึงได้นำเชื้อ *L. casei* และ *B. lactis* มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

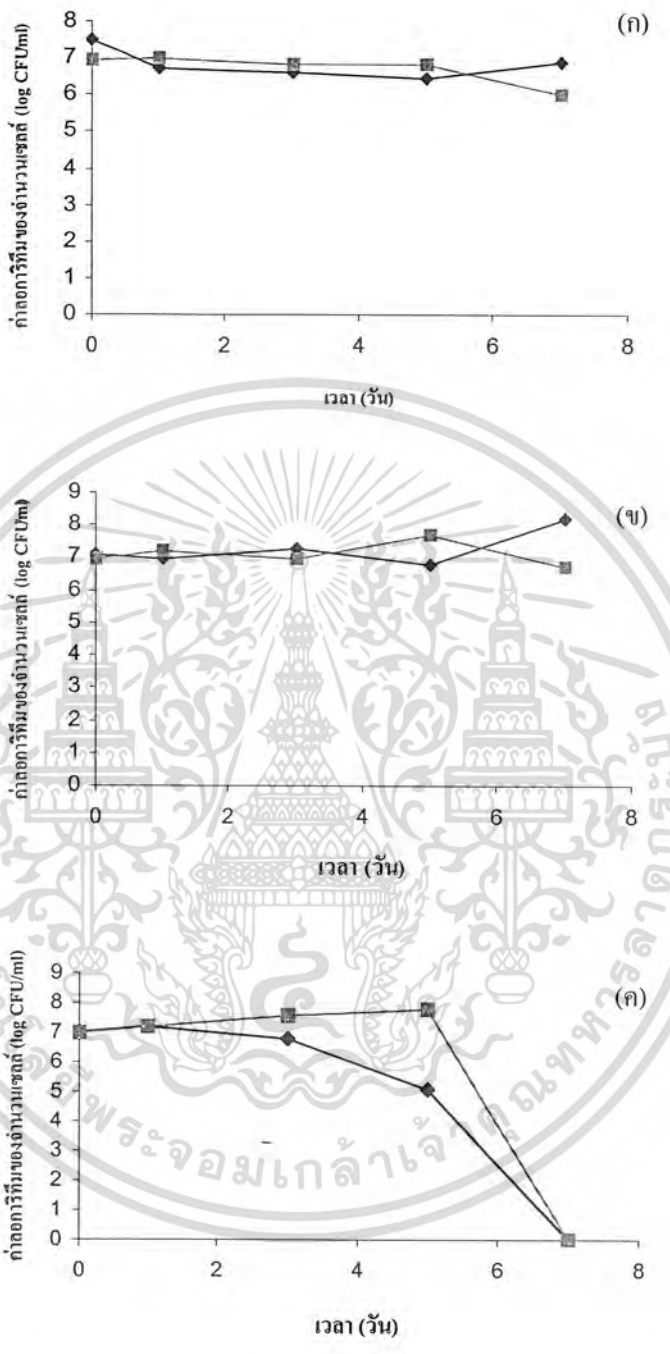
จากผลการทดลองพบว่ากรดทั้งสามชนิดทำให้เซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากธรรมชาติของกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่มีลักษณะไม่ชอบน้ำ ทำให้มีการแพร่ของโปรตอนผ่านเข้าในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งสิ่งเหล่านี้สามารถเกิดได้เอง เนื่องจากความแตกต่างของพีเอชและความเข้มข้นสารละลายระหว่างภายในเซลล์และนอกเซลล์ โดยทั่วไปแล้วพีเอชภายในเซลล์จะสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดสามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์และทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลงเนื่องจากการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้พีเอชภายในเซลล์แตกต่างไปจากเดิม ในการลดพีเอชภายในเซลล์มีผลมาจากการแตกตัวของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าของกรดที่เข้าไป ซึ่งเซลล์จะแบ่งพลังงานบางส่วนเพื่อไปทำลายโปรตอนที่เข้ามาใหม่ เป็นผลทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ช้าลง (Cassio, 1987; Ten Brink, 1980) Baird-Parker (1980) และ Minor (1970)กล่าวว่า โดยทั่วไปของกรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดซอร์บิก กรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิค และกรดเบนโซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิก นอกจากนี้ยังพบว่า กรดแอซีติกมีผลยับยั้งแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่ากรดแลคติกและกรดซิตริก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Abdul-Raouf และคณะ (1993) ซึ่งได้รายงานว่าในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157: H7 ในเนื้อวัวที่มีการเติมกรด กรดแต่ละชนิดจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแตกต่างกัน ดังนี้ กรดแอซีติกสามารถยับยั้งได้มากกว่ากรดแลคติกและกรดซิตริก ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันการทดลองของ Faber และคณะ (1989) ในเรื่องความสามารถในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ของกรดแต่ละชนิด พบว่ากรดแอซีติกยับยั้งได้มากกว่ากรดแลคติก กรดซิตริก และกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ และจากการทดลองของ Deng และคณะ (1999) พบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157: H7 ของกรดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันทั้งในเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดและไม่ผ่านการปรับตัว ซึ่งในการทดลองนี้กรดแอซีติกมีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่ากรดซิตริก เช่นเดียวกับที่ D'Aoust (1997) และ Ryu และคณะ (1999) ได้กล่าวว่ากรดแอซีติกมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียมากกว่ากรดแลคติกเพราะกรดแอซีติกมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแลคติก

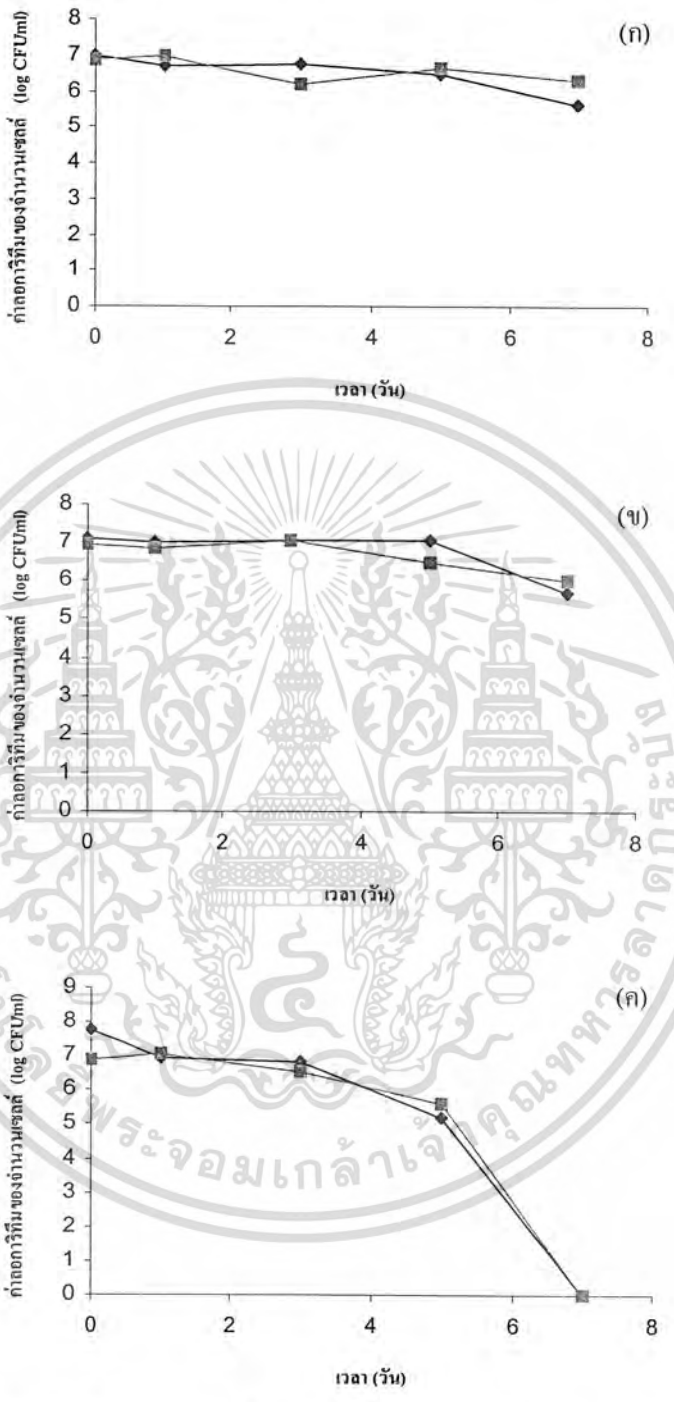
ในการทดลอง จากการที่เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งสามชนิดส่วนใหญ่มีจำนวนสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว เป็นผลเนื่องมาจากการที่เซลล์ได้พบกับสภาวะกรด ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองทำให้เซลล์ทนต่อกรดได้ดีขึ้น (Acid Tolerance Response, ATR) โดยเซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนพิเศษขึ้นในเซลล์ (Foster และ Hall, 1990; Foster, 1991; Davis และคณะ, 1996) ซึ่งการทนต่อกรดได้ดีขึ้นของเซลล์ปรับตัวด้วยกรดนี้ ได้มีผู้สังเกตพบในแบคทีเรียชนิดอื่นเช่นเดียวกันได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* (McDonald และคณะ, 1990), *Enterococcus hirae* (Belli และ Marquis, 1991) และ *Lactococcus lactis* (Hartke และคณะ, 1996; Rallu และคณะ, 1996; O'Sullivan และ Condon, 1997) นอกจากนี้ยังมีในแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นเชื้อก่อโรค เช่น *Salmonella typhimurium* (Foster และ Hall, 1991) และ *E. coli* (Leyer, 1995) Nighswonger และคณะ (1996) รายงานว่า *L. casei* สามารถมีชีวิตรอดในระหว่างการเก็บผลิตภัณฑ์นมหมักที่ 5 และ 7 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ที่พีเอชต่ำ และจากเหตุผลที่ว่าในอุจจาระของทารกซึ่งมีพีเอชต่ำ (เป็นกรด) จะมีปริมาณของ bifidobacteria มาก โดยปกติ bifidobacteria นี้มักพบในส่วนของระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรด ดังนั้น จึงเป็นเหตุผลที่ว่า bifidobacteria และ Lactobacilli มีความทนต่อกรดในระดับหนึ่ง (Zavaglia และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



