รายงานการวิจัย

การเพิ่มการรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 โดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับว่านหอมแดง

Survival and metabolic activity enhancements of *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 by co-encapsulation with *Eleutherine americana*

อัจฉรา เพิ่ม

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พ.ศ. 2559

ชื่องานวิจัย การเพิ่มการรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 โดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับว่านหอมแดง

ผู้วิจัย ดร. อัจฉรา เพิ่ม

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปี 2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง เปรียบเทียบกับเชื้ออิสระ ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ และการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบชิมโยเกิร์ตที่บรรจุและไม่บรรจุเม็ดบีด เมื่อผ่านการทดสอบในสภาวะจำลองของกรดในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องและการแช่เย็น พบว่าเชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าเชื้ออิสระที่เวลา 0 2 และ 4 สัปดาห์ โดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงจะมีการรอดชีวิตสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 มีค่ามากกว่า 10^7 cfu/g แต่เชื้ออิสระไม่สามารถรอดชีวิตได้ เชื้อที่ถูกห่อหุ้มที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนจะมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าเชื้อที่เก็บไว้ในโยเกิร์ต เชื้อที่ถูกห่อหุ้มจะมีการสร้างกรดแลคติกในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ เชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ได้ดีกว่าเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 โดยที่เชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีโซนการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ดีกว่าเชื้ออิสระ คะแนนความชอบรวมต่อโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีดจะอยู่ในช่วง 7.29-7.47 (ชอบปานกลาง) และคะแนนความชอบรวมมีความแตกต่างกันระหว่างโยเกิร์ตที่บรรจุและไม่บรรจุเม็ดบีดในสัปดาห์ที่ 4 จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงสามารถเพิ่มคุณสมบัติที่ดีของเม็ดบีดทั้งที่เก็บในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต

คำสำคัญ : ว่านหอมแดง *Lactobacillus plantarum* การห่อหุ้ม โปรไบโอติก โยเกิร์ต

Research Title Survival and metabolic activity enhancements of *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 by co-encapsulation with *Eleutherine americana*

Researcher Dr. Atchara Phoem

Faculty Science and Technology

Year 2017

Abstract

This study aimed to determine the survival and metabolic activities of *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 encapsulated in *Eleutherine americana* oligosaccharides extract both in a peptone solution and in yoghurt at 4 °C for 0, 2, and 4 weeks, and determine sensory evaluation of yoghurt samples. Survival of the encapsulated cells in the peptone solution and in yoghurt, after sequential exposure to simulated gastric and intestinal juices and refrigeration storage was higher than that of free cells. The highest count of viable cells at week 4 resulted from encapsulation with *E.americana* oligosaccharides extract. The cell viabilities were more than 10^7 cfu/g. However, no free cells survived at week 4. The viable count of encapsulated cells in peptone solution was higher than that of encapsulated cells in yoghurt. The peptone solution and yoghurt prepared with encapsulated cells showed less acidification, than the samples to which free cells had been added during refrigeration storage. The antibacterial activities of encapsulated cells against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were better than those against *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311. The peptone solution and yoghurt with added encapsulated cells had significantly higher inhibition zones than those with added free cells. The mean scores for overall acceptability of yoghurt containing encapsulated cells were in the range of 7.29-7.47 (where 7=like moderately). However, the panelist found clear differences between yoghurt with added and without added encapsulated cells at week 4. This study indicates that encapsulation of *Lactobacillus* cells with *E.americana* oligosaccharides extract could enhance their functional properties in peptone solution and in yoghurt.

Keywords : *Eleutherine americana*, *Lactobacillus plantarum*, microencapsulation, probiotic, yoghurt

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันวิจัย และพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่สนับสนุนทุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาประจำปีงบประมาณ 2559

ขอขอบพระคุณกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกมหาวิทยาลัยที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนสละเวลาในการตรวจทาน แก้ไข ปรับปรุงข้อผิดพลาดทำให้งานวิจัยฉบับนี้ถูกต้องสมบรูณ์ และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณพี่ๆและเพื่อนๆ โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย และคอยเป็นกำลังใจ รวมทั้งท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วยที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบรูณ์ด้วยดี

อัจฉรา เพิ่ม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	**ก**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ข**
กิตติกรรมประกาศ	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**ฉ**
สารบัญภาพ	**ช**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ขอบเขตการวิจัย	3
สมมติฐาน ตัวแปร และนิยามศัพท์เฉพาะ	4
บทที่ 2 ทฤษฎี	**6**
อาหารเสริมสุขภาพ	6
แบคทีเรียแลคติก	7
กระบวนการหมัก	24
การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก	29
จุลินทรีย์ประจำถิ่น	34
โปรไบโอติก	36

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
พรีไบโอติก	40
ไมโครเอนแคปซูเลชั่น	42
ว่านหอมแดง (*Eleutherine americana*)	46
ไมโครเอนแคปซูเลชั่น	42
โยเกิร์ต	47
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	48
บทที่ 3 การทดลอง	**51**
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	51
วิธีการทดลอง	53
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	**60**
การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต	60
กิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ*Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต	68
การทดสอบทางประสาทสัมผัส	74
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	**76**
สรุป	76
ข้อเสนอแนะ	77
เอกสารอ้างอิง	**78**
ภาคผนวก	**84**
ประวัติผู้วิจัย	**95**

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารที่จัดเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (functional foods)	7
2.2 สปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacillus* กลุ่มต่างๆ	14
2.3 การจัดกลุ่มของเชื้อสกุล *Lactobacillus*	15
2.4 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก	34
2.5 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์	35
2.6 ข้อดีและข้อเสียของเทคนิค extrusion และ emulsion	44
4.1 ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและการปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมด้วยโอลิโกแซคคาไรด์จากว่านหอมแดงและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า	61
4.2 การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงที่ผ่านระบบจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง โดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตเป็นเวลา 4 สัปดาห์	65
4.3 การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง โดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์	67
4.4 คะแนนทดสอบชิมโยเกิร์ตที่ใส่เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Pediococcus*	9
2.2 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Streptococcus*	10
2.3 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Lactobacillus*	13
2.4 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Leuconostoc*	16
2.5 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Carnobacterium*	17
2.6 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Lactococcus*	18
2.7 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Weissella*	19
2.8 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Enterococcus*	21
2.9 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Bifidobacterium*	22
2.10 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Tetragenococcus*	23
2.11 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Propionibacterium*	24
2.12 กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน	27
2.13 การทำไมโครเอนแคปซูเลชั่นด้วยวิธี extrusion และวิธี emulsion	43
2.14 ว่านหอมแดง (*Eleutherine americana*)	47
4.1 ลักษณะของเม็ดบีดที่ห่อหุ้มโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion technique)	60
4.2 การสร้างกรดแลคติกในสารละลายเพปโตน (a) และโยเกิร์ต (b) ที่มีเชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์	69
4.3 กิจกรรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเก็บไว้ในสารละลายเพปโตน (a,c) และโยเกิร์ต (b,d) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (i) และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 (ii) โดยวิธี agar well diffusion	72

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาสนใจดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป และพฤติกรรมการบริโภคอาหารมีส่วนทำให้เกิดความเสี่ยงก่อเกิดโรคต่างๆเช่น โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคท้องร่วง เป็นต้น ดังนั้นผู้บริโภคจึงหันมาให้ความสนใจในการบริโภคอาหารเสริมสุขภาพ (functional foods) ซึ่งเป็นอาหารที่บริโภคแล้วเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน ตัวอย่างอาหารเสริมสุขภาพเช่น ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก และผลิตภัณฑ์พรีไบโอติก เป็นต้น โปรไบโอติก (probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของบริโภค โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* การรอดชีวิตของโปรไบโอติกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น กระบวนการแปรรูปอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา และความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร หน่วยงาน International Dairy Federation (IDF) ได้กำหนดไว้ว่าผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกต้องมีแบคทีเรียที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^7 cfu/g จนกระทั่งถึงวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Shah, 2007)

โปรไบโอติกนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต และเนยแข็ง โดยเฉพาะโยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง แต่อย่างไรก็ตามกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของหัวเชื้อที่ใช้ในการทำโยเกิร์ตคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ทำให้โยเกิร์ตมีค่าพีเอช 4.8 ซึ่งเป็นอันตรายต่อการอดชีวิตของโปรไบโอติก ดังนั้นการห่อหุ้มโปรไบโอติกโดยใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชั่น (microencapsulation) เป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการเก็บ และความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารเพิ่มความคงตัวในการเก็บรักษาควบคุมอัตราการปลดปล่อยโปรไบโอติกอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ ทำให้มีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่เพียงพอส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค การห่อหุ้มเชื้อโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตมีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนตไม่เป็นพิษต่อเชื้อที่ถูกห่อหุ้ม และเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร (food additive) (Shah, 2007) นอกจากนี้การนำเชื้อโปรไบโอติกมาห่อหุ้มร่วมกับสารพรีไบโอติก (prebiotic) จะช่วยในการเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะแวดล้อมที่เป็นอันตรายได้ (Shoji และคณะ, 2009)

พรีไบโอติกเป็นสารกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ สารอาหารนี้สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์ในร่างกาย และจำกัดการ

เจริญของเชื้อที่ไม่มีประโยชน์ (Gibson และคณะ, 2004) พรีไบโอติกที่ใช้ทางการค้ามักจะถูกสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีและเอนไซม์ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภคในเชิงสุขภาพ ดังนั้นการสกัดพรีไบโอติกจากพืชในธรรมชาติเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค (Phoem และ Voravuthikunchai, 2013) ว่านหอมแดง (*Eleutherine americana*) เป็นพืชอาหารที่พบมากในท้องถิ่นภาคใต้มีการนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์ และประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ (Ifesan และคณะ, 2009a; Ifesan และคณะ, 2009b) สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (intestinal microbiota) (Phoem และ Voravuthikunchai, 2013a) นอกจากนี้การห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติก *Bifidobacterium longum* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและห่อหุ้มร่วมด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อดังกล่าวตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อในสภาวะที่มีความเป็นกรด และเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร (Phoem และ Voravuthikunchai, 2015b) รวมถึงการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อ *B.longum* ที่ประยุกต์ใช้ในเต้าหู้นมสด และน้ำสับปะรด (Phoem และ Voravuthikunchai, 2015c) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้เชื้อกลุ่ม lactobacilli เพราะเป็นเชื้อโปรไบโอติกที่มีความปลอดภัยสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Generally Recognized As Safe : GRAS) โดยเลือกใช้สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 จากงานวิจัยอื่นๆ พบว่า มีการห่อหุ้มเชื้อ lactobacilli ด้วยสารพรีไบโอติก เช่น ไคโตซาน (Krasaekoopt และ Watchrapoka, 2014) เพคตินและโปรตีนหางนม (Ribiero และคณะ, 2014) และอินนูลิน (Pinto และคณะ, 2012) ทำให้สามารถเพิ่มการรอดชีวิตเชื้อได้ดีในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร และการเก็บรักษาแบบแช่เย็น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาการรอดชีวิต และกิจกรรมแมทาบอลิซึมของ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมกับสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิต และกิจกรรมแมทาบอลิซึมของ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมกับสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมกับสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงในสภาวะที่มีความเป็นกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง และการเก็บรักษาในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.2 เพื่อศึกษากิจกรรมแมทาบอลิซึม (การสร้างกรดอินทรีย์ และการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ) ของ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมกับสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงที่เก็บรักษาในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.3 เพื่อศึกษาการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบชิม (sensory evaluation) โยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีดเปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่ไม่บรรจุเม็ดบีด

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1ทราบถึงวิธีการเพิ่มการรอดชีวิต และกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงในสภาวะที่เก็บรักษาในสารละลายเพปโตน และโยเกิร์ต

3.2 สามารถนำพืชว่านหอมแดงที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาประยุกต์ใช้ในอาหารเสริมสุขภาพ

3.3 มีการเผยแพร่องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยในการประชุมวิชาการ/วารสารวิชาการ/การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย

4. ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาการเพิ่มการรอดชีวิต (การทนต่อสภาวะเลียนแบบที่มีกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่อง และการเก็บรักษาแบบแช่เย็น) และกิจกรรมแมทาบอลิซึม (การสร้างกรดแลคติกและการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ) ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง เปรียบเทียบกับเชื้ออิสระ (เชื้อที่ไม่ถูกห่อหุ้ม) ที่เก็บในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบชิมโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีดเปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่ไม่บรรจุเม็ดบีด

5. สมมติฐาน ตัวแปร และนิยามศัพท์เฉพาะ

สมมติฐาน

เชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มด้วยโอลิโกแซคคาไรด์สกัดจากว่านหอมแดงสามารถรอดชีวิต และมีกิจกรรมแมทาบอลิซึมที่ดีกว่าเชื้ออิสระ

ตัวแปร

ตัวแปรต้น

- เชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มและไม่ห่อหุ้มด้วยโอลิโกแซคคาไรด์สกัดจากว่านหอมแดง
- ชนิดของพรีไบโอติก (co-encapsulating agent) ที่ใช้ห่อหุ้มเชื้อ
- การเก็บรักษาเม็ดบีดในสารละลายเพปโตน และโยเกิร์ต
- การทดสอบชิมโยเกิร์ตที่บรรจุและไม่บรรจุเม็ดบีด

ตัวแปรควบคุม

- ปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ใช้ทำ microencapsulation
- ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ โซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ทำ microencapsulation
- น้ำหนักของเม็ดบีด และปริมาณสารละลายเลียนแบบในสภาวะกรด และเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร
- อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ทดสอบการรอดชีวิตในสารละลายเลียนแบบในสภาวะกรด และเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร
- วิธีการหาปริมาณกรดอินทรีย์
- วิธีการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ

ตัวแปรตาม

- การรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระ

- คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบชิมโยเกิร์ต

นิยามศัพท์เฉพาะ

- โปรไบโอติก (probiotic) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย โดยปรับสมดุลในร่างกายและสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน และกรดแลคติก เป็นต้น

- พรีไบโอติก (prebiotic) คือ องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ สารกลุ่มนี้จึงเหลือไปถึงทางเดินอาหารบริเวณลำไส้ใหญ่ กลายเป็นอาหารของ โปรไบโอติก และส่งเสริมสุขภาพให้แก่เจ้าบ้าน

- การห่อหุ้มเชื้อ (microencapsulation) เป็นการห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกโดยใช้ตัวห่อหุ้ม (encapsulating agent) คือโซเดียมอัลจิเนต โดยอาจมีการห่อหุ้มร่วมด้วยกับสารพรีไบโอติกอื่นๆ (co-encapsulating agent) เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เชื้ออันเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ

- อาหารเสริมสุขภาพ (functional foods) คือ อาหารที่มนุษย์บริโภคเข้าไปแล้วให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน และเกลือแร่ จะช่วยลดอัตราความเสี่ยงต่อการเกิดโรค และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2

ทฤษฎี

1. อาหารเสริมสุขภาพ

อาหารเสริมสุขภาพ (functional foods) เป็นอาหารที่มนุษย์บริโภคเข้าไปแล้วให้ประโยชน์หรือคุณสมบัติอื่นๆต่อสุขภาพนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ ซึ่งคุณสมบัติพิเศษนี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยช่วยลดอัตราความเสี่ยงในการเกิดโรคคลอเรสเตอรอลในเลือดสูง โรคกระดูกพรุน โรคอ้วน และช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย (Gibson และคณะ, 2004) ตัวอย่างกลุ่มอาหารที่จัดเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (functional foods) เช่น วิตามิน เกลือแร่ โปรตีน ลิปิด ไฟโทเคมีคัล โปรไบโอติก และพรีไบโอติก **(ตารางที่ 2.1)** ที่มีการเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆดังนี้คือ (Contor, 2001)

เส้นใยอาหาร (dietary fiber) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องดื่มเสริมเส้นใยอาหาร ผลิตภัณฑ์ขนมอบเสริมเส้นใยอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเช้าธัญพืชเสริมเส้นใยอาหาร

น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) เช่น โอลิโกฟรุกโตส ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องดื่มเสริมน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมขบเคี้ยวเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ ผลิตภัณฑ์ลูกกวาด และหมากฝรั่งเสริมโอลิโกแซคคาไรด์

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โยเกิร์ตเสริมแบคทีเรียแลคติก ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตอัดเม็ดเสริมแบคทีเรียแลคติก

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในกลุ่มโอเมก้าทรี เช่น น้ำมันปลา EPA DHA ผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องดื่มผลิตภัณฑ์ลูกกวาดขนมหวาน ผลิตภัณฑ์ขนมอบ นมผงเสริมน้ำมันปลา

เกลือแร่ต่างๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น นมผง อาหารสำเร็จรูปเสริมแคลเซียม

ตารางที่ 2.1 สารที่จัดเป็นอาหารเสริมสุขภาพ (functional foods)

อาหารเสริมสุขภาพ	ตัวอย่าง
วิตามิน (vitamin)	วิตามินบี 6 บี 12 เค และดี
เกลือแร่ (mineral)	แคลเซียม แมกนีเซียม และสังกะสี
โปรตีน (protein)	เคซีนโปรตีนในนม
ลิปิด (lipid)	โอเมกาทรี
ไฟโทเคมีคัล (phytochemical)	ไอโซฟลาโวน ลิกนิน เบต้ากลูแคน
โปรไบโอติก (probiotic)	แบคทีเรียแลคติก
พรีไบโอติก (prebiotic)	โอลิโกแซคคาไรด์ เส้นใยอาหาร

ที่มา : Kaur และ Das (2011)

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจัดเป็นอาหารฟังก์ชั่นซึ่งอาจให้ผลไม่เท่ากับอาหารจากธรรมชาติ เนื่องจากปริมาณองค์ประกอบสารที่ต่างกัน สารออกฤทธิ์มีปริมาณและสัดส่วนที่ต่างจากที่มีในอาหารธรรมชาติ ผู้บริโภคจึงควรเลือกใช้โดยติดตามจากข้อมูลงานวิจัย และฉลากโภชนาการที่มีในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ประโยชน์คุ้มค่าต่อร่างกายในการเสริมสุขภาพให้มากที่สุด

2. แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่ต้องการอากาศ การจัดกลุ่มขึ้นอยู่กับรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคสความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ความสามารถเจริญได้ในที่มีเกลือความเข้มข้นสูงและการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกมีดังนี้ (Axelsson, 1993) คือ

Pediococcus

เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) เคยมีการเข้าใจว่ามีการแบ่งระนาบเดียวให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ **(ภาพที่ 2.1)** ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้าง

แคปซูล โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกต่างกัน เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติกไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (stab) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอดไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ มักพบในอาหารหมักไม่ค่อยพบในนมและผลิตภัณฑ์นม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) ตัวอย่างเช่น

Pediococcus pentosaceus

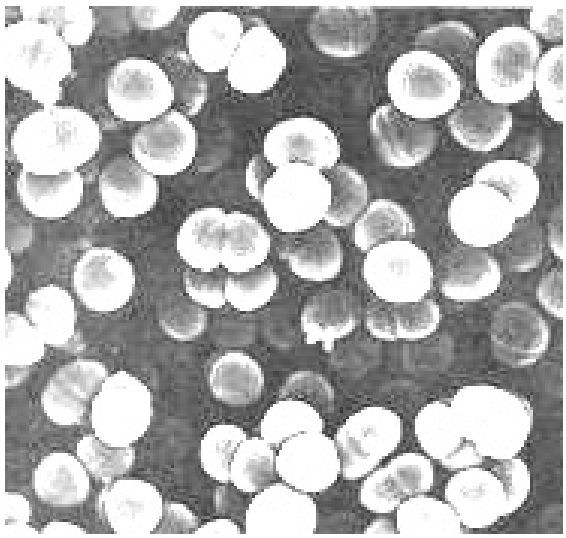
เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเติบโตบนอาหารกลูโคส (glucose) เพปโตน (peptone) และยีสต์เอ็กแทรกซ์ (yeast extract) โคโลนีสีขาวขนาดเล็กมาก ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไบโอติน (biotin) ไนอะซิน (niacin) และกรดโฟลิก (folic acid) ในการเจริญเติบโต ไม่ทนความร้อน เซลล์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 8 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น แตงกวาดอง

Pediococcus acidilactici

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.6-1.0 ไมโครเมตร ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) เพนทาโทนิก แอซิด (pentatonic acid) ในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 40 °C สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 52 °C และทนความร้อนได้ดีกว่า *Pediococcus pentosaceus* คือเซลล์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น กะหล่ำปลีดอง

Pediococcus halophilus

เซลล์เป็นรูปกลมมีขนาด 0.6-0.8 ไมโครเมตร การเจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็งเจริญเติบโตได้ช้ามาก ส่วนในอาหารเหลวก็เช่นกัน ต้องใช้เวลา 4-5 วัน พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 7 และ 8 อาหารที่ทำให้มีการเติบโตได้ดี คือ เช่น ไรโบฟลาวิน ไนอะซิน และกรดโฟลิก เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีเกลือแกง (NaCl) 6-8% เติบโตได้ดีในบริเวณที่มีเกลือแกง 18% และอาจทนต่อเกลือแกงความเข้มข้นสูงถึง 20-26% อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 40°C มักพบในอาหารหมักที่มีเกลือความเข้มข้นสูงๆ เช่น เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว น้ำปลา ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*



ภาพที่ 2.1 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Pediococcus*
ที่มา : http://www.vietsciences.free.fr/../images/Pediococcus.jpg

Streptococcus

โดยปกติเป็นเซลล์รูปกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายเมื่อเติบโตในอาหารเหลว **(ภาพที่ 2.2)** เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) บริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) บางชนิดต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มเติมในเติบโต เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกเป็นสารอาหารหลัก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถหมักกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดมาลิก (malic acid) กรดซิตริก (citric acid) และกรดอะมิโน (amino acid) เช่น ซีรีน (serine) อาร์จีนีน (arginine) ทดสอบคะตาเลส (catalase test) ให้ผลลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตปกติประมาณ 37 °C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแต่ละชนิด (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) ตัวอย่างเช่น

