1730

พ้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

T096546

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อัตราการรอดชีวิตของบิฟิโดแบคทีเรียที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ไอศกรีม และในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

(Survival rate of *Bifidobacterium* cells encapsulated in konjac - pectin gel beads in orange juice , ice-cream and in simulated gastrointestinal tract)

จัดทำโดย

นางสาวกองกัญจน์ เปี่ยมด้วยธรรม รหัสนักศึกษา **46041046**

นางสาวจุฑาภรณ์ ปาลคะเชนทร์ รหัสนักศึกษา **46041051**

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 28 / 3 / 50 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ดร. ศศิวิมล ชิ่นอิ่ม อาเหม็ด)

สน.
ก344อ
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 95546
วัน.เดือน.ปี.....

b.....
.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อัตราการรอดชีวิตของบิฟิโดแบคทีเรียที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ไอศกรีม และในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

(Survival rate of *Bifidobacterium* cells encapsulated in konjac - pectin gel beads in orange juice , ice-cream and in simulated gastrointestinal tract)

จัดทำโดย

นางสาวกองกัญจน์ เปี่ยมด้วยธรรม รหัสนักศึกษา **46041046**

นางสาวจุฑาภรณ์ ปาลคะเชนทร์ รหัสนักศึกษา **46041051**

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

ดร. ศศิวิมล ชิ่นอิ่ม อาเหม็ด

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กองกัญจน์ เปี่ยมด้วยธรรม และ จุฑาภรณ์ ปาลคะเชนทร์. 2549 : อัตราการรอดชีวิตของบิฟิโดแบคทีเรียที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ไอศกรีม และในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร (Survival rate of *Bifidobacterium* cells encapsulated in konjac-pectin gel beads in orange juice , ice-cream and in simulated gastrointestinal tract).
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด : 72 หน้า

บทคัดย่อ

การเคลือบเซลล์ (encapsulation) เป็นกระบวนการที่เซลล์ถูกห่อหุ้มหรือกักเก็บไว้ภายในเยื่อหุ้ม (encapsulating membrane) เพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์หรือปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงในระหว่างกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร รวมถึงในระหว่างการเคลื่อนผ่านระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ การทดลองนี้ได้ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน (emulsion) และเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำส้ม เป็นเวลา 20 วัน และ ไอศกรีม 56 วัน พบว่าเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 87.56% และ 87.42% ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มและไอศกรีม ตามลำดับ และจากการทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่สภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร ที่ pH 2 และ pH 4 และที่ความเข้มข้นของน้ำดี (bile salt 1%) พบว่าเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คิดเป็น 61.21% ที่ pH 2 และ 92.14% ที่ pH 4

กองกัญจน์ เปี่ยมด้วยธรรม ..... จุฑาภรณ์ ปาลคะเชนทร์ .....

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา** 28/3/58 **วัน /เดือน / ปี**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง อัตราการรอดชีวิตของบิฟิโดแบคทีเรียที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ไอศกรีม และในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารนี้ได้สำเร็จลงด้วยดี ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีมาค่าคอยแนะนำ ให้คำปรึกษาและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี รวมทั้ง แก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณพ่อและแม่ ที่คอยให้กำลังใจ รวมทั้งขอบคุณพี่ทราย (นางสาวสวรรยา เม้งเกร็ด) และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

12 มีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ก

กิตติกรรมประกาศ ข

สารบัญ ค

สารบัญตาราง ช

สารบัญภาพ ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 3

2.1 โพรไบโอติก (Probiotic) 3

2.1.1 หลักเกณฑ์ที่ใช้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก 5

2.1.1.1 ด้านลักษณะทั่วไป 5

2.1.1.2 ด้านความคงทนในสภาวะต่างๆ และสมบัติทางกายภาพ 5

2.1.1.3 ด้านบทบาทหน้าที่ 6

2.1.2 การทำงานของโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย 6

2.1.2.1 การสร้างกรดแลคติก โดยจุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*)และกลุ่มสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) 6

2.1.2.2 การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 6

2.1.2.3 การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) 6

2.1.2.4 การสร้างเอนไซม์แลคเตส 6

2.1.2.5 การสร้างวิตามินบี 6

2.1.2.6 การแข่งขันกับเชื้อก่อให้เกิดโรค การเกาะยึด การยึดติดหรือการอยู่รวมกันภายในระบบทางเดินอาหาร 7

2.1.3 การใช้เชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร 7

2.2 บิฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ประโยชน์ของ *Bifidobacterium* spp. 8
2.2.1.1 รักษาสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร 8
2.2.1.2 บรรเทาอาการแพ้น้ำตาลแลคโตส 8
2.2.1.3 ลดระดับปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือด 8
2.2.1.4 สังเคราะห์วิตามินบีได้หลายชนิด 8
2.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตกับเชื้อจุลินทรีย์โพรไบติกทั้งสองชนิด 8
2.2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของบิฟิโดแบคทีเรีย 8
2.3 เทคนิคการเคลือบเซลล์ (Encapsulation) 9
2.3.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion) 10
2.3.2 เทคนิคอิมัลชัน (Emulsion) 10
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการเคลือบเซลล์ 12
2.4.1 บุก (Konjac glucomannan) 12
2.4.2 เพคติน (Pectin) 13
บทที่ 3 วัสถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง 15
3.1 วัตถุดิบ 15
3.2 สารเคมี 15
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 16
3.4 วิธีการทดลอง 17
3.4.1 การเตรียมเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 17
3.4.2 การเตรียมบุก 1.5% 17
3.4.3 การเตรียมเพคติน 6% 17
3.4.4 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม และไอศกรีม 17
3.4.4.1 การเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลบุก โดยวิธีอิมัลชัน 17
3.4.4.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม 18
3.4.4.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม และไอศกรีม 19
3.4.5.1 การเคลือบเชื้อเซลล์ โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน 19
3.4.5.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม 19
3.4.5.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม 19
3.4.6 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และ วิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ 20
3.4.7 ศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์บิฟิโดแบคทีเรียด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน 20
3.4.7.1 ขนาดของเม็ดเจล 20
3.4.8 ศึกษาลักษณะภายนอกและภายในของเม็ดเจลโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) 20

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 22
4.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม 22
4.2 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม 24
4.3 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร 27
4.4 ลักษณะและขนาดของเม็ดเจลบุกผสมเพคตินที่ได้จากการเคลือบเซลล์ Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน 29
4.4.1 ขนาดของเม็ดเจล 29
4.4.2 ลักษณะภายนอกและภายในของเม็ดเจล 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 32
5.1 สรุปผลการทดลอง 32
5.2 ข้อเสนอแนะ 32
เอกสารอ้างอิง 33
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและวิเคราะห์ทางเคมี 38
ก.1. การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา 38
ก.1.1 การวิเคราะห์จำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย 38
ก.1.1.1 การเตรียมสารละลายกลูโคส 20% 38
ก.1.1.2 การเตรียมสารละลาย 2% LiCl 38
ก.1.1.3 การเตรียมสารละลาย 0.01% Dichloxallin 39
ก.1.1.4 การเตรียมสารละลาย 10% Cysteine hydrochloride 39
ก.1.1.5 การเตรียม 0.1% peptone solution 39
ก.1.2 วิธีวิเคราะห์ 39
ก.1.2.1 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธี plate count 39
ก.1.2.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธี plate count 39
ก.1.2.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ 40
ก.2. การวิเคราะห์ทางเคมี 40
ก.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์กรด 40
ก.2.1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N 40
ก.2.1.2 ฟีนอล์ฟทาลีน 1% 40
ก.2.2 วิธีวิเคราะห์ 41
ภาคผนวก ข ผลการตรวจนับเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (Bb-12) 42
ข.1 ผลน้ำส้ม 42
ข.1.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar 42
ข.2 ผลไอศกรีม 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar 45
ข.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ 49
ข.4 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตหาปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ และที่ผ่านการเคลือบเซลล์ 50
ข.4.1 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม 50
ข.4.2 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม 53
ข.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% 57
ข.6 การคำนวณปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต 66
ข.7 การคำนวณเปอร์เซ็นต์กรด 66
ข.8 การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน 67
ภาคผนวก ค การเตรียมไอศกรีมรสนม 68
ค.1. การเตรียมส่วนผสม 68
ค.2. ขั้นตอนการผลิต 68
ภาคผนวก ง รูปภาพ 69
ประวัติผู้เขียน 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น	23
4.2 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส	25
4.3 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร (pH เท่ากับ 2)	28
4.4 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร (pH เท่ากับ 4)	29
ข.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)	42
ข.2 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 2 (วันที่ 4)	43
ข.3 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)	43
ข.4 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 4 (วันที่ 16)	44
ข.5 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 5 (วันที่ 20)	44
ข.6 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)	45
ข.7 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 2 (วันที่ 7)	45
ข.8 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 3 (วันที่ 14)	46
ข.9 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 4 (วันที่ 21)	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.10 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 5 (วันที่ 28) 47

ข.11 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 6 (วันที่ 35) 47

ข.12 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 7 (วันที่ 42) 48

ข.13 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 8 (วันที่ 49) 48

ข.14 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 9 (วันที่ 56) 49

ข.15 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่ pH 2 49

ข.16 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่ ที่ pH 4 50

ข.17 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 1 (วันที่ 0) 50

ข.18 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 2 (วันที่ 4) 51

ข.19 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 3 (วันที่ 12) 51

ข.20 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 4 (วันที่ 16) 52

ข.21 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 5 (วันที่ 20) 52

ข.22 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 1 (วันที่ 0) 53

ข.23 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 2 (วันที่ 7) 53

ข.24 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 3 (วันที่ 14) 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.25 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 4 (วันที่ 21) 54
ข.26 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 5 (วันที่ 28) 55
ข.27 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 6 (วันที่ 35) 55
ข.28 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 7 (วันที่ 42) 56
ข.29 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 8 (วันที่ 49) 56
ข.30 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมครั้งที่ 9 (วันที่ 56) 57
ข.31 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 57
ข.32 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน 58
ข.33 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 58
ข.34 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 58
ข.35 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน 59
ข.36 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 59
ข.37 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.38 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีอิมัลชัน 60

ข.39 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 61

ข.40 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 61

ข.41 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีอิมัลชัน 62

ข.42 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 62

ข.43 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 63

ข.44 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีอิมัลชัน 63

ข.45 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 64

ข.46 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ 64

ข.47 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน 65

ข.48 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.49 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน จำนวน 50 เม็ด 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร	5
2.2 ลักษณะของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย	9
2.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium lactis* Bb-12)	9
2.4 กระบวนการเคลือบเซลล์โดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชันและอิมัลชัน	11
3.1 การเคลือบเซลล์ด้วยวิธีเอ็กทรูชัน (extrusion)	19
4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน	23
4.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน	24
4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่เติมเชื้อ Bb-12 และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง(-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน	26
4.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง(-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน	27
4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงลักษณะรูปร่างของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน	30
4.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงพื้นผิวภายนอกของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ *Bifidobacterium* Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน	30
4.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงภาพตัดขวางของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน	31
ง.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Beckman)	69
ง.2 สารละลายบุกและเพคติน	69
ง.3 เชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชัน	70
ง.4 เชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน	70
ง.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Bb-12	71
ง.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ในร่างกายมนุษย์มีเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด อาศัยอยู่ในลำไส้ตั้งแต่เกิด ทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ให้โทษ คือเมื่อย่อยอาหารแล้วจะให้สารพิษแก่ร่างกาย และจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ซึ่งเรียกว่า โพรไบโอติก (Probiotic) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus* *Enterococcus* และ *Bifidobacterium*

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ ซึ่งมีจุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นส่วนประกอบออกมาจำหน่าย แต่มีรายงานบ่งชี้ว่าอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ยังมีปริมาณค่อนข้างต่ำ (Svensson, 1999) รวมถึงการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ก็ยังเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคอาจไม่ได้รับประโยชน์จากจุลินทรีย์ดังกล่าวอย่างแท้จริง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีชีวิตอยู่ได้โดยสามารถต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคการเคลือบเซลล์ (encapsulation) จุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ อัลจิเนต (Alginate) คาราจีแนน (Caragenan) กัม (gum) และแป้ง (starch) เป็นต้น โดยทั่วไปการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) และวิธีอิมัลชัน (emulsion) ในงานวิจัยนี้มีความสนใจในการนำบุกมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับเพคติน และเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันและเอ็กซ์ทรูชัน ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ไอศกรีม และระบบทางเดินอาหาร ทั้งบุกและเพคตินจัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additives) ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ นอกจากนี้บุกและเพคตินยังประกอบด้วยใยอาหารที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ การใช้บุกและเพคตินเป็นสารเคลือบโพรไบโอติก เพื่อปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความเป็นกรด pH และที่อุณหภูมิแช่แข็งในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้การเติมบุกผสมเพคตินยังสามารถเพิ่มใยอาหารแก่ผลิตภัณฑ์อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันและเอ็กซ์ทรูชัน เทียบกับเซลล์อิสระในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม และไอศกรีม
2. เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชัน และ เอ็กซ์ทรูชัน เทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร
3. เพื่อศึกษาลักษณะภายนอกและภายในของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติก(Probiotic) เป็นคำในภาษากรีกที่มีความหมายว่า "เพื่อชีวิต" คำนี้เริ่มรู้จักกันดีมาเป็นเวลานานตั้งแต่ในศตวรรษที่ 20 Metchnikoff (1908) ได้รายงานเกี่ยวกับการมีสุขภาพที่ดีและอายุยืนของชาวบัลแกเรีย โดยให้เหตุผลว่า เพราะชาวบัลแกเรียนิยมบริโภคนมซึ่งผ่านการหมัก (Fermentation milk product) กันมาก ซึ่งเขาได้แยกเชื้อจุลชีพจากนมชนิดนี้ขึ้นมาหนึ่งชนิด ตั้งชื่อว่า บาซีลัส บัลแกริคัส (*Bacillus bulgaricus*) และภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็นแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส (*Lactobacillus bulgaricus*) หลังจากนั้นได้มีนักวิทยาศาสตร์มากมายพยายามที่จะให้คำจำกัดความของโพรไบโอติก แต่ก็ไม่เป็นที่ยอมรับมากนัก จนกระทั่งในปี 1989 นักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อว่า Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกที่มีความหมายเหมาะสมไว้ว่า โพรไบโอติก คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่ให้อาศัย โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ คำจำกัดความของเขาได้รับการยอมรับและถูกใช้เป็นคำจำกัดความของโพรไบโอติกมาจนถึงปัจจุบัน

โพรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตใช้เสริมลงในอาหาร สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (Fuller, 1992) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมีหลายชนิด ได้แก่ บิฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) เช่น *B. lactis* *B. bifidum* และ*B. longum* แลคโตบาซิลไล (Lactobacilli) เช่น *L. acidophilus* *L . johnsonii* *L. rhamnosus* และ*L. casei* เป็นต้น และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces boulardii* (วรรณพร, 2547) จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก ได้แก่ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* เป็นต้น

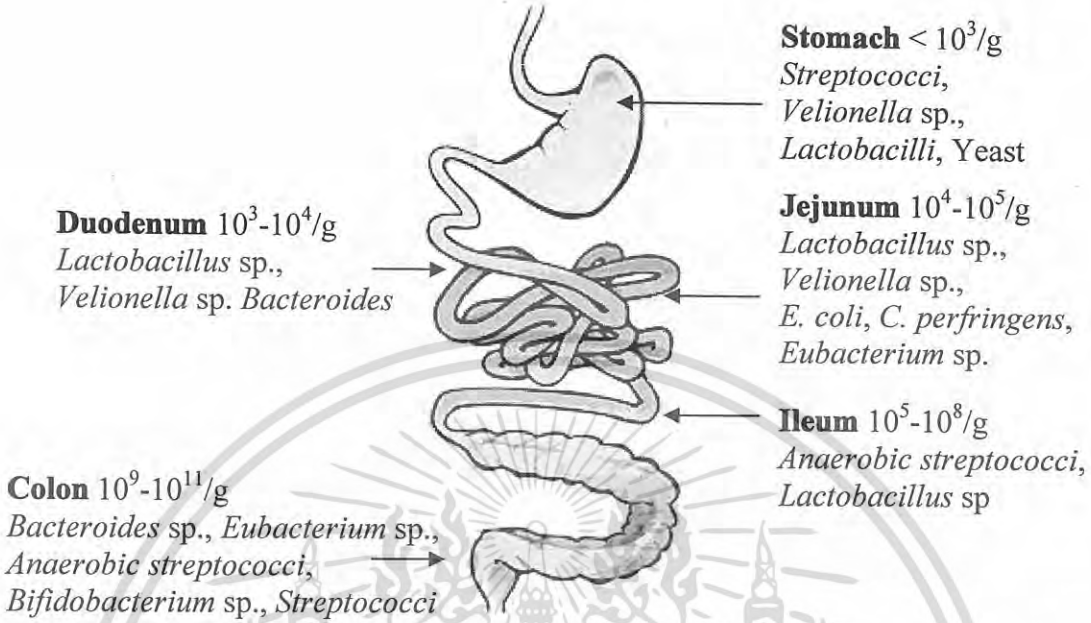
Gilliland และ Speck (1977) รายงานว่า การเติมแบคทีเรียแลคติก เช่น *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* เจริญในนมร่วมกับ *L. acidophilus* และ Bifidobacteria ช่วยสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเหล่านี้ได้ดีขึ้น สามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ในระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่มีประโยชน์ เช่น วิตามิน K และวิตามิน B ซึ่งวิตามินเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโคเอนไซม์ (coenzyme) หลายชนิดที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอาหาร สามารถย่อยเส้นใยอาหารที่ไม่ถูกย่อยที่ลำไส้เล็กให้เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกรดบิวทีริก ทำให้ค่า pH ของลำไส้ส่วนปลายลดลง (ธารารัตน์, 2542) สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันโรค (ลินนา, 2542) จุลินทรีย์โพรไบโอติกสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีปัญหาไม่สามารถบริโภคนมได้เพราะขาดเอนไซม์แลคเตส หรือเรียกว่า lactose intolerance นอกจากนี้จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารก่อมะเร็งจากสารที่ไม่ออกฤทธิ์ให้อยู่ในรูปที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา ดังนั้นจึงอาจช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Gilliland, 1977) จากประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีผลดีต่อสุขภาพ และเป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถใช้แหล่งอาหารจากนม เช่น น้ำตาลแลคโตส โดยเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติก จึงมีการศึกษาการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาเสริมในผลิตภัณฑ์นมหมักเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ ในหลายประเทศได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตควรมีแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตมากกว่า 10^6 ถึง 10^8 CFU/mL ตลอดอายุการเก็บรักษา จึงจะก่อให้เกิดประโยชน์ดังกล่าวแก่ผู้บริโภค (Birollo *et al.*, 2000)

อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาถึงจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตอยู่ภายในผลิตภัณฑ์พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียต่ำกว่ามาตรฐาน (Dave and Shah, 1996) เนื่องจากอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ กล่าวคือ สภาวะความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์นมหมัก (Klaver *et al.*, 1993) ค่า pH (Martin and Chou, 1992) ความเข้มข้นของกรดแลคติกและกรดอะซิติก (Samona and Robinson, 1994) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในผลิตภัณฑ์ (Dave and Shah, 1996) Ravula และ Shah (1998) พบว่าค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (post acidification) อันเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนลดลง 10^5 ถึง 10^6 CFU/mL ภายใน 8–12 สัปดาห์ นอกจากนี้กระบวนการผลิตและสภาวะในการเก็บรักษา เช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง ในระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหาร ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์อ่อนแอลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

ที่มา : www.glycoscience.org/glycoscience/document_viewer.wm

2.1.1 หลักเกณฑ์ที่ใช้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก (ศริสา, 2548)

2.1.1.1 ด้านลักษณะทั่วไป

1) การคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้กับมนุษย์นั้นควรมีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์

2) สายพันธุ์ที่ใช้ต้องมีความปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์โดยมีการทดสอบเพื่อใช้กับมนุษย์และมีการรับรองผลที่เกี่ยวกับสุขภาพทางด้านการบำบัดรักษาที่พิสูจน์ได้

3) เลือกสายพันธุ์ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่มีกลไกการส่งผ่านพลาสมิด (plasmid) ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และไม่ส่งผ่านยีนที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ

4) ไม่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) เป็นพิษ หรือมีปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในอวัยวะต่างๆ รวมทั้งมีประวัติที่เกี่ยวข้องกับโรค เช่น โรคติดเชื้อเยื่อบุหัวใจอักเสบ หรือโรคระบบทางเดินอาหารผิดปกติ เป็นต้น

2.1.1.2 ด้านความคงทนในสภาวะต่างๆ และสมบัติทางกายภาพ

1) ต้องรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ตอนบนทนต่อกรด และน้ำดี ยึดเกาะในส่วนของเยื่อบุผิวลำไส้ได้ และแพร่ขยายพันธุ์ในลำไส้อย่างน้อยที่สุดชั่วระยะเวลาหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ในระหว่างการใช้งานในกระบวนการแปรรูปและภายใต้สภาวะการเก็บรักษา เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกต้องมีชีวิตและมีความคงตัว

2.1.1.3 ด้านบทบาทหน้าที่

1) ผลิตสารต่อต้านจุลชีพ และออกฤทธิ์ต่อต้านสารที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุหรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen)

2) มีกิจกรรมต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Helicobacter pylori Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium difificile* เป็นต้น และมีคุณสมบัติต่อต้านการกลายพันธุ์ และต่อต้านสารก่อมะเร็ง รวมทั้งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ดีในผลิตภัณฑ์

3) ต้องให้ประโยชน์แก่ผู้ที่ให้ที่อยู่อาศัย (host) และต้องขยายระดับการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

2.1.2 การทำงานของโพรไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (ศิริสา, 2548)

2.1.2.1 การสร้างกรดแลคติก โดยจุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และกลุ่มสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) เป็นปัจจัยหนึ่งในหลายๆ ปัจจัยที่เป็นประโยชน์ในการทำงานของจุลินทรีย์เหล่านี้โดยการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง(pH) ในระบบทางเดินอาหารให้คงที่ได้

2.1.2.2 การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นตัวทำลายเชื้อก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น จุลินทรีย์ *C. perfringens* และ *E. coli* จะถูกทำลายจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้

2.1.2.3 การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และสเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) บางสายพันธุ์ที่โดดเด่นได้ถูกนำมาสาธิตในห้องทดลองทางวิทยาศาสตร์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus lactolin* จะสามารถสร้างสารฆ่าเชื้อก่อให้เกิดโรคในร่างกาย เมื่อมันเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหาร

2.1.2.4 การสร้างเอนไซม์แลคเตส โพรไบโอติกอาจเกี่ยวข้องการสร้างน้ำย่อยในระบบการย่อยที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น ตัวอย่างเช่น แลคโตบาซิลลัสสามารถสร้างน้ำย่อยแลคเตส (Lactase) ได้ และทำงานในฐานะที่เอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันในระบบทางเดินอาหารในกระบวนการย่อยอาหาร (Brush borderenterocycle enzymes) (Fuller, 1989)

2.1.2.5 การสร้างวิตามินบี จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นผู้ผลิตวิตามินบีหลายชนิดรวมถึงสารที่ช่วยในระบบการย่อยได้ในลำไส้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกายในการเสริมสร้างการเจริญเติบโตของมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.6 การแข่งขันกับเชื้อก่อให้เกิดโรค การเกาะยึด การยึดติดหรือการอยู่รวมกันภายในระบบทางเดินอาหารเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ในการพยายามที่จะอยู่ร่วมกันในพื้นที่พิเศษของลำไส้ จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีบทบาทในการขัดขวางเชื้อก่อให้เกิดโรค (Pathogen) จากการเกาะติดหรือรวมตัวกันในบริเวณทางเดินอาหาร หรือมีบทบาทในการป้องกันการเกาะติดโดยตรงของเชื้อโรคกับผนังทางเดินระบบทางเดินอาหาร (Fuller, 1989)

2.1.3 การใช้เชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร (ศริสา, 2548)

อาหารที่มีเชื้อโพรไบโอติกเป็นองค์ประกอบที่ใช้สำหรับการบริโภคของมนุษย์มีออกจำหน่ายในประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี ค.ศ. 1920 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. casei* โดยใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์นมหมัก ปัจจุบันมีการเพิ่มความหลากหลายของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกให้มีความหลากหลายขึ้น แต่ในผลิตภัณฑ์นมหมักยังคงเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้เป็นตัวกลางในการส่งผ่านเชื้อโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ อีก เช่น อาหารสำหรับทารก เนยแข็ง เครื่องดื่มจากเวย์ ซุปผลไม้ น้ำผลไม้ และยังใช้ในการเกสัชกรรมด้วย (Hekmat and McMahon, 1992) จากผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่กล่าวถึงบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการตลาดของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในอนาคต สำหรับในปัจจุบันแบคทีเรียที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อการค้าเป็นหลักนั้นโดยส่วนมาก คือ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ในตระกูล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งสิ่งที่ได้รับความสนใจในการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหาร คือ การเหลือรอดชีวิตของเชื้อและประโยชน์ที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพ เป็นต้น (Svensson *et al*., 1999)

2.2 บิฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria)

เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งที่มีหลายรูปแบบ เช่น แท่งสั้น แท่งยาว เซลล์ผอมหรือมีปลายเรียวแหลม (point end) เป็นต้น และยังจัดเป็นแบคทีเรียประเภทไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ไม่เจริญเติบโตในสภาพที่มีออกซิเจน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37-41 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 6.5-7.0 ไม่เจริญที่ pH 4.5-5.0 หรือที่ 8.0-8.5 หมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดอะซิติกและกรดแลคติกในอัตราส่วน 3:2 ไม่สังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1900 โดย Harry Tissier แห่งสถาบันห้องปฏิบัติการปาสเตอร์ (Pasteur Laboratory) ในอุจจาระของเด็กทารก Bofodibacteria จะเริ่มเจริญเติบโตหลังจากทารกได้รับน้ำนมจากแม่ เนื่องจากน้ำนมมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N-acetylglucosamine เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดในวัยทารกจากนั้นจะมีปริมาณลดลงเมื่ออายุมากขึ้น

2.2.1 ประโยชน์ของ *Bifidobacterium* spp. (Huges & Hoover, 1991)

2.2.1.1 รักษาสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร เช่น ควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อโคลิฟอร์ม (coliform) Enterobacteria สูงสามารถต่อต้านการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ดี

2.2.1.2 บรรเทาอาการแพ้น้ำตาลแลคโตส อันเนื่องมาจากร่างกายไม่ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase ที่ย่อยน้ำตาลแลคโตส ซึ่งส่วนใหญ่พบในคนเชื้อชาติเอเชียและแอฟริกา

2.2.1.3 ลดระดับปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือด กลไกของการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของ Bifidobacteria ยังไม่แน่ชัด แต่มีการวิจัยที่ให้หนูกิน Bifidobacteria แล้วระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของหนูลดลง

2.2.1.4 สังเคราะห์วิตามินบีได้หลายชนิด เช่น วิตามินบีหนึ่ง บีสอง และบีหก รวมทั้งวิตามินเค เมื่ออาศัยอยู่ในลำไส้ วิตามินจะถูกดูดซึมอย่างช้าๆ เข้าสู่ร่างกาย

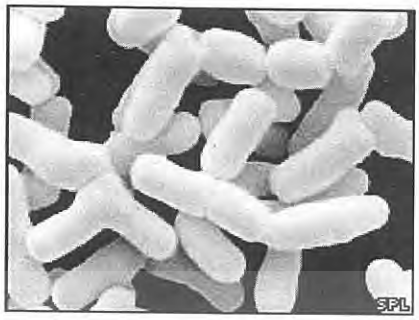
2.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตกับเชื้อจุลินทรีย์โพรไบติกทั้งสองชนิด