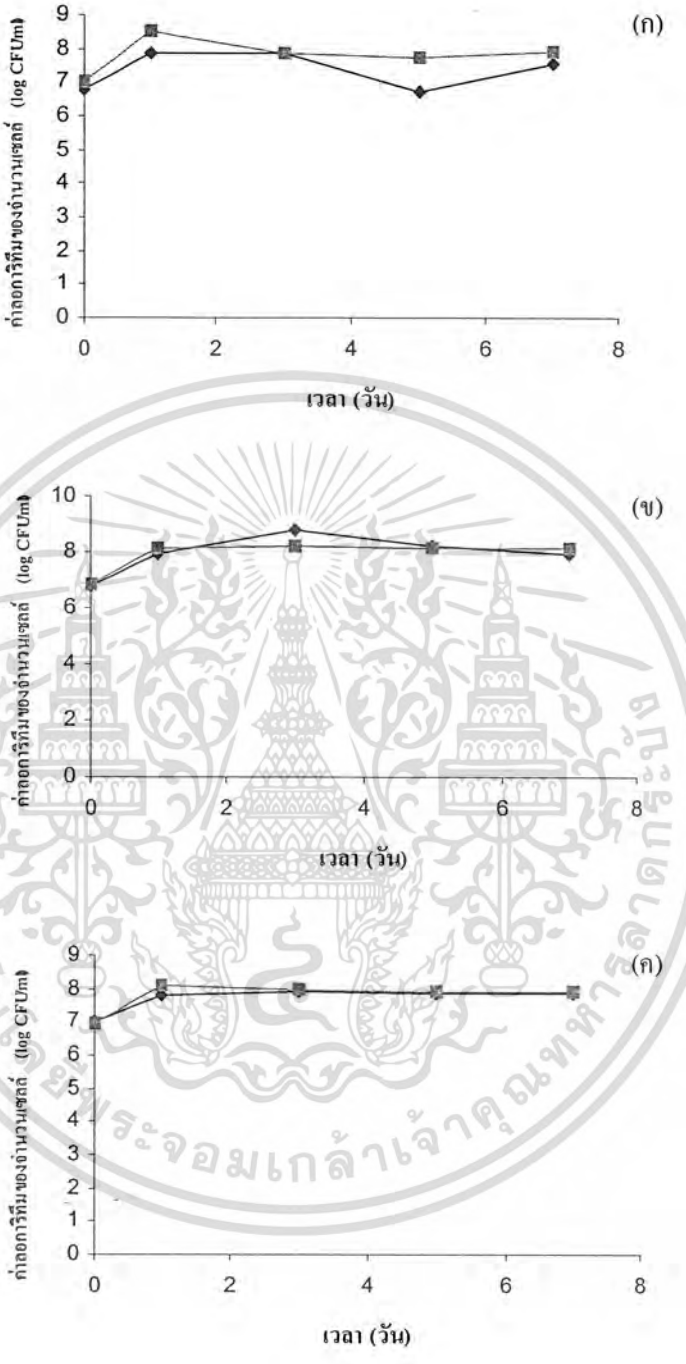
รูปที่ 3 ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *Bifidobacterium lactis* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส: ◆ เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวต่อกรด, ■ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส: ◆ เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวต่อกรด, ■ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ผลของการปรับตัวด้วยกรดของเชื้อ *Lactobacillus casei* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก (ก) กรดแลคติก (ข) กรดแอซีติก (ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส: ◆ เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวต่อกรด, ■ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาผลของการปรับตัวในสภาวะกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

จากการศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันที่มีต่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. lactis* และ *L. casei* ในน้ำสลัดโพรไบโอติก ที่เก็บในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณการอยู่รอดของเซลล์ *B. lactis* ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน มีปริมาณการอยู่รอดมากที่สุด ในน้ำสลัดที่เก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ (การอยู่รอด ร้อยละ 95.2) โดยมีความแตกต่างกับน้ำสลัดอีกทั้ง 3 ทรีตเมนต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองมาคือ เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดแต่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน ส่วนการอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน และเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันนั้นมีค่าลดลงมาก คือ มีปริมาณการอยู่รอดน้อยกว่าร้อยละ 0.001 สำหรับการอยู่รอดของ *L. casei* ที่ผ่านกระบวนการทั้ง 4 แบบในน้ำสลัดพบว่า เมื่อเก็บน้ำสลัดนาน 2 สัปดาห์ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน และเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดแต่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันนั้นสามารถเจริญขึ้นได้ในน้ำสลัด เนื่องจากมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (สัปดาห์ที่0) คือมีปริมาณการอยู่รอดเป็นร้อยละ 113.9 และ 108.8 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการอยู่รอดของ *L. casei* ในน้ำสลัดอีก 2 ทรีตเมนต์ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเก็บรักษาครบ 4 สัปดาห์ เซลล์ของ *L. casei* ในน้ำสลัดทั้ง 4 ชุด มีจำนวนลดลงโดยเซลล์ที่ผ่านปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันมีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุด (ร้อยละ103.8) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ผ่านกระบวนการอีก 3 แบบ จากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิดที่ผ่านกระบวนการทั้ง 4 กระบวนการจะเห็นได้ว่า *L. casei* อยู่รอดในน้ำสลัดได้ดีกว่า *B. lactis* และเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่มากที่สุด ดังนั้น เชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน จึงเหมาะสมที่สุดในการนำไปผลิตน้ำสลัดโพรไบโอติกในขั้นต่อไป

จากการทดลองพบว่า เชื้อที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันและผ่านการปรับตัวด้วยกรดมีเปอร์เซนต์การอยู่รอดมากที่สุด เมื่อเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดจะมีการสังเคราะห์โปรตีนพิเศษขึ้นในเซลล์ ซึ่งได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้มีการอยู่รอดได้ดีขึ้น และกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นกระบวนการรักษาเซลล์ไว้ภายในวัสดุหุ้ม เพื่อลดการบาดเจ็บและการสูญหายของเซลล์ (Champagne และ Cote, 1987) จึงทำให้เซลล์มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการอยู่รอดที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันช่วยป้องกันเซลล์จากสภาวะที่มีระดับออกซิเจนสูง (Sunohara และคณะ, 1995) ป้องกันเซลล์ระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บโยเกิร์ต (Adhikari และคณะ, 2000) ป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง (Shah และ Ravula, 2000) และระหว่างการส่งผ่านเข้าไปในระบบลำไส้ของมนุษย์ (Wenrong และ Griffiths, 2000) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Hou และคณะ (2003) ที่พบว่าอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการเอนแคปซูเลชันใน artificial sesame oil emulsion ซึ่งเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน มีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้น จากร้อยละ 0.023 เป็นร้อยละ 5.45 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ประมาณ 10^4 เท่า) ในสภาวะที่มีกรดในกระเพาะอาหารสูงหรือสภาวะที่มีเกลือน้ำดี และ Adhikari และคณะ (2003) ได้ทดลองเติม *Bifidobacterium longum* ที่ผ่านกระบวนการเอนแคปซูเลชันโดยใช้แคปปา-คาราจีแนนลงในโยเกิร์ตชนิดคนหลังจากการหมัก (พีเอช 4.6) และเก็บที่อุณหภูมิ 4.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์ที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันในตัวอย่างโยเกิร์ตมีจำนวนเซลล์ไม่ลดลง ขณะที่เซลล์ที่ไม่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้พบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดในบางสัปดาห์มีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cheng และ Chou (2001) ที่พบว่า ในขณะที่เซลล์ของ *E. coli* O157: H7 สายพันธุ์ ATCC 43889 และ ATCC 43895 ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดที่พีเอช 5.0 สามารถทนกรดในน้ำมะม่วงและน้ำหน่อไม้ฝรั่งได้ แต่เซลล์ที่ปรับตัวด้วยกรดสามารถอยู่รอดได้น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับตัวด้วยกรดเมื่ออยู่ในยาคูลท์และโยเกิร์ต นอกจากนี้พบว่า ถ้าหากอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ำ ความแตกต่างในการทนต่อกรดของเซลล์ที่ปรับตัวไม่ปรับตัวต่อกรดจะมีค่าน้อย