Streptococcus lactis

เซลล์รูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 30 °C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 °C เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแกง 4% ไม่เติบโตในบริเวณที่มีเกลือ 6% บางสายพันธุ์สร้างสารปฏิชีวนะ ไนซิน (nisin) ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ในนมและผลิตภัณฑ์นม

Streptococcus lactis subsp. *diacetyllactis*

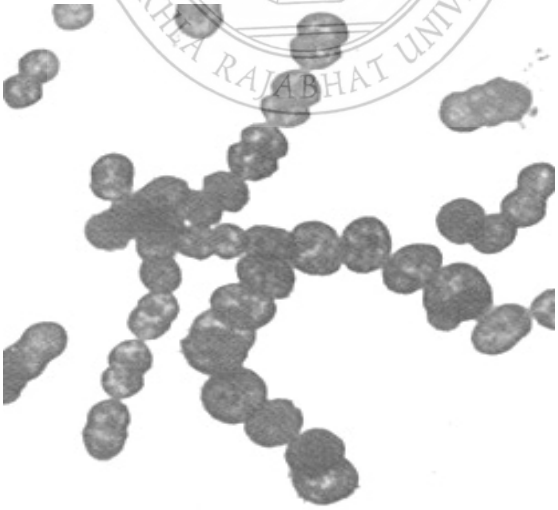
ลักษณะโดยทั่วไปเหมือน *S. lactis* แต่ *S. lactis* สายพันธุ์นี้สามารถหมักซิเตรต (citrate) ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) อะซิโตอิน (acitoin) และไดอะซิทิล (diacetyl)

Streptococcus cremoris

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-1.0 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาวโดยเฉพาะในนม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 30 °C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 40 °C สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 10 °C ไม่สามารถเติบโตในอาหารที่มีเกลือ 6% บางสายพันธุ์สามารถสลายซิเตรต (citrate) เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก (acitic acid) และ ไดอะซิทิล (diacetyl) บางสายพันธุ์ผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะต่างจาก *S. lactis* คือ ไม่สร้างอาร์จีนีน (arginine) มักพบในนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

Streptococcus thermophilus

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-0.9 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาว เติบโตในอาหารที่มีเกลือแกง 2.5% แต่บริเวณที่มีเกลือแกง 4% ไม่สามารถเติบโต อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญเติบโต 19-21 °C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญเติบโต 52 °C เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C อยู่รอดที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที มักพบในนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็งสวิส และโยเกิร์ต



ภาพที่ 2.2 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Streptococcus*
ที่มา : http://www.kepler.uag.mx/.../Streptococcus%20pyogenes.jpg

Lactobacillus

เซลล์รูปท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิลไล (coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด **(ภาพที่ 2.3)** เป็นพวกที่ทนกรด (aciduric) พีเอชที่เหมาะสมในการเติบโต 5.5-6.2 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง เป็นพวกต้องการออกซิเจนน้อย (microaerophilic) การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบก็จะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐ มักพบในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ เบียร์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง และบริเวณเนื้อเยื่อในท่อทางเดินอาหารและช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) ตัวอย่างเช่น

Lactobacillus acidophilus

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.6-0.9 x 1.5-6 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น แคลเซียมเพนโททิเนต (calcium pentotinate) กรดโฟลิก (folic acid) ไนอะซิน (niacin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) แยกได้จากอุจจาระของทารก มีบทบาทในการหมักนมเปรี้ยวชนิดต่างๆ เช่น คิวมิสส์ (Koumiss) เป็นนมม้าหมักที่มีกรดและแอลกอฮอล์ถิ่นเดิมอยู่ทางตอนใต้ของรัสเซีย

Lactobacillus delbrueckii

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.5-0.8 x 2-9 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต คือ กรดเพนโททินิก (pentotinic acid) และไนอะซิน (niacin) บางสายพันธุ์ต้องการไรโบฟลาวิน (riboflavin) กรดโฟลิก (folic acid) วิตามินบี 12 (vitamin B12) และไทอะมีน (thiamine) และไม่ต้องการไทอะมีน (thiamine) ไพริดอกซิน (pyridoxine) ไบโอติน (biotin) และกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (para aminobenzoic acid) แบ่งได้เป็น 3 ชนิดย่อย คือ

Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii*

แยกได้จากผักดองที่หมักที่อุณหภูมิสูงๆ (40-53°C)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

แยกได้จากโยเกิร์ต และเนยแข็ง

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*

แยกได้จากนม เนยแข็ง ยีสต์ขนมปัง และธัญพืช

Lactobacillus plantarum

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.9-1.2 x 3-8 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (calcium pentotinate) ไนอะซิน (niacin) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผักดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ช่องปาก และอุจจาระคน

Lactobacillus casei

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (riboflavin) กรดโฟลิก (folic acid) แคลเซียมแพนโททิเนต (calciumpentotinate) ไนอะซิน (niacin) แยกได้จากนม เนย ผลิตภัณฑ์นม มีบทบาทในการหมักยาคูลท์ แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

Lactobacillus casei subsp. *casei*

Lactobacillus casei subsp. *pseudoplantarum*

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus*

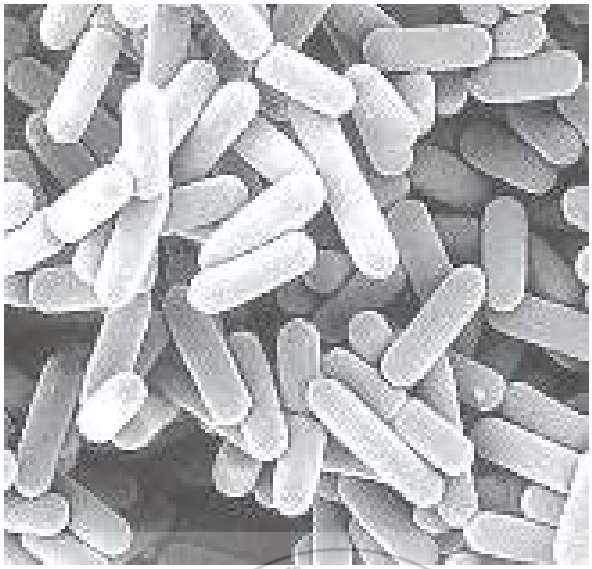
Lactobacillus casei subsp. *toleran*

Lactobacillus fermentum

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.5-0.9ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการ แคลเซียมเพนโททิเนต (calcium pentotinate) ไนอะซิน (niacin) ไทอะมีน (thiamine) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากยีสต์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์นม ผักกาดดอง น้ำทิ้ง ปาก และอุจจาระคน

Lactobacillus brevis

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.7-1.0 x 2-4 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (calcium pentotinate) ไนอะซิน (niacin) ไทอะมีน (thiamine) และกรดโฟลิก (folic acid) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากนม เนยแข็ง กะหล่ำปลีดอง ลำไส้ ปาก และอุจจาระคน



ภาพที่ 2.3 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Lactobacillus*
ที่มา : http://www.dicat.csic.es/rdcsic/images/Lactobacillus.jpg

Lactobacillus จัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Axelsson, 1993) ตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ **(ตารางที่ 2.2)** คือ

1) Streptobacterium

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15 °C อาจเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45 °C หรือไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45 °C

2) Thermobacterium

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 45 °C แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 15 °C

Lactobacillus จัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการใช้อาหารและการสร้างสาร **(ตารางที่ 2.2)** คือ

1) Facultative heterofermentative lactobacilli

เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส (hexose) และน้ำตาลเพนโทส (pentose) ได้ ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

2) Obligately heterofermentative lactobacilli

เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส แต่ไม่หมักน้ำตาลเพนโทส เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3) Obligately homofermentative lactobacilli

เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส แต่ไม่หมักน้ำตาลเพนโทส ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ตารางที่ 2.2 สปีชีส์ของเชื้อ *Lactobacillus* ในกลุ่มต่างๆ

แบ่งตามลักษณะการใช้น้ำตาล และการสร้างสารยับยั้ง	
homofermentative	heterofermentative
Obligately homofermentative lactobacilli *- Lactobacillus acidophilus, L. ruminis* *L. delbrueckii, L. helveticus, L. jensenii,* และ *L. amylovorus*	**Facultatively heterofermentative lactobacillli** *- L. plantarum, L. pentosus, L. casei, L. sake* และ *L.rhamnosus* **Obligately heterofermentative lactobacilli** *- L. brevis, L. buchneri, L. bifermentans,* *L. cinfusus* และ *L. hilgardii*
แบ่งตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ	
เติบโตที่อุณหภูมิ 15 °C	ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 15 °C
Streptobacterium *- L. casei* และ *L. plantarum*	**Thermobacterium** *- L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis,* *L. jugurti, L. acidophilus, L. leichmannii,* *L. delbrueckii* และ *L. salivarius*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Axelsson (1993)

นอกจากนี้การจำแนก *Lactobacillus* แต่ละกลุ่มอาจศึกษาจากการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนส (gluconate) การสร้าง FDP aldolase และการสร้าง phosphoketolase **(ตารางที่ 2.3)**

ตารางที่ 2.3 การจัดกลุ่มของเชื้อสกุล *Lactobacillus*

คุณสมบัติ	Obligately homofermnetative	Facultatively heterofermentative	Obligately heterofermentative
- การหมักน้ำตาลเพนโทส	-	+	+
- การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
- การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+[a]	+
- การสร้าง FDP aldolase	+	+[b]	-
- การสร้าง phosphoketolase	-	+	+

[a] เกิดจากกระบวนการหมัก

[b] ชักนำน้ำตาลเพนโทส

ที่มา : Kandler and Weiss (1986)

Leuconostoc

เซลล์อาจเป็นรูปกลมแต่โดยมากมักเป็นรูปรี โดยเฉพาะเมื่อเติบโตในอาหารแข็ง การเรียงตัวมักเป็นคู่หรือเป็นสาย **(ภาพที่ 2.4)** เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อเติบโตในอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดเล็กมาก โดยมากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมักน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร มักต้องการกรดอะมิโน (amino acid) และสารเร่งการเจริญเติบโต ทุกชนิดต้องการกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ไทอะมีน (thiamine) ไบโอติน (biotin) และกรดเพนโททินิก (pentotinic acid) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติก (lactic acid) เอทานอล (ethanol) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไม่สามารถไฮโดรไลซิสอาร์จีนีน (arginine) สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิล (diacetyl) จากซิเตรต (citrate) ในนมได้ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) ตัวอย่างเช่น

Leuconostoc mesenteroides

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ สามารถสร้างเมือกเด็กซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้ดีที่อุณหภูมิ 20-25 °C ในอาหารเหลวกลูโคสเซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 30 นาที มักพบในสารละลายน้ำตาล ผัก ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*

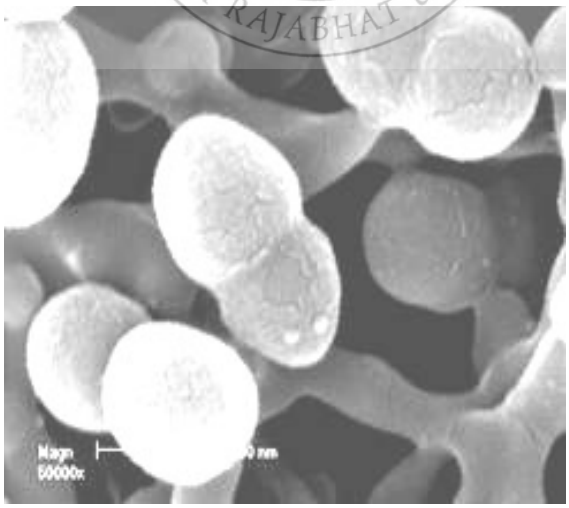
เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ สามารถสร้างเมือกเด็กซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้เช่นกัน แต่ไม่ดีเท่ากับ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* มักพบในผัก ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาว ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส สามารถละลายซิเตรต (citrate) เป็นอะซิเตต (acetate) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) อะซิโตน (acetone) และไดอะซิทิล (diacetyl) มักพบในนม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc lactis

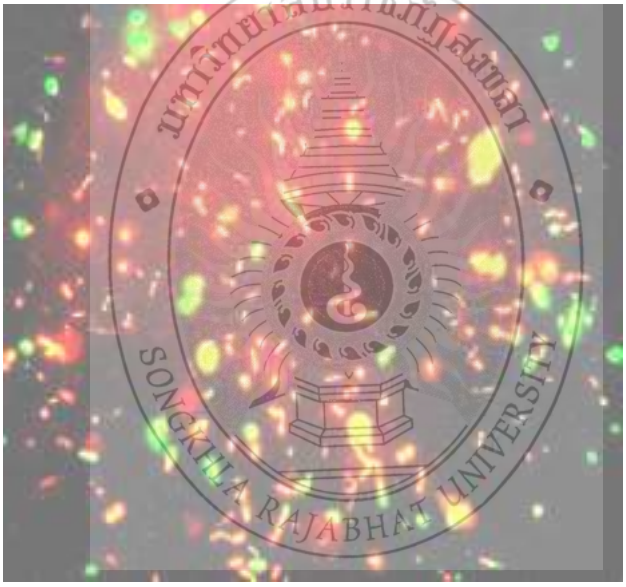
เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร ทนต่อความร้อนได้ดีกว่าชนิดอื่นๆ โดยปกติสามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที มักพบในนม และผลิตภัณฑ์นม



ภาพที่ 2.4 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Leuconostoc*
ที่มา : http://www.fde.metu.edu.tr/../image004.jpg

Carnobacterium

เป็นรูปท่อน แกรมบวก **(ภาพที่ 2.5)** ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส เดิมจัดอยู่ในพวก Lactobacilli เป็นเชื้อที่มีขนาดสารพันธุกรรม (phylogeny) ใกล้เคียงกับ Enterococci และ Vagococci มากกว่า Lactobacilli เชื้อ *Carnobacterium* จัดเป็นเชื้อที่มีการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative เชื้อส่วนใหญ่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 0 °C และไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 °C เชื้อบางชนิดสร้างก๊าซจากการหมักน้ำตาลกลูโคส เชื้อ *Carnobacterium* แตกต่างจาก Lactobacilli ตรงที่ไม่สามารถเติบโตได้บนอาหารอะซิเตต (acetate medium) และไม่สามารถสังเคราะห์กรดโอเลอิก (oleic acid) มักพบเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งปลาและไก่ที่บรรจุแบบสุญญากาศมีปริมาณเบสก้วนีนและไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 33-37.2 เปอร์เซ็นต์โมล (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) ตัวอย่างเช่น *C. divergens* และ *C. piseicola* เป็นต้น



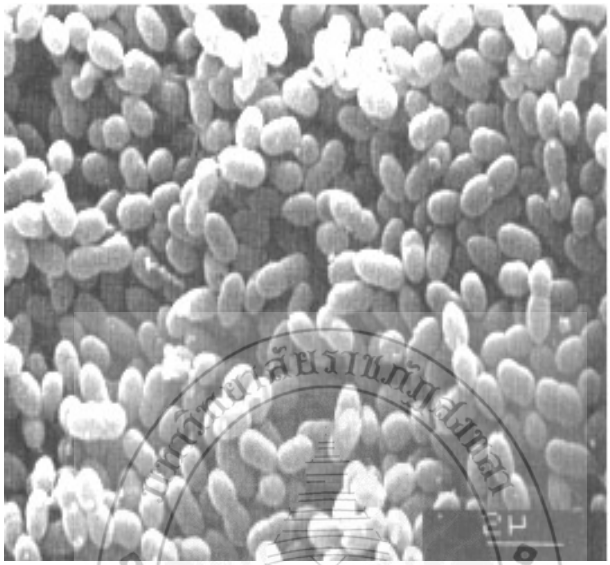
ภาพที่ 2.5 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Carnobacterium*
ที่มา : http://www.futura-sciences.com/img/bacteries1.jpg

Lactococcus

เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* โดยเป็นเชื้อรูปกลมหรือรูปไข่อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือต่อกันยาวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก **(ภาพที่ 2.6)** ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ต้องการอาหารที่อุดมสมบรูณ์ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30 °C แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 °C พบได้ในนม และผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ ตัวอย่างเช่น

Lactococcus lactis

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงตัวเป็นโซ่สั้นๆ มีขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างกรดแลคติกในปริมาณมาก พบได้ในเนยแข็งและเนยอ่อน



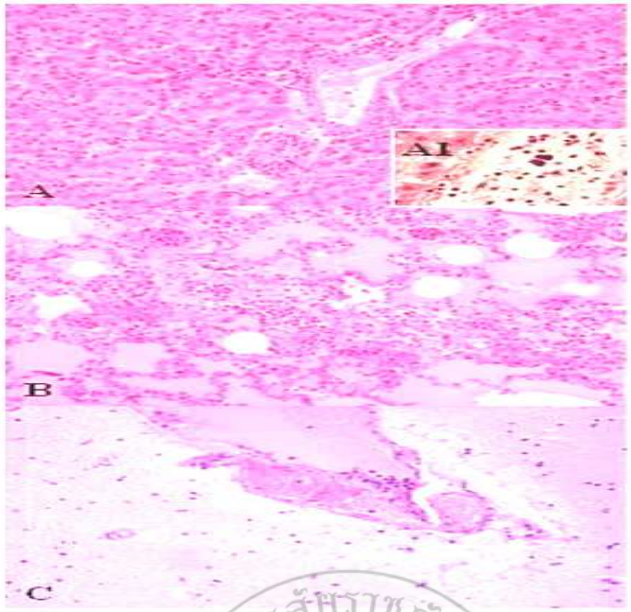
ภาพที่ 2.6 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Lactococcus*
ที่มา : http://www.mogen.biol.rug.nl/../images/llactis.jpg

Vagococcus

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม หรือรูปไข่ ท่อนสั้น เซลล์อยู่เป็นแบบเดี่ยวๆ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นเชื้อที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 °C แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 °C สามารถเติบโตได้ในบริเวณที่มีเกลือแกง 4 % แต่ไม่เติบโตในบริเวณที่มีเกลือแกง 6.5 % ในพีเอชที่ 9.6 จะไม่พบการเติบโตของเชื้อนี้ เป็นเชื้อที่มีปริมาณเบสกัวนีน และไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ 33.6 เปอร์เซ็นต์โมล แหล่งที่พบเชื้อนี้ คือ ปลา อุจจาระ น้ำ และอาหาร (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

Weissella

เป็นแบคทีเรียแลคติก รูปกลมที่แยกกลุ่มออกมาจาก *Leuconostoc paremesenteroides* เป็นเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* (ภาพที่ 2.7) มีปริมาณเบสกัวนีน และไซโตซีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 37-47 เปอร์เซ็นต์โมล



ภาพที่ 2.7 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Weissella*
ที่มา : http://www.cdc.gov/../vol9 no10/images/02-0667_1 b.jpg

Enterococcus

เป็นแบคทีเรียมีรูปร่างกลม มีจำนวนมากกว่า 22 สปีชีส์ เดิมได้รวมแบคทีเรียในสกุลนี้ไว้กับ fecal Streptococci 2 สปีชีส์ คือ *Streptococcus bovis* และ *Streptococcus equinus* แต่ในปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่ม fecal Streptococci ไม่รวมกับสกุล *Enterococcus* (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) **(ภาพที่ 2.8)**

Enterococcus faecalis และ *Enterococcus faecium* (classic Enterococci) ได้มีการใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำ และมีการเปรียบเทียบ Classic Enterococci กับ Coliform ในฐานะที่เป็นดรรชนีบ่งชี้ความปลอดภัยของอาหาร

การใช้ Classic Enterococci เป็นดรรชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำ มีเหตุผลดังนี้ คือ

1) Classic Enterococci ไม่เพิ่มจำนวนในน้ำ โดยเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณสารอินทรีย์ต่ำ
2) ในอุจจาระของมนุษย์มี Classic Enterococci น้อยกว่า *E.coli* คิดเป็นอัตราส่วน fecal Coliform ต่อ Enterococci 4:1 หรือสูงกว่า ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนจากของเสียของมนุษย์

3) ในน้ำ Enterococci จะตายช้ากว่า Fecal Coliform ดังนั้นจึงน่าจะใช้ Enterococci ชี้บ่งถึงเชื้อโรคในน้ำที่ต้องการค้นหาได้ดีกว่า Fecal Coliform
4) การใช้ Enterococci และ Fecal Coliform เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระ โดยในอุจจาระของมนุษย์มี Enterococci ทุกตัวอย่าง 100% ในขณะที่ที่มี Fecal Coliform เพียง 86-89%

การจำแนก Enterococci และความต้องการในการเจริญเติบโต

แม้ว่า Classic Enterococi ไม่ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารและน้ำแทน Coliform แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้ก็มักพบในอุจจาระไม่แพ้ Coliform เช่น *Enterococcus faecalis* พบในอุจจาระของสัตว์เลือดอุ่นบ่อยๆ และ *Enterococcus faecium* พบในอุจจาระของหมูบ้าน และหมูป่า

Enterococci ต้องการอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน (fastidious) โดยเฉพาะความต้องการอาหารที่มีวิตามินบี และกรดอะมิโนเฉพาะชนิด Enterococci จะเจริญในช่วงพีเอชที่กว้างกว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) หรือสภาวะที่มี Eh ต่ำด้วย

Enterococci กับความปลอดภัยในอาหาร

Classic Enterococci เป็นตัวชี้วัดสุขลักษณะของอาหารดีกว่า Coliform โดยเฉพาะอาหารแช่แข็ง จากการวิเคราะห์ผักแช่แข็งที่ผลิตเป็นการค้าจำนวน 376 ตัวอย่าง พบว่า Coliform เหมาะสมที่จะใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารมากกว่า Enterococci ก่อนแช่แข็ง แต่หลังจากแช่แข็งแล้วและเก็บไว้ในสภาวะแช่เยือกแข็ง Enterococci เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพอาหารมากกว่า Coliform อาหารแช่แข็งเมื่อเก็บไว้ 1 ปี อัตราการรอดชีวิตของ Enterococci ต่อ Coliform เป็น 89% และ 60% ตามลำดับ **(ตารางที่ 2.8)**