โดยปกติแล้วเชื้อ Bifidobacteria เพียงชนิดเดียวจะเจริญได้ไม่ดีนักในนม ถ้าไม่ได้ผสมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตลงไปด้วย การช่วยให้ Bifidobacteria เจริญได้ดีขึ้นอีกทางหนึ่งคือการผสมเชื้อแบคทีเรียแลคติกอีกชนิดหนึ่งให้เจริญร่วมด้วย จะช่วยให้เชื้อ Bifidobacteria เจริญได้ดีขึ้น เช่น *Streptococcus thermophilus* หรือ *Lactobacillus acidophilus* และเจริญร่วมกันของ Bifidobacteria กับ *Lactobacillus acidophilus* ยังมีการเกื้อหนุนกันในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตอีกด้วย (Huger and Peitersen, 1992)

2.2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของบิฟิโดแบคทีเรีย

บิฟิโดแบคทีเรียสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โคโลนีมีลักษณะผิวเกลี้ยงนูนโค้ง ขอบเรียบ ไม่เว้า สีครีม หรือสีขาว เนื้อโคโลนีนุ่ม สะท้อนเป็นเงาไม่ขุ่นมัว เมื่อย้อมสีแกรมติดสีแกรมบวก ไม่ติดสีแอซิดฟาสต์ (acid fast) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สายพันธุ์ที่แยกจากมนุษย์เจริญได้ที่อุณหภูมิ 36-38 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ที่แยกได้จากสัตว์เจริญที่อุณหภูมิ 41-43 องศาเซลเซียส โดยไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และไม่ทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 46 องศาเซลเซียส ส่วน pH ที่เหมาะสมในการเจริญเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 6.5-7.0 และไม่เจริญที่ pH ต่ำกว่า 5.0 หรือสูงต่ำ 8.0 (Scardovi, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย

ที่มา : http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/5253182.stm

ภาพที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium lactis* Bb-12)

ที่มา : http://users.utu.fi/artouwe/functionalfoods.html

2.3 เทคนิคการเคลือบเซลล์ (Encapsulation)

การเคลือบเซลล์ คือ กระบวนการที่เซลล์ถูกห่อหุ้มหรือกักเก็บไว้ภายในเยื่อหุ้ม (encapsulating membrane) เพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์หรือการสูญเสียของเซลล์จากสภาวะแวดล้อม วิธีเคลือบเซลล์ได้ถูกประยุกต์ใช้ในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติก สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก หรือการผลิตมวลเซลล์ (biomass production) สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นถึง 80-95% (Krasaekoopt *et al*., 2003) การเคลือบเซลล์จัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องตัวเซลล์ไว้ภายในไฮโดรคอลลอยด์เม็ดเจล ช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกภายในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร (Rao *et al*., 1989) แบ่งประเภทตามวิธีการที่ใช้เคลือบเซลล์ได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion)

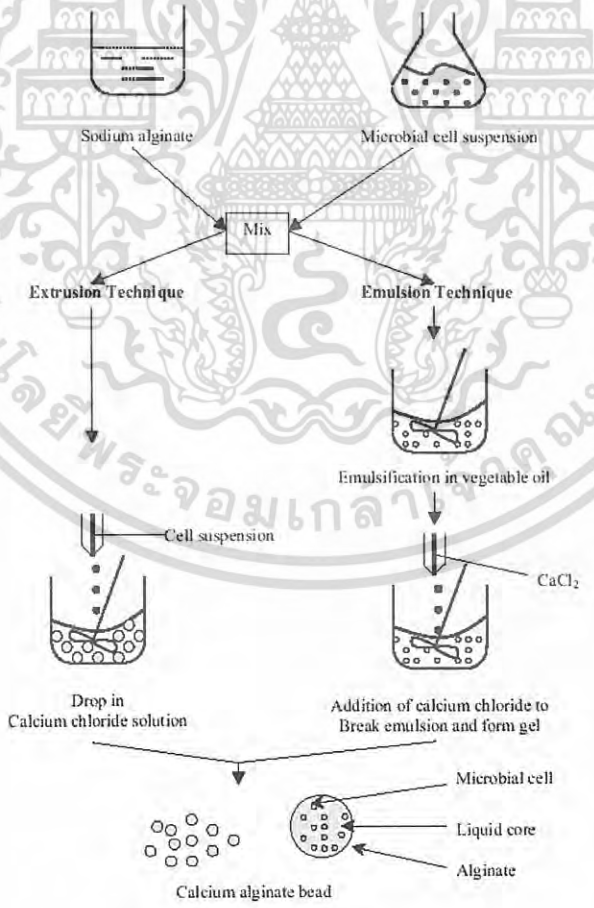
เทคนิคเอ็กซ์ทรูชันเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดและเป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งอาศัยการฟอร์มเม็ดเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เริ่มจากมีการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์และเติมจุลินทรีย์ลงไป จากนั้นขับเซลล์ให้ไหลออกจากรูของเข็มฉีดยาในรูปของหยดสารละลายและทำให้แข็งตัวหรือขึ้นรูปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม และระยะห่างของหยดแต่ละหยด วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากง่าย สะดวก ราคาถูก และไม่มีสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น ความร้อนหรือแรงเฉือน เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจะถูกหยดลงในสารละลายที่มีประจุบวกมาก (โดยทั่วไปใช้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในรูปของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์) และเกิดการฟอร์มเป็นเม็ดเจลในทันที การดักจับเซลล์ของอัลจิเนตจะอยู่ในรูปโครงสร้างที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติที่มีการเชื่อมของพันธะไอออนิก การเคลือบเซลล์จะให้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับตัวที่ใช้ในการดักจับ (entrapped material) โดยมีราคาถูก ใช้งานง่าย และเข้ากันได้ (biocompatibility) กับสิ่งมีชีวิต (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

2.3.2 เทคนิคอิมัลชัน (Emulsion)

เทคนิคนี้ของผสมระหว่างเซลล์กับโพลีเมอร์จะถูกเติมลงในน้ำมันพืช (continuous phase) เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันคาโนลา (canola oil) และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจนอยู่ในรูปของอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) ซึ่งประกอบด้วย 2 เฟส ได้แก่ เฟสน้ำ (internal phase) กับ เฟสน้ำมัน (continuous phase) โดยที่เฟสน้ำจะมีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าเฟสน้ำมัน ซึ่งเฟสน้ำจะประกอบด้วยวัตถุดิบที่ใช้เคลือบกับจุลินทรีย์อยู่ในรูปของอนุภาคเม็ดเจลเล็กๆ ภายในเฟสน้ำมัน การที่จะทำให้เฟสน้ำกลายเป็นเม็ดเจลได้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เคลือบ เม็ดเจลจะถูกเก็บเกี่ยวหลังจากขั้นตอนนี้โดยการกรอง หรือหมุนเหวี่ยง ขนาดของเม็ดเจลจะถูกควบคุมโดยความเร็วของการกวน (agitation speed) และสามารถผันแปรได้ระหว่าง 25 ไมโครเมตร และ 2 มิลลิเมตร เทคนิคนี้เหมาะกับการเคลือบเซลล์แบคทีเรียแลคติก (Krasaekoopt *et al.*, 2003) การเติมอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) สามารถช่วยในการเกิดอิมัลชันที่ดีเพราะอิมัลซิไฟเออร์ช่วยลดแรงตึงผิว ทำให้ได้เม็ดเจลที่มีขนาดเล็กกว่าวิธีเอ็กซ์ทรูชัน สารอิมัลซิไฟเออร์โดยทั่วไปที่ใช้กันมากที่สุด คือ Tween 80 Sheu *et al.* (1993) ได้ทดลองใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 0.2% ร่วมกับโซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate) ความเข้มข้น 0.5% ในการเคลือบเซลล์ได้ขนาดเม็ดเจลเท่ากับ 25-35 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hansen *et al.* (2002) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *B. longum* ในผลิตภัณฑ์นมสูงขึ้นจากสภาพที่ถูกเคลือบด้วยเม็ดเจลของอัลจิเนต Picot และ Lacroix (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Bifidobacteria) ที่ถูกเคลือบในเวย์โปรตีน (whey-protein) เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการรอดชีวิตของ *B. breve* ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษาโยเกิร์ตเพิ่มขึ้น แสดงว่าการเคลือบเซลล์ทำให้อัตราการรอดชีวิตของ *B. breve* อยู่ผลิตภัณฑ์สูงขึ้น ซึ่งมีรายงานว่า Bifidobacteria หลากหลายสายพันธุ์สามารถถูกห่อหุ้ม (entrapped) ไว้ภายใน K-caragenan (Dinaker and Mistry, 1994; Adhikari *et al.*, 2000) และอัลจิเนตร่วมกับไคโตซานได้ (Krasaekoopt *et al.*, 2004) ดังนั้นการเคลือบเซลล์จึงช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิดมากขึ้น เช่น มายองเนส ไอศกรีม และเนยแข็ง (Kailasapathy and Chin, 2000) และเป็นหัวเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตโยเกิร์ตอย่างต่อเนื่อง โดยช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วย (Krasaekoopt *et al.*, 2003)



ภาพที่ 2.4 กระบวนการเคลือบเซลล์โดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชันและอิมัลชัน

ที่มา : Krasaekoopt *et. al.* (2003)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการเคลือบเซลล์

2.4.1 บุก (Konjac glucomannan)

บุกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amorphophallus konjac* เป็นพืชหัวพื้นเมืองของหลายประเทศในแถบทวีปเอเชีย มีต้นกำเนิดมาจากประเทศญี่ปุ่น จีน เป็นไม้เนื้ออ่อนมีหัวอยู่ใต้ดิน มีทั้งหมดประมาณ 90 ชนิด แต่เท่าที่พบในประเทศไทยมีไม่ต่ำกว่า 15 ชนิด (กัลยาณี, 2546) บุกถูกนำมาใช้เป็นอาหารมากกว่า 1,000 ปีแล้วในประเทศญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์บุกที่บริโภคผลิตโดยตรงจากผงบุกซึ่งนิยมนำผงบุกมาผลิตเป็นเส้น (vermicilli) หรือเป็นก้อน เป็นที่รู้จักกันดีในนามของคอนนิยากุ (Konnyaku) ประเทศไทยมีการปลูกบุกพันธุ์เนื้อทราย ซึ่งสามารถนำมาผลิตเป็นผงบุกที่มีคุณสมบัติของสารกลูโคแมนแนนเช่นเดียวกับบุกของญี่ปุ่น (บุปผา, 2535) อย่างไรก็ตามบุกของไทยได้รับการพัฒนาน้อยมาก เนื่องจากเป็นพืชป่าท้องถิ่น ดังนั้นจึงควรมีการส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากบุกให้มากขึ้น (กัลยาณี, 2546)

สารธรรมชาติที่มีอยู่ในบุก คือ สารกลูโคแมนแนน (glucomannan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 50-60% กลูโคแมนแนนเป็นแหล่งของเส้นใยอาหารที่สามารถละลายน้ำได้และเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ (soluble dietary fiber) กลูโคแมนแนนเป็นสายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีมวลโมเลกุลสูงประกอบด้วย น้ำตาลแมนโนส (mannose) และกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก ในอัตราส่วนโมลแมนโนสต่อกลูโคส คือ 3:2 โมเลกุลเส้นตรงของกลูโคแมนแนนนี้มีหมู่อะซิทิล (acetyl groups) กระจายอยู่อย่างไม่มีแบบแผน โดยจะพบหมู่อะซิทิล 1 กลุ่มต่อน้ำตาลกลูโคสหรือแมนโนส 19 หน่วย (Tye, 1991 ; Thomas, 1997)

ในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้บุกเป็นสารให้ความคงตัวชนิดไม่มีประจุ เช่น ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม และผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง และนมเปรี้ยว และป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ (www.glucomannan.com/gum.htm) นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดและเพิ่มบอดี้ให้กับผลิตภัณฑ์อาหารไขมันต่ำ เจลบุกมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเจลของโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ กล่าวคือ เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายบุกในสภาวะที่เป็นด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต และโพแทสเซียมคาร์บอเนตจะได้เจลบุกที่คงตัวที่อุณหภูมิสูง (thermal-irreversible gel) ซึ่งโดยปกติ สารละลายบุก จะไม่เกิดเป็นเจล เนื่องจากหมู่ acetyl อยู่ในโครงสร้าง แต่เมื่อให้ความร้อนในสภาวะที่ pH 9-10 จะเกิดโครงสร้างที่เป็นเจลขึ้นโดยเจลนี้จะมีความคงตัว แม้ว่าจะอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 100-200 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนจะไปกำจัดหมู่ acetyl ในโครงสร้างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายบุก (Tye, 1991) และการให้ความร้อนซ้ำแก่เจลบุกมีส่วนทำให้เจลมีความแข็งแรงและเสถียรภาพเพิ่มขึ้น (Thomas, 1997)

Wang และ He (2002) ได้ทดลองการใช้บุกเป็นส่วนผสมในไมโครแคปซูลร่วมกับอัลจิเนตและไคโตซานในการห่อหุ้มตัวยาเพื่อช่วยในการปลดปล่อยตัวยา (drug release) ในระบบทางเดินอาหาร พบว่าช่วยเพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยตัวยาเป็น 3 ชั่วโมง ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้น 0.1 N

Nussinovitch (2004) ศึกษาการใช้บุกและเพคติน หรือ อัลจิเนตร่วมกับสารไฮโดรคอลลอยด์อื่นๆ เช่น โลคัสบีนกัม และไฮดรอกซีเมทิลซึ่งได้เยื่อหุ้ม (hydrocolloid membrane) ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ –20 ถึง 90 องศาเซลเซียส

2.4.2 เพคติน (Pectin)

เพคตินเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติ สกัดได้จากพืชและผลไม้ส่วนใหญ่ เช่น พืชตระกูลส้มทุกชนิด แอปเปิ้ล องุ่น แครอท กล้วย ถั่วและบีท (beet) เป็นต้น โดยการทรีตด้วยกรดร้อน ซึ่งจะไฮโดรไลซ์โพรโตเพคติน (protopectin) ให้เป็นเพคติน เพคตินจัดเป็นเส้นใยอาหาร (soluble dietary fiber) ที่ละลายน้ำได้

เพคติน ประกอบด้วย กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) เป็นองค์ประกอบหลักต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-D-galacturonic acid และมี side chain เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น rhamnogalacturonan เกิดจากกรดกาแลกทูโรนิกเชื่อมด้วย L-rhamnopyranose โดยพันธะ 1,2-D-rhamnose (Schol and Voragen, 1996) กรดกาแลกทูโลนิกจะถูกเอสเทอริไฟด์บางส่วนด้วยหมู่เมทิลได้ ซึ่งโครงสร้างของเพคตินขึ้นอยู่กับแหล่งวัตถุดิบและกระบวนการสกัด Low methoxy pectin มี degree of esterification (DE) น้อยกว่า 50% สามารถฟอร์มเจลที่แข็งแรงด้วยปฏิกิริยาของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) หรือมัลติวาเลนท์แคทไอออน ซึ่งเชื่อมต่อกับสายของกรดกาแลกทูโรนิกเกิดเป็นแคลเซียมเพคติเนตไฮโดรเจล (calcium pectinate hydrogels) มีความเสถียรในสารละลายที่เป็นกรด เพคตินเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อทำหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ เป็นสารทำให้เกิดเจล (gelling agent) เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด (thickening agent) และเป็นสารให้ความคงตัว (Rolin, 1993)

Aydin และ Akbuga (1996) ได้ศึกษาการเตรียมเพคตินเจลที่ห่อหุ้มยา Atenolol และ Piroxicam ด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันใช้สารละลายเพคตินความเข้มข้น 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการฟอร์มเม็ดเจลของเพคตินขึ้นห่อหุ้มตัวยาไว้ ซึ่งประสบความสำเร็จในการใช้เพคตินห่อหุ้มตัวยาทั้งชนิดยาที่มีประจุบวกและยาที่มีประจุลบ เช่น ยา Atenolol และ Piroxicam ตามลำดับ

Sriamornsak และ Nunthanid (1998) ศึกษาการเตรียมเม็ดเจลแคลเซียมเพคติเนตที่ห่อหุ้มยา indomethacin โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของเพคติน ขนาดของเม็ดเจล ผลได้ของการกักเก็บตัวยา (drug loading) และพฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยา (drug release) ในสภาวะจำลอง (in-vitro) เพื่อใช้ขนส่งยาไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย

Sriamornsak *et al.* (2004) ศึกษาการเคลือบน้ำมันบริโภค (edible oil) ด้วยสารละลายเพคตินซึ่งเตรียมโดยวิธีอิมัลชันเพื่อใช้ขนส่งตัวยาไปยังกระเพาะอาหาร เนื่องจากเพคตินมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างเฟสน้ำมันและเฟสน้ำ ซึ่งมีผลดีต่อการเกิดอิมัลชัน

Sriamornsak *et al.* (2005) ปรับปรุงการห่อหุ้มตัวยาด้วยวิธีอิมัลชันเพื่อขนส่งตัวยา metronidazole ไปยังสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร พบว่าอิมัลชันเม็ดเจลประมาณ 80% มีการปลดปล่อยตัวยาอย่างรวดเร็วภายใน 20-80 นาที จึงควรเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดเจลโดย การเคลือบอีกชั้นด้วยกลีเซอริลโมโนสเตียเรต (glyceryl monostearate) และ eudragit® L เพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการปลดปล่อยตัวยาภายในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Desai (2003) ทดลองใช้ High amylose corn starch (HACS) และเพคติน เพื่อทำหน้าที่ปลดปล่อยตัวยาในลำไส้และใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray-drying) วิธีนี้ให้ขนาดของเม็ดเจลระหว่าง 5.8-7.3 ไมโครเมตร และประสิทธิภาพการเคลือบเซลล์ 80.11-94.7%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัตถุดิบ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium sp.* Bb-12 (DVS-Freeze dried, Chr.Hansen, Denmark)

3.1.2 เพคติน (Food & Cosmetic System Co.,LTD.)

3.1.3 ผงบุก (Nutricol® FMC Corporation, U.S.A.)

3.1.4 น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด, ประเทศไทย

3.1.5 น้ำส้ม UHT (บริษัท มาลี สามพราน จำกัด (มหาชน))

3.1.6 นมสด

3.1.7 ครีม

3.1.8 หางนมผง

3.1.9 น้ำตาลทราย

3.1.10 น้ำตาลไอซ์ซิ่ง

3.1.11 สเตบิไลเซอร์ (Riplex IF 22)

3.2 สารเคมี

3.2.1 โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)

3.2.2 แคลเซียมคลอไรด์ (0.2 M $CaCl_2$)

3.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 N NaOH)

3.2.4 ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolpthalein) 1.0%

3.2.5 แอลกอฮอล์ 95 %

3.2.6 เมทิลลีนบลู

3.2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS-IM และสารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

3.2.8 โซเดียมคลอไรด์ (1 N NaCl)

3.2.9 กรดไฮโดรคลอริค (5 M HCl)

3.2.10 สารละลายเกลือน้ำดี (bile salt) ความเข้มข้น 1% (Sigma)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (IKA work, T-25 basic)

3.3.2 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Kendo Laboratory Products, Germany)

3.3.3 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan)

3.3.4 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (JEOL:JSM-5410LV, Japan)

3.3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.3.6 เครื่องวัด pH (LISTED 8F93 Laboratory Equipment, Germany)

3.3.7 เครื่องทำไอศกรีม (Fortunate, Thailand)

3.3.8 เครื่องผสม (Vortex mixer) (G-560E, U.S.A.)

3.3.9 โถสูญญากาศ (Anaerobic jar) (Oxoid, Australia)

3.3.10 แผ่นดูดซับออกซิเจน (Anaerocult, Merck , Germany)

3.3.11 ตู้อบ (Hot Air Oven) (Memment 600 D06062)

3.3.12 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.3.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.14 จานเพาะเชื้อ

3.3.15 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.3.16 ไมโครปิเปต

3.3.17 ปิเปต

3.3.18 สำลี

3.3.19 ที่วางหลอด (Rack)

3.3.20 เครื่องวัด pH

3.3.21 บิวเรต

3.3.22 ขาตั้ง

3.3.23 เครื่อง autoclave

3.3.24 กระบอกฉีดยา และเข็มฉีดยา

3.3.25 กรวยแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12

3.4.1.1 นำเชื้อ Bb-12 มาเลี้ยงในอาหาร Modified MRS-IM broth โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.02%

3.4.1.2 บ่มที่สภาวะไร้อากาศ (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ได้เชื้อบิฟิโดแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^8-10^9 CFU/mL

3.4.2.3 นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 x g นาน 10 นาที เพื่อทำการแยกเซลล์และล้างเซลล์ด้วย sterile 0.1% peptone

3.4.2 การเตรียมบุก 1.5%

น้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส ใส่บุก 0.6 กรัมลงไปคนให้ละลาย ให้ความร้อนอีกครั้งจนมีอุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เติม K_2CO_3 ประมาณ 0.06 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นนำเข้าเก็บในตู้เย็น โดยให้บีกเกอร์ที่ใส่บุกที่เตรียมไว้แช่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง

3.4.3 การเตรียมเพคติน 6%

น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ใส่เพคติน 4.8 กรัม ลงไปคนให้ละลาย ให้ความร้อนอีกครั้งจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเข้าเก็บในตู้เย็น

3.4.4 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม และไอศกรีม

3.4.4.1 การเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลบุก โดยวิธีอิมัลชัน (สวรรยา, 2549)

ในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชัน ใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันเป็นเฟสต่อเนื่อง (continuous phase) และสารละลายผสมเจลบุกและเพคตินเป็นเฟสไม่ต่อเนื่อง (discontinuous phase)

1) ผสมสารละลายเจลบุก 1.5% และเพคติน 6% ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 20 กรัม และทำการเติมเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
38546

2) เติมน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี 0.2% tween 80 และมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Adhikari *et al.*, 2003) ทำการกวนผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 90 วินาที

3) เทอิมัลชันที่ได้ใส่ในกรวยแยกและเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และรอให้เม็ดเจลคงตัวเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จนปริมาตรรวมของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 450 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เวลาทั้งหมดนาน 30 นาที จึงทำแยกส่วนของสารละลาย $CaCl_2$ และเม็ดเจลออกมา

4) ทำการแยกเม็ดเจลออกจากสารละลาย $CaCl_2$ ด้วยการหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 1000 x g เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

3.4.4.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม

นำเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์เติมลงในน้ำส้ม และในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน สุ่มตัวอย่างน้ำส้ม ทุกๆ 4 วัน มาทำการวิเคราะห์ ดังนี้

1) ตรวจนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิต ภายในเม็ดเจล โดยปิเปตตัวอย่างน้ำส้ม 10 มิลลิลิตรใส่ลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และทำการตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 6 นาที เจือจางด้วย 0.1% เปปโตน จนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงปิเปตมา 1 มิลลิลิตร pour plate ด้วยอาหาร Modified MRS-IM agar บ่มที่สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Sultana *et al.*, 2000)

2) วิเคราะห์ความเป็นกรด โดยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

3) วัดความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

3.4.4.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม

นำเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มาเติมในส่วนผสมของไอศกรีม (ภาคผนวก) แล้วทำการปั่นจนได้ไอศกรีม แบ่งบรรจุใส่ถ้วยพลาสติก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน สุ่มตัวอย่างไอศกรีม ทุกๆ 7 วัน มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม และไอศกรีม

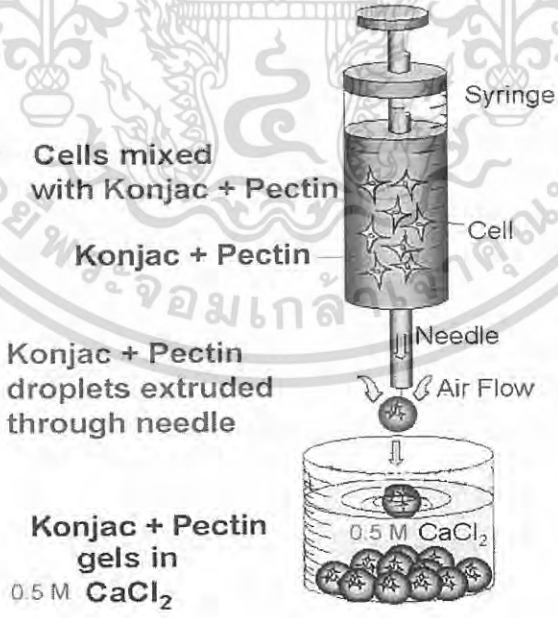
3.4.5.1 การเคลือบเชื้อเซลล์ โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน (Wang and He, 2002; Aydin and Akbuga, 1996)

1) ผสมสารละลายเจลบุก 1.5% และเพคติน 6% ในอัตราส่วน 1:2 ปริมาณ 20 กรัม และเติมเชื้อบิฟิโดแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงไป

2) ดูดสารผสมที่ได้บรรจุในหลอดฉีดยา แล้วหยดผ่านรูเข็มฉีดยาเบอร์ 21 ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้เม็ดเจลคงตัวเป็นเวลา 30 นาที กรอง และล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

3.4.5.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2

3.4.5.3 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.3



ภาพที่ 3.1 การเคลือบเซลล์ด้วยวิธีเอ็กทรูชัน (extrusion)

ที่มา : http://www.nanotec.or.th/en/index.php?type=clession&status=read&thelesson1=Nano-Encapsulation&readid=72&program1=Platforms

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และ วิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

1) เตรียมสภาวะจำลองในกระเพาะอาหาร ซึ่งประกอบด้วยหางนมผง 12% yeast extract 1% กลูโคส 2 % และ cysteine 0.05% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 2 หรือ 4 ด้วย 5 M HCl ปริมาตร 0.35 มิลลิลิตร และ 0.18 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2) เติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชัน เอ็กซ์ทรูชัน หรือ เซลล์อิสระลงไปบ่มที่สภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 1 2 และ3 มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี pour plate ในอาหาร Modified MRS-IM agar

3) นำเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการทดสอบในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารครบ 3 ชั่วโมง มาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของลำไส้ ซึ่งประกอบด้วย หางนมผง 12% yeast extract 1% กลูโคส 2 % cysteine 0.05% และ เกลือน้ำดี 1% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วย 1 M NaOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

4) บ่มที่สภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี pour plate ในอาหาร Modified MRS-IM agar

3.4.7 ศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์บิฟิโดแบคทีเรียด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

3.4.7.1 ขนาดของเม็ดเจล

สุ่มตัวอย่างเม็ดเจลจำนวน 50 เม็ด มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล แล้วหาค่าเฉลี่ยของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

3.4.8 ศึกษาลักษณะภายนอกและภายในของเม็ดเจลโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

1) นำตัวอย่างเม็ดเจลแช่ในสารละลาย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 ซึ่งมีสารละลาย gluteraldehyde 2.5% นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

2) นำตัวอย่างเม็ดเจลไประเหยน้ำออกด้วยสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น (%) 30 50 70 90 โดยล้างอย่างละ 1 ครั้ง และที่ความเข้มข้น(%) 100 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ทำให้แห้งด้วยเครื่องการทำแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer) จากนั้น นำตัวอย่างไปวางบนแป้นที่ติดด้วยเทปกาว 2 หน้า เพื่อเคลือบตัวอย่างเม็ดเจลด้วยผงทอง

4) นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชันและวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนเชื้อ Bb-12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน พบว่าเมื่อระยะการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น แนวโน้มการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีอิมัลชัน และเซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธี เอ็กซ์ทรูชัน ในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 8.73 10.22 และ10.45 log CFU/mL ตามลำดับ แต่เมื่อผ่านไป 20 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ Bb-12 ลดลงเหลือ 6.90 8.05 และ 9.15 log CFU/mL ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) 79.04 78.77 และ 87.56 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันมีอัตราการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสูงที่สุด