จากการวัดค่าพีเอชของน้ำสลัดที่ได้มีการเติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วในขั้นต้น หลังจากการเก็บรักษาน้ำสลัดที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ค่าพีเอชที่วัดได้ในแต่ละสัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 0, 1, 2 และ 4) ของน้ำสลัดแต่ละทรีตเมนต์ มีค่าอยู่ในช่วง 3.2 - 3.7 ซึ่งค่าพีเอชที่ได้นี้ในเชื้อทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เนื่องจากเชื้อไม่เกิดการหมักที่อุณหภูมิต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลของการปรับตัวในสภาวะกรดและไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Bifidobacterium lactis* และ *Lactobacillus casei* ในน้ำสลัดโพรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บรักษา (สัปดาห์)	การอยู่รอด (ร้อยละ)[a]							
	B. lactis				*L. casei*			
	NE[b]	AE[c]	NN[d]	AN[e]	NE	AE	NN	AN
0	100.0A[f]	100.0A	100.0A	100.0A	100.0A	100.0A	100.0A	100.0A
1	81.6A	82.2A	<0.1A	<0.03A	150.0A	110.8A	77.3A	65.6A
2	67.6AB	108.0A	<0.1B	<0.03B	108.8A	113.9A	69.9A	59.0A
4	49.4AB	95.2A	<0.001B	<0.001B	45.4 A	103.8A	41.9A	43.4A

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้ง 2 ซ้ำ

[b] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[c] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[d] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[e] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[f] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันใน 4 คอลัมน์ที่ใช้เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียวกัน (ที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าพีเอชของน้ำสลัดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

ระยะเวลาการเก็บรักษา (สัปดาห์)	พีเอช[a] ± SD							
	B. lactis				*L. casei*			
	NE[b]	AE[c]	NN[d]	AN[e]	NE	AE	NN	AN
0	3.5±0.11A	3.5±0.00A	3.6±0.00A	3.6±0.0A	3.4±0.04A	3.5±0.11A	3.6±0.00A	3.6±0.00A
1	3.5±0.07B	3.6±0. 00AB	3.6±0.04A	3.6±0.07AB	3.4±0.04B	3.5±0.11AB	3.6±0.04A	3.6±0.00AB
2	3.3±0.10A	3.4±0.06A	3.4±0.00A	3.4±0.00A	3.2±0.00B	3.4±0.07A	3.4±0.00A	3.4±0.00A
4	3.6±0.11A	3.6±0.04A	3.7±0.00A	3.7±0.00A	3.5±0.04B	3.4±0.11AB	3.7±0.00A	3.7±0.00A

[a] ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้ง 2 ซ้ำ

[b] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[c] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[d] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[e] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[f] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันใน 4 คอลัมน์ที่ใช้เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียวกัน (ที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวในสภาวะกรดร่วมกับกระบวนไมโครเอนแคปซูเลชัน

จากผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดที่เติมเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน เปรียบเทียบกับน้ำสลัดที่ไม่ได้เติมเชื้อ (ตารางที่ 8) พบว่าผู้ทดสอบชิมชอบน้ำสลัดที่ไม่ได้เติมเชื้อ *L. casei* (ชุดควบคุม) มากกว่าน้ำสลัดที่เติมเชื้อ *L. casei* เนื่องจากผู้ทดสอบชิมให้คะแนนคุณลักษณะในด้านของสี ความหวาน ลักษณะปรากฏ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวมของน้ำสลัดที่ไม่เติมเชื้อ *L. casei* มากกว่าน้ำสลัดที่เติมเชื้อ *L. casei* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยน้ำสลัดที่เติมเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน มีสีอ่อนกว่าน้ำสลัดที่ไม่เติมเชื้อ และมีลักษณะปรากฏคล้ายฟองอากาศขนาดเล็กอยู่ในน้ำสลัด จึงทำให้ผู้ทดสอบชิมชอบน้อยกว่าน้ำสลัดไม่เติมเชื้อ สำหรับคุณลักษณะของน้ำสลัดทั้ง 2 ชนิด ในด้านกลิ่นและความเปรี้ยว ไม่พบความแตกต่างของคะแนนที่ให้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

สำหรับน้ำสลัดโพรไบโอติกนี้ควรปรับปรุงในด้านของลักษณะเนื้อสัมผัส ซึ่งต้องมีการพัฒนาเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน โดยทำให้เม็ดอัลจิเนตมีขนาดเล็กลง จะทำให้น้ำสลัดมีความเนียนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดที่ไม่มีเชื้อ *Lactobacillus casei* และที่มีเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน

คุณสมบัติทางประสาทสัมผัส	คะแนนเฉลี่ย[a] ± SD		ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
	น้ำสลัดที่ไม่มีเชื้อ *L. casei* (ชุดควบคุม)	น้ำสลัดที่มีเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน	
สี	7.53±1.11	6.50±1.09	P<0.05
กลิ่น	6.68±1.33	6.33±1.65	P>0.05
ความเปรี้ยว	7.00±1.32	6.40±1.74	P>0.05
ความหวาน	6.93±1.21	6.25±1.55	P<0.05
ลักษณะปรากฏ	7.20±1.07	6.33±1.19	P<0.05
ลักษณะเนื้อสัมผัส	7.28±1.15	5.93±1.44	P<0.05
ความชอบรวม	7.48±0.82	6.63±1.17	P<0.05

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรดของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 ชนิด คือ *B. lactis*, *L. acidophilus* และ *L. casei* ต่อการอยู่รอดในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซิตริก กรดแลคติกและกรดแอซีติก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เซลล์ส่วนใหญ่ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรด มีแนวโน้มการอยู่รอดได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว โดยแบคทีเรียทั้งสามชนิดซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^6-10^7 CFUต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ได้ลดลงเล็กน้อยในอาหารเหลวที่มีกรดซิตริก และกรดแลคติก หลังจากบ่มนาน 7 วัน แต่ในกรณีของอาหารเหลวที่มีกรดแอซีติกมีผลทำให้เซลล์ของ *B. lactis* และ *L. acidophilus* ลดจำนวนลงมากที่สุดโดยลดเหลือน้อยกว่า 10 CFUต่อมิลลิลิตร เชื้อ *L. casei* สามารถอยู่รอดได้ดีในอาหารเหลว ที่มีกรดแอซีติก แบคทีเรียทั้งสามชนิดสามารถเจริญและอยู่รอดได้ในสภาพที่มีกรดแลคติก และกรดซิตริกมากกว่าในกรดแอซีติก จึงได้เลือกเชื้อ *L. casei* และ *B. lactis* มาใช้ในการทำน้ำสลัดโพรไบโอติกในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีการอยู่รอดได้ดีที่สุดตามลำดับ

ในการที่จะทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการอยู่รอดได้ดีมากยิ่งขึ้น จึงได้มีการนำเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันมาใช้ร่วมกับการปรับตัวในสภาวะกรด แล้วนำไปเติมลงในน้ำสลัด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ และวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอช การใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันร่วมกับการปรับตัวในสภาวะกรดมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณการอยู่รอดของ *B. lactis* และ *L. casei* ในน้ำสลัด เชื้อ *B. lactis* และ *L. casei* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดร่วมกับกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันในน้ำสลัดที่เก็บไว้ 4 สัปดาห์ มีปริมาณการอยู่รอดได้ดีที่สุด คือร้อยละ 95.2 และ 103.8 ตามลำดับ ต่างกับเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ซึ่งลดจำนวนลงมากกว่า ดังนั้น *L. casei* ที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันและผ่านการปรับตัวด้วยกรดจึงเหมาะสมที่สุด ที่จะนำมาผลิตน้ำสลัดโพรไบโอติก ซึ่งได้ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยเทียบกับน้ำสลัดธรรมดา ในการวัดค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชที่วัดได้ในแต่ละสัปดาห์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 3.2 ถึง 3.7 เนื่องจากนำไปเก็บในอุณหภูมิต่ำจึงทำให้ไม่มีการหมักเกิดขึ้น

การทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาในขั้นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลในการปรับปรุงคุณภาพน้ำสลัดโดยการเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชันเพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการปรับปรุงเทคนิคและวิธีการไมโครเอนแคปซูเลชันเพื่อให้ได้น้ำสลัดที่มีรสชาติ เนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น และให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Abee, T. and Wouters, J. A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal of Food Microbiology**. 50: 65-91.

Abdul-Raouf, U. M.; Beuchat, L. R. and Ammar, M. S. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. **Applied and Environmental Microbiology.** 59: 2364-2368.