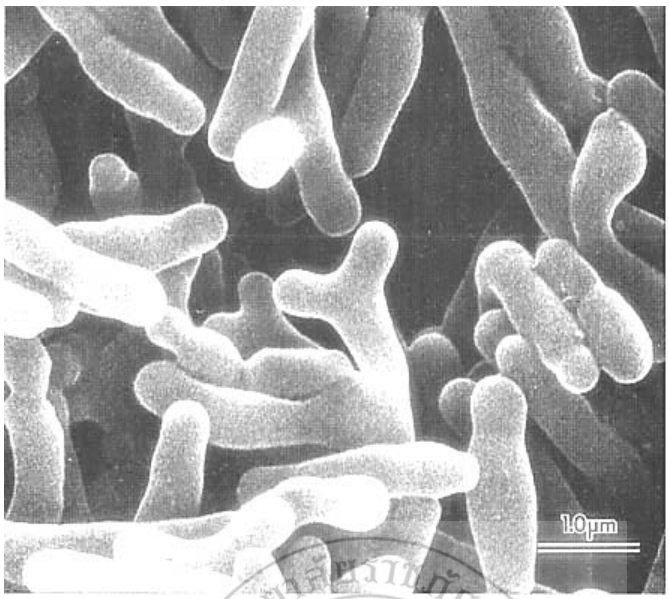
ภาพที่ 2.8 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Enterococcus*
ที่มา : http://www.jgi.doe.gov/news/news_bug2.jpg

Bifidobacterium

ประกอบด้วยสมาชิกอย่างน้อย 27 สปีชีส์ ลักษณะโดยทั่วไป มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น **(ภาพที่ 2.9)** ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-28 °C แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43-45 °C เจริญได้ดีที่ค่าพีเอช 5-8 ในกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) สารอาหารคาร์โบไฮเดรตจะปลดปล่อยกรดแลคติกและกรดอะซิติกเป็นสำคัญ ใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ บางสปีชีส์ถูกนำมาใช้ในการผลิตนมหมัก โยเกริต์ และผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเชื่อว่าจะทำให้มีสุขภาพดี (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

Bifidobacterium เคยพบในอุจจาระของมนุษย์ในระดับ 10^8-10^9 cfu/g มากกว่า *E.coli* พบ 10^6-10^7 cfu/g จึงน่าที่จะนำมาใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระมนุษย์แทน *E.coli* แต่มีจุดด้อยอยู่ที่ว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เจริญเติบโตได้ช้า และใช้เวลาหลายวันกว่าจะรู้ผลและมีแนวโน้มที่จะเจริญเติบโตในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์และอาหารทะเลมากกว่าผัก เพราะผักตามธรรมชาติมี Eh สูงกว่าเนื้อและอาหารทะเล จึงเป็นไปได้ว่า *Bifidobacterium* เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้คุณภาพของเนื้อสัตว์และอาหารทะเลมากกว่าอาหารอย่างอื่น

ในกรณีที่ใช้ *Bifidobacterium* เป็นตัวชี้วัด สามารถบอกแหล่งที่มาของการปนเปื้อนได้ 3 ทาง คือ ทางอุจจาระของมนุษย์ อุจจาระของสัตว์ และสิ่งแวดล้อม



ภาพที่ 2.9 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Bifidobacterium*
ที่มา : http://www.agr.hokdai.ac.jp/jslab/images/cover122.jpg

Tetragenococcus

Tetragenococcus halophilus เป็นแบคทีเรียแลคติก รูปกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ หรือคู่ หรือเซลล์เดี่ยว ย้อมติดสีแกรมบวก **(ภาพที่ 2.10)** ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

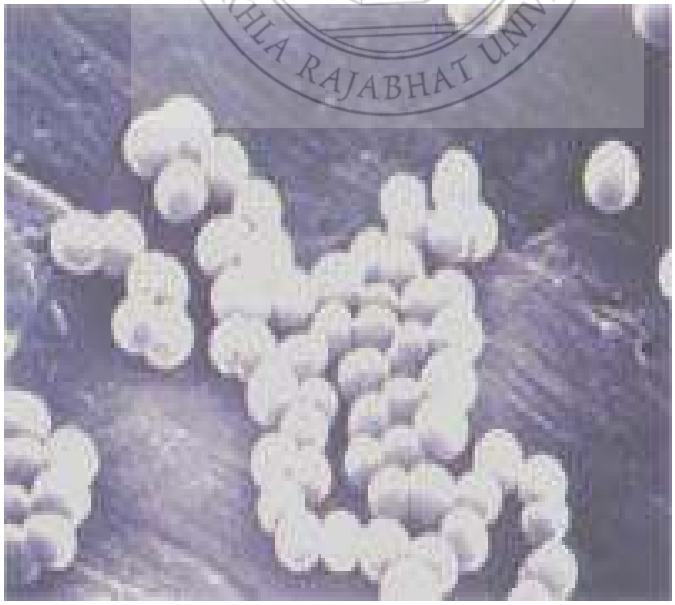
การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่

1) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นสี่เซลล์
2) คุณสมบัติทางการเจริญ เป็นเชื้อที่เจริญได้ช้าบนอาหารแข็ง มีโคโลนีเป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผิวโคโลนีเรียบ และมีสีขาวเทา และใช้เวลา 4-5 วัน สำหรับการเติบโตในอาหารเหลว
3) คุณสมบัติทางสรีรวิทยา เป็นเชื้อที่ต้องการพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตระหว่าง 7-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 30-35 °C เป็นแบคทีเรียชอบเค็มสามารถเติบโตได้ในที่ที่มีเกลือแกง 18%
4) คุณสมบัติทางชีวเคมี เป็นแบคทีเรียแลคติกชนิด homofermentative ที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกที่มีไอโซเมอร์แบบแอล (L) และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บ้างเล็กน้อย ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่ย่อยอาร์จีนีน (arginine) ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท แต่

สามารถหมักน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) ไรโบส (ribose) มอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) มอลโทไทรโอส (maltotriose) กลีเซอรอล (glycerol) และมีค่าเปอร์เซ็นต์โมลของ G+C เป็น 34-36 %

ในปัจจุบัน *P.halophilus* จัดอยู่ในสกุล *Tetragenococcus halophilus* เนื่องจากมีการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ของ *Pediococcus halophilus* พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci และ *Carnobacterium* มากกว่า *Pediococcus* จึงจัด *Pediococcus halophilus* ไว้ในสกุล *Tetragenococcus*

จากการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาความคล้ายคลึงของ ดีเอ็นเอจากเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริดไดเซชั่น (DNA hybridization) รวมทั้งการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ให้อยู่ใน *Tetragenococcus halophilus* จึงได้เสนอเป็นสปีชีส์ใหม่คือ *Tetragenococcus muriaticus* ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้คือ ย้อมติดสีแกรมบวก รูปกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.8 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสี่เซลล์หรือเป็นคู่ เคลื่อนที่ไม่ได้ โคโลนีมีสีขาว ขอบเรียบ โค้งนูน เจริญได้ในที่มีเกลือแกง 1-25% เจริญที่อุณหภูมิ 15-40 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 °C แต่ไม่เจริญที่ 45 °C เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอช 5-9 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.5-8 และเป็นแบคทีเรียที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่ย่อยอาร์จีนีน ไม่รีดิวส์ไนเตรต สร้างฮีสตามีน และหมักน้ำตาลชนิดต่างๆได้



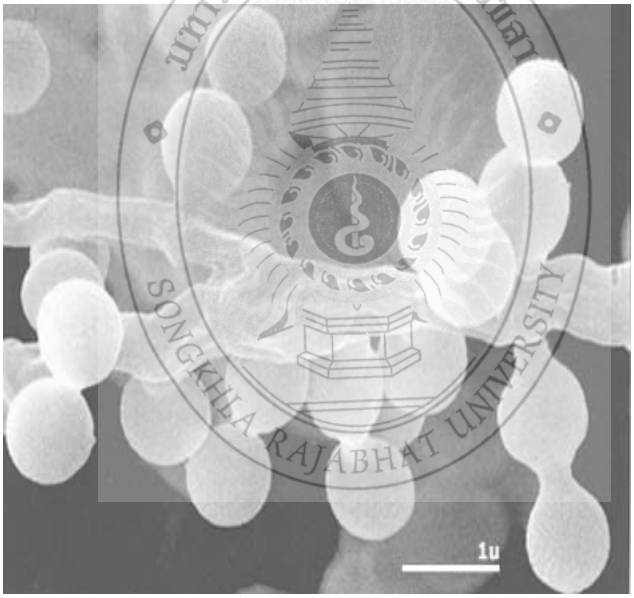
ภาพที่ 2.10 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Tetragenococcus*
ที่มา : http://www.kiifc.kikkoman.co.jp/tenji/image/nyusan.jpg

Propionibacterium

เป็นเชื้อแกรมบวกรูปท่อน มีการเรียงตัวเป็นคู่ **(ภาพที่ 2.11)** ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) พบได้เกือบทุกส่วนของร่างกายโดยทั่วไปไม่เป็นเชื้อก่อโรค บางสปีชีส์ของ *Propionibacterium* พบในอาหารพวกเนยแข็ง และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

Propionibacterium freudeureichii มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดรูใน Swiss cheese มีการสร้างกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) จากการสลายตัวของกลูโคส ทำให้ Swiss cheese มีรสชาติที่ดี

ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ คือ *Propionibacterium acidipropionici Propionibacterium acenes Propionibacterium australliense Propionibacterium avidium Propionibacterium jensenii* และ *Propionibacterium microaerophilum* เป็นต้น



ภาพที่ 2.11 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกสกุล *Propionibacterium*
ที่มา : http://www.nih.go.jp/../section_8/pics_s8/8-11-1A.jpg

3. กระบวนการหมัก

เป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักจะมีอยู่ทั้งในสภาพรีดิวซ์ และออกซิไดซ์ สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรตจะเป็นสารอะไรนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ คือ ชนิดของเชื้อ ชนิดของคาร์โบไฮเดรต และสภาวะการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ เวลา และความ

เป็นกรดด่าง โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรตและแอลกอฮอล์ อาจจะมีก๊าซไฮโดรเจน (H_2) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กรดบางชนิด แอลกอฮอล์ และสารพวกคีโตน และแบคทีเรียที่มีการหมักได้ปกติจะเป็นพวกที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe)

จากการศึกษาวิถี (pathway) ของการหมัก พบว่าที่สำคัญสำหรับการย่อยสลาย กลูโคส คือ Embden Meyerhof pathway Pentose Shunt และ Entner-Dandoroff pathway โดยทั้ง 3 วิถีนี้ โมเลกุลของกลูโคสจะต้องถูก phosphorylation คือ มีการเติม phosphate group เข้าไปในช่วงต้นของวิถี และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ จะมีการหมักอยู่ 5 แบบ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548) **(ภาพที่ 2.12)** คือ

1) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation)

โดยแบคทีเรียที่สร้างแอลกอฮอล์ (alcoholic bacteria) จะย่อยสลายกลูโคสจนได้เป็น กรดไพรูวิก (pyruvic acid) โดยผ่าน Embden Meyerhof pathway สุดท้ายได้สมการ

glucose $\longrightarrow$ 2 ethanol + CO_2

2) กระบวนการหมักกรดโพรพิโอนิก (propionic acid fermentation)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ การเจริญต้องการสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) สุดท้ายจะได้กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

3) กระบวนการหมักของกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform group fermentation)

เป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- ย่อยกลูโคสให้กรดชนิดต่างๆ เช่น *E.coli*
- ย่อยสลายกลูโคสสุดท้ายได้บิวทิลีนไกลคอล (butylene glycol) เป็นส่วนใหญ่

4) กระบวนการหมักบิวทิล แอลกอฮอล์ (butyl alcohol fermentation)

พบในแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* sp. การย่อยสลายกลูโคสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) บิวทิล แอลกอฮอล์(butyl alcohol) อะซิโตน (acetone) ไอโซโพรพิว แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) และจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับก๊าซไฮโดรเจน (H_2) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ที่สำคัญจะไม่มีกรดแลคติก (lactic acid)

5) กระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation)

กระบวนการหมักกรดแลคติกเกิดในไซโทพลาสซึม มีการสร้างพลังงานแบบ substrate level phophorylation แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของผลผลิตที่เกิดขึ้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

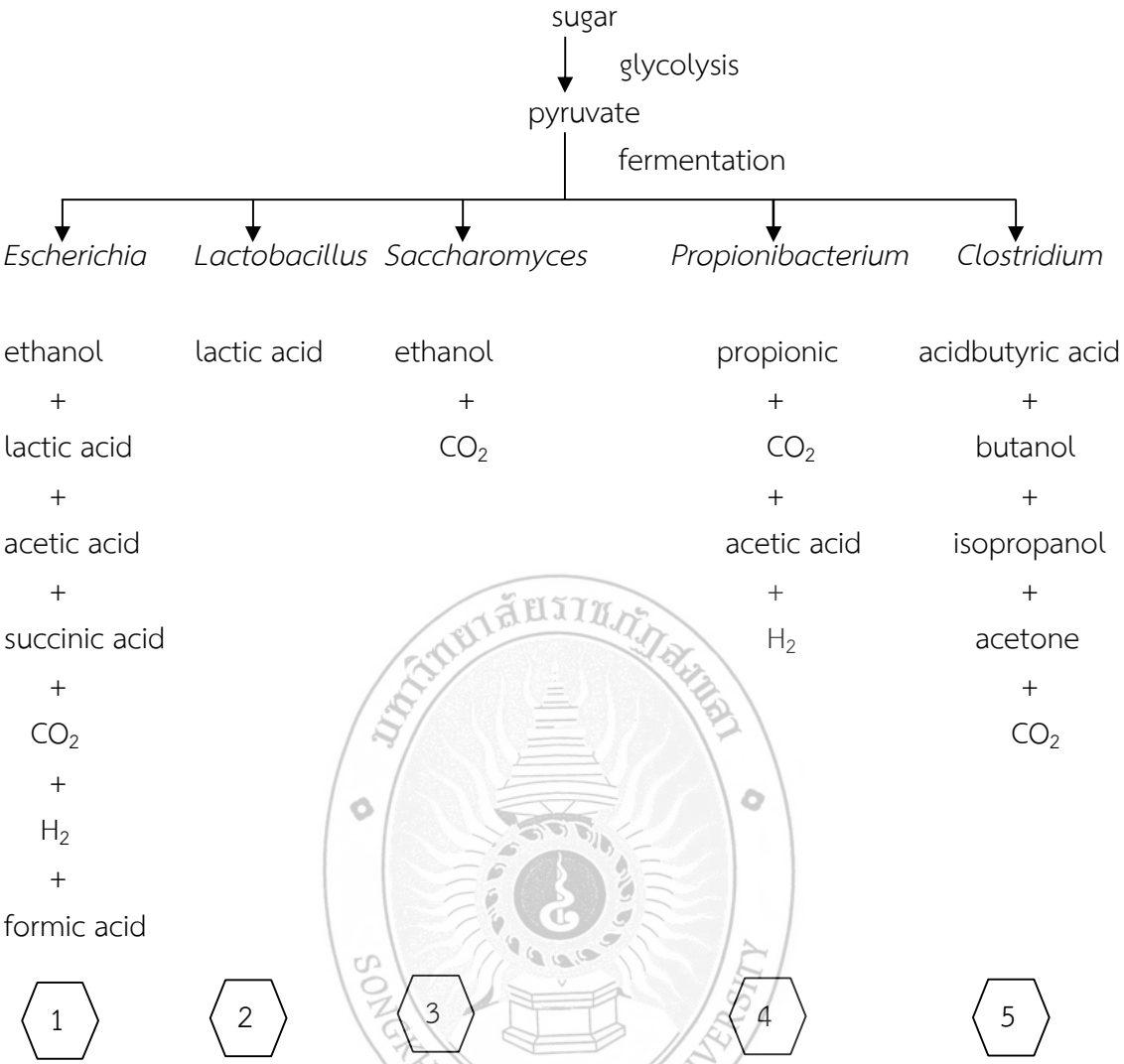
5.1) homofermentative

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตเพียงชนิดเดียว คือ กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80% โดยผ่าน glycolysis (Embden Meyerhof pathway : EMP) และเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่า homofermentative bacteria เช่น *Pediococcus* *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัล-3-ฟอตเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชั่นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอตเฟต

5.2) heterofermentative หรือ mixed acid fermentation

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตหลายชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก 20-25% กรดแลคติก 50% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% โดยผ่าน phosphoglyconate หรือ phosphoketolase pathway และเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า heterofermentative bacteria เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด



ภาพที่ 2.12 กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

1 คือ Coliform group fermentation

2 คือ lactic acid fermentation

3 คือ alcoholic fermentation

4 คือ propionic acid fermentation

5 คือ butyric acid fermentation

ที่มา : นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ (2548)

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชั่น (oxidation) และดีคาร์บอกซิลเลชั่น (decarboxylation) ร่วมด้วย น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอตเฟตซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และอะซิทิลฟอตเฟต (acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phophoketolase enzyme) กลีเซอรัลดีไฮด์ฟอตเฟต (glyceroldehyde phosphate) จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (lactate) เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซิสในการหมักแบบ homofermentative แต่เนื่องจากการหมักแบบ heterofermentative มีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอตเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP 1 โมเลกุล

ในอนาคตของอะเซทติลฟอตเฟต ขึ้นอยู่กับว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอนอะเซทติลฟอตเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเอง ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลได้เป็น NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์เอ็นเอดีเอช ออกซิเดส (NADH oxidase) และ เพอรอกซิเดส (peroxidase) ปล่อยอะเซทติลฟอตเฟตที่มีมากพอไปเป็นอะซิเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอตเฟตให้กับซับเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลจากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบ homofermentative

ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆด้วย เช่น ฟรุกโตส (fructose) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์เป็นแมนนิทอล (mannitol)

การระบุว่าเกิดการหมักแบบ heterofermentative หรือไม่ อาศัยการชี้บ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น Lactobacilli ทำให้เกิดการหมักแบบ heterofermentative บางชนิดไม่ทนกรด ถูกนำมารวมไว้ในสกุลใหม่คือ *Carnobacterium*

4. การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีบทบาทในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักเนย ผักดอง ไส้กรอกหมัก และแหนม เป็นต้น ในกระบวนการหมักแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารหลายชนิด ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร สารยับยั้ง (inhibitory substances) เหล่านี้ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไดอะซิทิล (diacetyl) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ไมโครแกรด (micrograd) กรดแลคติก (lactic acid) และรูทีรีน (ruterin) เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria : LAB) สามารถสร้างสารยับยั้งในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร สารยับยั้ง (inhibitory substances) (อรวินทร์ เสาหรัชตนันท์, 2532) มีดังนี้ คือ

กรดแลคติก (lactic acid)

แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติก ทำให้พีเอชของอาหารลดลง มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารหมักดองประเภทต่างๆ เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอื่นๆด้วย

กรดอะซิติก (acetic acid)

กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียพวก heterofermentative Lactobacilli ซึ่งกรดดังกล่าวมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่ากรดอะซิติกใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองชนิดต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการถนอมอาหารต้องใช้ความเข้มข้นอย่างต่ำ 3.6%

นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดแลคติกและกรดอะซิติกร่วมกัน หรือใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์อื่นๆ โดยมีการใช้ในเนื้อวัวที่ขายปลีกจะช่วยลดแบคทีเรียทั้งหมด และ *E.coli* เป็นจำนวน 1 log แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้น การยับยั้งเนื่องจากกรดทั้งสองชนิดจะเพิ่มขึ้นโดยสามารถลดจำนวนเชื้อลง 2 log และเมื่อมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น การฉีดพ่นกรดอะซิติก กรดแลคติก สารสกัดจากขิง สารสกัดจากกระเทียม และสารสกัดหอมลงไปในเนื้อ โดยการฉีดพ่นเพียงเดี่ยวๆ หรือรวมกับเกลืองแกง (NaCl) จะช่วยยืดอายุการเก็บ ส่วนการสังเกตสี กลิ่น และการทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิม โดยเมื่อพิจารณาคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะดีกว่าเนื้อที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบแสดงว่ากรดอินทรีย์และเครื่องเทศที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย และสามารถใช้เก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิห้องได้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการแมทาบอลิซึมในระหว่างการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก ที่จะไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดสจะไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

ในอาหารหมักจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อย เนื่องจากมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีผลดีตรงที่จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มากเกินไป ซึ่งอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

วิธีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีแตกต่างกันหลายแบบดังนี้ (อรัญญา สังขศรี, 2541) คือ

$$\text{pyruvate} + O_2 + PO_4^{3-} \xrightarrow[\text{pyruvate oxidase}]{} \text{acetyl phosphate} + CO_2 + H_2O_2$$

$$\text{lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{L-lactate oxidase}]{} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

$$\text{lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{NAD-independent D-lactate dehydrogenes}]{} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

$$NADH + H + O_2 \xrightarrow[\text{NADH oxidase}]{} NAD + H_2O_2$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีการนำมาใช้ในการถนอมอาหาร มีการเติมลงในน้ำนมดิบโดยใส่ที่ความเข้มข้น 0.02-0.05% จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ และมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.04-0.08% ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53 °C นาน 30 นาทีในนมพาสเจอไรซ์ ปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และพวกโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบในนมได้

เอทานอล (ethanol)

เกิดจากการหมักแบบ heterofermentative ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดเอทานอลเกิดขึ้น เป็นสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอทานอลจะเกิดขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม

อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

เป็นผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายของสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปจะมีจำนวนเพียงเล็กน้อยซึ่งมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารเป็นสำคัญ และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอะซิทัลดีไฮด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกเมื่อมีความเข้มข้น 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้

ไดอะซิทิล (diacetyl)

แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตไดอะซิทิลได้โดยใช้ซิเตรทเป็นสารตั้งต้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีหางนม หรือนมซึ่งมีซิเตรทเป็นองค์ประกอบ ซิเตรทจะถูกนำเข้าไปใช้ในเซลล์โดยเอนไซม์ซิเตรทเพอมีเอส (citrate permease) และเกิดปฏิกิริยาหลายขั้นตอนจนได้สารไดอะซิทิล ซึ่งสารตัวนี้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่ให้กลิ่น รสในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด และเครื่องดื่มต่างๆ

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยการหมักแบบ heterofermentative Lactobacilli ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมัก โดยจะมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก ส่วนการยับยั้งจุลินทรีย์จะออกฤทธิ์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยเข้าแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนเป็นผลให้พีเอชลดลง ทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันพวกเชื้อรา

รูทีริน (ruterin)

เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น (hydroxy propionaldehyde ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่พีเอชปานกลาง สร้างมาจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus ruterin* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา โปรโตซัว และยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella Staphylococcus Listeria* และ *Clostridium*

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

เป็นสารยับยั้งอีกชนิดหนึ่งที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีการกำหนดแบคเทอริโอซินไว้ 6 ข้อ คือ

1) แบคเทอริโอซินเป็นสารพวกโปรตีน ซึ่งถูกทำลายโดนเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน
2) แบคเทอริโอซินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายแบคทีเรียได้
3) แบคเทอริโอซินจะมีบริเวณจำเพาะในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ
4) ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะพบว่าอยู่บริเวณพลาสมิด
5) แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อหลั่งแบคเทอริโอซินออกมานอกเซลล์จะทำให้เซลล์ตาย แต่มีแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระยะ log ดังนั้นจึงไม่มีการตายของเซลล์
6) แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอซินไม่ได้ประกอบด้วยโปรตีนเพียงอย่างเดียว แต่ยังประกอบด้วยไขมันและคาร์โบไฮเดรต และมีการจัดแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

1) แลนติไบโอติก (Lantibiotic)

เป็นสายเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แตกต่างจากแบคเทอริโอซินอื่นๆ คือ ประกอบด้วยกรดอะมิโน ไดดีไฮโดร (didehydedroamino acid) และกรดอะมิโนไทโออีเทอร์ (thioether amino acid) สามารถแยกออกเป็นกลุ่มย่อยจากลักษณะโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน ดังนี้

- มีรูปร่างเป็นเกลียว มีมวลโมเลกุล 2164-3488 ดาลตัน ประจุบวก 2-7 ประจุ
- ลักษณะรูปร่างเป็นก้อนกลมมีมวลโมเลกุล 1954-2041 ดาลตัน อาจมีประจุเป็นลบ ได้แก่ ไนซิน (nisin) และแลคโตซิน 481 (lactocin 481)

2) ขนาดมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน

แบคเทอริโอซินนี้จะไม่มีกลุ่มแลนติไบโอติก (lantibiotic) ได้แก่ ดิโพคอคซิน (diplococcin) แลกโตคอคซินเอ (lactococcinA) และแลกโตคอคซินเอฟ (lactococcin F)

3) แบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่

เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน ได้แก่ เฮลเวทติซินเจ (helveticin J) และเคซิซิน 80 (caseicin 80)

4) แบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อน

ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แพนทาริซินเอส (plantaricin S) และแลกโตซิน 27 (lactocin 27)

กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน

กลุ่มแบคเทอริโอซินสามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย เช่น แพนทาริซิน 149 (plantaricin 149) แพนทาริซินซี (plantaricin C) แพนทาริซินยูจี 1 (plantaricin UG1) อะซิโดซินเอ (acidocin A) และอะซิโดซินบี (acidocin B) ในการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยผนังเซลล์ ซึ่งมีเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ มีลักษณะเป็นร่างแห ทำให้แบคเทอริโอซินเข้าสู่ชั้นของเมมเบรนได้ง่าย ในชั้นนี้ประกอบด้วยสารพวกฟอสโฟไลปิด ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ กรดไขมัน และหมู่ฟอตเฟต โดยหมู่ฟอตเฟตส่งผลให้บริเวณเมมเบรนมีประจุลบ ในขณะที่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะเป็นประจุบวก เมื่อเกิดการจับกันของประจุลบและประจุบวกโดย electrostatic attractions ทำให้ชั้นเมมเบรนเกิดการฉีกขาด ของเหลวต่างๆที่เป็นส่วนประกอบภายในเซล์เมมเบรนจะไหลออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย

ไนซิน (nisin) เป็นแบคเทอริโอซินตัวแรกที่ผลิตมาจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก อาจอยู่ในรูปของไนซินเอ (nisin A) หรือ ไนซินแซ็ด (nisin Z)

ไนซินเอ มีมวลโมเลกุลขนาด 3354 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันเป็นสายเพปไทด์ทั้งหมด 34 ตัว ในจำนวนนี้มีกรดอะมิโนพิเศษที่ไม่พบสายเพปไทด์โดยทั่วไปอยู่ด้วย ได้แก่ lanthionine 1 ตัว β-methyllanthionine 4 ตัว และ 2-dehydroalanine 1 ตัว

ไนซินแซ็ด จะมีกรดอะมิโนต่างจากไนซินเอ เพียงตัวเดียว คือมีแอสพาราจีน (asparagines) แทนฮิสทีดีน (histidine) ในตำแหน่งที่ 27

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ได้รับการยอมรับ และอนุญาตให้นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ไนซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* บางสายพันธุ์ในประเทศอังกฤษและประเทศอื่นบางประเทศนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร

กลไกการทำงานของไนซิน

สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และทำลายเยื่อหุ้มภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด ไนซินทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มพลาสมาจึงเกิดการรั่วซึมและรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ เป็นผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ไป

เดิมนำไนซินมาใช้ในอาหารมีวัตถุประสงค์เพื่อหยุดการเจริญของสปอร์ *Bacillus* ในอาหารบางชนิด เช่น เนยแข็ง อาหารกระป๋อง

ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินเพิ่มมากขึ้น พบว่าเป็นสารโปรตีนที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่างๆ และทนความร้อน **(ตารางที่ 2.4)**

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก

ชื่อแบคเทอริโอซิน	คุณสมบัติ
Lactocin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 20 นาที
	เป็นสารโปรตีน ทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 20 นาที
Sakacin A	เป็นสารพวกโปรตีน ทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 60 นาที
Plantaricin 149	เป็นสารพวก glycoprotein ทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 60 นาที
Plantaricin S	เป็นสารพวกโปรตีน
Plantaricin LC74	เป็นสารพวกโปรตีน ที่ทนความร้อนสูง
Plantaricin UG1	เป็นสารพวกโปรตีน ที่ทนความร้อน
Pediocin AcH	เป็นสารพวกโปรตีน
Sakacin P	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน
Lactocin A	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 30 นาที
Fermencin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 นาที
Acidocin A	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 นาที
Acidocin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 นาที

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก De Vuyst and Vandamme (1994)

ไมโครแกรด (microgard)

เป็นหางนมเกรดเอ ที่หมักด้วยเชื้อ *Propionibacterium shermanii* แล้วพาสเจอร์ไรซ์ ไมโครแกรดเป็นสารประเภทโปรตีนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคีทเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา บางชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

5. จุลินทรีย์ประจำถิ่น

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในอวัยวะสืบพันธุ์ ช่องปาก และระบบทางเดินอาหาร

ในระบบทางเดินอาหารมี จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota) แตกต่างกันหลายชนิด แต่จุลินทรีย์สามารถผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปในลำไส้ได้ โดยปกติลำไส้เล็กส่วนบนจะมีจุลินทรีย์ไม่มาก เช่น *Streptococcus, Lactobacillus* และยีสต์มีจำนวน 10^1-10^2 cfu/ml

แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) จะมีจุลินทรีย์ 10^6-10^8 cfu/ml โดยเป็นแบคทีเรีย family Enterobacteriaceae และ *Bacteriodes* เด็กทารกหลังจากคลอดได้ไม่กี่ชั่วโมงสามารถพบ normal flora ที่ผิวหนัง เช่น *Staphylococcus* และ *Corynebacterium* เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น *Bifidobacterium, Clostridium, Lactobacillus* และ *Streptococcus* เมื่อเวลาผ่านไป normal flora จะเปลี่ยนแปลงไป คือ ในลำไส้ของผู้ใหญ่ส่วนใหญ่เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe condition) ได้แก่ *Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium* และ *Eubacterium* เป็นต้น โดยมีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) ในอัตราส่วน 1,000 : 1 แบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ *Escherichia coli* สมาชิกอื่นๆใน family Enterobacteriaceae, *Enterococcus* และ *Streptococcus* จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของอุจจาระที่อยู่ในลำไส้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใกล้กับลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (sigmoid colon) 80% ของอุจจาระแห้งของคนปกติจะมีแบคทีเรีย 10^{11}-10^{12} cfu/g เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะจะพบเชื้อจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* และแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยา จำนวนเชื้อในแต่ละบริเวณของระบบทางเดินอาหาร (นวลจิรา ภัทรรังรอง, 2538) ดังแสดงใน **(ตารางที่ 2.5)**

ตารางที่ 2.5 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

ระบบทางเดินอาหาร	จุลินทรีย์ [1]	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อ ml
กระเพาะอาหาร	*Streptococcus* *Lactobacillus*	10^1-10^2
ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และส่วนกลาง (jejunum)	จุลินทรีย์เหมือนกับกระเพาะอาหาร	10^2-10^4
ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum)	*Bateroides* *Clostridium* *Streptococcus* *Lactobacillus*	10^6-10^8

ระบบทางเดินอาหาร	จุลินทรีย์ [1]	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อ ml
ลำไส้ใหญ่	*Bacteroides*	10^{11}-10^{12}
	Eubacterium	
	Peptococcus	
	Bifidobacterium	
	Streptococcus	
	Fusobacterium	

[1] จุลินทรีย์สปีชีส์หลักที่แยกได้จากตำแหน่งที่ต่างกันในระบบทางเดินอาหาร

ที่มา : Salminen and Wright (1993)

6. โปรไบโอติก

โปรไบโอติก (probiotic) หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้สามารถผลิตกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่ายช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (FAO/WHO, 2002)

6.1 ชนิดของโพรไบโอติก มีดังนี้คือ

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกยังสามารถพบได้ในแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

กลุ่มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

1. *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *B.coagulan B.subtilis B.licheniformis B.toysi* และ *B.stearothermophilus*
2. *Bacteroides* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *B.amylophilus B.capillosus B.ruminocola* และ *B.suis*
3. *Bifidobacterium* spp.สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *B.thermophilum, B.adolescentis, B.anamalis,*

B.bifidum, B.infantis และ *B.longum*

4. *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *L.acidophilus L.bifidus L.brevis L.bulgaricus L.casei L.rerterii L.cellobiosus L.colinoides L.corvatus L.delbruekii L.fermentum Llactis L.plantarum L.ruminis* และ *L.vitulinus*
5. *Leuconostoc* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *L.cremoris l.dextranicum L.lactis* และ *L.mesenteroides*
6. *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *P.acidophilus P.halophilus P.pentosaecus P.cerevisiae* และ *P.acidilactici*
7. *Propionibacterium* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *P.fredenreichii* และ *P.shermanii*
8. *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *S.cremoris S.diacetylactis S.faecium S.intermedius S.lactis* และ *S.thermophilus*
9. *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *C.butyridium*
10. *Enterococcus* spp.
11. *Escherichia coli*

กลุ่มยีสต์ที่เป็นโพรไบโอติก

1. *Saccharomyces cerevisiae*
2. *Candida pentoiepessi (Torulopsis bovina)*

กลุ่มราที่เป็นโพรไบโอติก

1. *Aspergillus oryzae*
2. *Aspergillus niger*

6.2 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ซึ่งจะส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น ดังนั้นการที่โปรไบโอติกจะสามารถผ่านลงไปในลำไส้และเจริญเพื่อส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้นได้นั้นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เพื่อสามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในทางเดินอาหารส่วนบนและส่วนล่างได้ ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติ (Salminen และ Wright, 1993) ดังนี้คือ

ทนกรด

ก่อนเข้าสู่ลำไส้ขั้นแรกโปรไบโอติกแบคทีเรียต้องผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์ ในแต่ละวันกระเพาะอาหารมีการหลั่งกรดมากกว่า 2 ลิตรต่อวัน ส่งผลให้ภายในกระเพาะอาหารมีพีเอชต่ำกว่า 1.5 เพื่อเป็นการป้องกันแบคทีเรียเข้าสู่ลำไส้ เช่น *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตมากที่พีเอช 3 2 และ 1.5 ตามลำดับ

ทนเกลือน้ำดี

ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีเกลือน้ำดีเป็นคุณสมบัติที่สำคัญยิ่งในการคัดเลือกโปรไบโอติก เกลือน้ำดีถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับแล้วหลั่งไปยังลำไส้เล็กส่วนต้นเมื่อมีการรับประทานอาหารเข้าไป ประมาณ 500-700 มิลลิลิตรต่อวัน ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ lactobacilli ที่แยกจากลำไส้ ถึงแม้เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการทนแตกต่างกัน เช่น *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *L. bulgaricus* *L. fermenti* *L. casei* *L. acidophilus* และ *L. casei* shirota ทนได้ที่ความเข้มข้น 2, 4, 10, 12 และ 15% ตามลำดับ

สามารถสร้างกรดแลคติก

สามารถสร้างกรดแลคติกทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก

เกาะติดผนังลำไส้

ระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งลำไส้เล็ก มีแรงขับเคลื่อนบีบอัด และมีการไหลเวียนของน้ำย่อยตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อล้างและขับเคลื่อนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้ามา ดังนั้นความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของโปรไบโอติกจึงเป็นสมบัติหนึ่งที่สำคัญในการเพิ่มโอกาสการอยู่รอดและอาศัยอยู่ภายในลำไส้ การเกาะผนังลำไส้ของแบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญทำให้เกิดสมดุลของแบคทีเรียภายในลำไส้โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียจะไปแย่งจับผนังลำไส้ นอกจากนี้โปรไบโอติกยังช่วยซ่อมแซมเยื่อเมือกที่ถูกทำลาย

ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สามารถสร้างสารต่างๆเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีจำนวนที่มากเกินไป เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น จากการทดลองแยกแบคทีเรีย *Lactobacillus*

2 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 4 สายพันธุ์ ศึกษาผลการยับยั้ง *Listeria* 16 สายพันธุ์ พบว่า *Pediococcus* สายพันธุ์ 413 416 419 และ 446 สามารถยับยั้ง *Listeria* สายพันธุ์ที่ทดสอบได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า รูทีรีน (reuterin) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L.reuteri* ซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน สามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว โดยสารยับยั้งที่สร้างมีทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

สร้างเอนไซม์ เพคติเนส เบต้า-กาแลคโตซิเดส อะไมเลส โปรตีเอส แลคเตส และ เซลลูเลส

โปรไบโอติกยังสามารถสร้างเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งมีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆดีขึ้น

การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์

ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) แกมมา อินเตอเฟียรอน (gamma interferon) และส่งเสริมกิจกรรมของแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับการนำ *Lactobacillus* sp. (GG) จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึง 90% เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. (GG) มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียง 46%

ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon)

โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น เบต้า-กลูคิวโรนิเดส (β-glucuronidase) เอโซรีดักเตส (azoreductase) ไนเตรต รีดักเตส (nitrate reductase) และเบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) ตัวอย่างเช่น นมที่มี *Lactobacillus casei* เป็นส่วนประกอบจะช่วย กระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจในหนูได้ โดยการทดสอบให้หนูกินนมที่มี *L. casei* เป็นส่วนประกอบหลังจาก 8 วันนำหนูมาฆ่า และตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจากแมคโครฟาจ ในการทดลองนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ lactase dehydrogenase (LDH) พบว่าการบริโภคนมที่มีส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับของ LDH ทำให้ลดการเพิ่มของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้

นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกอื่นๆ เช่น การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ไม่สามารถสร้างสารพิษ สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว สามารถยังชีพอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยาสามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 20-60 °C

สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น โฟเลท (folate) ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง วิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ กรดไขมัน และกรดอะมิโน ช่วยลดระดับของโคเลสเตอรอล (cholesterol) ในเลือด และไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในการดื้อยา

คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ได้ทางสิ่งแวดล้อม ดังนี้คือ

ปรับปรุงคุณภาพน้ำ ทำให้น้ำที่ปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนน้อยลง อาจมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

การควบคุมความเข้มข้นของแอมโมเนีย ไนไตรท์ และไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดนสร้างเอนไซม์บางชนิด เช่น เอ็กโซเอนไซม์ (exoenzyme) ที่ทำให้ความเป็นพิษของสารดังกล่าวลดลง

มีความคงทนต่อสภาพแห้งแล้งได้นาน สามารถนำมาผลิตหรือผสมในอาหารสัตว์ได้

เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ

ส่งเสริมการเจริญของสาหร่ายที่มีประโยชน์ และยับยั้งการเจริญของสาหร่ายที่เป็นพิษ เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำ

7. พรีไบโอติก

พรีไบโอติก (prebiotic) คือ องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อย ซึ่งมีประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ที่มีประโยชน์อย่างจำเพาะและช่วยปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้าน สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษได้ พรีไบโอติกที่ควรส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* (Giboson และคณะ, 2004)

7.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สามารถเคลื่อนไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อย และไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน

สามารถที่จะเกิดการหมักที่ลำไส้ใหญ่โดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์แก่ร่างกายเช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus*

ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ได้ Gibson และคณะ (อ้างถึงในสิรสา สุมงคล, 2556) ได้ศึกษาผลของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และอินนูลินในอาสาสมัคร 100 โดยให้รับประทาน 5-20 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า มีปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้นภายในลำไส้ของอาสาสมัคร

เนื่องจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่สามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร ไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนไปถึงลำไส้ใหญ่ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microbiota) อาศัยอยู่จึงสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อเหล่านี้ ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุและป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ชนิดของสารพรีไบโอติกที่เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น แลคโตส แลคตูโลส แรฟฟีโนส สตาคีโอส ฟรุตโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) resistant starch (RS) non-starch polysaccharide (NPS) แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไซเลน

7.2 ชนิดของพรีไบโอติก

สารพรีไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมและมีขายทางการค้าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีหน่วยย่อย 2-20 มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์ (Giboson และคณะ, 2004)

พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosaccharides, FOS) และอินนูลิน (inulin) อินนูลินเป็นสารโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้ซึ่งเป็นสารประกอบขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุกโตโอลิโกแซกคาไรด์ที่มีฟรุกโตส (fructose) 3-60 โมเลกุล อินนูลินพบทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช ผัก และผลไม้ โดยพบในตระกูล chicorium เช่น ชิคอรี (chicory) และพืชในตระกูลหอม เช่น หอมใหญ่ กระเทียม เป็นต้น กาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides, GOS) มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบในน้ำนมของมนุษย์และสัตว์ ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (soybean- oligosaccharides, SOS) เป็นสารกลุ่มราฟีโนส และสตาคีโอสพบในถั่วเหลือง

พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

ผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกสังเคราะห์ที่วางขายตามท้องตลาดมีชื่อเรียกทางการค้าที่แตกต่างกันออกไปมีหลายชนิด เช่น แลคโตซูโครส (lactosucrose) แลคทูโลส (lactulose) ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides) กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (gluco-oligosaccharides) และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides)

8. ไมโครเอนแคปซูเลชั่น

ไมโคเอนแคปซูเลชั่น (microencapsulation) เป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติกจากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเชื้อ เช่น สภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหาร สภาวะที่มีเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในสภาวะแช่เย็นและแช่แข็ง โดยการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยวัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น calcium alginate, sodium alginate, carageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น

8.1 เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชั่น (microencapsulation)