ภาพที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 20 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์น้ำส้มมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่(ภาพที่ 4.2) อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัย ของศริสา(2548) ที่ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง(pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* และเชื้อผสมระหว่าง *L. acidophilus* กับ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ในน้ำส้ม (pH เท่ากับ 3.0-4.0) น้ำสับปะรด (pH เท่ากับ 3.4-3.7) และน้ำมะเขือเทศ (pH เท่ากับ 3.8-4.4) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของน้ำผลไม้โพรไบโอติกซึ่งแสดงในรูปของกรดซิตริกมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากในอุณหภูมิต่ำ เชื้อแบคทีเรียแลคติกยังคงสามารถมีกิจกรรมในการสร้างกรดแลคติกส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) มีค่าลดลงได้

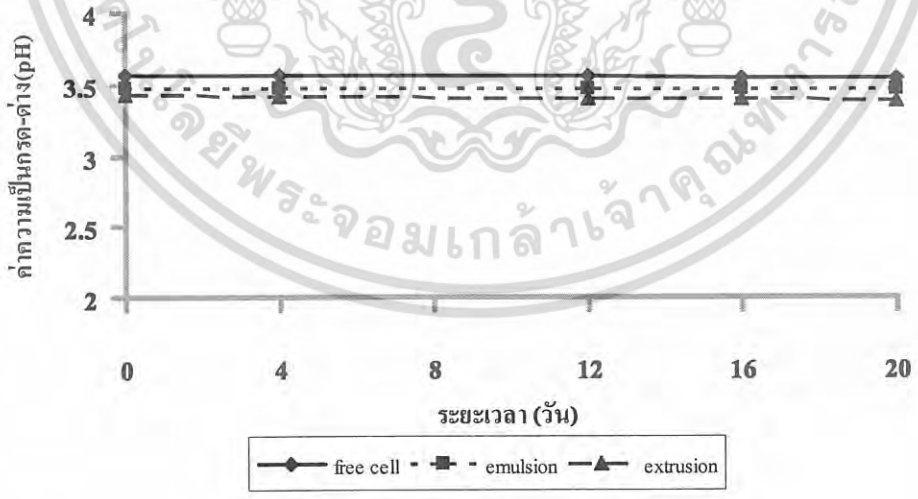
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log CFU/mL)*		
	เซลล์อิสระ(Free cell)	Encapsulated cells	
		Emulsion	Extrusion
0	8.73±0.03[a]	10.22±0.06[a]	10.45±0.07[a]
4	8.43±0.03[b]	9.07±0.05[b]	9.45±0.00[b,c]
12	7.36±0.06[c]	8.89±0.09[c]	9.55±0.03[b]
16	7.23±0.07[c]	8.50±0.05[d]	9.36±0.09[c]
20	6.90±0.09[d]	8.05±0.07[e]	9.15±0.11[d]
อัตราการรอดชีวิต (%)**	79.04	78.77	87.56

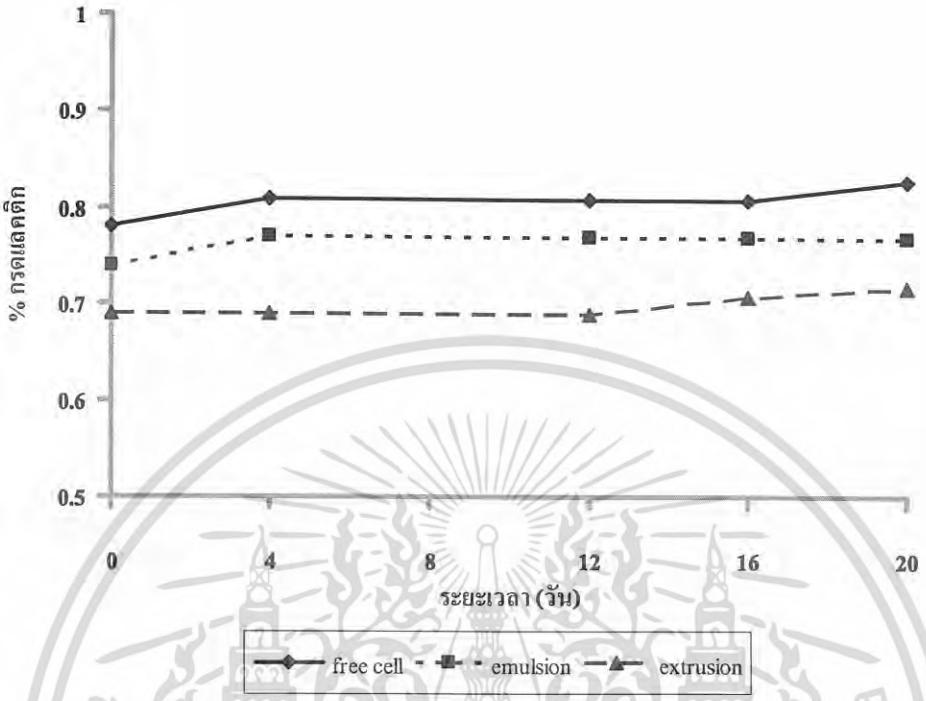
* ข้อมูลจากการทดลอง 2 ซ้ำ
ตัวอักษร a b c d e ในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** คำนวณจากจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในวันที่ 20 เทียบกับวันที่ 0



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 20 วัน

4.2 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชันและวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น แนวโน้มการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีอิมัลชัน และเซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน ในวันที่ 0 มีค่าเท่ากับ 8.84 8.92 และ 9.38 log CFU/mL ตามลำดับ แต่เมื่อผ่านไป 56 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ Bb-12 ลดลงเหลือ 7.05 7.33 และ 8.20 log CFU/mL ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) 79.75 82.17 และ 87.42 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันมีค่าสูงที่สุด จากงานวิจัยของ Hekmat และ Mcmahon (1992) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมที่ -29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ลดลงจาก 1.5 x 10^8 และ 2.5 x 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) เหลือ 4 x 10^6 และ 1x10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/mL) ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) 80.68 และ 83.33 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

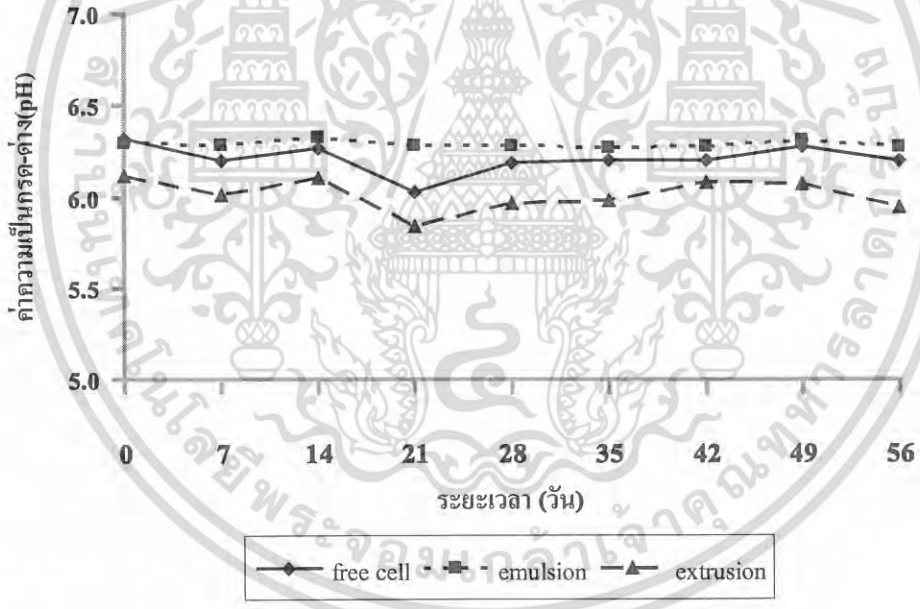
ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log CFU/g)*		
	เซลล์อิสระ(Free cell)	Encapsulated cells	
		Emulsion	Extrusion
0	8.84±0.08^{a}	8.92±0.00^{a}	9.38±0.03^{a}
7	8.70±0.16^{a}	8.53±0.19^{b}	9.53±0.06^{a}
14	8.43±0.04^{b}	7.99±0.01^{c}	9.28±0.05^{a}
21	8.20±0.06^{d}	8.16±0.12^{a}	8.81±0.25^{b}
28	7.41±0.03^{c}	7.40±0.00^{e}	8.26±0.21^{c}
35	7.41±0.03^{e}	7.38±0.00^{e}	8.20±0.17^{c}
42	7.41±0.05^{e}	7.41±0.02^{e}	8.26±0.03^{c}
49	7.43±0.03^{e}	7.42±0.03^{e}	8.03±0.07^{c}
56	7.05±0.07^{f}	7.33±0.01^{e}	8.20±0.17^{c}
อัตราการรอดชีวิต (%)**	79.75	82.17	87.42

* ข้อมูลจากการทดลอง 2 ซ้ำ
ตัวอักษร a b c d e f ในแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** คำนวณจากจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในวันที่ 56 เทียบกับวันที่ 0

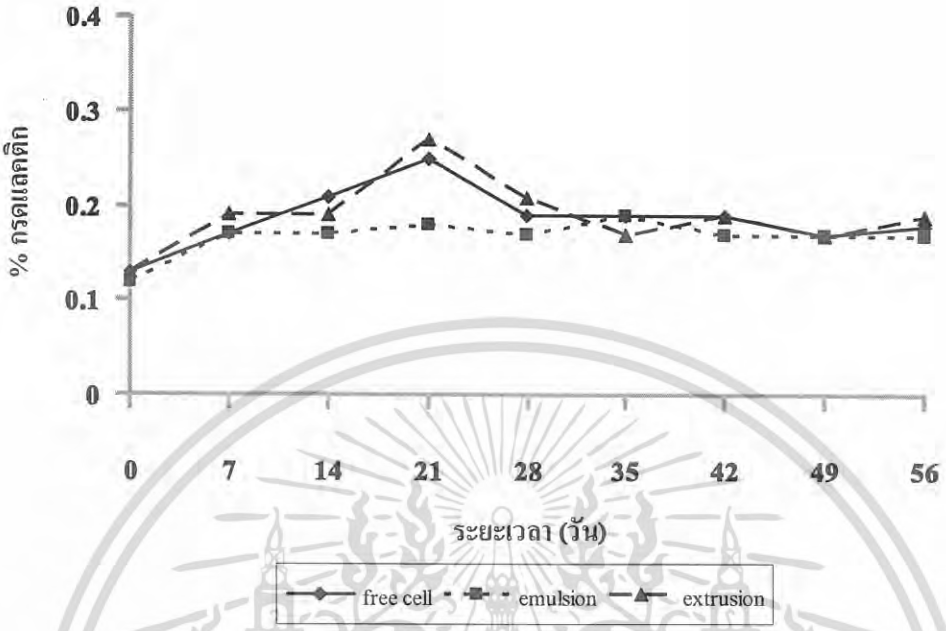
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน โดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง(-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก (ภาพที่ 4.4) จากงานวิจัยของ Alamprese *et al.* (2005) ซึ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด (กรดแลคติก) ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมที่มีเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GG ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -16 และ -28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน พบว่าค่าความเป็นกรดในไอศกรีมมีค่าค่อนข้างคงที่ จากเริ่มต้น(วันที่ 0) เท่ากับ 1.9 และ 1.9 meq/100g ตามลำดับ และเมื่อผ่านไป 90 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) เท่ากับ 2.0 และ 1.9 meq/100g ตามลำดับ



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่เติมเชื้อ Bb-12 และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง(-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่เติมเชื้อ Bb-12 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง(-18 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน

4.3 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชันและวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารที่ pH 2 และที่สภาวะจำลองลำไส้ พบว่าจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีอิมัลชัน และเซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องที่สภาวะ pH เท่ากับ 2 จากเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) เท่ากับ 9.23 9.28 และ 9.41 log CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ Bb-12 ลดลงเหลือ 6.86 6.97 และ 7.04 log CFU/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบที่สภาวะน้ำดีผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเชื้อ Bb-12 ลดลงเหลือ 4.00 4.62 และ 5.76 log CFU/mL ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) ของเชื้อ Bb-12 หลังจากผ่านการทดสอบที่สภาวะจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้ เท่ากับ 43.34 49.78 และ 61.21 สำหรับเซลล์อิสระ เซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีอิมัลชัน และเอ็กซ์ทรูชัน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร (pH เท่ากับ 2)

วิธีการเคลือบเซลล์	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log CFU/mL)							อัตราการรอดชีวิต (%)*
	กรด pH = 2				1% น้ำดี pH = 7.5			
	ชั่วโมงที่				ชั่วโมงที่			
	0	1	2	3	2	4	6	
Free cell	9.23	8.28	7.78	6.86	5.18	4.85	4.00	43.34
Emulsion	9.28	8.34	7.95	6.97	5.25	4.97	4.62	49.78
Extrusion	9.41	8.39	8.15	7.04	6.08	6.12	5.76	61.21