Adams, P.; Fowler, R.; Kinsella, N.; Howell, G., Farris, M., Coote, P. and O'Connor, C. C. 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. **Proteomics**. 1: 597-607.

Adamson, A. W. 1982. **Physical chemistry of surfaces**. New York: Wiley.

Adhikari, K.; Mustupha, A. and Grun, I. U. 2003. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. **Journal of Food Science**. 68(1): 275-280.

Adhikari, K.; Mustupha, A.; Grun, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**. 83: 1946-1951.

Alm, L. 1982a. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose individuals. **Journal of Dairy Science**. 65: 346-352.

Anderson, H. B.; Ellegard, L. H. and Bosaeus, I. G. 1999. Nondigestibility characteristics of inulin and oligofructose in humans. **Journal of Nutrition**. 129: 1428s-1430s.

Arvola, T.; Laiho, K.; Mykkahen, H.; Salminen, S.; Maunula, L. and Tsolauri, E. 1999. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: A randomized study. **Prediatrics.** 1045: 1121.

Asahara, T.; Nomoto, K.; Shimizu, K.; Watanum, M. and Tanaka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection by symbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**. 91: 985-996.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Audet, P.; Paquin, C. and Lacroix, C. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with k-carrageenan-locust bean gum gel. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 29(1): 11-28.

Axelsson, L.; Chung, T. C.; Dobrogosz, W. J. and Lindgren, L. E. 1987. Discovery of a new antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. **FEMS Microbial Reviews**. 46(3): 65.

Baird-Parker, A. C. 1980. Organic acids. **In: Microbial Ecology of Food**, Vol.1, Factors Affecting Life and Death of Microorganisms, pp. 129-135. Silliker, J. H., Elliot, R. P. and Baird- Parker, A. C., eds. London: Academic Press.

Bearson, S.; Bearson, B.; and Foster, J. W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 147: 173-180.

Belli, W. A. and Marquis, R. E. 1991. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. 57: 1134-1138.

Bornet, F. R. J. 1994. Undigestible sugars in food products. **American Journal of Clinical Nutrition**. 59: 7635-7695.

Bouhnik, Y.; Flourie, B.; Pochart, P.; Marteau, P.; Abensour, L.; Morin Mo, et al. 1991. Oligosaccharides de synthese. Aspects nutritionnels (fructo-oligosaccharides et transgalactoside-oligsaccharides). **Cah. Nutr. Diet**. XXVI(6): 418-422.

Bouhnik, Y.; Flourie, B.; D'Agay-Abensour, L.; Pochart, P.; Gramet, G.; Durand, M. and Ramband, C. J. 1991. Administration of transgalacto-oligosaccharides increase fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **Journal of Nutrition**. 127: 444-448.

Breslaw, E. S. and Kleyn, D. H. 1973. In vitro digestibility of protein in yoghurt at various stages of processing. **Journal of Food Science**. 38: 1016-1021.

Buchanan, R. L. and Edelson, S. G. 1999. pH-Dependent stationary phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. **Journal of Food Protection**. 62: 211-218.

Buddington, K. K.; Danohoo, J. B. and Buddington, R. K. 2002. Dietary oligofructose and innulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **Journal of**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nutrition. 132: 472-477.

Champagne, C. P. and Cote, C. B. 1987. Cream fermentation by immobilized lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters**. 9: 329-332.

Champagne, C. P.; Gaudy, C.; Poncelet, D. and Neyfeld, R. J. 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. **Applied and Environmental Microbiology**. 58(5) : 1429-1434.

Chang, Y. Y. and Cronan, J. E. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. 33: 249-259.

Cheng, H. Y. and Chou, C. C. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *Escherichia coli* O157: H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. **International Food Microbiology**. 70: 189-195.

Clark, P. A.; Cotton, L. N. and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in culture dairy foods:II. Tolerance to stimulate pH of human stomachs. **Cultured Dairy Products Journal**. 28: 11-14.

Coakley, M.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G.; Devery, R. and Stanton, C. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**. 94(1): 138-145.

Cook, G. M. and Russel, J. B. 1994. The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. **Current Microbiology**. 28: 165-168.

Coudray, C.; Bellanger, J.; Castigila-Delavaud, C.; et al. 1997. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **European Journal of Clinical Nutrition**. 51: 375-380.

Crittenden, R. G. and Playne, M. J. 1996. Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. **Trends in Food Science Technology**. 7: 353-361.

Cummings, J. H. 1995. Short chain fatty acids. **In: Human Colonic Bacteria**: Role in Nutrition, Physiology and Pathology, pp. 101-130. Gibson, G. R. and Macfarlane, G. T., eds. Boca Raton, FL: CRC Press.

Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**. 70: 443-459.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D'Aoust, J. Y. 1997. *Salmonella* species. **In: Food microbiology** : fundamentals and Frontiers, pp.129-158. Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. and Montville T. J., eds. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.

Dave, R. I. and Shah, N. P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter culture. **Internatonal Dairy Journal**. 7: 31-41.

Davis, M. J.; Coote, P. J., et al. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. **Microbiology**. 142: 2975-2982.

Deeth, H. C. and Tamine, A. Y. 1981. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. **Journal of Food Protection**. 44: 78-86.

Deng, Y.; Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. 1999. Tolerance of acid-adapted and non-adapted *Escherichia coli* O157: H7 cells to reduced pH as affected by type of acidulant. **Journal of Applied Microbiology**. 86: 203-210.

Dickson, J. S.1995. Susceptibility of preevisceration washed beef carcasses to contamination by *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella*. **Journal of Food Protection.** 58: 1060-1068.

Doores, S. 1993. Organic acids. **In: Antimicrobials in Foods**, 2nd ed , pp. 95-136. Davidson, P. M. and Branen, A. L., eds. New York: Marcel Dekker.

Fairweather-Tait, S. J. and Johnson, I. T. 1999. Bioavailability of minerals. **In: Colonic Microbiota**, Nutrition and Health. Dordrecht, Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., eds. Kluwer Academic Press.

FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria, Report from FAO/WHO Expert consultation 1-4 Oct, Cordoba, Argentina.

Farber, J. M. and Brown, B. E. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. **Applied and Environmental Microbiology**. 56: 1584-1587.

Farber, J. M.; Sanders, G. W.; Dunfield, S. and Prescott, R. 1989. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes.* **Letters in Applied Microbiology**. 9: 181-183.

Fay, A. C. 1934. The effect of hypertonic sugar solution on the thermal resistance of bacteria. **Journal of Agricultural Research**. 48: 453-468.

Fooks, L. J.; Fuller, R. and Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

microbiology. **International Dairy Journal**. 9: 53-61.

Foster, J. W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. **Journal of Bacteriology**. 173: 6896-6902.

Foster, J. W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal of Bacteriology**. 175: 1981-1987.

Foster, J. W. 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **Current Opinion Microbiology**. 2: 170-174.

Foster, J. W. 2000. Microbial response to acid. **In: Bacterial Stress Responses**, pp. 99-116. Storz, G. and Hegge-Aronis, R., eds. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Foster, J. W. and Hall, H. K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 172(2): 771-778.

Foster, J. W. and Hall, H. K. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. 173: 5129-5135.

Friend, B. A. and Shahani, K. M. 1984. Nutritional and therapeutic aspects of lactobacilli. **Journal of Applied Nutrition**. 36: 125-153.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. 66(5): 365-378.

Fuller, R. 1992. **Probiotics-The Scientific Basis**. London: Chapman and Hall.

Fuller, R. and Gibson, G. R. 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Gastroenterology**. 32, Suppl 222: 28-31.

Gahan, C. G.; O'Driscoll, B., and Hill, C. 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. 62: 3128-3132.

Gibson, G. R. and Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**. 77: 412-420.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of probiotics. **Journal of Nutrition**. 125: 1404-1412.

Gibson, G. R.; Berry, O. P. and Rastall, R. A. 2000. **Prebiotics: New Developments in Functional Foods.** Oxford: Chandos Publishing Limited.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gibson, G. R.; Willems, A.; Reading, S. and Collins, M. D. 1996. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. **Proceedings of the Nutrition Society**. 55: 899-912.

Gilliland, S. E. 1985. **Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Foods**. Boca Raton: FL, CRC Press.

Glick, M. C.; Sall, T.; Zilliken, F. and Mudd, S. 1960. Morphological changes in *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor. **Bichemica et Biophysica Acta**. 37: 361-368.

Godward, G.; Sultana, K.; Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R. and Reynolds, N. 2000. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy food. **Milchwissenschaft**. 558(2000): 441-445.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1977. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. **Cancer**. 40: 2421-2426.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. **Journal of National Cancer Institute**. 64: 263-265.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1984a. Effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **American Journal of Clinical Nutrition**. 39: 756-761.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1984b. Alterations of the inestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*. Decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. **Journal of National Cancer Institute**. 73: 689-695.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1992. Probiotics for Human. **In: Probiotics: The Scientific Basis**, pp. 355-371. Fuller, R., ed. London: Chapman and Hall, 2-6 Boundary Row.