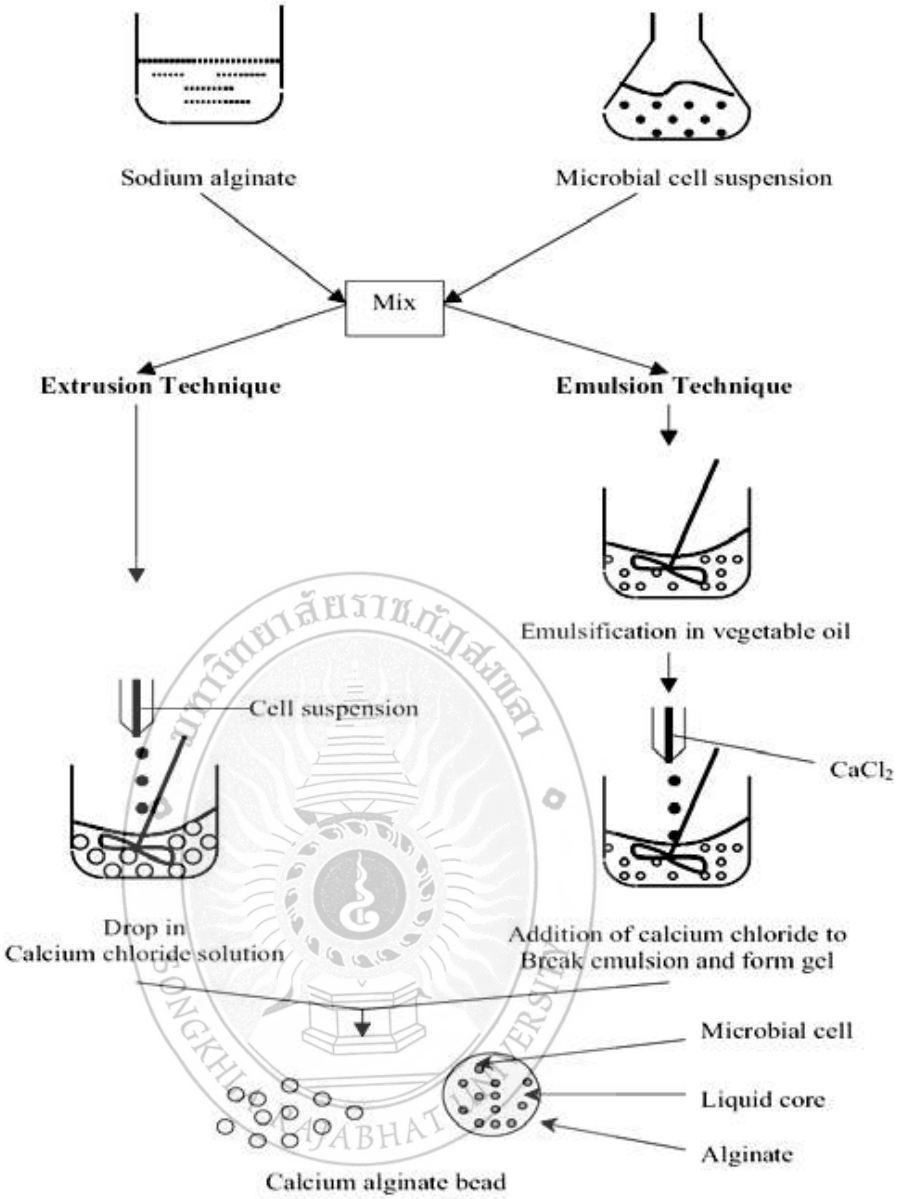
เทคนิคในการทำ microencapsulation สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ extrusion technique และ emulsion technique Krasaekoopt และคณะ (อ้างถึงในหทัยรัตน์ มุสิกสังข์, 2551) คือ

เทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion tenhnique)

เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้กันโดยทั่วไปในการทำเม็ดบีด โดยการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ เช่น โซเดียมอัลจิเนต แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมกัน และปล่อยสารที่ผสมกันผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยดลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เม็ดบีดแข็งตัว (hardening solution) คือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) **(ภาพที่ 2.13)** ขนาดและรูปร่างเม็ดบีดขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้ และความสูงของการหยดสารผสมที่ปล่อยลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยขนาดเม็ดบีดมีได้จะมีขนาดตั้งแต่ 2 ถึง 5 มิลลิเมตร วิธีการนี้นิยมใช้เป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมในการใช้มีสภาวะที่ไม่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียโปรไบโอติก

เทคนิคอิมัลชั่น (emulsion technique)

เทคนิคการเติมสารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อในไฮโดรคอลลอยด์ลงในน้ำมันที่มีปริมาณมากกว่า จากนั้นทำการตีปั่นส่วนผสมจนอยู่ในรูป water-in oil emulsion และเติมสารที่ทำให้เม็ดบีดแข็งตัวคือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ลงไปทีละน้อย **(ภาพที่ 2.13)** ขนาดเม็ดบีดจะขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น โดยเม็ดบีดที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร



ภาพที่ 2.13 การทำไมโครเอนแคปซูเลชั่นด้วยวิธี Extrusion และวิธี Emulsion
ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (อ้างถึงในหทัยรัตน์ มุสิกสังข์, 2551)

วิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยเทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion technique) และเทคนิคอิมัลชั่น (emulsion technique) มีข้อดีและข้อเสียดัง**ตารางที่ 2.6** การที่จะเลือกใช้เทคนิคใดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำเม็ดบีดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นๆ

ตารางที่ 2.6 ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค extrusion และ emulsion

คุณสมบัติ	เทคนิคเอ็กทรูชั่น	เทคนิคอิมัลชั่น
การนำไปใช้	ยากต่อการ scale up	ง่ายต่อการ scale up
ราคา	ต่ำ	สูง
ความง่าย	สูง	ต่ำ
ขนาดของเม็ดบีด	2-5 มิลลิเมตร	25 ไมโครเมตร-2 มิลลิเมตร

ที่มา : Krasaekoopt และคณะ (2003)

8.2 ปัจจัยในการห่อหุ้มเซลล์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติก

ปัจจัยในการห่อหุ้มที่มีผลต่อการรอดชีวิตของแลคติก สามารถแบ่งออกได้หลายปัจจัย คือ

วิธีการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก

วิธีการห่อหุ้มด้วยเทคนิคเอ็กทรูชั่น และเทคนิคอิมัลชั่นสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อได้ โดยให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (% encapsulation yield) ประมาณ 80-95% แต่จะเลือกใช้เทคนิคใดขึ้นอยู่กับการนำเม็ดบีดไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารนั้นๆ (Krasaekoopt และคณะ, 2003)

ชนิดของวัสดุตัวพยุง

วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกมีหลายชนิด เช่น อัลจิเนต cellulose acetate phthalate gum arabic และเจลาติน เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงที่แตกต่างกันก็จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่างกัน การเคลือบเม็ดบีดด้วยไคโตซาน (chitosan) และ poly-l-lysine เป็นต้น จะเพิ่มความแข็งแรงให้เม็ดบีดส่งผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อได้มากขึ้น จากการศึกษาของ Krasaekoopt และคณะ (2004) นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bifidum* และ *Lactobacillus casei* มาห่อหุ้มด้วยเทคนิคเอ็กทรูชั่น โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) เป็นวัสดุตัวพยุงแล้วเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ไคโตซาน และ poly-l-lysine จากนั้นนำไปทดสอบการทนต่อกรดที่พีเอช 1.5 และทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.6% พบว่าเม็ดบีดที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถเพิ่มการรอดของเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้ดีกว่าชุดการทดสอบอื่นๆ

ความเข้มข้นของวัสดุตัวพยุงที่ใช้

จากการศึกษาของ Mandal และคณะ (2006) ทำการห่อหุ้มเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* NCDC-298 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้เทคนิคอิมัลชั่นแล้วทดสอบการทนต่อพีเอช 1.5 และทนต่อเกลือน้ำดีระดับ 1% และ 2% พบว่า *L. casei* ที่ห่อหุ้มสามารถทนต่อกรด (pH 1.5) และเกลือน้ำดี (ความเข้มข้น 2%) ได้ดีกว่าเชื้ออิสระ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการห่อหุ้มเชื้อสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อได้ดีกว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ต่ำกว่า

ขนาดของเม็ดบีด

จากการศึกษา Chandramouli และคณะ (อ้างถึงในหทัยรัตน์ มุสิกสังข์, 2551) ทำการห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2409 โดยใช้อัลจิเนต 1.5 % (w/v) พีเอช 6.9 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 M ใช้เชื้อ 10^9 cfu/ml เตรียมเม็ดบีดให้มีขนาดต่างๆ กันคือ 200 450 1000 µm พบว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ห่อหุ้มจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเม็ดบีดที่เพิ่มขึ้น โดยเม็ดบีดขนาด 1000 µm ทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตจากกรดที่มีพีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมงได้มากที่สุด รองลงมาคือเม็ดบีดขนาด 450 และ 200 µm ตามลำดับ

จำนวนเซลล์เริ่มต้น

จากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (อ้างถึงในหทัยรัตน์ มุสิกสังข์, 2551) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2409 โดยใช้อัลจิเนต 2 % (w/v) พีเอช 6.9 และใช้เชื้อความเข้มข้นต่างๆคือ 10^7 10^8 และ 10^9 cfu/ml พบว่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่ 10^9 cfu/ml มีจำนวนเซลล์คงที่หลังจากใส่ในกรดพีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในขณะที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^7 และ 10^8 cfu/ml ลดลงต่ำกว่า 10^5 cfu/ml ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของ International Dairy Federation (IDF) ได้กำหนดไว้ว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกที่พบอย่างน้อย 10^7 cfu/ml จนกระทั่งถึงวันที่บริโภคผลิตภัณฑ์นั้น (Shah, 2007)

เวลาในการทำให้เม็ดบีดแข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นสารที่ช่วยในการแข็งตัวหรือการขึ้นรูปเม็ดบีด ซึ่งจากการศึกษาของ Chandramouli และคณะ (อ้างถึงในหทัยรัตน์ มุสิกสังข์, 2551) ได้ทดลองโดยแช่เม็ดบีดไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 5 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมง ดูความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียพบว่า หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แบคทีเรียในเม็ดบีดที่ทำให้แข็งตัวในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความ

เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เวลามากกว่าหรือเท่ากับ 30 นาที มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำให้แข็งตัวเป็นเวลา 5 นาที เนื่องจากเวลาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เม็ดบีดมีความแข็งแรงมากขึ้น

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Krasaekoopt และคณะ (2004) นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bifidum* และ *Lactobacillus casei* มาห่อหุ้มด้วยเทคนิคเอ็กทรูชั่น โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นวัสดุตัวพยุงแล้วเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนต ไคโตซาน และ poly-l-lysine จากนั้นนำไปทดสอบการทนต่อกรดที่พีเอช 1.5 และทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.6% พบว่าเม็ดบีดที่เคลือบด้วยไคโตซานสามารถเพิ่มการรอดของเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้ดีกว่าชุดการทดสอบอื่นๆ แต่ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อ *B. bifidum* ที่ระดับพีเอช 1.5 เชื้อแต่ละสายพันธุ์รอดชีวิตได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะในตัวเชื้อ

9. ว่านหอมแดง (*Eleutherine americana*)

ชื่อสมุนไพร ว่านหอมแดง
ชื่ออื่นๆ ว่านไก่แดง ว่านข้าว ว่านหมาก (เหนือ) ว่านเพลาะ (เชียงใหม่) หอมแดง(กลาง)
ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.
ชื่อพ้อง *Eleutherine amaricana* (L.) Merr.
ชื่อวงศ์ Iridaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก หัวใต้ดินรูปไข่ยาว เปลือกหุ้มหัวสีแดง ทรงกระสวย มีลักษณะคล้ายหัวหอม แต่ใบเกล็ดที่หุ้มหัวหนา มีสีแดงเข้มอมม่วง ลำต้นที่อยู่เหนือดินตั้งขึ้น

ใบ แทงขึ้นมาจากพื้นดิน รูปหอก จีบซ้อนกันคล้ายพัด กว้าง 1-2.5 เซนติเมตร ยาว 25-60 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบแคบ ขอบใบเรียบ ขนเกลี้ยง ใบที่ออกตามลำต้นมีขนาดเล็ก

ดอก ออกเป็นช่อ กลีบสีขาวรูปช้อน ก้านช่อยาว 2.5-4 เซนติเมตร ตั้งตรง หรือกางออก กาบหุ้มดอกมี 2-10 อัน ซ้อนกันอยู่ยาว 12-16 มิลลิเมตร มีสีเขียว ดอกมีจำนวน 4-10 ดอก ก้านดอกยาว 1-1.5 เซนติเมตร มีสีขาว 6 กลีบ กว้าง 1.5-3.5 เซนติเมตร รูปไข่กลับ หรือรูปช้อน เรียงเป็น 2 วง กลีบที่อยู่วงในมีขนาดเล็กกว่ากลีบวงนอก เกสรเพศผู้มี 3 อัน สีเหลืองสด ก้านเกสรเพศเมียสีเหลืองแยกเป็นแขนงสั้นๆ 3 แขนง

ผล รูปขอบขนาน หัวตัด มี 3 ช่อง เมล็ดรูปรี อัดกันแน่น พบตามป่าดิบราบต่ำ (Voravuthikunchai และคณะ, 2007)

สรรพคุณ ตำรายาไทยใช้หัว มีรสร้อน ใช้ขับลมในกระเพาะอาหารและลำไส้ หรือตำผสมกับเหง้าเปราะหอมสุมหัวเด็ก แก้หวัดคัดจมูกในเด็ก เป็นยาขับปัสสาวะ ยาระบาย แก้บิด แก้อาการอักเสบของริดสีดวงทวาร แก้แมลงกัดต่อย และแก้ปวดท้อง (Voravuthikunchai และคณะ, 2007)

ภาพที่ 2.14 ว่านหอมแดง (*Eleutherine americana*)

10. โยเกิร์ต

โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีความเป็นกรดสูงหรือมีรสเปรี้ยว การทำโยเกิร์ตมีต้นกำเนิดมาจากแถบประเทศยุโรปในประเทศบัลแกเรีย โดยนำนมวัวหรือนมแพะมาต้มทิ้งไว้ให้เย็นลงพออุ่นแล้วเติมนมเปรี้ยวที่มีอยู่แล้วลงไป บ่มไว้ 8-10 ชั่วโมง จากนั้นหุ้มหม้อบรรจุนมด้วยขนสัตว์และเก็บไว้ในเตาอบเพื่อให้อุณหภูมิคงที่ประมาณ 40-45 °C จะได้โยเกิร์ตซึ่งเป็นน้ำนมที่มีลักษณะเป็นตะกอนหรือเป็นลิ่มมีความหนืดสูง ผิวหน้าเรียบและมีส่วนสารละลายใสเพียงเล็กน้อย

ปัจจุบันโยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่รู้จักกันแพร่หลาย เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโยเกิร์ตมี 2 ชนิด คือ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40-45 °C จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้จะมีปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกันในลักษณะร่วมมือกัน คือ *Lactobacillus bulgaricus* เป็นตัวช่วยย่อยโปรตีนในน้ำนมทำให้เชื้อ *Streptococcus thermophilus* ถูกกระตุ้นให้เจริญซึ่งในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจนจะใช้น้ำตาลแลคโตสหรือกลูโคส

ในน้ำนมเปลี่ยนได้เป็นกรดแลคติกที่จะไปกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ส่งผลให้เชื้อตัวนี้สร้างกรด และสารให้กลิ่นรสที่ระเหยได้ขึ้นมาด้วยและเป็นกลิ่นเฉพาะของตัวโยเกิร์ต และยังมีคุณค่าทางอาหารสูง ช่วยระบบย่อยอาหารของร่างกายในการผลิตเพื่อการค้า การผลิตเริ่มจากอุ่นนมให้ร้อนถึงอุณหภูมิ 60 °C เติมหางนมผง 3-5% ถ้าใช้หางนมสดควรเติมหางนมผงอีก 6-7% แล้วโฮโมจีไนซ์ที่ความดัน 1800-2000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พาสเจอไรซ์น้ำนมที่อุณหภูมิ 83 °C เป็นเวลา 30 วินาที ทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 43 °C แล้วใส่เชื้อโยเกิร์ต 2-3% คนให้เข้ากัน เทลงภาชนะที่สะอาดและฆ่าเชื้อแล้วปิดฝา บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 43 °C หรือในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิเดียวกัน จนกระทั่งน้ำนมเป็นลิ่ม ถ้าเชื้อที่ใช้แข็งแรงดีจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง โยเกิร์ตที่ได้มีความเป็นกรด 0.85-0.95% (pH ประมาณ 4.4-4.5) แล้วนำเข้าแช่ตู้เย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยาหมักของเชื้อแบคทีเรีย (นิรนาม, 2550)

โยเกิร์ตจะแบ่งตามลักษณะการผลิตได้ 2 ชนิด คือ

1) โยเกิร์ตชนิดแข็งตัว (set yoghurt) มีการบรรจุภาชนะหลังจากเติมเชื้อเลยเป็นการหมักนมด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการและปล่อยให้นมมีการแข็งตัวในภาชนะระหว่างการรอจำหน่ายในร้านค้า อาจมีการใส่ผลไม้เชื่อมรองที่ก้นภาชนะก่อนแล้วค่อยใส่นมลงหมักก็ได้

2) โยเกิร์ตชนิดคน (stirred yoghurt) เป็นชนิดที่มีการหมักในถังขนาดใหญ่จนนมตกตะกอน แล้วจึงเติมผลไม้เชื่อมหรือน้ำเชื่อม กลิ่นสี ทำให้ก้อนนมแตกและคนให้เข้ากันก่อนที่จะเทในภาชนะขนาดเล็กเพื่อรอการจำหน่ายซึ่งจะได้โยเกิร์ตค่อนข้างเหลว

โยเกิร์ตชนิดอื่นๆ ได้แก่

1) โยเกิร์ตเหลว (drinking yoghurt) หรือนมเปรี้ยว มีลักษณะเป็นก้อนนมแตกกระจายอยู่

2) โยเกิร์ตผลไม้ (fruit yoghurt) เป็นการเติมผลไม้บด หรือแยมและน้ำตาลลงไปในโยเกิร์ต

3) โยเกิร์ตรสธรรมชาติ (plain yoghurt) ไม่มีการเติมแต่งกลิ่นรส ใดๆ ลงไป

4) โยเกิร์ตแต่งกลิ่นรส (sweet yoghurt) มีการเติมกลิ่นรสเทียมและสารให้ความหวานลงไป

5) โยเกิร์ตแช่แข็ง (freeze yoghurt) ลักษณะคล้ายไอศกรีม

11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chaikham (2015) การห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus casei* 01 *Lactobacillus acidophilus* LA5 และ *Bifidobacterium lactis* BB-12 ด้วยสารสกัดสมุนไพรไทยคือ ดอกมะม่วงหิมพานต์ ใบบัวบก และใบย่านางโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อในโยเกิร์ต (stirred yoghurt) และน้ำผลไม้ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เชื้อ *L. casei* 01 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยดอกมะม่วงหิมพานต์เก็บรักษาไว้ในโยเกิร์ต และน้ำผลไม้ตลอดระยะเวลา 30 วันจะรอดชีวิตได้ดีที่สุด

โดยให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกับสารสกัดชาเขียว (ชุดควบคุมบวก) นอกจากนี้เชื้อ *L. casei* 01 และ *B. lactis* BB-12 ที่ถูกห่อหุ้มจะมีการรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้อ *L. acidophilus* LA5 ในทุกชุดทดสอบ

Garcia-Ceja และคณะ (2015) เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus reuteri* ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต หรือโซเดียมอัลจิเนตเคลือบด้วยไคโตซาน แล้วบรรจุเม็ดบีดลงในโยเกิร์ต ศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร และเก็บแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อมีความคงตัวและรอดชีวิตได้มากกว่าหรือเท่ากับ 10^7 cfu/g เมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ

Haghshenas และคณะ (2015) เชื้อ *Enterococcus durans* มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตและอินนูลิน ศึกษาการรอดชีวิตในระบบจำลองของทางเดินอาหาร และเก็บแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 28 วัน มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 47% เมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ ประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม (%Encapsulation yield, EY) มากกว่า 98%

Krasaekoopt และ Watcharapoka (2014) การห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 5 และ *Lactobacillus casei* 01 ด้วย galacto-oligosaccharides และอินนูลิน และเคลือบด้วยไคโตซาน โดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่นทำให้เม็ดบีดมีขนาดใหญ่ขึ้น พบว่าการใช้ 3% galacto-oligosaccharides จะป้องกันเชื้อจากสภาวะเลียนแบบกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ดีที่สุด โดยที่เชื้อ *L.acidophilus* 5 และ *L.casei* 01 มีจำนวนลดลง 3.1 และ 2.9 log cfu/g ตามลำดับ การห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกโดยใช้ 1.5% galacto-oligosaccharides บรรจุในโยเกิร์ตและน้ำส้มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในโยเกิร์ต พบว่า เชื้อ *L.acidophilus* 5 และ *L.casei* 01 มีจำนวนลดลงเป็น 1.1 และ 1.4 log cfu/g ตามลำดับ ในน้ำส้มพบว่า เชื้อ *L.acidophilus* 5 และ *L.casei* 01 มีจำนวนลดลงเป็น 0.5 และ 0.4 log cfu/g ตามลำดับ แต่จำนวนเชื้อโปรไบโอติกมีจำนวนสูงกว่า 10^7 cfu/g ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษา

Ribeiro และคณะ (2014) เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ถูกห่อหุ้มด้วย ionic gelation และ complex coaceration โดยใช้ pectin และ whey protein เป็นตัวห่อหุ้ม ทดสอบการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะระบบทางเดินอาหาร และทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส พบว่าเม็ดบีดบรรจุในโยเกิร์ตทำให้มีการสร้างกรดได้น้อยลง มีการรอดชีวิตเพียง 62% เปรียบเทียบกับเชื้ออิสระ 10% ตลอดระยะเวลา 35 วัน ไม่มีความแตกต่างกันในการทดสอบชิม

Trabelsi และคณะ (2014) เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TN9 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตแล้วเคลือบด้วยไคโตซาน และอีกชุดทดสอบเคลือบด้วยเจลาตินโดยใช้เทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่น ศึกษาการรอดชีวิตเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 35 วัน เชื้อที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซานเพิ่มการรอดชีวิตได้ดีเมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ ทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 สายพันธุ์ คือ *Listeria ivanovii* *Salmonella enteritica* และ *Escherichia coli* โดยวิธี agar well diffusion มีกิจกรรมการยับยั้งมากกว่าเชื้ออิสระ

Pinto และคณะ (2012) โยเกิร์ตแช่แข็ง (frozen yoghurt) บรรจุเชื้อ *Bifidobacterium* BB-12 ห่อหุ้มด้วย Skim milk และ inulin ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโยเกิร์ตแช่แข็งเป็นเวลา 90 วัน เชื้อ *Bfidobacterium* สามารถรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้ออิสระ 34% ตลอดระยะเวลา 90 วันของการเก็บรักษา เม็ดบีดที่ใส่ skim milk มีค่าพีเอชสูงสุด โยเกิร์ตที่เติมเม็ดบีดที่ห่อหุ้มด้วยอินนูลินมีความหนืดเพิ่มขึ้น