*คิดจากจำนวนเซลล์รอดชีวิต หลังจากทดสอบที่สภาวะน้ำดี 6 ชั่วโมงเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชัน และวิธีเอ็กซ์ทรูชัน เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารที่ pH 4 และที่สภาวะจำลองลำไส้ พบว่าจำนวนเซลล์อิสระ เซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีอิมัลชัน และเซลล์ที่ผ่านการเคลือบโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่ pH 2 กล่าวคือจำนวนเชื้อ Bb-12 เริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) เท่ากับ 9.45 9.41 และ 10.18 log CFU/mL ตามลำดับ และเมื่อผ่านไป 3 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ Bb-12 ลดลงเหลือ 8.92 8.58 และ 9.43 log CFU/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบในสภาวะน้ำดีผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเชื้อ Bb-12 ลดลงเหลือ 7.91 7.99 และ 9.38 log CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) เท่ากับ 83.70 84.91 และ 92.14 ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยของ Allan – Wojtas *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *B. lactis* Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยอัลจิเนต และมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 70 ไมโครเมตร พบว่ามีการลดลงของจำนวนเชื้อจาก 10^9 เป็น 10^7 CFU/mL ในสภาวะจำลอง กระเพาะอาหารที่ pH 2.0 แต่สำหรับที่ pH 3.0 พบว่ามีการลดลงของเชื้อเพียงเล็กน้อยจาก 10^9 เป็น 10^8 CFU/mL แสดงให้เห็นว่าเมื่อค่า pH สูงขึ้น เชื้อ *B. lactis* Bb-12 สามารถรอดชีวิตได้มากขึ้น และจากงานวิจัยของ Champagne *et al.* (1992) ได้ศึกษาการเคลือบเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* ด้วยอัลจิเนต พบว่าเม็ดเจลขนาดเล็ก (30 ไมโครเมตร) มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ที่ต่ำกว่าเม็ดเจลขนาดใหญ่ (100 ไมโครเมตร) และจากงานวิจัยของ Allan – Wojtas *et al.* (2002) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *Bifidobacteria lactis* Bb-12 ที่ผ่านการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลือบเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่มีขนาดเม็ดเจลเท่ากับ 20 และ 70 ไมโครเมตร เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระที่ความเป็นกรด-ด่าง(pH) เท่ากับ 6 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเชื้อเริ่มต้นของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่เคลือบด้วยอัลจิเนตที่มีขนาด 20 และ 70 ไมโครเมตร เท่ากับ 8.73 7.8 และ 8.2 log CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งเมื่อผ่านไป 2 ชั่วโมงจำนวนเชื้อลดลงเหลือเท่ากับ 8.4 7.67 และ 8.2 log CFU/mL ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต(%) 96.22 98.33 และ 100 แสดงให้เห็นว่าเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีกว่าเม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก

ตารางที่ 4.4 จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 ที่รอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร (pH เท่ากับ 4)

วิธีการเคลือบเซลล์	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log CFU/mL)							อัตราการรอดชีวิต (%)*
	กรด pH = 4				1% น้ำดี pH = 7.5			
	ชั่วโมงที่				ชั่วโมงที่			
	0	1	2	3	2	4	6	
Free cell	9.45	9.34	9.00	8.92	8.38	8.20	7.91	83.70
Emulsion	9.41	9.20	8.75	8.58	8.36	8.23	7.99	84.91
Extrusion	10.18	10.11	9.49	9.43	9.25	9.44	9.38	92.14

*คิดจากจำนวนเซลล์รอดชีวิต หลังจากทดสอบที่สภาวะน้ำดี 6 ชั่วโมงเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น

4.4 ลักษณะและขนาดของเม็ดเจลบุกผสมเพคตินที่ได้จากการเคลือบเซลล์ Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

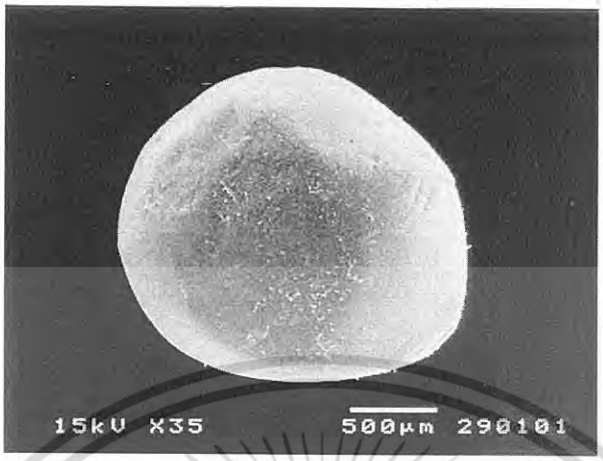
4.4.1 ขนาดของเม็ดเจล

จากการทดลองสุ่มตัวอย่างเม็ดเจลจำนวน 50 เม็ด มาวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.2 ± 0.4 มิลลิเมตร

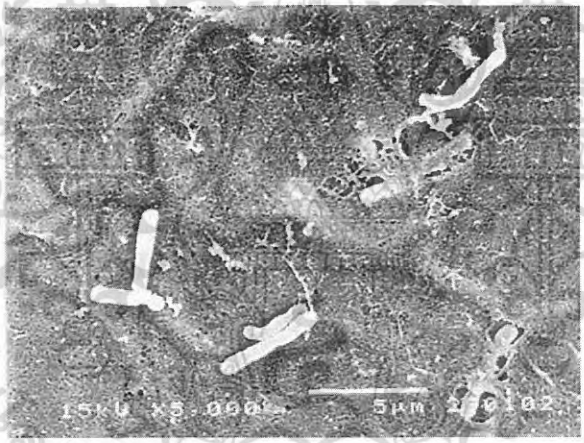
4.4.2 ลักษณะภายนอกและภายในของเม็ดเจล

ภาพที่ 4.5 และ 4.6 แสดงลักษณะภายนอกของเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน พบว่า ลักษณะของเม็ดเจลมีรูปทรงค่อนข้างกลม และพื้นผิวมีลักษณะขรุขระ เนื่องจากลักษณะโครงร่างของเชื้อ Bb-12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงลักษณะรูปร่างของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน



ภาพที่ 4.6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงพื้นผิวภายนอกของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ *Bifidobacterium* Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะภายในของเม็ดเจล พบว่าเชื้อ Bb-12 กระจายตัวอยู่ภายในโครงสร้างที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติของเจลบุกผสมเพคติน

ภาพที่ 4.7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงภาพตัดขวางของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ Bb-12 โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี ชาวนา. 2546. แยมแครอทจากกลูโคแมนแนน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์. หน้า 357-360

บุปผา เตชะภัทรพร. 2535. การสกัดผงบุกจากหัวบุก และการเตรียมผลิตภัณฑ์เจล.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ลินนา ทองยงค์. 2542. โภชนบำบัด. ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วรรณพร จิตจำเริญ. 2547. การใช้คัพภะข้าวโพดทดแทนหางนมผงในการผลิตไอศกรีมโยเกิร์ตเสริมโพรไบโอติก.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ศริสา ทวีแสง. 2548. การเหลือรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สวรรยา เม้งเกร็ด. 2549. อัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกร่วมกับเพคตินในโยเกิร์ตพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์. สัมมนาปริญญาโท โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Adhikari, K., Mustapha, A. and Grun, I.U. 2003. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yoghurt. *Journal of Food Science*, 68, 275-280.

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

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C. and Corti, S. 2005. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal of Dairy Technology.*, 58, 187-198.

Allan-Wojtas, P.M., Hansen Truelstrup, L., Jin Y.-L. and Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and stimulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology., 41, 35-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aydin, G.M. and Akbuga, A.H. 1996. Preparation and evaluation of pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 137, 133-136.

Birollo, G.A., Reinheimer, J.A. and Vinderola, C.G. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33, 799-805.

Champagne, C.P., Gaudy, C., Poncelet, D. and Neufeld, R.J. 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1429-1434.

Dave, R.I. and Shah, N.P.1996. Evaluation of media for selective enumeration of Streptococcus, *Lactobacillus delbrueckii spp.* bulgaricus, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79, 1529-1536.

Desai, K.G.H. 2003.Preparation and characteristic of high-amylose corn starch/pectin blend microparticles : A Technical Note. *AAPS Pharmaceutics Technology*, 6(2), 202-208.

Dinaker, P. and Mistry, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium longum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2854-2864.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and amimal. J. Appl. Bacteriol, 66, 365-378

Fuller, R. 1992. Probiotics : the scientific basis. London : Chapman & Hall.

Gilliland, S.E. 1989. Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72, 2483-2494.

Gilliland, S.E and Speck, M.L. 1977. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 60, 1394-1398.

Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.L. and Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions, *Food Microbiology*, 19, 35-45.

Hekmat S. and Mcmahon D.J. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophillus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice cream for use as a Probiotic Food. *Journal Dairy science.*, 75, 1415-1422.

Huges, D.B. and Hoover, D.G. 1991. Bifidobacteria : Their potential for use in American dairy products. Food Technol. 45(4) , 74-80

Huger, W. and Peitersen, N. 1992. New Technical Aspects of the Preparation of Starter Culture. Bulletin of IDF.277 , 17-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kailasapathy, K. and Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immuno Cell Biology, 78, 80-88.

Klaver, F. A. M., Kingma, F. and Weerkamp, A.H. 1993. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 151-164.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737-743.

Martin, J.H. and Chou, K.M. 1992. Selection of *Bifidobacterium ssp.* for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods I. Tolerance to pH of yoghurt. *Cultured Dairy Products*, 27, 21-26.

Metchnikoff, E. 1908. The Prolongation of Life: Optimistic Studies. New York, NY: GP Putman's Sons, 161-83.

Nussinovitch, A. 2004. Encapsulating liquid with hydrocolloid membrane stable from about-20 to 90^{o}C without bursting. United States Patent, 6,680,184.

Picot , A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.

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, 345-349.

Ravula, R.R. and Shah, N.P. 1998. Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Food Australia*, 50, 136-139.

Rolin, C. 1993. Pectin. In : Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), Industrail Gums : Polysaccharides and Their Derivatives.Acedemic Press, Newyork, 257-293.

Samona, A. and Robinson, R.K. 1994. Effect of yoghurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 47, 58-60.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scadovi, V. 1986. Genus Bifidobacterium Oral-Jensen 1924, 472AL. Bergey's manual of systemaic bacteriology, 2 , 1423-14425

Schol, H.A. and Voragen, A.G.J. 1996. Complex pectin structure elucidation using enzymes. In : Visser, J., Voragen, A.G.J. (EDS.), progress in Biotechnology : Pectin and Pectinases. Elsevier Amsterdum, 14, 3-19.

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

Sriamornsak, P. and Nunthanid, J. 1998. Calcium pectinate gel beads for controlled drug delivery : in preparation and in-vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 160, 207-212.

Sriamornsak, P., Thirawong, N. and Puttipipatkhachorn, S. 2004. Morphology and buoyancy of oil-entrapped calcium pectinate gel beads. *AAPP Pharmaceutics of Science Technology Journal*, 6(3), 1-7.

Sriamornsak, P., Thirawong, N. and Puttipipatkhachorn, S. 2005. Emulsion gel beads of calcium pectinate capable of floating on the gastric fluid : effect of some additives, hardening agent or coating on release behavior of methanizole. *European Journal of Phamaceutical Science*, 24, 363-373.

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

Svensson, U., Fondén, R.,. Reniero, R. and Mattila-Sandholm, T. 1999. The technology of probiotics. Curr. Issues Intestinal Microbiol, 7, 73–90.

Thomas, W.R. 1997. Konjac gum. *In* : Thickening and gelling agents for food (edited by A.Imeson). *London : Blackie Acedemic and Professional* pp. 169-179.

Tye, R.J. 1991. Konjac flour : Properties and applications. *Food Technology*, 45, 82-92.

Wang, K. and He, Z. 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 244, 117-126.

"จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร" [ออนไลน์วันที่ 4 ธันวาคม 2549]. เข้าถึงได้จาก : www.glycoscience.org/glycoscience/document_viewer.wm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

"ลักษณะของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย" [ออนไลน์วันที่ 11 มกราคม 2550]. เข้าถึงได้จาก : http://news.bbc.co.uk/ 2/hi/health/5253182.stm

"ลักษณะโคโลนีของเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium lactis* Bb-12)" [ออนไลน์วันที่ 11 มกราคม 2550]. เข้าถึงได้จาก : http://users.utu.fi/artouwe/functionalfoods.html

"วิธีการเคลือบเซลล์ ด้วยวิธีเอ็กทรูชัน (extrusion)" [ออนไลน์วันที่ 4 ธันวาคม 2549]. เข้าถึงได้จาก : http://www.nanotec.or.th/en/index.php?type=clession&status=read&thelesson1=NanoEncapsulation&readid=72&program1=Platforms

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและวิเคราะห์ทางเคมี

ก.1. การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ก.1.1 การวิเคราะห์จำนวนเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS-IM agar

การเตรียม Modified MRS-IM agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-Potassium hydrogen phosphate	2.6	กรัม
Sodium acetate.$3H_2O$	5	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Manganese(II) sulphate.H_2O	0.05	กรัม
Magnesium sulphate.$7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	13	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายให้เข้ากันโดยให้ความร้อนและไม่ให้วุ้นจับตัวเป็นก้อน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.1.1 การเตรียมสารละลายกลูโคส 20%

กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมได้มาผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ก.1.1.2 การเตรียมสารละลาย 2% LiCl

LiCl	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำสารละลาย LiCl ที่เตรียมได้มากรองโดย Sterilize by filtration เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.1.3 การเตรียมสารละลาย 0.01% Dichloxallin

Dichloxallin	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำสารละลาย Dichloxallin ที่เตรียมได้มากรองโดย Sterilize by filtration เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ก.1.1.4 การเตรียมสารละลาย 10% Cysteine hydrochloride

Cysteine hydrochloride	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำสารสารละลาย Cysteine hydrochloride ที่เตรียมได้มาผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-IM agar 1000 มิลลิลิตร ที่ได้เตรียมไว้มาหลอม เมื่ออุณหภูมิประมาณ 47 องศาเซลเซียส เติม 20% glucose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย LiCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลาย Dichloxallin ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ สารสารละลาย Cysteine hydrochloride ปริมาตร 5 มิลลิลตร

ก.1.1.5 การเตรียม 0.1% peptone solution

นำ peptone 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.2 วิธีวิเคราะห์

ก.1.2.1 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธี plate count

ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ทำ ten fold dilution ในสารละลายเปปโตน 0.1% จากนั้นดูดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางประมาณ 10^{-4}-10^{-6} มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วทำการ pour plate ด้วย Modified MRS-IM agar แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

ก.1.2.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธี plate count

นำตัวอย่างน้ำส้มที่มีเซลล์ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ 10 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นตัวอย่างไอศกรีมชั่งมา 10 กรัม) เจือจางด้วย 0.1% เปปโตน จนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงปิเปตมา 1 มิลลิลิตร pour plate ด้วยอาหาร Modified MRS-IM agar บ่มที่สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.2.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