Goodson, M. and Rowbury, R.J. 1989. Habituation to alkali and increased UV-resistance in DNA repair-proficient and –deficient strains of *Escherichia coli* grown at pH 9.0. **Letters in Applied Microbiology**. 11: 123-125.

Gorbach, S. L. 2002. Probiotica and gasterointestinal health. **American Journal of Gastrointestinal**. 95(1) : S2-S4.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gotz, V.; Romankiewicz, J. A.; Moss, J. and Murray, H. W. 1979. Prophylaxis against ampicillin-asscociated diarrhea with a *lactobacillus* preparation. **American Journal Hospital Pharmacology**. 36: 754.

Greger, J. L. 1999. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. **Journal of Nutrition**. 129: 1434s-1435s.

Groboillot, A. F.; Champagne, C. P.; Darling, G. D. and Poncelet, D. 1993. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. **Biotechnology and Bioengineering**. 42(10): 1157-1163.

Gruneward, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**. 47: 2078-2079.

Hahn, K.; Faustoferri, R. C. and Quivey, R. B. 1999. Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. **Molecular Microbiology**. 31: 1489-1498.

Hargrove, R. E. and Alford, J. A. 1978. Growth rate and feed efficiency of rats fed yogurt and other fermented milks. **Journal of Daiy Science**. 61: 11-19.

Hartke, A.; Bouche, S., et al. 1994. Starvation-induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. **Applied and Environmental Microbiology**. 60(9): 3474-3478.

Hartke, A.; Bouche, S., et al. 1995. UV-inducible proteins and UV-induced cross-protection against acid, ethanol, H_2O_2 or heat treatments in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Archives Microbiology**. 163: 329-336.

Hartke, A.; Bouche, S.; et al. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Current Opinion Microbiology**. 33(3): 194-199.

Hayakawa, K.; Mizutani, J.; Wada, K.; Masai, T.; Yoshihara, I. and Mitsuoka, T. 1990. Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. **Microbial Ecology in Health and Disease**. 3: 293-303.

Heimer, S. R.; Welch, R. A.; Per, N. T.; Posfai, G.; Evans, P. S.; Kaper, J. B.; Blattner, F. R. and Mobley, H. L. 2002. Urease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: evidence of regulation by *fur* and a *trans*-acting factor. **Infection and Immunity**. 70: 1027-1031.

Heyde, M. and Portalier, R. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. 69: 19-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hickey, E. W. and Hirschfeld, I. N. 1990. Low-pH-induced effects on pattern of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**. 56: 1038-1045.

Hikada, H.; Eida. T.; Torizawa, T.; Tokunaga, T. and Tashiro, Y. 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacteria Microflora**. 5(1): 37-50.

Hitchins, A. D.; Wells, P.; McDonough, F. E. and Wong, N. A. 1985. Amelioration of the adverse effect of a gastrointestinal challenge with *Salmonella enteritidis* in weanling rats by a yogurt diet. **American Journal of Clinical Nutrition**. 41: 91-100.

Hou, R. C. W.; Lin, M. Y.; Wang, M. M. C. and Tzen, J. T. C. 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. **Journal of Dairy Science**. 86: 424-428

Hyndman, C. L.; Groboillot, A. F. and Poncelet, D. 1993. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 56(3):259-263.

Ishibashi, M. and Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technology**. 46: 126-135.

Ito, M.; Kimura, M.; Deguchi, Y.; Miyamori-Watabe, A.; Yajima, T. and Kan, T. 1993. Effect of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal flora and their metabolism. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. 39: 279-288.

Jankowski, T.; Zielinska, M. and Wysakowska, A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Biotechnology Techniques**. 11(1): 31-34.

Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues Intestinal Microbiology Technology**. 11:31-34.

Karem, K. L.; Foster, J. W., et al. 1994. Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas Hydrophila.* **Microbiology**. 140: 1731-1736.

Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Reviews**. 46: 233-244.

Kearney, L.; Upton, M. and Loughlin, A. 1990. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads. **Applied**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไปใช้

and Environmental Microbiology. 56(10): 3112-3116.

Kilara, A. and Shanani, K. M. 1976. Lactose activity of cultured and acidified dairy products. **Journal of Dairy Science**. 61: 2031-2035.

Kinouchi, T.; Kataoka, K.; Ruo Bing, S.; Nakayama, H.; Uejima, M.; Shimono, K.; Kuwahara, T., Akimoto, S.; Hiraoka, I. and Ohnishi, Y. 1998. Culture supernatants of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium adolescentis* repressileal under formation in rats treated with a non-steroidal anti-inflammatory drug by supressing unbalanced growth of aerobic bacteria and lipid peroxidation. **Microbiology and Immunology**. 42: 347-355.

King, A. H. 1995. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrpcolloids. **In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**, pp. 213-220. Risch, S. J. and Reineccius, G. A., eds. Washington DC: American Chemical Society.

Kolot, F. B. 1988. **Immobilized microbial system: principles, techniques and industrial applications**. Cambridge: Cambridge University press.

Kopp-Hoolihan, L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics. A Review. **Journal of the American Dietetic Association**. 101(2): 229-241.

Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. and Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. **International Dairy Journal**. 13(1): 3-13.

Kullen, M. J. and Klaenmammer. 1999. Identification of the pH- inducible, proton-trans-locating F_1F_0-ATPase (atp BEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. **Molecular Microbiology**. 33: 1152-1161.

Kurmann, J. A. and. Rasic, J. L. 1991. The Health potential of products containing bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. 47: 151-164.

Lacroix, C.; Paquin, C. and Arnaud, J. P. 1990. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. I. Optimisation of the rheological properties of the entrapment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 32(4): 403-408.

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

Leyer, G. J. and Johnson, E. A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cheese. **Applied and Environmental Microbiology**. 58: 2075-2080.

Leyer, G. J.; Wang, L. L. and Johnson E. A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157: H7 increases survival in acidic foods. **Applied and Environmental Microbiology**. 61: 3752-3755.

Lou, Y. and Yousef, A. E. 1997.Adaptation to sulolethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 1252-1255.

Macfarlane, G. T. and Gibson, G. R. 1994. Metabolic interactions between colinic bacteria and the host. **In: The Contribution of Microorganisms**, pp.17-52. Gibson, S. A. W., ed. London: Springer, Verlag.

Mackey, B. M. and Derrick, C. M. 1987. The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. **Letters in Applied Microbiology**. 5: 115-118.

Maguin, E.; Prevost, H., et al. 1996. Efficient insertional mutagenesis in Lactococci and other gram-possitive bacteria. **Journal of Bacteriology**. 178: 931-935.

Malm, C. J.; Emerson, J. and Hiatt, G. D. 1951. Cellulose acetate phthalate as an enteric-coating material. **Journal of American Pharmaceutical Association Science**. 10(3): 520-525.

Martinson, A.; Skjak-Braek, C. and Smidsrod, O. 1989. Alginate as immobilization material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**. 33(1): 79-89

Marx, J. L. 1989. **A revolution in biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press.

McDonald, L. C.; Fleming, H. P., et al. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**. 56: 2120-2124.

McDonough, F. E.; Wells, P.; Wong, N. P., et al. 1983. Role of vitamins and minerals in growth stimulation of rats fed yogurt. **Federation Proceeding**. 42: 556.

Mcknight, C. A.; Ku, A. and Goosen, M. F. A. 1988. Synthesis of chitosan-alginate microencapsule membranes. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 3(8): 334-354.

Montserrat, R. U. and Alicia, S. O. 2001. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**. 65: S43-S52.

Nighwonger, B. D.; Brashears, M. M. and Gilliland, S. E. 1996. Viability of *Lactobacillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acidophilus and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during storage. **Journal of Dairy Science**. 79(2): 212-219

Niv, M.; Levy, W. and Greenstein, N. M. 1963. Yogurt in the treatment of infantile diarrhea. **Clinical Peadiatrics**. (Phila). 2: 407-411.

O'Driscoll, B., Gahan, C. G., et al. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of acid - tolerant mutant which demonstrates increased virulence. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(5): 1693-1698.

O'Sullivan, M. G. 1996. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora-an overview. Bulletin of the IDF 313: Oligosaccharides and Probiotic Bacteria. 23-30.

O'Hara, G. W. and Glenn, A. R. 1994. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. **Archives Microbiology**. 161: 286-292.

Oksanen P. J.; Salminen, S.; Saxelin, M.; Hamalanien, P.; Ihantola-vormisto, A.; Muurasniemi-Isoviita, L.; Nikkari, S.; Oksanen, T.; Porsti, T.; Salminen, E.; Siitonen, S.; Stukey, H.; Toppila A. and Vapaatplo, H. 1990. Prevention of travellers diarrhoes by *Lactobacillus* GG. **Annals of Medicine**. 22(1): 53-56.

Olson, E. R. 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. **Molecular Microbiology**. 8(1): 5-14.

O'Sullivan, E. R. and Condon, S. 1997. Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stress in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(11): 4210-4215.