Shoji และคณะ (2012) เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ถูกห่อหุ้มโดยใช้เทคนิค complex coacervation ตามด้วย lyophilization ประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ตที่ทำจากนมควาย ศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบในในระบบทางเดินอาหาร และการเก็บรักษาพบว่า *L.acidophilus* เก็บรักษาแบบแช่เย็นมีจำนวน 10^7 cfu/g แต่ไม่สามารถปกป้องเชื้อจากสภาวะในกระเพาะอาหาร ปริมาณกรดในโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีดมีค่าลดลงเปรียบเทียบกับโยเกิร์ตบรรจุเชื้ออิสระ

Brinques และคณะ (2011) การห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BL011 ด้วยเพคตินแล้วเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนตหรือไคโตซาน แล้วนำมาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบในระบบทางเดินอาหาร และการเก็บแบบแช่เย็น พบว่า เชื้อสามารถรอดชีวิตได้เพิ่มขึ้นเมื่อมีการห่อหุ้มด้วยสารพรีไบโอติก การรอดชีวิตของ *L.plantarum* ที่ห่อหุ้มด้วย 3% โซเดียมอัลจิเนตแล้วเคลือบด้วยไคโตซาน บรรจุในโยเกิร์ตจะลดจำนวนลง 0.55 log cfu/g ตลอดระยะเวลาในการเก็บ 38 วัน

Sandoval-Castilla และคณะ (2010) เชื้อ *Lactobacillus casei* มีการห่อหุ้มด้วยสารเพคตินโดยใช้เทคนิคเอกทรูชั่น นำมาทดสอบการรอดชีวิตในโยเกิร์ต และสภาวะเลียนแบบในระบบทางเดินอาหาร พบว่า เชื้อ *L.casei* ที่ห่อหุ้มโดยใช้สัดส่วนอัลจิเนตต่อเพคตินเป็น 1:4 และ 1:6 ทำให้เชื้อรอดชีวิตเพิ่มขึ้นในสภาวะอันตราย และการรอดชีวิตสัมพันธ์กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีด

บทที่ 3

การทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องมือพื้นฐาน

- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
- ตู้เย็น (refrigerator)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (biological safety cabinet)
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- เครื่องชั่ง (balance)
- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
- เครื่องตีปั่น (stomacher)
- เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

1.2 เครื่องมือที่ต้องการเพิ่มเติม

วัสดุ อุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์

- จานเพาะเชื้อ (plate)
- หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิด
- บีกเกอร์ (beaker)
- ฟลาสก์ (flask)
- ปิเปต (pipette)

- หลอดฉีดยา และเข็มฉีดยา (Nipro)

- ขวดดูแรน (Duran) พร้อมฝาปิด

- กระดาษกรองเบอร์ 4

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี เชื้อมาตรฐาน และวัตถุดิบในการทำโยเกิร์ต

- หัวเชื้อโยเกิร์ต *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus*

- เชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR1465

- เกลือ (sodium chloride)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

- โซเดียมอัลจิเนต

- เกลือน้ำดี

- เพปโตน

- เอนไซม์แพนครีเอติน

- ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า

- นมสด หางนม

- ถ้วยพลาสติก

- จาน ชาม ช้อน หม้อ ทัพพี

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติกเริ่มต้น

นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 จาก stock เชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h จากนั้นเก็บเกี่ยวเชื้อนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 min นำเชื้อส่วนที่ตกตะกอน (pellet) มาล้าง 2 ครั้งด้วย 0.85% น้ำเกลือ (normal saline solution) จากนั้นนำตะกอนเชื้อมาใส่ใน 0.1% สารละลายเพปโตน (peptone solution) ปริมาตร 10 ml จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อโดยประมาณเป็น $1x10^{10}$ cfu/ml แบ่งตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นที่ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อที่ถูกห่อหุ้ม และเชื้ออิสระ (เชื้อที่ไม่ถูกห่อหุ้ม)

2.2 การสกัดว่านหอมแดง

สารพรีไบโอติกกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากว่านหอมแดงได้รับความอนุเคราะห์จากสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยสกัดตามวิธีการของ Phoem และ Voravuthikunchai (2013a) ดังนี้คือ นำหัวว่านหอมแดงมาอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 h นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยน้ำโดยใช้อัตราส่วนระหว่างว่านหอมแดงต่อน้ำเป็น 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 h กรองแยกเอาส่วนใสไประเหยน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Freeze-dryer

นำสารสกัดหยาบจากว่านหอมแดง (crude extract) มาทำบริสุทธิ์บางส่วน (partially purified fraction) นำผงสารสกัดหยาบจากว่านหอมแดงมาละลายในน้ำกลั่นปรับเป็น 20 °Brix โดยใช้ refractometer เติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* BCC12652 ในตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 48 h เพื่อกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ออกจากสารสกัดหยาบ กรองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดรู 0.22 µm (ดัดแปลงจากวิธีการของ Wichienchot และคณะ, 2010) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตกตะกอนด้วย 80% เอทานอลที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 h เพื่อกำจัดสารประกอบฟีนอลลิก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 min นำส่วนที่ตะกอน (oligosaccharides extract) มาทำให้แห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป และใช้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (sigma-Aldrich) เป็นชุดควบคุมบวก (positive control)

2.3 การห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง

การห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion) ดัดแปลงจากวิธีการของ Krasaekoopt และคณะ (2004) โดยเตรียมสารแขวนลอยของ *L.plantarum* TISTR1465 ที่มีจำนวนเชื้อ $1x10^{10}$ cfu/ml ปริมาตร 2 ml ผสมกับ 2% โซเดียมอัลจิเนต ปริมาตร 16 ml แล้วเติม 1% โอลิโกแซคคาไรด์ และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (ชุดควบคุมบวก) ลงไป 16 ml ผสมให้เข้ากันจะได้จำนวนเชื้อที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $1x10^{9}$ cfu/ml หยดตัวอย่างที่ได้ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 23 G ความสูงของปลายเข็มฉีดยากับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น 5 cm แช่เม็ดบีดในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 30 min แยกเม็ดบีดกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำมาล้างด้วย 0.85% น้ำเกลือ (normal saline solution) เก็บไว้ใน 0.1% สารละลายเพปโตน (พีเอช 6) ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อที่จะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ส่วนเชื้ออิสระที่ไม่ได้ห่อหุ้มใช้เป็นชุดควบคุม

2.3.1 การวัดขนาดเม็ดบีด

นำเม็ดบีดมา 100 อันวัดขนาดโดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์

2.3.2 การหาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเชื้อ (% Encapsulation yield, %EY)

หาประสิทธิภาพในการห่อหุ้ม และการรอดชีวิตของเชื้อระหว่างกระบวนการห่อหุ้มโดยใช้สูตร (Chavarri และคณะ 2011) % Encapsulation yield = N/No x100

N คือ จำนวนเชื้อที่มีชีวิตภายหลังจากกระบวนการห่อหุ้ม (cfu/g)

No คือ จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนกระบวนการห่อหุ้ม (cfu/g)

ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยชั่งเม็ดบีดมา 1 g มาละลายใน 0.1 M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ปริมาตร 9 ml ปั่นโดย stomacher ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 min นำส่วนใสของเชื้อ (supernatant) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว pour plate ด้วย MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h รายงานผลเป็น cfu/g เพื่อนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในเม็ดบีดทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.3 การปลดปล่อยเชื้อที่ห่อหุ้ม (% cell release)

ศึกษาการปลดปล่อยเชื้อออกจากเม็ดบีดภายหลังจากการห่อหุ้มโดยใช้สูตรของ Rao และคณะ (1989)

% cell release = N/No x100

N คือ จำนวนเชื้อที่มีชีวิตระหว่างการปลดปล่อยออกจากเม็ดบีด (cfu/g)

No คือ จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนกระบวนการห่อหุ้ม (cfu/g)

ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยชั่งเม็ดบีดมา 1 g มาละลายใน 0.1 M ฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ปริมาตร 9 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 h นับจำนวนเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาในสารละลาย (suspension) โดยการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว pour plate ด้วย MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h รายงานผลเป็น cfu/g เพื่อนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในเม็ดบีดทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4 การรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มและเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตน

2.4.1 ผลของระบบจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

เม็ดบีดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มจะเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตน (พีเอช 6) อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0 2 และ 4 สัปดาห์ มาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบของระบบทางเดินอาหาร โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Sandoval-Castilla และคณะ (2010) สารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารประกอบด้วยบัฟเฟอร์ของกรดไฮโดรคลอริก (HCl buffer) พีเอช 2 มีเอนไซม์เพปซินความเข้มข้น 3 g/l นำเม็ดบีดมา 1 g และเชื้ออิสระ 1 ml มาใส่ในสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร (simulated gastric juice) ปริมาตร 9 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 h จากนั้นนำเม็ดบีดและเชื้ออิสระข้างต้นมาใส่ในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M (พีเอช 7.4) ปั่นให้เม็ดบีดแตกโดยใช้ stomacher แล้วนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 2.3.2 ส่วนตัวอย่างเม็ดบีดและเชื้ออิสระที่ผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารครบ 3 h นำมาปั่นเหวี่ยงแล้วล้างด้วย 0.85% normal saline solution จากนั้นนำเม็ดบีดและเชื้ออิสระ 1 g มาใส่ในสารละลายเลียนแบบเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก (simulated intestinal juice)

ปริมาตร 9 ml (พีเอช 7.4) ประกอบด้วยเกลือน้ำดี (bile salt) ความเข้มข้น 3 g/l และแพนครีเอติน ความเข้มข้น 1 g/l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 h จากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 2.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4.2 ผลของการเก็บรักษาแบบแช่เย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

การเก็บรักษาเม็ดบีดแบบแช่เย็นตามวิธีการของ Brinques และ Ayub (2011) โดยนำเม็ดบีดมา 1 g และเชื้ออิสระ 1 ml มาใส่ในสารละลายเพปโตนความเข้มข้น 0.1% พีเอช 6 ปริมาตร 9 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0 2 และ 4 สัปดาห์ นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 2.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4.3 การสร้างกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเม็ดบีดและเชื้ออิสระมาใส่ในสารละลายเพปโตนความเข้มข้น 0.1% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาวัดพีเอชของกรดแลคติกที่สร้างขึ้น และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกตามวิธีการของ Holdeman และคณะ (1977) โดยการนำเม็ดบีดและเชื้ออิสระไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 min นำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC (Agilent 1100)

2.4.4 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเม็ดบีดที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0 2 และ 4 สัปดาห์ มาศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงตามวิธีการของ Tejero-Sarinena และคณะ (2012) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar มาเททับด้วย BHI soft agar ปริมาตร 7 ml ที่มีแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษคือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ($1x10^7$ cfu/ml) และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 ($1x10^7$ cfu/ml) ปริมาตร 20 µl ทิ้งไว้ให้แข็งเจาะหลุมเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm จำนวน 4 หลุมต่อจาน นำส่วนใส (supernatant) ของเม็ดบีด ($1x10^9$cfu/g) เชื้ออิสระ ($1x10^9$cfu/ml) และชุดควบคุม (ไม่มี *Lactobacillus plantarum* TISTR1465)

ลงไปในหลุม 60 µl โดยที่ส่วนใสของเม็ดบีดและเชื้ออิสระเตรียมตามวิธีการข้อ 2.3.2 แล้วนำจานทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5 การรอดชีวิตและกิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มและเก็บรักษาไว้ในโยเกิร์ต

2.5.1 การผลิตโยเกิร์ต

การผลิตโยเกิร์ตดัดแปลงจากวิธีการของ Kailasapathy (2006) นำนมสด (UHT) 5 l มาอุ่นแล้วเติมหางนมลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 180 g/l นำนมที่ผสมเข้ากันแล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 20 min ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 45 °C ใส่หัวเชื้อโยเกิร์ตชนิดละ 2% (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus*) บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 3 h จนกระทั่งได้พีเอช 4.8 หยุดกิจกรรมการหมักโดยนำโยเกิร์ตไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นำเม็ดบีดเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนความเข้มข้น 0.1% ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0 สัปดาห์ (เวลาเริ่มต้น) มาใส่ในโยเกิร์ตโดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด คือ ชุดที่ 1 เม็ดบีดถูกห่อหุ้มด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง ชุดที่ 2 เม็ดบีดถูกห่อหุ้มด้วยฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า ชุดที่ 3 เชื้ออิสระ และชุดที่ 4 ชุดควบคุมไม่มีการใส่เชื้อลงไป ความเข้มข้นเชื้อที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดบีดเป็น $1x10^9$ cfu/g และความเข้มข้นเชื้ออิสระเป็น $1x10^9$ cfu/ml และใช้อัตราส่วนระหว่างเม็ดบีดต่อเชื้ออิสระเป็น 1 ต่อ 10 จากนั้นถ่ายโยเกิร์ตแต่ละชุดการทดลองลงในถ้วยพลาสติกปลอดเชื้อ ปิดฝา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.2 ผลของสภาวะเลียนแบบกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารแบบต่อเนื่องต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

เม็ดบีดที่บรรจุในโยเกิร์ตเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2, และ 4 สัปดาห์ มาทดสอบการรอดชีวิตสภาวะเลียนแบบกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร ดัดแปลงจากวิธีการของ Sandoval-Castilla และคณะ(2010) โดยนำโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีด 10 g หรือ เชื้ออิสระ 10 ml มาใส่ในสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหาร (simulated gastric juice) ปริมาตร 90 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 h จากนั้นนำตัวอย่างเม็ดบีดมา 1 g หรือ เชื้ออิสระ 1 ml มาใส่

ในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M พีเอช 7.4 ปั่นให้เม็ดบีดแตกโดยใช้ stomacher แล้วนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 3.2 ส่วนตัวอย่างเม็ดบีดและเชื้ออิสระที่ผ่านสารละลายเลียนแบบกรดในกระเพาะอาหารครบ 3 h นำมาปั่นเหวี่ยงแล้วล้างด้วย 0.85% normal saline solution จากนั้นนำเม็ดบีด 1 g และเชื้ออิสระมา 1 ml ใส่ในสารละลายเลียนแบบเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก (simulated intestinal juice) ปริมาตร 9 ml (พีเอช 7.4) ประกอบด้วยเกลือน้ำดี (bile salt) ความเข้มข้น 3 g/l และแพนครีเอตินความเข้มข้น 1 g/l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 h จากนั้นนำมานับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 2.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.3 ผลของการเก็บรักษาแบบแช่เย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีด และเชื้ออิสระที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ (Brinques และ Ayub, 2011) แล้วนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตตามวิธีการข้อ 2.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.4 การสร้างกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีด เชื้ออิสระ และชุดควบคุม (ไม่บรรจุเชื้อ) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกตามวิธีการของ Holdeman และคณะ (1977) โดยการนำโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีด เชื้ออิสระ และชุดควบคุมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 min นำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC (Agilent 1100)

2.5.5 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้อที่ถูกห่อหุ้ม เชื้ออิสระ และชุดควบคุม (ไม่บรรจุเชื้อ) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0 2 และ 4 สัปดาห์ มาศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงตามวิธีการของ Tejero-Sarinena และคณะ (2012) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar มาเททับด้วย BHI soft agar ปริมาตร 7 ml ที่มีแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษคือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ($1x10^7$ cfu/ml) และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 ($1x10^7$ cfu/ml)

ปริมาตร 20 µl ทิ้งไว้ให้แข็งเจาะหลุมเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm จำนวน 4 หลุมต่อ นำส่วนใส (supernatant) ของเม็ดบีดเชื้ออิสระ และชุดควบคุมหยดลงไปในหลุม 60 µl โดยที่ส่วนใสของเม็ดบีดและเชื้ออิสระเตรียมตามวิธีการข้อ 2.3.2 แล้วนำจานทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.5.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทำการทดสอบชิมโยเกิร์ตทั้ง 4 ชุดทดสอบตามวิธีการของ Bergara-Almeda และคณะ (2002) นำโยเกิร์ตที่บรรจุเม็ดบีด เชื้ออิสระ และชุดควบคุม (ไม่บรรจุเชื้อ) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ มาทดสอบชิมโดยใช้แบบทดสอบ hedonic scale ประเมินค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะที่ปรากฏ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบรวม ให้คะแนนเป็น 9 ระดับ คือ 9=ชอบมากที่สุด 8=ชอบมาก 7=ชอบปานกลาง 6=ชอบน้อย 5=เฉยๆ 4=ไม่ชอบเล็กน้อย 3=ไม่ชอบปานกลาง 2=ไม่ชอบมาก และ 1=ไม่ชอบมากที่สุด โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 40 คน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.6 การวิเคราะห์สถิติ

นำผลการทดลองที่ได้ 3 ซ้ำ มารายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$±SD) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น $p<0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต

1.1 ผลของสภาวะจำลองในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 มาห่อหุ้มโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นตัวพยุง (supporting material) และห่อหุ้มร่วมด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น (extrusion technique) โดยชุดควบคุมบวกคือ สารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (commercial fructo-oligosaccharides) เม็ดบีดของเชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีรูปร่างกลม สีขาวใส สารที่ใช้เป็นตัวห่อหุ้มร่วม (co-encapsulating agent) ไม่มีผลต่อขนาดของเม็ดบีด เม็ดบีดที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1.47-2.08 mm **(ภาพที่ 4.1)**

ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเม็ดบีดที่ห่อหุ้มโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและปลดปล่อยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมด้วยโอลิโกแซคคาไรด์จากว่านหอมแดง และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า

การห่อหุ้มเชื้อ	ประสิทธิภาพ	
	ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเชื้อ (% Encapsulation yield, EY)	ประสิทธิภาพในการปลดปล่อยเชื้อ (% cell release)
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์	93.18 ± 0.02	92.92 ± 0.01
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์	94.92 ± 0.03	94.58 ± 0.03

นำเชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมด้วยโอลิโกแซคคาไรด์จากว่านหอมแดง และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า มาศึกษาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเชื้อ (% Encapsulation yield, %EY) มีค่าเป็น 93.18 และ 94.92 % ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *L. plantarum* TISTR1465 ที่ห่อหุ้มร่วมด้วยโอลิโกแซคคาไรด์จากว่านหอมแดง และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า มาศึกษาประสิทธิภาพในการปลดปล่อยเชื้อ (% cell release) มีค่าเป็น 92.92 และ 94.58 % ตามลำดับ **(ตารางที่ 4.1)**

การห่อหุ้มเชื้อด้วยโซเดียมอัลจิเนตและห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงจะทำให้เม็ดบีดมีความคงตัวดีในสภาวะที่เป็นกรด และละลายได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการห่อหุ้มเชื้อ *Bifidobacterium longum* B10MA5920 ด้วยสารคล้ายคอลลาเจนของคน (human-like collagen) การห่อหุ้มเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ด้วยไคโตซาน สารที่ใช้ห่อหุ้มสามารถปลดปล่อยเชื้อออกมาในระบบจำลองของลำไส้ใหญ่ที่มีพีเอชเป็นด่างได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง (su และคณะ, 2011)

นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงมาเปรียบเทียบการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องกับชุดควบคุมบวก คือ สารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS) และชุดควบคุมลบคือ เชื้ออิสระ (เชื้อที่ไม่ถูกห่อหุ้ม) เก็บไว้ในสารละลายเพปโตน (พีเอช 6) และโยเกิร์ต (พีเอช 4.8) ดังแสดงใน**ตารางที่ 4.2** เม็ดบีดจะถูกเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ จำนวนเชื้อ *Lactobacillus plantarum* เริ่มต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 9.35-9.52 log cfu/g เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงและสารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS) สามารถรอดชีวิตในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่องได้ดีกว่าเชื้ออิสระ ($p<0.05$) เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงจะมีการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นสัปดาห์ที่ 4 เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS) จะมีการรอดชีวิตในสภาวะจำลองของกรดในกระเพาะอาหารสูงกว่าลำไส้เล็ก

ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนตมีโครงสร้างประกอบด้วย manuronic acid (M) และ guluronic acid (G) เรียงตัวกันแน่นทำให้ป้องกันเชื้อที่ถูกห่อหุ้มได้ดี (Nualkaekul et al., 2012) และเมื่อห่อหุ้มร่วมด้วยสารพรีไบโอติกโอลิโกแซคคาไรด์จะช่วยปกปิดรูของโซเดียมอัลจิเนต ทำให้เพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อได้ดีขึ้น เม็ดบีดที่ทำโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่นมีขนาด 1.47-2.08 mm ทำให้เชื้อมีโอกาสสัมผัสสารละลายในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้น้อยลง (Shi et al., 2013)

การรอดชีวิตของเชื้อจะลดลงเมื่อเก็บไว้นานเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สารโอลิโกแซคคาไรด์สามารถป้องกันเชื้อได้ดีที่สุด โดยที่เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนจะมีจำนวนเชื้อลดลง 9.51 log cfu/g เป็น 8.26 log cfu/g และเก็บไว้ในโยเกิร์ตมีจำนวนเชื้อลดลงจาก 9.52 log cfu/g เป็น 7.30 log cfu/g เนื่องจากสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงยึดจับด้วยพันธะ α,β-ไกลโคซิดิก ทำให้สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี (bile salt) ที่อยู่ในลำไส้เล็ก เม็ดบีดจะมีความคงตัวในสภาวะที่เป็นกรด เชื้อจะถูกปลดปล่อยออกจากเม็ดบีดน้อยมากและสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่าง (Phoem และ Voravuthikunchai, 2015b) ในขณะที่เชื้ออิสระ (เชื้อที่ถูกห่อหุ้ม) จะไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้จนถึง 4 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 เชื้อที่ถูกห่อหุ้มเก็บไว้ในสารละลายเพปโตน (broth-like system) จะมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าเชื้อที่ถูกห่อหุ้มแล้วเก็บไว้ในโยเกิร์ต (food-like system) ($p<0.05$) เนื่องจากเชื้อในโยเกิร์ตมีการสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีสภาวะพีเอชต่ำทำให้ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ (Dave และ Shah, 1997)