นำเซลล์ที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์เติมลงในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร(12%หางนมผง 2%กลูโคส 1 %yeast extract 0.05%cysteine) แล้วปรับ pH ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 M ให้มี pH เท่ากับ 2 และ 4 ปริมาตร 10 mL บ่มที่สภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการตรวจนับเชื้อทุกชั่วโมง โดยการ pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 0 1 2 และ 3) หลังจากบ่มครบ 3 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านการหมุนเหวี่ยงที่ 5000xg 10 นาที (ถ้าเป็นเซลล์ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชัน จะนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 1000xg 10 นาที และ เอ็กซ์ทรูชัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 1000xg 10 นาที) จากนั้นนำเม็ดเจลที่เหลืออยู่มาทดสอบในสภาวะจำลองลำไส้ (12%หางนมผง 2%กลูโคส 1%yeast extract 0.05%cysteine 1%bile salt) ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 M ให้มี pH = 7.5 แล้วบ่มที่สภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการตรวจนับเชื้อทุกๆ 2 ชั่วโมง โดยการ pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 0 2 4 และ 6)

การคำนวณ

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor x 1 mL}}{\text{0.1 mL}}$$

ก.2. การวิเคราะห์ทางเคมี

ก.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์กรด

ก.2.1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาณให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : การหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำได้โดยนำโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

ก.2.1.2 ฟีนอล์ฟทาลีน 1%

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.2 วิธีวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ (flask) จากนั้นหยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH จนได้จุดยุติที่ pH ประมาณ 8.2-8.3 บันทึกปริมาณของ 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{ค่าความเป็นกรด (\%)} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (N) x ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ (mL) x 90.08}^{**}\text{ x 100}}{(1000)\text{ x (ปริมาตรของสารละลายอาหารตัวอย่าง)}}$$

** มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแลคติก เท่ากับ 90.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ผลการตรวจนับเชื้อบิฟิโดแบคทีเรีย (Bb-12)

ข.1. ผลน้ำส้ม

ข.1.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar

ตารางที่ ข.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	53	61	4	2	$5.7x10^{8}$
Free cell 2	>300	>300	53	48	8	0	$5.1x10^{8}$
Emulsion 1	>300	>300	>300	>300	190	171	$1.8x10^{10}$
Emulsion 2	>300	>300	>300	>300	163	154	$1.5x10^{10}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	289	283	$2.8x10^{10}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	290	292	$2.9x10^{10}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 2 (วันที่ 4)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	285	298	78	69	$2.9x10^{8}$
Free cell 2	>300	>300	258	262	97	87	$2.6x10^{8}$
Emulsion 1	>300	>300	>300	>300	118	151	$1.3x10^{9}$
Emulsion 2	>300	>300	>300	>300	111	108	$1.1x10^{9}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	275	293	$2.8x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	281	273	$2.8x10^{9}$

ตารางที่ ข.3 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	236	257	44	60	$2.5x10^{7}$
Free cell 2	>300	>300	217	211	17	9	$2.1x10^{7}$
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
Emulsion 1	>300	>300	>300	>300	85	98	$9.1x10^{8}$
Emulsion 2	>300	>300	>300	>300	76	58	$6.7x10^{8}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	329	352	$3.4x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	372	368	$3.7x10^{9}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 4 (วันที่ 16)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	198	189	38	47	$1.9x10^{7}$
Free cell 2	>300	>300	134	172	30	27	$1.5 x10^{7}$
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
Emulsion 1	>300	>300	297	314	44	36	$3.5x10^{8}$
Emulsion 2	>300	>300	284	278	27	32	$2.9x10^{8}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	208	196	$2.0x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	277	265	$2.7x10^{9}$

ตารางที่ ข.5 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 5 (วันที่ 20)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	85	98	27	13	$9.1x10^{6}$
Free cell 2	>300	>300	76	58	18	14	$6.7x10^{6}$
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
Emulsion 1	>300	>300	172	141	56	42	$1.5x10^{8}$
Emulsion 2	>300	>300	104	98	41	37	$1.0x10^{8}$
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		
Extrusion 1	>300	>300	128	106	6	9	$1.2x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	187	163	10	13	$1.7x10^{9}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2. ผลไอศกรีม

ข.2.1 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar

ตารางที่ ข.6 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-7}		10^{-8}		10^{-9}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	85	75	56	40	7	4	$8.0x10^{8}$
Free cell 2	58	62	34	38	9	14	$6.0x10^{8}$
Emulsion 1	73	95	9	5	8	0	$8.4x10^{8}$
Emulsion 2	78	89	7	4	0	0	$8.4x10^{8}$
Extrusion 1	>300	>300	264	262	5	14	$2.6x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	235	214	0	4	$2.3x10^{9}$

ตารางที่ ข.7 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 2 (วันที่ 7)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	66	61	7	5	$6.4x10^{8}$
Free cell 2	>300	>300	39	37	1	7	$3.8x10^{8}$
Emulsion 1	227	229	29	24	1	2	$2.5x10^{8}$
Emulsion 2	256	233	76	65	9	5	$4.7x10^{8}$
Extrusion 1	>300	>300	357	378	17	21	$3.7x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	296	329	11	13	$3.1x10^{9}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 3 (วันที่ 14)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	227	262	37	34	7	5	$2.9x10^{8}$
Free cell 2	254	273	14	32	5	9	$2.5x10^{8}$
Emulsion 1	108	97	23	17	23	0	$1.0x10^{8}$
Emulsion 2	102	89	9	7	0	0	$9.5x10^{8}$
Extrusion 1	>300	>300	208	218	11	8	$2.1x10^{8}$
Extrusion 2	>300	>300	179	197	2	3	$1.8x10^{9}$

ตารางที่ ข.9 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 4 (วันที่ 21)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	176	162	7	4	$1.7x10^{8}$
Free cell 2	>300	>300	145	137	2	5	$1.4x10^{8}$
Emulsion 1	>300	>300	192	184	24	22	$1.8x10^{8}$
Emulsion 2	>300	>300	128	119	18	19	$1.2x10^{8}$
	10^{-6}		10^{-7}		10^{-8}		
Extrusion 1	>300	>300	98	93	6	4	$9.5x10^{9}$
Extrusion 2	>300	>300	46	39	2	0	$4.3x10^{8}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 5 (วันที่ 28)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	264	277	0	0	$2.7x10^7$
Free cell 2	>300	>300	251	232	0	0	$2.4x10^7$
	10^{-5}		10^{-6}		10^{-7}		
Emulsion 1	268	234	7	4	0	0	$2.5x10^7$
Emulsion 2	259	244	6	8	0	0	$2.5x10^7$
Extrusion 1	>300	>300	202	246	7	11	$2.6x10^8$
Extrusion 2	>300	>300	163	105	0	5	$1.3x10^8$

ตารางที่ ข.11 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 6 (วันที่ 35)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	273	278	78	92	$2.8x10^7$
Free cell 2	>300	>300	242	256	82	67	$2.5x10^7$
Emulsion 1	>300	>300	265	221	118	109	$2.4x10^7$
Emulsion 2	>300	>300	228	252	89	72	$2.4x10^7$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	189	237	$2.1x10^8$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	111	125	$1.2x10^8$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 7 (วันที่ 42)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	288	276	122	153	$2.8x10^{7}$
Free cell 2	>300	>300	253	223	108	117	$2.4x10^{7}$
Emulsion 1	>300	>300	256	243	183	172	$2.5x10^{7}$
Emulsion 2	>300	>300	278	259	154	149	$2.7x10^{7}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	186	208	$1.9x10^{8}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	90	124	$1.1x10^{8}$

ตารางที่ ข.13 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 8 (วันที่ 49)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	289	272	182	198	$2.8x10^{7}$
Free cell 2	>300	>300	267	256	166	153	$2.6x10^{7}$
Emulsion 1	>300	>300	279	284	88	72	$2.8x10^{7}$
Emulsion 2	>300	>300	253	245	48	53	$2.5x10^{7}$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	112	128	$1.2x10^{8}$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	88	104	$9.6x10^{7}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 ผลการตรวจนับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร Modified MRS-IM agar ครั้งที่ 9 (วันที่ 56)

วิธีเคลือบเซลล์	จำนวนโคโลนีที่ตรวจนับได้						จำนวนเชื้อ CFU/mL
	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	
Free cell 1	>300	>300	109	155	28	25	$1.3x10^7$
Free cell 2	>300	>300	102	98	21	18	$1.0x10^7$
Emulsion 1	>300	>300	229	215	148	203	$2.2x10^7$
Emulsion 2	>300	>300	213	207	125	132	$2.1x10^7$
Extrusion 1	>300	>300	>300	>300	222	196	$2.1x10^8$
Extrusion 2	>300	>300	>300	>300	106	137	$1.2x10^8$

ข.3 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

ตารางที่ ข.15 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่ pH 2

วิธีการเคลือบเซลล์	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log cfu/ml)						
	กรด pH = 2				1% น้ำดี pH = 7.5		
	ชั่วโมงที่				ชั่วโมงที่		
	0	1	2	3	2	4	6
Free cell	9.23	8.28	7.78	6.86	5.18	4.85	4.00
Emulsion	9.28	8.34	7.95	6.97	5.25	4.97	4.62
Extrusion	9.41	8.39	8.15	7.04	6.08	6.12	5.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 การตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีชีวิตที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ และผ่านการเคลือบเซลล์ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่ ที่ pH 4

วิธีการเคลือบเซลล์	จำนวนเชื้อ *Bifidobacterium* Bb-12 (log cfu/ml)						
	กรด pH = 4				1% น้ำดี pH = 7.5		
	ชั่วโมงที่				ชั่วโมงที่		
	0	1	2	3	2	4	6
Free cell	9.45	9.34	9.00	8.92	8.38	8.20	7.91
Emulsion	9.41	9.20	8.75	8.58	8.36	8.23	7.99
Extrusion	10.18	10.11	9.49	9.43	9.25	9.44	9.38

ข.4 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตหาปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ในผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ และที่ผ่านการเคลือบเซลล์

ข.4.1 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม

ตารางที่ ข.17 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	3.57	4.5	4.5	4.50
Free cell 2	3.57	4.5	4.5	4.50
Emulsion 1	3.48	4.2	4.2	4.20
Emulsion 2	3.47	4.3	4.3	4.30
Extrusion 1	3.43	3.9	3.9	3.90
Extrusion 2	3.43	4.0	4.0	4.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 2 (วันที่ 4)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	3.57	4.7	4.8	4.75
Free cell 2	3.57	4.5	4.6	4.55
Emulsion 1	3.47	4.4	4.3	4.35
Emulsion 2	3.47	4.4	4.4	4.40
Extrusion 1	3.42	3.9	3.9	3.90
Extrusion 2	3.43	4.1	4.1	4.10

ตารางที่ ข.19 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 3 (วันที่ 12)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	3.56	4.6	4.7	4.65
Free cell 2	3.57	4.6	4.6	4.60
Emulsion 1	3.47	4.4	4.4	4.40
Emulsion 2	3.47	4.4	4.3	4.35
Extrusion 1	3.41	3.9	4.0	3.95
Extrusion 2	3.40	4.0	4.0	4.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 4 (วันที่ 16)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	3.56	4.6	4.6	4.60
Free cell 2	3.56	4.7	4.7	4.70
Emulsion 1	3.47	4.5	4.4	4.45
Emulsion 2	3.47	4.4	4.4	4.40
Extrusion 1	3.42	3.9	4.0	3.95
Extrusion 2	3.41	4.2	4.1	4.15

ตารางที่ ข.21 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ครั้งที่ 5 (วันที่ 20)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	3.56	4.7	4.7	4.70
Free cell 2	3.55	4.7	4.8	4.75
Emulsion 1	3.47	4.5	4.4	4.45
Emulsion 2	3.46	4.4	4.4	4.40
Extrusion 1	3.40	4.2	4.2	4.20
Extrusion 2	3.40	4.1	4.1	4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4.2 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม

ตารางที่ ข.22 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 1 (วันที่ 0)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.32	0.9	0.8	0.85
Free cell 2	6.32	0.6	0.6	0.60
Emulsion 1	6.27	0.8	0.7	0.75
Emulsion 2	6.33	0.7	0.6	0.65
Extrusion 1	6.09	0.8	0.9	0.85
Extrusion 2	6.15	0.7	0.6	0.65

ตารางที่ ข.23 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 2 (วันที่ 7)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.16	1.0	1.0	1.00
Free cell 2	6.24	1.0	1.0	1.00
Emulsion 1	6.25	1.0	1.0	1.00
Emulsion 2	6.33	1.0	1.0	1.00
Extrusion 1	6.05	1.1	1.1	1.10
Extrusion 2	5.98	1.1	1.1	1.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.24 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 3 (วันที่ 14)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.27	1.2	1.3	1.25
Free cell 2	6.26	1.1	1.1	1.10
Emulsion 1	6.29	1.0	1.0	1.00
Emulsion 2	6.36	0.9	0.9	0.90
Extrusion 1	6.26	1.1	1.1	1.10
Extrusion 2	5.96	1.1	1.1	1.10

ตารางที่ ข.25 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 4 (วันที่ 21)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.01	1.5	1.6	1.55
Free cell 2	6.04	1.4	1.4	1.40
Emulsion 1	6.26	1.1	1.1	1.10
Emulsion 2	6.31	1.0	1.0	1.00
Extrusion 1	5.93	1.5	1.5	1.50
Extrusion 2	5.75	1.6	1.6	1.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.26 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 5 (วันที่ 28)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.16	1.1	1.1	1.10
Free cell 2	6.23	1.1	1.1	1.10
Emulsion 1	6.26	1.0	1.0	1.00
Emulsion 2	6.31	1.0	1.0	1.00
Extrusion 1	6.00	1.2	1.2	1.20
Extrusion 2	5.93	1.2	1.2	1.20