Overgaard, S.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M. and Bols, N. C. 1991. Immobilization of hybridoma cells in chitosan alginate beads. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**. 69(4): 439-443.

Oyarzabal, O. A. and Conner, D. E. 1995. In vitro fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. **Poultry Science**. 74(9): 1418-1425.

Perrin, S.; Grill, J. P. and Schneider, F. 2000. Effect of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three spicies of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 88: 968-974.

Playne, M. J. and Crittenden, R. 1996. Commercially avaliable oligosaccharides. **Bull Int. Dairy Found**. 313: 10-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poolman, B.; Driessen, A. J., et al. 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. **Journal of Bacteriology**. 169(12): 5597-5604.

Raja, N.; Goodson, M., et al. 1991. Habituation to acid in of *Escherichia coli* : conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. **Journal of Applied Bacteriology**. 70: 59-65.

Rajalakshmi, R. and Vanaji, K. 1967. Chemical and biological evaluation of the effects of fermentation on the nutritive value of foods prepared from rice and grain. **British Journal Nutrition**. 21: 467-473.

Rallu, F.; Gruss, A., et al. 1996. *Lactococcus lactis* and stress. **Antonie van Leeuwenhoek.** 70(2-4): 243-251.

Rallu, F.; Gruss, A., et al. 2000. Acid-and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. **Molecular Microbiology**. 35(3): 517-528.

Rao, A. V.; Shiwnarain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. 22(4): 345-349.

Rao, D. M.; Chawan, C. B. and Pulusani, S. R. 1981. Influence of milk and thermophilic milk plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. **Journal of Food Science**. 46: 1339-1341.

Ravishankar, S. and Harrison, M. A. 1999. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* strains does not offer cross-protection against an activated lactoperoxidase system. **Journal Food Protection.** 62: 670-673.

Ravula, R. R. and Shah, N. P. 1999. Survival of microencapsulated cells of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in fermented frozen dairy products. **Journal of Dairy Science**. 82: 4 (Abstr.)

Read, A. E.; McCarthy, C. F., Heaton, K. W. and Laidlow, J. 1966. *Lactobacillus acidophilus* (ENPAC) in treatment on hepatic encephalopathy. **British Medical Journal**. 1: 1267-1269.

Rees, C. E. D.; Dodd, C. E. R.; Gibson, P. T.; Booth, I. R. and Steward, G. S. A. B. 1995. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. **International**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Journal of Food Microbiology. 28: 263-275

Reuter, G. 1963. Vergleichende Untersuchurge uber die Bifidus-flora in Sauglings und Erwashenenstuhlz. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektion skrankheiten und Hygiene(1.Abteilung Originale). A191: 486-507.

Robert, H.; Ten Brink, B. and Jos, H. J. 1992. Selection of strains for probiotic use. **In: Probiotics: The Scientific Basis**, pp. 209-221. Fuller, R., ed. London: Chapman and Hall, 2-6 Boundary Row.

Roberfroid, M.B. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. **Advances in Experimental Medicie Biology**. 427: 211-219.

Robinson, R. K. 1987. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in fermented products. **S. Afr. Tydskr. Suiwelk**. 19: 25-27.

Rowbury, R. J. 1995. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli, Salmonella* spp. and other enterobacteria. **Letters in Applied Microbiology**. 20: 333-337.

Rowland, I. R. 1995. Toxicology of the colon-role of the intestinal microflora. **In: Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology, and Pathology**, pp.155-174. Gibson, G. R. and Macfarlane, G. T., eds. Florida: Boca Raton, CRC Press.

Ryu, J. H.; Deng, Y. and L. R. Beuchat. 1999. Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157: H7 when exposed to reduced pH achieved with various organics acids. **Journal of Food Protection**. 62: 451-455.

Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**. 83: 894-907.

Shah, N. P. and Lankraputhra, W. E. V. 1997. Improvimg viability of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt. **International of Dairy Journal**. 7: 349-356.

Shah, N. P. and Ravulu, R. R. 2000. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy technology**. 55: 139-144.

Shah, N. P.; Lankaputhra, W. E. V.; Britz, M. and Kyle, W. S. A. 1995. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**. 5: 515-521.

Shahani, K. M. and Chandan, R. C. 1979. Nutritional and healthful aspects of cultured and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

culture-containing dairy food. **Journal of Dairy Science**. 62: 1685-1694.

Shahani, K. M.; Friend, B. A. and Bailey, P. J. 1983. Antitumor activity of fermented colostrum and milk. **Journal of Food Protection**. 46: 385-386.

Shanahan, F. 2000. Immunology. Therapeutic manipulation of gut flora. Science. 289(5483): 1311-1322.

Shelef, L. A. 1994. Antimicrobial effect of lactates: a review. **Journal of Food Protection**. 57: 445-450.

Sheu, T. Y. and Marshall, R. T. 1991. Improving culture viability in frozen dairy desserts by microencapsulation. **Journal of Dairy Science**. 74(supplement 1): 107.

Sheu, T. Y. and Marshall, R. T. 1993. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**. 54(3): 557-561.

Sheu, T. Y.; Marshall, R. T. and Heymann, H. 1993. Improving survivial of culture bacterial in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**. 76(7): 1902-1907.

Silva, M.; Jacobus, N. V.; Deneke, C. and Gorbach, S. L. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents Chemotheraphy**. 31: 1231-1233.

Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**. 8(3): 71-78.

Smidsrod, O.; Haug, A. and Lian, B. 1972. Properties of poly (1,4-heuronates) in the gel state. I. Evaluation of a method for the determination of stiffness. **Acta Chemica Scandinavica**. 26(1): 71-78.

Sultana, K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Pelris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in stimulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**. 62 (1-2): 47-55.

Sunohara, H.; Ohno, T.; Shibata, N.; and Seki, K. (Inventors) Morishita Jintan Co.Ltd. (assignee). 1995. Process for producing capsule and capsule obtained thereby. **us patent** 5: 478-570.

Tagg, J. R.; Dajani, A. S. and Wannaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive species. **Bacteriology Reviews**. 40: 722-756.

Takata, I.; Tasa, T. and Chibata, I. 1997. Screening of matrix suitable for immobilization of microbial cells. **Journal Solid-Phase Biochemistry**. 2(2): 225-236.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tamura, Z. 1983. Nutriology of bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora**. 2: 3-16.

Tanaka, H.; Irie, S. and Ochi, H. 1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 68(3): 216-219.

Tissier, H. 1900. **Recherches sur la flore intestine normale et pathologique du nourisson.** Thes is, University of Paris, Paris, France.

Tsai, Y. W. and Ingham, S. C. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. **Journal of Food Protection**. 60: 751-755.

Watson, K. 1990. Microbial stress proteins. Advances in Microbial Physiology. 31: 183-223.

Wenrong, S. and Griffiths, M. W. 2000. Survival bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Food Microbiology**. 61: 17-25.

Yousef, A. E. and Courtney, P. D. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. **In: Microbial Stress Adaptation and Food Safety**, pp.2-25. Florida: Boca Raton, CRC Press.

Zavaglia, A. G.; Kociubinski, G.; Perez, P. and Antoni, G. D. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. **Journal of Food Protection**. 61: 865-873.

Ziemer, C. and Gibson, G. R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concepts perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**. 8: 473-479.

Zhou, Y.; Martins, E.; Groboillot, A.; Champagne, C. P and Neufeld, R. J. 1998. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. **Journal of Applied Microbiology**. 84(3): 342-348.

Zychowicz, C.; Surazynmska, A.; Sietwierska, B. and Ciephinska, T. 1974. Effect of *Lactobacillus acidophilus* cultures (acidophilus milk) on the carrier state of *shigella* and *salmonella* organisms in children. **Pediatria Polska**. 49: 997-1003.