จากงานวิจัยหลายๆงานมีการศึกษาเกี่ยวกับการห่อหุ้มเชื้อ (encapsulation) จะมีความสามารถในการปกป้องเชื้อได้ต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโปรไบโอติก เทคนิคการห่อหุ้มเชื้อ วัสดุตัวพยุง (co-encapsulating agent) แต่จากการทดลองจำนวนเชื้อโปรไบโอติกจะเหลือรอดมากกว่า 10^7 cfu/g ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค ซึ่ง FDA ได้กำหนดไว้ว่าจำนวนเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์จะต้องมี

จำนวนไม่น้อยกว่า 10^7 cfu/g จนกระทั่งถึงวันที่บริโภค (Brinque et al., 2011; Mortazavian et al., 2008; Ribeiro et al., 2014; Sandoval-Castilla et al., 2010)

1.2 ผลการเก็บรักษาแบบแช่เย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

นำเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 มาห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง เปรียบเทียบการรอดชีวิตในสภาวะที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต ดังแสดงใน**ตารางที่ 4.3** เม็ดบีดจะถูกเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ จำนวนเชื้อเริ่มต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 9.48-9.72 log cfu/g เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงสามารถรอดชีวิตในการเก็บรักษาแบบแช่เย็นได้ดีกว่าเชื้ออิสระที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ เชื้อที่ถูกห่อหุ้มเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนจะมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าเชื้อที่เก็บไว้ในโยเกิร์ตที่เวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ ($p<0.05$)

จำนวนเชื้อลดลงเมื่อเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงสามารถปกป้องเชื้อได้ดีที่สุด โดยที่เชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนจะมีจำนวนเชื้อลดลงจาก 9.72 log cfu/g เป็น 9.45 log cfu/g และเก็บรักษาไว้ในโยเกิร์ตจะมีจำนวนเชื้อลดลงจาก 9.70 log cfu/g เป็น 8.45 log cfu/g ที่เวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่เชื้ออิสระจะไม่สามารถรอดชีวิตได้ถึง 4 สัปดาห์ การรอดชีวิตของเชื้อที่ถูกห่อหุ้มเนื่องจากการใช้สารโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กมาห่อหุ้มร่วม และสามารถปกปิดรูที่เกิดขึ้นภายในเม็ดบีด (Phoem และ Voravuthikunchai, 2015b)

สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการนำโปรไบโอติกมาห่อหุ้มร่วมกับไคโตซาน (Brinque et al., 2011; Krasaekoopt et al., 2014) เพคติน (Sandoval-Castilla et al., 2010) สามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้ออิสระตลอดระยะเวลาที่มีการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C สอดคล้องกับงานวิจัย Krasaekoopt และ Watcharapoka (2014) นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 5 และ *Lactobacillus casei* 01 ห่อหุ้มด้วยกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์และอินนูลินเคลือบด้วยไคโตซานโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น บรรจุในโยเกิร์ตเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า *L.acidophilus* 5 และ *L.casei* 01 ลดลงจาก 1.10 log cfu/g เป็น 1.40 log cfu/g ตามลำดับ แต่เชื้อโปรไบโอติกที่มีจำนวนสูงกว่า 10^7 cfu/g ตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษา งานวิจัยของ Brinque และคณะ (2014) นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BL011 มาห่อหุ้มด้วยเพคตินแล้วเคลือบด้วยไคโตซาน และงานวิจัยของ Sandoval-Castilla

และคณะ (2010) นำเชื้อ *Lactobacillus casei* มาห่อหุ้มด้วยเพคตินโดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น เก็บในโยเกิร์ตแบบแช่เย็นมีจำนวนเชื้อลดลงเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา 1 เดือน

ตารางที่ 4.2 การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงที่ผ่านระบบจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง โดยเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การห่อหุ้มเชื้อ	เวลา	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (log cfu/g)					
	(สัปดาห์)	ก่อนผ่านกระเพาะอาหาร (pre-gastric juice)		หลังผ่านกระเพาะอาหาร (post-gastric juice)		หลังผ่านลำไส้เล็ก (post-intestinal juice)	
		เพปโตน	โยเกิร์ต	เพปโตน	โยเกิร์ต	เพปโตน	โยเกิร์ต
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	0	9.51 ± 0.11^{aA}	9.52 ± 0.05^{aA}	9.50 ± 0.01^{aA}	9.55 ± 0.04^{aA}	9.57 ± 0.11^{aA}	9.67 ± 0.03^{aA}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		9.35 ± 0.18^{aA}	9.46 ± 0.15^{aA}	9.48 ± 0.05^{aA}	9.38 ± 0.14^{aA}	9.65 ± 0.13^{aA}	9.60 ± 0.08^{aA}
เชื้ออิสระ		9.37 ± 0.21^{aA}	9.38 ± 0.20^{aA}	8.54 ± 0.17^{bA}	7.42 ± 0.16^{bB}	8.58 ± 0.16^{bA}	7.53 ± 0.12^{bB}
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	2	9.61 ± 0.10^{aA}	8.22 ± 0.14^{bB}	8.53 ± 0.21^{bA}	7.71 ± 0.24^{cB}	8.17 ± 0.20^{bA}	7.44 ± 0.02^{cB}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		9.42 ± 0.16^{aA}	8.31 ± 0.08^{bB}	8.48 ± 0.15^{bA}	7.53 ± 0.06^{cB}	8.27 ± 0.07^{bA}	7.38 ± 0.16^{cB}
เชื้ออิสระ		4.81 ± 0.22^{cA}	3.62 ± 0.03^{dB}	3.45 ± 0.13^{dA}	2.64 ± 0.17^{eB}	3.51 ± 0.06^{dA}	1.46 ± 0.15^{eB}
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	4	9.46 ± 0.10^{aA}	8.20 ± 0.12^{bB}	8.34 ± 0.08^{bA}	7.21 ± 0.12^{cB}	8.26 ± 0.25^{bA}	7.30 ± 0.16^{cB}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		8.32 ± 0.12^{bA}	7.23 ± 0.08^{cB}	7.38 ± 0.16^{cA}	6.35 ± 0.05^{dB}	6.37 ± 0.22^{cA}	5.37 ± 0.24^{dB}
เชื้ออิสระ		0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{fA}	0.00 ± 0.00^{eA}	0.00 ± 0.00^{fA}

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ (A,B) ในแนวนอนที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่ทดสอบในแต่ละสภาวะของระบบจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง ($p<0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-f) ในแนวตั้งที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 การรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง โดยเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การห่อหุ้มเชื้อ	เวลา	จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (log cfu/g)	
	สัปดาห์	เพปโตน	โยเกิร์ต
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	0	9.72 ± 0.01^{aA}	9.70 ± 0.03^{aA}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		9.48 ± 0.02^{aA}	9.51 ± 0.21^{aA}
เชื้ออิสระ		9.52 ± 0.09^{aA}	9.62 ± 0.14^{aA}
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	2	9.45 ± 0.10^{aA}	8.51 ± 0.10^{bB}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		9.67 ± 0.16^{aA}	8.27 ± 0.08^{bB}
เชื้ออิสระ		4.53 ± 0.14^{cA}	3.65 ± 0.11^{dB}
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	4	9.45 ± 0.15^{aA}	8.45 ± 0.11^{bB}
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		8.53 ± 0.12^{bA}	7.48 ± 0.16^{cB}
เชื้ออิสระ		0.00 ± 0.00^{dA}	0.00 ± 0.00^{eA}

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ (A,B) ในแนวนอนที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต ($p<0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-e) ในแนวตั้งที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)

2. กิจกรรมแมทาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ต

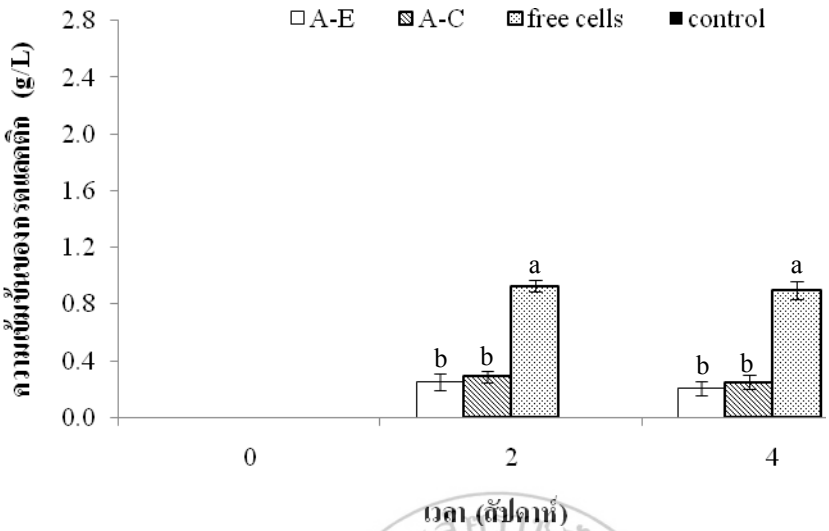
2.1 การสร้างกรดแลคติกของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

การสร้างกรดแลคติกของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยใช้สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเปรียบเทียบกับสารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้าและเชื้ออิสระ โดยเก็บรักษาเม็ดบีดไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.2** ความเข้มข้นกรดแลคติกเริ่มต้นในโยเกิร์ตมีค่าเป็น 1.50 g/l ความเข้มข้นกรดแลคติกในโยเกิร์ตที่สร้างโดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระมีค่าสูงกว่าเชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระที่อยู่ในสารละลายเพปโตน ความเข้มข้นกรดแลคติกที่สร้างจากเชื้ออิสระในโยเกิร์ตมีค่าอยู่ระหว่าง 1.40-2.53 g/l ความเข้มข้นกรดแลคติกในโยเกิร์ตที่สร้างโดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีค่าอยู่ระหว่าง 1.43-1.55 g/l โดยสารที่ใช้ห่อหุ้ม (co-encapsulating agent) ไม่มีผลต่อการสร้างกรดแลคติก ส่วนค่าพีเอชของเชื้อที่ถูกห่อหุ้มทั้งในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตมีค่าคงที่ แต่ค่าพีเอชของเชื้ออิสระมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

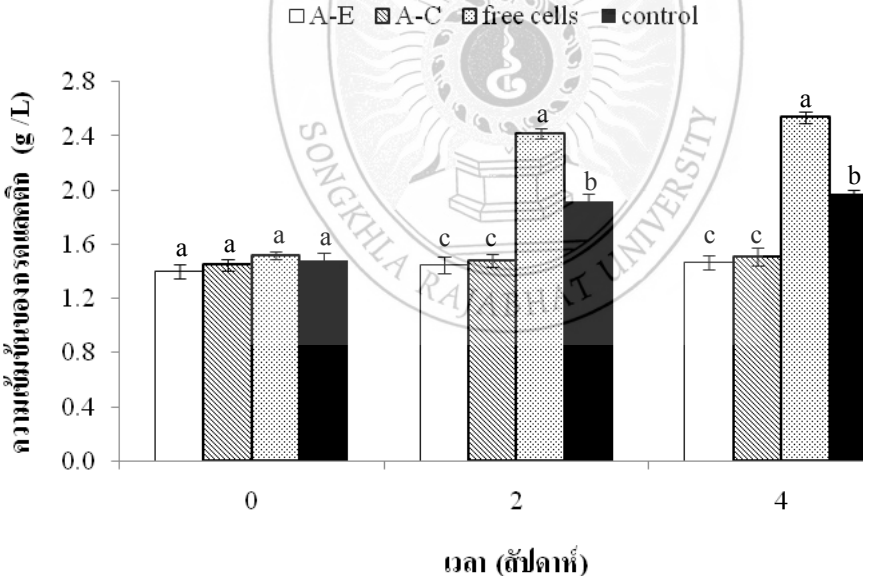
การผลิตโยเกิร์ตมีการใช้หัวเชื้อ 2 ชนิดคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* มีการหมักน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ความเข้มข้นกรดแลคติกที่ได้จึงสูงกว่าในสารละลายเพปโตน เชื้อ *L.plantarum* ที่ถูกห่อหุ้มจะมีกระบวนการ แมทาบอลิซึมที่ต่ำในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำให้ลดปัญหาการสร้างที่มากเกินไป (overacidification) ซึ่งจะมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ นอกจากนี้สารพรีไบโอติกที่ใช้ห่อหุ้มมีผลต่อการนำเข้าของสารอาหารจากภายนอกสู่ภายในเม็ดบีดจึงส่งผลต่อการสร้างแมทาบอไลท์ของเชื้อ (Homayouni et al., 2008)

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ribeiro et al., 2014 และ Shoji et al., 2013 ที่ทำการห่อหุ้มเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ด้วยเพคติน (pectin) และเวย์โปรตีน (whey protein) มีผลต่อการลดปริมาณกรดในโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ribeiro และคณะ (2014) นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* LA5 มาห่อหุ้มด้วยเพคติน และเวย์โปรตีน บรรจุเม็ดบีดในโยเกิร์ตทำให้มีการสร้างกรดในปริมาณที่น้อยลงเมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ ส่วนงานวิจัยของ Shoji และคณะ (2012) นำเชื้อ *L.acidophilus* มาห่อหุ้มโดยใช้เทคนิค complex coacervative ตามด้วย lyophilization บรรจุเม็ดบีดในโยเกิร์ตที่ทำจากนมควาย พบว่าปริมาณกรดลดลงเมื่อเทียบกับเชื้ออิสระ

a



b



ภาพที่ 4.2 การสร้างกรดแลคติกในสารละลายเพปโตน (a) และโยเกิร์ต (b) ที่มีเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

กำหนดให้

A-E (แท่งกราฟสีขาว) คือ เชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง

A-C (แท่งกราฟลายเฉียง) คือ เชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS)

Free cells (แท่งกราฟลายจุด) คือ เชื้ออิสระ

Control (แท่งกราฟสีดำ) คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระ

ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นกรดแลคติก ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-c) ที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างชุดทดสอบในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)

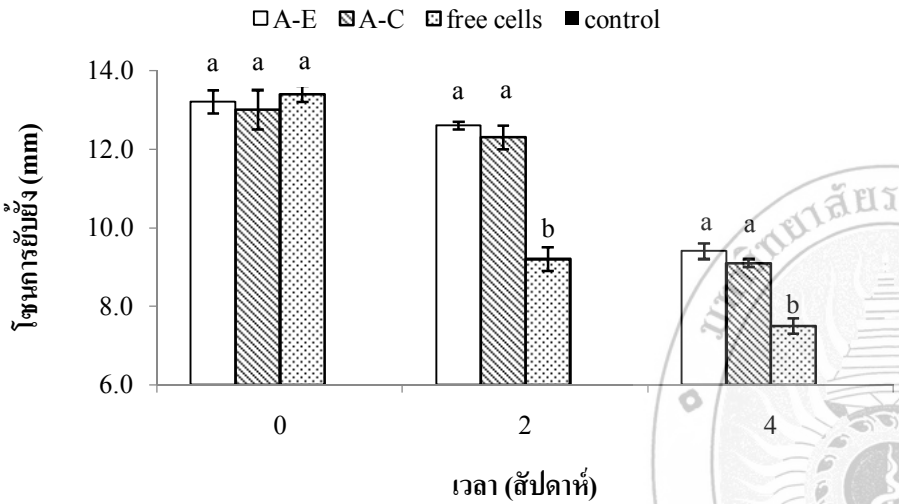
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม

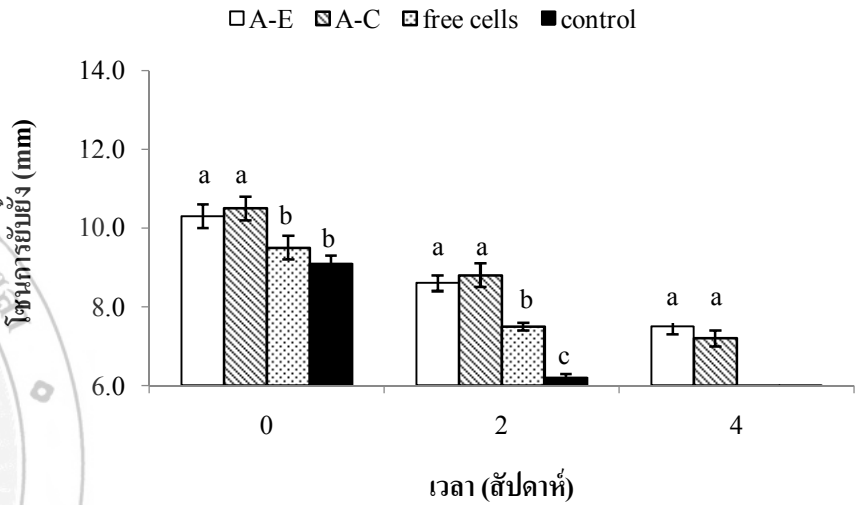
ทดสอบความสามารถของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยใช้สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 โดยวิธี agar well diffusion ดังแสดงใน**ภาพที่ 4.3** เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง และเชื้ออิสระที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนและโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0, 2 และ 4 สัปดาห์ โดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC25923 ได้ดีกว่า *S.*Typhimurium ATCC13311 เชื้อที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ดีกว่าเชื้อที่เก็บไว้ในโยเกิร์ต เชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีโซนการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าเชื้ออิสระ ($p<0.05$) เชื้อที่ถูกห่อหุ้มซึ่งเก็บไว้ในสารละลายเพปโตนสามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC25923 มีค่าเป็น 8.2-13.5 mm และสามารถยับยั้งเชื้อ *S.*Typhimurium ATCC13311 มีค่าเป็น 6.4-11.5 mm ส่วนเชื้อที่ถูกห่อหุ้มซึ่งเก็บไว้ในโยเกิร์ตสามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC25923 มีค่าเป็น 6.2-10.4 mm และสามารถยับยั้งเชื้อ *S.*Typhimurium ATCC13311 มีค่าเป็น 4.3-9.1 mm อย่างไรก็ตามเชื้ออิสระไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ในสัปดาห์ที่ 4

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยเชื้อ *L.plantarum* เกิดจากการสร้างสารยับยั้งหลักคือกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดซิตริก การลดลงของค่าพีเอชมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค จากการที่กรดเข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการแตกตัวของเซลล์ ซึ่งจะแบ่งพลังงานส่วนหนึ่งไปทำลายโปรตอนที่เข้ามา เมื่อกระบวนการแมทาบอลิซึมเสียสมดุลจะทำให้เชื้อก่อโรคตายในที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Trabelsi et al. (2014) นำเชื้อ *L.plantarum* TN9 มาห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตแล้วเคลือบด้วยไคโตซาน จากนั้นทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคคือ *Listeria ivanovii, Salmonella enteritica* และ *Escherichia coli* โดยวิธี agar well diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี

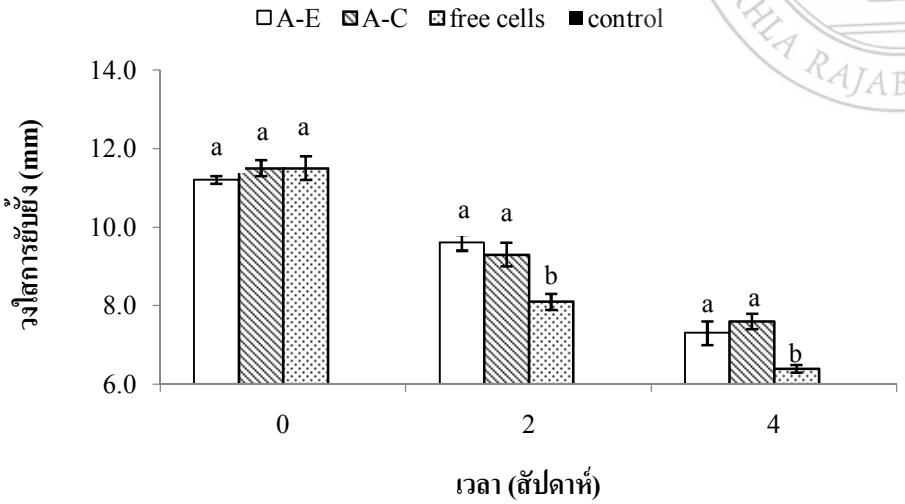
a (i)



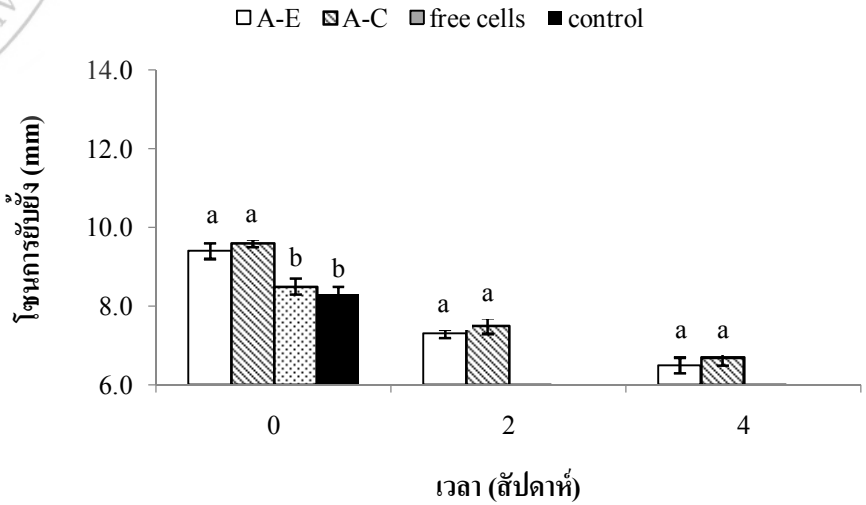
b (i)



c (ii)



d (ii)



มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ 4.3 กิจกรรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเก็บไว้ในสารละลายเพปโตน (a,c) และโยเกิร์ต (b,d) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่อการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (i) และ *Salmonella* Typhimurium ATCC13311 (ii) โดยวิธี agar well diffusion

กำหนดให้

A-E (แท่งกราฟสีขาว) คือ เชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง

A-C (แท่งกราฟลายเฉียง) คือ เชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS)