ตารางที่ ข.27 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 6 (วันที่ 35)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.24	1.1	1.1	1.10
Free cell 2	6.18	1.1	1.1	1.10
Emulsion 1	6.27	1.1	1.1	1.10
Emulsion 2	6.28	1.2	1.1	1.15
Extrusion 1	5.97	1.0	1.0	1.00
Extrusion 2	6.01	1.0	1.0	1.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 7 (วันที่ 42)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.20	1.1	1.1	1.10
Free cell 2	6.23	1.1	1.1	1.10
Emulsion 1	6.29	1.0	1.0	1.00
Emulsion 2	6.28	0.9	1.0	0.95
Extrusion 1	6.09	1.1	1.0	1.05
Extrusion 2	6.08	1.1	1.2	1.15

ตารางที่ ข.29 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 8 (วันที่ 49)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.30	1.0	1.1	1.05
Free cell 2	6.29	0.9	0.9	0.90
Emulsion 1	6.27	0.9	1.0	0.95
Emulsion 2	6.28	1.1	1.0	1.05
Extrusion 1	6.07	1.0	1.0	1.00
Extrusion 2	6.08	1.1	1.0	1.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.30 ผลค่า pH และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ครั้งที่ 9 (วันที่ 56)

ลักษณะเซลล์	pH	ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไทเทรต (mL)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
Free cell 1	6.20	1.1	1.1	1.10
Free cell 2	6.23	1.0	1.0	1.00
Emulsion 1	6.32	1.0	1.0	1.00
Emulsion 2	6.32	0.9	0.9	0.90
Extrusion 1	5.96	1.1	1.1	1.10
Extrusion 2	5.94	1.1	1.1	1.10

ข.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ ข.31 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

	N	Subset for alpha = .05			
Day	1	2	3	4	1
20.00	2	6.8950			
16.00	2		7.2300		
12.00	2		7.3600		
4.00	2			8.4350	
.00	2				8.7350
Sig.		1.000	.090	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.32 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5	1
20	2	8.0550				
16	2		8.5000			
12	2			8.8950		
4	2				9.0750	
0	2					10.2200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.33 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์น้ำส้ม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5	1
20	2	8.0550				
16	2		8.5000			
12	2			8.8950		
4	2				9.0750	
0	2					10.2200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.34 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
20	2	3.5550	
16	2	3.5600	3.5600
12	2	3.5650	3.5650
0	2		3.5700
4	2		3.5700
Sig.		.082	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.35 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05
	1	1
20	2	3.4650
4	2	3.4700
12	2	3.4700
16	2	3.4700
0	2	3.4750
Sig.		.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.36 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05			
	1	2	3	4	1
20	2	3.4000			
12	2	3.4050	3.4050		
16	2		3.4150	3.4150	
4	2			3.4250	3.4250
0	2				3.4300
Sig.		.403	.127	.127	.403

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.37 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
0	2	.7800	
12	2	.8050	.8050
4	2	.8100	.8100
16	2	.8100	.8100
20	2		.8250
Sig.		.109	.248

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.38 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
0	2	.7400	
4	2		.7650
12	2		.7650
16	2		.7700
20	2		.7700
Sig.		1.000	.557

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.39 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05
	1	1
0	2	.6900
12	2	.6950
4	2	.6950
16	2	.7050
20	2	.7200
Sig.		.139

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.40 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5	1
56	2	7.0550				
28	2		7.4050			
42	2		7.4150			
35	2		7.4250			
49	2		7.4300			
21	2			8.1900		
14	2				8.4300	
7	2					8.6950
0	2					8.8400
Sig.		1.000	.761	1.000	1.000	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.41 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05				
	1	2	3	4	5	1
56	2	7.3300				
35	2	7.3800				
28	2	7.4000				
42	2	7.4150				
49	2	7.4250				
14	2		7.9900			
21	2			8.1650		
7	2				8.5350	
0	2					8.9200
Sig.		.280	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.42 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	3	1
49	2	8.0300		
35	2	8.2000		
56	2	8.2000		
28	2	8.2600		
42	2	8.2600		
21	2		8.8050	
14	2			9.2850
0	2			9.3850
7	2			9.5300
Sig.		.163	1.000	.128

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.43 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	3	1
21	2	6.0250		
28	2		6.1950	
7	2		6.2000	
35	2		6.2100	
42	2		6.2150	
56	2		6.2150	
14	2		6.2650	6.2650
49	2			6.2950
0	2			6.3200
Sig.		1.000	.072	.128

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.44 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05
	1	1
35	2	6.2750
49	2	6.2750
21	2	6.2850
28	2	6.2850
42	2	6.2850
7	2	6.2900
0	2	6.3000
56	2	6.3200
14	2	6.3250
Sig.		.202

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.45 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
21	2	5.8400	
56	2	5.9500	5.9500
28	2	5.9650	5.9650
35	2	5.9900	5.9900
7	2	6.0150	6.0150
49	2		6.0750
42	2		6.0850
14	2		6.1100
0	2		6.1200
Sig.		.098	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.46 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ

Duncan

Day	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	3	1
0	2	.1250		
49	2		.1700	
7	2		.1700	
56	2		.1800	
28	2		.1900	
35	2		.1900	
42	2		.1900	
14	2		.2050	
21	2			.2550
Sig.		1.000	.090	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.47 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีอิมัลชัน

Duncan

	N	Subset for alpha = .05		
Day	1	2	3	1
0	2	.1200		
14	2		.1650	
56	2		.1650	
7	2		.1700	
28	2		.1700	
42	2		.1700	
49	2		.1750	
21	2		.1800	.1800
35	2			.1950
Sig.		1.000	.127	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตารางที่ ข.48 การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (% lactic acid) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนม ที่มีการเติมเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กซ์ทรูชัน

Duncan

	N	Subset for alpha = .05			
Day	1	2	3	4	1
0	2	.1300			
35	2		.1700		
49	2		.1750		
7	2		.1900	.1900	
14	2		.1900	.1900	
42	2		.1900	.1900	
56	2		.1900	.1900	
28	2			.2100	
21	2				.2700
Sig.		1.000	.153	.151	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.6 การคำนวณปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

- การคำนวณปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor}}{\text{1 mL}}$$

ข.7 การคำนวณเปอร์เซ็นต์กรด

- การคำนวณเปอร์เซ็นต์กรด

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \frac{\text{mL(NaOH) x N.(NaOH) x (Eq.Wt.lactic acid) x 100}}{\text{1000 x mL (sample)}}$$

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.8 การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

ตารางที่ ข.49 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน จำนวน 50 เม็ด

ตัวอย่างที่สุ่ม	ขนาดเซลล์ (cm.)	ตัวอย่างที่สุ่ม	ขนาดเซลล์ (cm.)
1	0.30	26	0.30
2	0.30	27	0.35
3	0.30	28	0.35
4	0.35	29	0.35
5	0.35	30	0.25
6	0.35	31	0.25
7	0.30	32	0.40
8	0.30	33	0.35
9	0.35	34	0.30
10	0.30	35	0.25
11	0.35	36	0.35
12	0.35	37	0.30
13	0.30	38	0.30
14	0.35	39	0.25
15	0.30	40	0.30
16	0.35	41	0.30
17	0.30	42	0.35
18	0.40	43	0.30
19	0.30	44	0.30
20	0.35	45	0.30
21	0.35	46	0.35
22	0.30	47	0.35
23	0.30	48	0.25
24	0.30	49	0.30
25	0.30	50	0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
การเตรียมไอศกรีมรสนม

ค.1. การเตรียมส่วนผสม

นมสด	1000	มิลลิลิตร
ครีม	450	มิลลิลิตร
หางนมผง	90	กรัม
น้ำตาลทราย	100	กรัม
น้ำตาลไอซ์ซิ่ง	100	กรัม
สเตบิไลเซอร์	7	กรัม

ค.2. ขั้นตอนการผลิต

คำนวณปริมาณส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตไอศกรีมตามสูตรตามต้องการ

1. นมสด 1 ลิตร พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. นำครีม 0.45 ลิตร เทลงในหม้อผสม กวนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วผสมหางนมผง น้ำตาลทราย น้ำตาลไอซ์ซิ่ง และสเตบิไลเซอร์ให้เข้ากัน

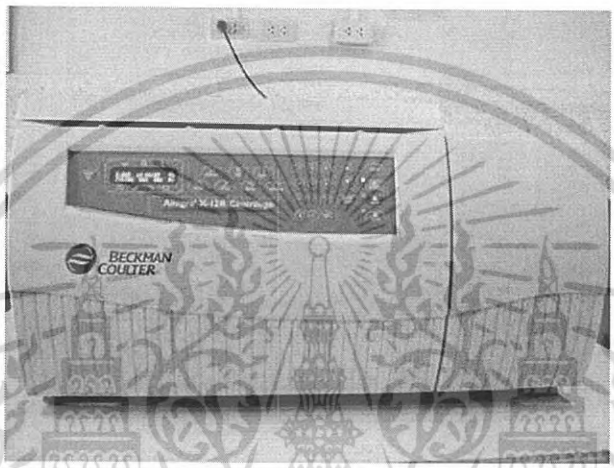
3. ทำการ Homogenize ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที และทำให้เย็นลงทันทีจนอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงถ่ายลงในถังนมที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาเก็บไว้ในห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการบ่มไอศกรีม ประมาณ 12 ชั่วโมง

4. นำส่วนที่บ่มไว้มากวนผสมในถังไอศกรีม แล้วปั่นในเครื่องปั่น ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้น้ำประมาณ 50% ของส่วนผสมไอศกรีมกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง พร้อมกับอัดอากาศเข้าไปในส่วนผสม จากนั้นนำไปบรรจุใส่ถ้วย แล้วเก็บในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิประมาณ -18 องศาเซลเซียส ทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

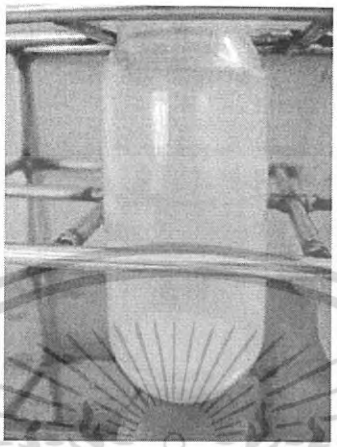
รูปภาพ



ภาพที่ ง.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Beckman)

ภาพที่ ง.2 สารละลายบุกและเพคติน

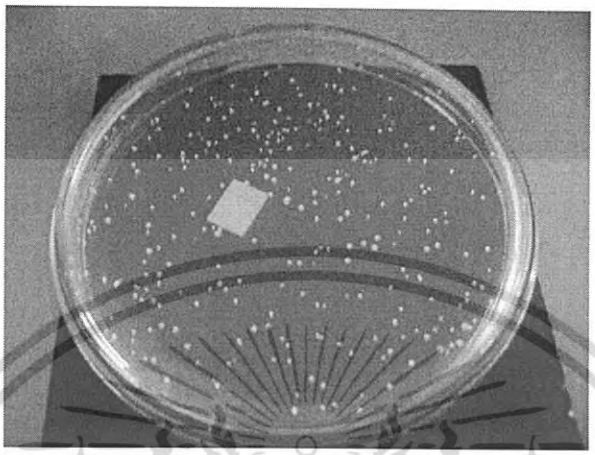
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



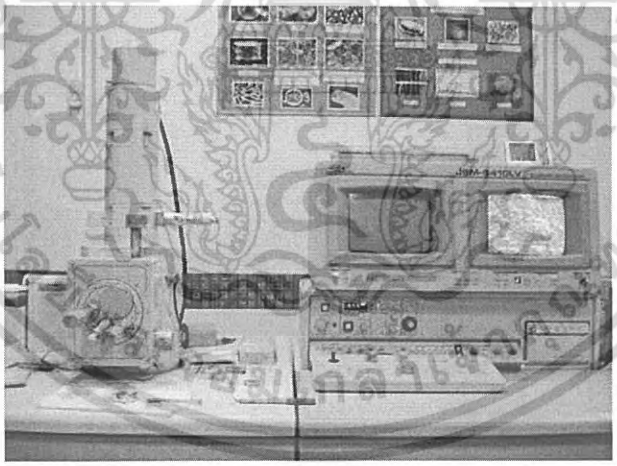
ภาพที่ ง.3 เชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชัน

ภาพที่ ง.4 เชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ง.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Bb-12



ภาพที่ ง.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวกองกัญจน์ เปี่ยมด้วยธรรม
วัน เดือน ปี เกิด 22 สิงหาคม 2527
สถานที่อยู่ปัจจุบัน 211/104 หมู่ที่ 6 ถนน พัฒนาการ แขวง/เขต ประเวศ กรุงเทพฯ 10250
ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
จากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาพัฒนาการ
ปีการศึกษา 2549 จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการหมัก
จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-สกุล นางสาวจุฑาภรณ์ ปาลคะเชนทร์
วัน เดือน ปี เกิด 22 กันยายน 2527
สถานที่อยู่ปัจจุบัน 92 ถ.การุณราษฎร์ ต.ตลาด อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี 84000
ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2545 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
จากโรงเรียนสุราษฎร์พิทยา จ.สุราษฎร์ธานี
ปีการศึกษา 2549 จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการหมัก
จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินมีผลช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์น้ำส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น โดยพบว่าเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด เท่ากับ 87.78% ในขณะที่เชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชัน และเซลล์อิสระมีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน คือประมาณ 79%

5.1.2 การเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินมีผลช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมรสนมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (-18 องศาเซลเซียส) โดยพบว่าเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์โดยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด เท่ากับ 87.66% รองลงมาคือเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชัน เท่ากับ 82.27% และเชื้อ Bb-12 ที่เป็นเซลล์อิสระ เท่ากับ 80.05%

5.1.3 จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ Bb-12 ในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร พบว่าที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อ Bb-12 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าที่ pH เท่ากับ 2 โดยเชื้อ Bb-12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด เท่ากับ 92.14% และ 61.21% ตามลำดับ

5.1.4 ขนาดของเม็ดเจลมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายใน ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์จะแทรกตัวอยู่ภายในโครงสร้างที่เป็นร่างแหของเจล ดังนั้นขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่จึงสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

- ในการทดลองต่อไปควรเติมสารอาหารหรือสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (growth factor) ลงในสารเคลือบ เพื่ออาจมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น
- ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกชนิดอื่นๆ ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน
- ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้