Zychowicz, C.; Kowalczyk, S. and Ciephinska, T. 1975. Results of administration of *Lactobacillus acidophilus* cultures (acidophilus milk) in an endemic focus of dysentry. **Pediatria Polska**. 50: 429-435.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การทดลองเบื้องต้น

1. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถอยู่รอดได้ดีในสภาวะกรด

ในการทดลองขั้นแรกนี้จะทำการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Lactobacillus casei* BCC 4308, *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus fermentum* BCC4398, *Lactobacillus jensennii* TISTR 1342 ใน อาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชให้ได้ 5.5 เพื่อที่จะคัดเลือกเชื้อที่สามารถอยู่รอดได้ดี 3 ชนิดเพื่อใช้ ในการทดลองขั้นต่อไป

1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

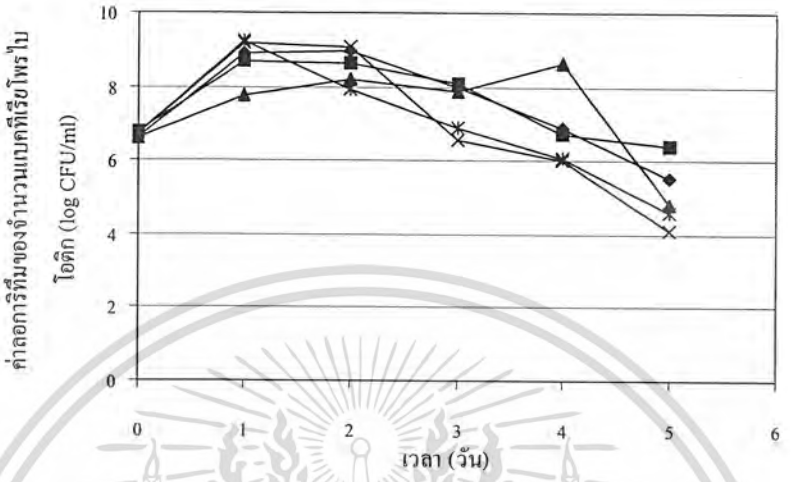
เขี่ยเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดจากอาหารแข็ง MRS ปริมาณ 1 ลูป เติมใส่ลงใน อาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อมานำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 2 ครั้ง ทำให้เป็น สารละลายแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากันในแต่ละสายพันธุ์ด้วย McFarland Standard เบอร์ 3

1.2 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหาร MRS พีเอช 5.5

ทำการปิเปตเซลล์ที่ผ่านการปรับความขุ่นแล้วมาเชื้อละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ปรับให้มีพีเอช 5.5 ด้วยกรดแลคติก นำหลอดอาหาร MRS ทั้ง 5 หลอด ที่ใส่เชื้อแต่ละชนิดแล้วไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค pour plate โดยใช้อาหาร MRS agar ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 คำนวณหาปริมาณเชื้อต่อมิลลิลิตร (CFUต่อมิลลิลิตร) ในแต่ละช่วงเวลา นำผลการทดลองที่ได้ไปพลอตกราฟการเจริญ (growth curve) ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ เพื่อดูความสามารถในการทนต่อกรดแล้วทำการคัดเลือกเชื้อที่ทนกรดได้ดี 3 ชนิด มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง



รูปที่ 6 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเหลว MRS ที่พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส: โดยที่ —◆— *Lactobacillus acidophilus*, —■— *Bifidobacterium lactis*, —▲— *Lactobacillus casei*, —×— *Lactobacillus fermentum*, —✱— *Lactobacillus jensenii*

ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่รอดได้ดีในสภาวะกรดนั้นจะต้องนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญ ซึ่งในตอนแรกปริมาณเชื้อเริ่มต้นจะใกล้เคียงกันในวันที่ 0 มีปริมาณเซลล์ 6.67 log CFUต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 จะเห็นว่าเชื้อมีการเจริญมากขึ้น ซึ่งเชื้อ 5 ชนิดนี้ จะมีการเจริญที่แตกต่างกันในวันที่ 2, 3, 4 และ 5 ซึ่งมีแนวโน้มการเจริญของเชื้อลดลง สำหรับในวันที่ 2 *L. acidophilus* และ *L. casei* มีการเจริญเพิ่มขึ้น ในวันที่ 4 *L. casei* มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุดคือ 8.63 log CFUต่อมิลลิลิตร ส่วนในวันที่ 5 เชื้อที่มีความสามารถในการเจริญที่ดี คือ *B. lactis* และ *L. acidophilus* ซึ่งมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มากที่สุด โดยมีปริมาณเซลล์เป็น 6.37 และ 5.51 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเชื้อทั้งสามนี้คือ *L. acidophilus, B. lactis* และ *L. casei* มีการเจริญเติบโตที่ดี จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร MRS (deMan Rogosa Sharpe Medium) มีดังนี้

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Polysorbate(tween80)	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม

ในกรณีที่ใช้อาหารแข็งจะใช้วุ้น ร้อยละ 2

2. สารละลายทำเจือจาง

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5

เตรียมสาร A โดยชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 78.00 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร

เตรียมสาร B โดยชั่ง $Na_2HPO_4.7H_2O$ 134.02 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร

นำสาร A 16 มิลลิลิตร และสาร B 84 มิลลิลิตร ผสมกันและปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ซึ่งสามารถเพิ่มได้ตามอัตราส่วนในปริมาตรที่ต้องการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ลักษณะของแบบทดสอบการให้คะแนนในการชิมน้ำสลัด

แบบรายงานการทดสอบการให้ความชอบ

ชื่อผู้ตัดสิน _____ วันที่ _____

ผลิตภัณฑ์ _____

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างเหล่านี้ตามลำดับที่เสนอ และให้คะแนนแต่ละปัจจัยตามความชอบที่ท่านมีต่อผลิตภัณฑ์นั้น ตามที่ท่านเห็นสมควร

คะแนน	
9	ชอบมากที่สุด
8	ชอบมาก
7	ชอบปานกลาง
6	ชอบเล็กน้อย
5	บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ
4	ไม่ชอบเล็กน้อย
3	ไม่ชอบปานกลาง
2	ไม่ชอบมาก
1	ไม่ชอบมากที่สุด

รหัส : _____		รหัส : _____	
ลักษณะปรากฏ	_____ คะแนน	ลักษณะปรากฏ	_____ คะแนน
สี	_____ คะแนน	สี	_____ คะแนน
ลักษณะเนื้อสัมผัส	_____ คะแนน	ลักษณะเนื้อสัมผัส	_____ คะแนน
กลิ่น	_____ คะแนน	กลิ่น	_____ คะแนน
ความเปรี้ยว	_____ คะแนน	ความเปรี้ยว	_____ คะแนน
ความหวาน	_____ คะแนน	ความหวาน	_____ คะแนน
ความชอบรวม	_____ คะแนน	ความชอบรวม	_____ คะแนน

วิจารณ์ _____ วิจารณ์ _____

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 9 ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *Bifidobacterium lactis* , *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 1

จุลินทรีย์	เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ (log CFU / ml)					
		citric		lactic		acetic	
		non	adapt	non	adapt	non	adapt
B. lactis	0	7.35	6.84	7.23	6.87	6.95	6.83
	1	6.78	5.85	7.08	7.21	7.17	7.13
	3	6.15	6.46	5.57	5.56	6.87	6.90
	5	5.21	5.34	4.30	4.04	3.00	5.79
	7	5.48	5.70	4.54	4.40	-[a]	-
L. acidophilus	0	7.05	7.68	7.03	6.64	6.86	6.56
	1	6.72	6.91	7.08	6.88	6.93	6.68
	3	6.64	6.34	6.95	6.14	6.85	6.45
	5	5.57	5.83	4.70	6.10	5.20	6.06
	7	6.74	6.30	3.78	5.30	-	-
L. casei	0	6.77	7.08	6.55	7.27	6.72	7.01
	1	7.66	7.81	7.76	7.76	7.66	7.74
	3	7.66	7.57	7.88	7.99	7.85	7.89
	5	7.25	7.37	8.33	8.05	7.72	7.83
	7	7.60	7.90	7.95	8.10	7.85	7.85

[a] = ตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *Bifidobacterium lactis* , *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 2

จุลินทรีย์	เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ (log CFU / ml)					
		citric		lactic		acetic	
		non	adapt	non	adapt	non	adapt
B. lactis	0	7.76	6.95	6.77	6.98	8.40	7.02
	1	6.64	7.22	6.53	7.23	7.23	7.18
	3	6.59	7.09	6.71	8.12	6.84	7.99
	5	6.92	7.29	7.08	8.16	4.70	8.09
	7	7.21	6.23	8.20	6.97	- [a]	-
L. acidophilus	0	6.74	6.89	6.92	7.03	8.20	6.88
	1	6.72	6.93	6.96	6.65	7.02	7.06
	3	6.35	5.98	6.94	7.38	6.56	6.65
	5	6.90	6.82	7.09	6.86	3.65	4.74
	7	5.85	6.48	5.89	6.27	-	-
L. casei	0	6.80	7.00	6.86	6.97	6.77	6.97
	1	8.11	8.14	7.94	8.20	8.12	8.20
	3	8.15	7.85	8.15	8.29	7.93	8.00
	5	8.04	7.77	8.11	8.17	7.87	7.96
	7	7.73	8.03	8.04	8.26	7.89	7.93

[a] = ตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 ผลการปรับตัวด้วยกรดต่อการอยู่รอดของ *Bifidobacterium lactis* , *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอซีติก ในการทดลองครั้งที่ 3

จุลินทรีย์	เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ (log CFU / ml)					
		citric		lactic		acetic	
		non	adapt	non	adapt	non	adapt
B. lactis	0	7.04	7.04	7.08	7.07	7.06	7.05
	1	7.04	7.13	7.11	7.16	7.06	7.26
	3	6.89	6.72	7.70	7.14	6.57	6.70
	5	5.27	5.69	7.40	6.23	5.28	5.10
	7	5.30	5.57	6.48	5.74	- [a]	-
L. acidophilus	0	7.14	7.03	7.24	7.10	7.03	7.05
	1	9.40	7.14	9.40	6.92	9.40	7.33
	3	7.00	6.15	7.14	7.05	7.01	7.24
	5	5.66	6.74	7.36	5.51	3.48	4.78
	7	5.28	6.03	5.31	4.85	-	-
L. casei	0	6.85	6.97	6.94	7.00	7.31	6.96
	1	7.73	8.87	7.99	8.31	6.84	8.15
	3	7.41	8.02	9.03	8.21	8.01	8.10
	5	7.34	7.87	8.17	8.14	7.95	8.03
	7	7.21	7.75	7.74	7.89	7.83	7.93

[a] = ตรวจไม่พบเซลล์ที่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 การศึกษาผลของการปรับตัวด้วยกรดและกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำสลัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ทั้ง 2 ซ้ำ

ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)		จำนวนเซลล์(CFUต่อมิลลิลิตร)							
		B. lactis				*L. casei*			
		NE[a]	AE[b]	NN[c]	AN[d]	NE	AE	NN	AN
ซ้ำที่ 1	0	$2.5x10^6$	$5.9x10^6$	$1.1x10^6$	$5.2x10^6$	$3.2x10^6$	$5.1x10^6$	$3.8x10^6$	$5.0x10^6$
	1	$2.8x10^6$	$3.4x10^6$	$<10^3$	$<10^3$	$6.6x10^6$	$5.1x10^6$	$4.2x10^6$	$3.6x10^6$
	2	$2.8x10^6$	$5.9x10^6$	$<10^3$	$<10^3$	$3.6x10^6$	$6.1x10^6$	$2.8x10^6$	$2.6x10^6$
	4	$1.6x10^6$	$4.8x10^6$	<10	<10	$1.0x10^6$	$5.4x10^6$	$2.0x10^6$	$1.5x10^6$
ซ้ำที่ 2	0	$4.3x10^6$	$4.4x10^6$	$1.3x10^6$	$2.0x10^6$	$7.9x10^6$	$3.7x10^6$	$5.9x10^6$	$4.4x10^6$
	1	$2.2x10^6$	$4.7x10^6$	$<10^3$	$<10^3$	$7.4x10^6$	$4.5x10^6$	$2.6x10^6$	$2.6x10^6$
	2	$1.0x10^6$	$5.1x10^6$	$<10^3$	$<10^3$	$8.3x10^6$	$4.0x10^6$	$3.9x10^6$	$2.9x10^6$
	4	$1.5x10^6$	$4.8x10^6$	<10	<10	$4.7x10^6$	$3.8x10^6$	$1.6x10^6$	$2.5x10^6$

[a] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[b] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[c] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

[d] น้ำสลัดที่เติมเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับตัวด้วยกรดและไม่ผ่านการไมโครเอนแคปซูเลชัน

ตารางที่ 13 ค่าพีเอชของน้ำสลัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ทั้ง 2 ซ้ำ

ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)		ค่าพีเอช							
		B. lactis				*L. casei*			
		NE[a]	AE[b]	NN[c]	AN[d]	NE	AE	NN	AN
ซ้ำที่ 1	0	3.55	3.50	3.55	3.55	3.35	3.55	3.55	3.55
	1	3.55	3.55	3.65	3.65	3.45	3.55	3.60	3.55
	2	3.39	3.39	3.40	3.40	3.20	3.40	3.40	3.40
	4	3.65	3.60	3.65	3.65	3.50	3.65	3.65	3.65
ซ้ำที่ 2	0	3.40	3.50	3.55	3.55	3.40	3.40	3.55	3.55
	1	3.45	3.55	3.60	3.55	3.40	3.40	3.66	3.55
	2	3.25	3.30	3.40	3.40	3.20	3.30	3.40	3.40
	4	3.50	3.55	3.65	3.65	3.45	3.50	3.65	3.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ข้อมูลการทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 ซ้ำโดยใช้ผู้ชิม 20 คน

ผู้ชิม	ซ้ำ	คะแนนของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส[a]						
		ลักษณะปรากฏ	สี	ลักษณะเนื้อสัมผัส	กลิ่น	ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความชอบรวม
ทรีตเมนต์ 1 คือ น้ำสลัดที่ไม่ใส่เชื้อ *L. casei*								
1	1	8	9	8	8	8	7	8
	2	8	9	8	8	8	7	8
2	1	8	8	8	8	7	7	7
	2	8	8	8	7	7	8	8
3	1	8	8	8	8	8	7	8
	2	8	8	8	7	8	8	8
4	1	8	9	8	9	8	7	8
	2	8	9	9	9	8	8	9
5	1	8	8	9	7	6	7	7
	2	7	8	8	7	6	6	7
6	1	7	9	7	8	9	8	8
	2	8	9	8	7	9	8	8
7	1	7	6	7	5	4	6	7
	2	7	6	7	5	4	5	7
8	1	7	8	8	7	8	8	8
	2	8	8	8	8	7	8	8
9	1	7	7	6	7	7	6	7
	2	7	7	7	6	7	8	8
10	1	8	7	7	5	7	6	7
	2	8	7	7	5	7	6	7
11	1	7	7	7	4	5	6	7
	2	4	4	4	6	7	7	8
12	1	7	8	8	7	8	8	8
	2	8	8	8	7	8	7	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 (ต่อ) ข้อมูลการทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 ซ้ำโดยใช้ผู้ชิม 20 คน

ผู้ชิม	ซ้ำ	คะแนนของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส[a]						
		ลักษณะปรากฏ	สี	ลักษณะเนื้อสัมผัส	กลิ่น	ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความชอบรวม
13	1	7	7	8	7	8	8	8
	2	7	7	7	7	7	8	7
14	1	8	7	7	7	8	8	8
	2	7	7	7	7	7	8	7
15	1	8	8	7	5	6	5	8
	2	5	5	5	5	4	5	5
16	1	4	9	4	9	9	8	7
	2	8	8	7	5	5	3	7
17	1	7	8	6	5	6	6	6
	2	7	7	6	5	6	6	6
18	1	5	7	7	8	8	9	9
	2	7	7	7	6	6	6	7
19	1	6	7	7	6	7	7	8
	2	7	6	7	5	6	6	6
20	1	8	8	9	7	8	7	8
	2	8	8	9	8	8	8	8
ทรีตเมนต์ 2 คือ น้ำสลัดที่ใส่เชื้อ *L. casei* ที่ผ่านกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชัน								
1	1	8	8	8	7	8	7	8
	2	8	8	7	7	8	7	8
2	1	7	8	7	8	8	8	8
	2	7	7	8	7	8	7	7
3	1	7	7	6	7	7	7	7
	2	7	7	7	8	8	7	7
4	1	8	9	7	9	8	8	8
	2	7	8	7	9	7	7	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 (ต่อ) ข้อมูลการทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 ซ้ำโดยใช้ผู้ชิม 20 คน

ผู้ชิม	ซ้ำ	คะแนนของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส*						
		ลักษณะปรากฏ	สี	ลักษณะเนื้อสัมผัส	กลิ่น	ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความชอบรวม
5	1	4	6	4	7	3	3	4
	2	6	6	5	7	6	6	6
6	1	5	7	5	8	9	8	7
	2	5	7	6	7	9	8	7
7	1	7	8	7	7	7	6	8
	2	7	6	6	5	7	7	8
8	1	7	6	8	7	8	8	7
	2	8	7	8	8	8	8	8
9	1	6	6	6	7	4	4	6
	2	6	6	6	7	4	4	4
10	1	6	7	4	5	7	6	6
	2	6	7	4	5	7	6	6
11	1	4	4	7	7	7	6	6
	2	7	7	7	6	6	6	7
12	1	6	6	6	6	7	5	6
	2	6	6	6	6	6	5	6
13	1	7	6	4	4	4	6	8
	2	6	6	6	7	4	4	5
14	1	7	7	7	7	7	7	7
	2	6	6	6	7	6	6	7
15	1	8	7	5	4	5	5	7
	2	5	5	5	5	4	5	5
16	1	8	7	7	2	8	9	8
	2	6	4	1	1	2	2	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 (ต่อ) ข้อมูลการทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 ซ้ำโดยใช้ผู้ชิม 20 คน

ผู้ชิม	ซ้ำ	คะแนนของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส[a]						
		ลักษณะปรากฏ	ลักษณะเนื้อสัมผัส			ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความชอบรวม
			สี		กลิ่น			
17	1	7	6	7	5	6	8	7
	2	4	6	4	5	4	6	4
18	1	5	6	6	7	6	7	8
	2	4	4	4	6	4	4	6
19	1	7	7	6	6	7	6	7
	2	5	6	5	5	7	6	6
20	1	7	7	6	8	8	8	7
	2	6	6	6	7	7	7	7

[a]คะแนนที่ได้รับ (9 หมายถึง ชอบมากที่สุด; 8: ชอบมาก; 7: ชอบปานกลาง; 6: ชอบเล็กน้อย; 5: บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ; 4: ไม่ชอบเล็กน้อย; 3: ไม่ชอบปานกลาง; 2: ไม่ชอบมาก และ 1: ไม่ชอบมากที่สุด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้