Free cells (แท่งกราฟลายจุด) คือ เชื้ออิสระ

Control (แท่งกราฟสีดำ) คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่เชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระ

ค่าเฉลี่ยของโซนการยับยั้ง ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a-c) ที่ต่างกัน คือมีความแตกต่างกันระหว่างชุดทดสอบในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

3. การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การประเมินค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคด้านลักษณะที่ปรากฏ สีเนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบรวม ใช้แบบทดสอบ hedonic scale ให้คะแนน 9 ระดับ ดังแสดงใน **ตารางที่ 4.4** ในตอนเริ่มต้นไม่มีความแตกต่างในการประเมินคุณค่าทางประสาทสัมผัสในการทดสอบชิมโยเกิร์ตทุกตัวอย่าง ($p>0.05$) คะแนนการทดสอบชิมโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้ออิสระ และชุดควบคุม (ไม่มีการใส่เชื้อ) จะมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บ 4 สัปดาห์ คะแนนความชอบรวมของโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้อที่ถูกห่อหุ้มจะมีค่าสูงกว่าโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้ออิสระที่สัปดาห์ที่ 4 ($p<0.05$) โดยชนิดของตัวอย่างที่ห่อหุ้มไม่มีผลต่อคะแนนการทดสอบชิม คะแนนการทดสอบชิมของโยเกิร์ต (ความชอบรวม) ที่บรรจุเม็ดบีดจะอยู่ในช่วง 7.26-7.56 (ชอบปานกลาง)

การห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงแล้วเติมลงในโยเกิร์ตจะช่วยเพิ่มเนื้อสัมผัสในการขบเคี้ยว โยเกิร์ตที่เป็นเนื้อเดียวกันจะไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการสร้างกรดในปริมาณที่มากเกินไปอันจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ต (Kailasapathy, 2006) ในขณะที่โยเกิร์ตที่ใส่เชื้ออิสระ รสชาติมีการเปลี่ยนแปลงเพราะมีการสร้างกรดแลคติกในปริมาณที่มากเกินไปที่เวลา 4 สัปดาห์ จากงานวิจัยอื่นๆ เกี่ยวกับการทดสอบชิมโยเกิร์ตพบว่า โยเกิร์ตที่มีการเติมเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเพคติน (Ribeiro et al., 2014) และแป้งข้าวโพดที่ย่อยยาก (Hi-maiz resistant starch) (Kailasapathy, 2006) ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนการยอมรับที่เติมเชื้อที่ถูกห่อหุ้มไม่แตกต่างจากโยเกิร์ตที่เติมเชื้ออิสระ

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4.4 คะแนนการทดสอบชิมโยเกิร์ตที่ใส่เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การห่อหุ้มเชื้อ	เวลา	คะแนนการทดสอบชิม				
	(สัปดาห์)	ลักษณะที่ปรากฏ	สี	เนื้อสัมผัส	รสชาติ	ความชอบรวม
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	0	7.23 ± 0.10[a]	7.37 ± 0.10[a]	7.38 ± 0.05[a]	7.39 ± 0.14[a]	7.30 ± 0.08[a]
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		7.34 ± 0.05[a]	7.35 ± 0.07[a]	7.29 ± 0.06[a]	7.43 ± 0.03[a]	7.45 ± 0.12[a]
เชื้ออิสระ		7.45 ± 0.06[a]	7.40 ± 0.03[a]	7.35 ± 0.08[a]	7.38 ± 0.05[a]	7.38 ± 0.12[a]
ชุดควบคุม		7.30 ± 0.07[a]	7.45 ± 0.05[a]	7.28 ± 0.10[a]	7.37 ± 0.07[a]	7.41 ± 0.10[a]
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	2	7.23 ± 0.05[a]	7.34 ± 0.09[a]	7.45 ± 0.05[a]	7.35 ± 0.15[a]	7.47 ± 0.08[a]
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		7.26 ± 0.10[a]	7.28 ± 0.15[a]	7.36 ± 0.14[a]	7.28 ± 0.08[a]	7.29 ± 0.06[a]
เชื้ออิสระ		7.45 ± 0.15[a]	7.48 ± 0.12[a]	7.41 ± 0.16[a]	7.42 ± 0.10[a]	7.33 ± 0.15[a]
ชุดควบคุม		7.38 ± 0.10[a]	7.30 ± 0.10[a]	7.22 ± 0.17[a]	7.37 ± 0.16[a]	7.42 ± 0.09[a]
อัลจิเนต-โอลิโกแซคคาไรด์ (ว่านหอมแดง)	4	7.38 ± 0.05[a]	7.28 ± 0.10[a]	7.34 ± 0.10[a]	7.38 ± 0.08[a]	7.36 ± 0.06[a]
อัลจิเนต-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (การค้า)		7.35 ± 0.07[a]	7.37 ± 0.11[a]	7.42 ± 0.15[a]	7.45 ± 0.12[a]	7.40 ± 0.12[a]
เชื้ออิสระ		6.21 ± 0.18[b]	7.32 ± 0.09[a]	6.27 ± 0.15[b]	6.31 ± 0.08[b]	6.38 ± 0.11[b]
ชุดควบคุม		6.30 ± 0.12[b]	7.29 ± 0.14[a]	6.30 ± 0.07[b]	6.43 ± 0.12[b]	6.45 ± 0.10[b]

กำหนดให้ คะแนนการทดสอบชิมมี 9 ระดับ

9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง 6 = ชอบน้อย 5 = เฉยๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

ค่าเฉลี่ยของคะแนนการทดสอบชิม ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็ก (a,b) ในแนวตั้งที่ต่างกัน คือ มีความแตกต่างกันระหว่างคะแนนการทดสอบชิมโยเกิร์ตในแต่ละช่วงเวลา ($p<0.05$)

บทที่ 5

สรุป และข้อเสนอแนะ

1. สรุป

เม็ดบีดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มมีรูปร่างกลม สีขาวใส มีขนาดอยู่ในช่วง 1.47-2.08 mm เมื่อนำเชื้อ *L.plantarum* ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงเก็บไว้ในสารละลายเพปโตน และโยเกิร์ต ทำการทดสอบในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าเชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าเชื้ออิสระ ในสัปดาห์ที่ 4 เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงมีการรอดชีวิตสูงที่สุด แต่เชื้ออิสระไม่สามารถรอดชีวิตได้

การสร้างกรดแลคติกของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยใช้สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงพบว่า ความเข้มข้นกรดแลคติกในโยเกิร์ตที่สร้างโดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระมีค่าสูงกว่าเชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระที่อยู่ในสารละลายเพปโตน โดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีการสร้างกรดแลคติกน้อยกว่าเชื้ออิสระ

ทดสอบความสามารถของเชื้อ *L.plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้มโดยใช้สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยวิธี agar well diffusion พบว่า เชื้อที่ถูกห่อหุ้มและเชื้ออิสระมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ATCC25923 ได้ดีกว่า *S.*Typhimurium ATCC13311 เชื้อที่เก็บไว้ในสารละลายเพปโตนมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ดีกว่าเชื้อที่เก็บไว้ในโยเกิร์ต เชื้อที่ถูกห่อหุ้มมีโซนการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าเชื้ออิสระ

การประเมินค่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคด้านลักษณะที่ปรากฏ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบรวมพบว่า คะแนนความชอบรวมของโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้อที่ถูกห่อหุ้มจะมีค่าสูงกว่าโยเกิร์ตที่บรรจุเชื้ออิสระที่สัปดาห์ที่ 4 คะแนนความชอบรวมจะอยู่ในช่วง 7.26-7.56 (ชอบปานกลาง)

งานวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาในสัตว์ทดลองก่อนที่จะประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์

2. ข้อเสนอแนะ

- สารละลายที่ใช้ในการทดสอบสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร (gastric juice) และลำไส้เล็ก (intestinal juice) ควรเตรียมใหม่ๆแล้วนำมาใช้งาน เพราะมีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบ ถ้าเก็บไว้นานจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงจากสภาวะจริงที่ควรเป็น

- ควรนำเม็ดบีดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ห่อหุ้มด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดงมาทดสอบกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ทำด้วยนม (non-dairy product) ทั้งนี้เพื่อประโยชน์แก่ผู้ที่แพ้นมสามารถรับประทานอาหารเสริมสุขภาพชนิดอื่นที่บรรจุเม็ดบีดแทนผลิตภัณฑ์จากนมได้

- ควรนำเม็ดบีดมาผลิตในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดอื่นเช่น แคปซูล แกรนูล และผงชาชงดื่ม เป็นต้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2548). จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นวลจิรา ภัทรรังรอง. (2538). โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิรนาม สุพัฒน์. (2550). เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง กาถนอมอาหารโดยใช้จุลินทรีย์สำหรับครูและบุคคลทั่วไป. ฝ่ายพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ. สวทช เครือข่ายภาคเหนือ. 34 หน้า.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : กลุ่มงานส่งเสริมและประกันคุณภาพการศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ. 425 หน้า.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2536). ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 37-52.

สิรสา สุมงคล. (2556). การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 90 หน้า.

สุมณฑา วัฒนศิลป์. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 470 หน้า.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. (2551). การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่ และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 116 หน้า.

อรวินทร์ เลาหรัชตนันท์. (2532). สารกันเสียจากอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก. วารสารอาหาร. 19, 12-16.

อรัญญา สังขศรี. (2541). การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 108 หน้า.

Axelsson, L.T. (1993). Lactic acid bacteria : classification and physiology. *In* Lactic acid bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A.V.) New York : Marcel Dekker. pp. 1-64.

Bergara-Almeida, S., Aparecida, M., and Da Silva, A. (2002). Hedonic scale with reference: performance in obtaining predictive models. Food quality and preference, 13, 57-64.

Bifidobacterium. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม 2557, จาก http://www.agr.hokudai.ac.jp/jslab/Images/cover122.jpg.

Brinques, G.B.; Ayub and M.A.Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. Journal of Food Engineering, 103, 123-128.

Carnobacterium. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม 2557, จาก http://www.futura- sciences.com/img/bacteries.jpg.

Chaikham, P. 2015. Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. Food Bioscience, 12, 61-66.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., and Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. In simulated gastric conditions. Journal of Microbiology Methods, 56, 27-35.

Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F. and Villaran, M. D. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. International Journal of Food Microbiology, 142, 185-189.

Contor, L. (2001). Functional food science in Europe. Nutrition Metabolism Cardiovascular and Diseases, 11(4 Suppl), 20-23.

De vuyst, L and Vandamme, E.J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. In Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology genetics and applications. Oxford : The Alden Press. pp. 1-12.

Enterococcus. สืบค้นเมื่อวันที่ 31 มกราคม 2557, จาก http://www.jgi.doe.gov/news_bug2.jpg.

FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powdered milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Report. Retrieved insert the date from http://www.fao.org/es/esn/probio/probio.htm.

Gibson GR, Probert H.M., Van Loo J., Rastall R.A., and Roberfroid M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews, 17, 259-275.

Haghshenas, B., Yousef, M., Minoo, H., Abolfazl, B., Simin, S., Dayang, R., Rozita, R., and Norhafizah, A. (2015). Effect of addition of inulin and fenugreek on the survival of microencapsulated *Enterococcus durans* 39C in alginate-psyllium polymeric blends in simulated digestive system and yogurt. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 10(4), 350-361.

Holdeman LV, C.E., and Moore W.E.C., Editors. (1977). Anaerobe laboratory manual; Virginia Polytechnic Institute and State University : Blacksburg.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., and Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry, 111, 50-55.

Ifesan, B., Hamtasin, C., Mahabusarakam, W., and Voravuthikunchai, S. (2009a). Inhibitory effect of *Eleutherine americana* Merr. extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. Journal of Food Science, 74, M31-M36.

Ifesan, B.O.T., Siripongvutikorn, S., and Voravuthikunchai, S.P. (2009b). Application of *Eleutherine americana* crude extract in homemade salad dressing. Journal of Food Protection, 72, 650-655.

Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT-Food Science and Technology, 39, 1221-1227.

Kandler and Weiss. (1986). Bergey 's manual determinative bacteriology, 2, 1208-1235.

Kaur, S. and Das, M. (2011). Functional foods: An overview. Research Review, 20(4), 861-875.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal. 12, 730-736.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and 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.

Krasaekoopt, W. and S. Watcharapoka. (2014). Effect of addition of inulin and galacto-oligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. LWT - Food Science and Technology, 57(2), 761-766.

Lactobacillus. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม 2557, จาก http://www.dicat. csic.es/rdcsic/images/Lactobacillus.jpg.

Lactococcus. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม 2557, จาก http://www.molgen. biol.rug.nl/../images/llactis.jpg.

Leuconostoc. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2557, จาก http://www.fdc.metu. edu.tr/.../image004.jpg.

Mandal, S, Puniya, A.K., and Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. International Dairy Journal, 16, 1190-1195.

Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehasani, M.R., Razavis, H., Mousavi, S.M., and Sohrabvandis, S. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yoghurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. Journal of Nutrition Research and Food Science, 63(4), 349-472.

Paul D., Marijke M. F., Milica S., and Jan S. (2010). Encapsulation for preservation of functionality as targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal, 20, 292-302.

Pediococcus. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2557, จาก http://www.vietsciences. free.fr/../images/Pediococcus.jpg.

Phoem, A.N., and Voravuthikunchai, S.P. (2013). *Eleutherine americana* as a growth promotor for infant intestinal microbiota. Anaerobe, 20, 14-19.

Phoem, A.N., and Voravuthikunchai, S.P. (2015a). Preparation of *Eleutherine americana*-alginate complex microcapsules and application in *Bifidobacterium longum*. Nutrients, 7, 831-848.

Phoem, A.N., and Voravuthikunchai, S.P. (2015b). Applications of microencapsulated *Bifidobacterium longum* with *Eleutherine americana* in fresh milk tofu and pineapple. Nutrients, 7, 2469-2484.

Pinto, S.S., Fritzen-Freire, C.B., Munoz, I.B., Barreto, P.L.M., Prudencio, E.S., and Amboni, R.D. (2012). Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. Journal of Food Engineering, 111, 563-569.

Propionibacterium. สืบค้นเมื่อวันที่ 31 มกราคม 2557, จาก http://www.nih.go.jp /../section_8/pics_s8/8-11-1A.jpg.

Rao, A., 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.

Ribeiro, M.C., chaves, K.S., Gebara, C., and Infante, F.N.S. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. Food Research International, 66, 24-431.

Salminen, S., and Wright, A.V. (1993). Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker Inc. 442 pp.

Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Garcia-Galindo, H.S., Alvarez-Ramirez, J., and Vernon-Carter, E.J. (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Food Research International, 43, 111-117.

Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. International Dairy Journal, 17, 1262-1277.

Shoji, A. S., Oliveira, A.C., Baliero, J.C.C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R.J.B., Okuro, P.K., and Favaro-Trindade, C.S. (2012). Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. Food Bioproduct Process, 91(2), 83-88.

Streptococcus. สืบค้นเมื่อวันที่ 31 มกราคม 2557, จาก http://www.kepler.uag.mx/../ Streptococcus/20pyogenes.jpg.

Su, R., Zhu, X.L., Fan, D.D., Mi, Y., Yang, C., and Jia, X. (2011). Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Biology Macromolecule, 49, 979-984.

Sumeet Kaur and Madhusweta Das. (2011). Functional foods : an overview. Research Review, 20(4), 861-875.

Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G.R., and Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens : Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe, 18(5), 530-538.

Tetragenococcus. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2557, จาก http://www.kiifc.kikkoman.co.jp/tenji/image/nyusan.jpg

Trabelsi, I., Ayadi, D., Bejar, W., Bejar, S., Chouayekh, H., and Ben Salah, R. (2014). Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. International Journal of Biological Macromolecules, 64, 84-89.

Voravuthikunchai, S.P., Limsuwan,S., and Chusri, S. (2007). New perspectives on herbal medicines for bacterial infection. In Natural Products II (Govil, J.N., Singh, V.K., Siddqui, N.T., Eds.), Recent Progress in Medicinal Plants, Studium Press, LLC USA. pp.41-101.

Weissella. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม 2557, จากhttp://www.cdc.gov/../vol 9 no 10/images/02-0667_1b.jpg.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., and Rastall, R. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chemistry, 120, 850-857

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

BHI soft (0.7%) agar

calf brain, infusion form	200.0	g	beef heart, infusion form	250.0	g
sodium chloride	5.0	g	disodium phosphate	2.5	g
bacto dextrose	2.0	g	bacto proteose peptone	10.0	g
agar	0.11	g	distilled water	1,000.0	ml

pH 7.4

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

BHI broth

ละลายส่วนผสมของ BHI 37 g (ไม่เติมวุ้น) ด้วยน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Mannitol salt agar (MSA)

beef extract	1.0	g	peptone	10.0	g
sodium chloride	75.0	g	mannitol	10.0	g
agar	10.0	g	phenol red	0.025	g
distilled water	1,000.0	ml			

pH 7.1

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

MRS (Man Rogosa and Sharpe)

bromocresol purple	0.4	g	peptone	10.0	g
sodium azide	0.0014	g	beef extract	10.0	g
yeast extract	5.0	g	glucose	20.0	g
K_2HPO_4	2.0	g	Tween 80	1.0	g
sodium acetate.$3H_2O$	5.0	g	diammonia citrate	2.0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g	$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
agar	15.0	g	distilled water	1,000.0	ml

pH 6.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

MRS broth

peptone	10.0	g	beef extract	10.0	g
yeast extract	5.0	g	glucose	20.0	g
K_2HPO_4	2.0	g	Tween 80	1.0	g
sodium acetate.$3H_2O$	5.0	g	diammonia citrate	2.0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g	$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
distilled water	1,000.0	ml			

pH 6.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้ละลายเข้ากันดีนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

0.85% Sodium chloride solution (0.85% NaCl)

Sodium chloride	0.85	g
น้ำกลั่น	100.0	ml

นำ NaCl มาละลายในน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Pre-reduced phosphate buffer saline (PBS)

KH_2PO_4	1.5	g
NaCl	9.0	g
$Na_2HPO_4.2H_2O$	9.0	g
L-cysteine HCl solution	0.5	ml
Distilled water	1,000.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงเติม cysteine HCl solution

Simulated gastric juice

$CaCl_2.2H_2O$	0.1	g
KCl	0.2	g
$MgCl_2.6H_2O$	0.2	g
NaCl	8.0	g

$Na_2HPO_4.2H_2O$	8.3	g
NaH_2PO_4	14.4	g
Pepsin	3.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงเติมเอนไซม์เพปซิน

Simulated intestinal juice

NaCl	6.5	g
KCl	0.8	g
$CaCl_2$	0.2	g
$NaHCO_3$	1.4	g
Bile salt	3.0	g
α-amylase	1.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงเติมเอนไซม์ α-amylase

น้ำยาทดสอบคะตาเลส (3% H_2O_2)

35% H_2O_2	8.6	ml
distilled water	1,000.0	ml

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้เย็น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

Crystal violet

- สารละลาย A : ละลาย crystal violet 2.0 gในร้อยละ 95 ethyl alcohol ปริมาตร 20 ml
- สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate 0.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml
  ผสมสารละลาย Aและ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชม. กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

95% ethyl alcohol

- decolorizing solvent

Gram iodine (mordant)

- mordant : บดไอโอดีน 1.0 g และ potassium iodide 2.0 g เข้าด้วยกันค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปบดผสม
  จนกระทั่งไอโอดีนละลาย ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300ml เก็บไว้ในขวดสีชา

Safranin (counterstain)

- counterstain : ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในร้อยละ 95 ethyl alcohol ปริมาตร 10 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

สารละลายไอโอดีน

iodine	1.0	g	potassium iodide	20.0	g
distilled water	100.0	ml			

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีน และ potassium iodide จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ และการทดสอบต่างๆ

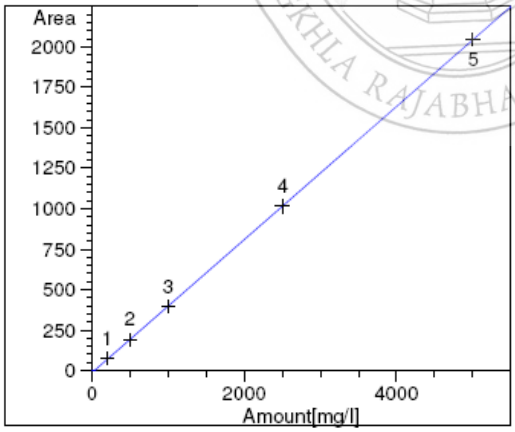
สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (FOS)

ภาพที่ ข 1 สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากว่านหอมแดง (a) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (b)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

เครื่องมือ	High Performance Liquid Chromatography 1100, Agilent Technologies, Germany (HPLC2)
เทคนิคการทดสอบ	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
สภาวะการทดสอบ	Column : Hypersil ODS 4x250 mm, 5 µm
	Mobile phase : 0.1%H_3PO_4
	Flow rate : 1 ml/min
	Injection volume : 20 µl
	Detector : Variable wavelength detector ความยาวคลื่น 210 nm

```
Calculate              :      External Standard
Based on               :      Peak Area

Rel. Reference Window :       0.500 %
Abs. Reference Window :       0.500 min
Rel. Non-ref. Window  :       0.500 %
Abs. Non-ref. Window  :       0.500 min
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks     :      not reported
Partial Calibration    :      Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times:       No, only for identified peaks

Curve Type             :      Linear
Origin                 :      Ignored
Weight                 :      Equal

Recalibration Settings:
Average Response       :      Average all calibrations
Average Retention Time:       Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
    Printout of recalibrations within a sequence:
        Calibration Table after Recalibration
        Normal Report after Recalibration
    If the sequence is done with bracketing:
        Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime    Lvl    Amount       Area      Amt/Area  Ref Grp Name
 [min] Sig        [mg/l]
-------|--|--|----------|----------|----------|---|--|----------------
  3.328  1  1  200.00000   75.52916    2.64798 +       LActic acid
            2  500.00000  190.40224    2.62602
            3 1000.00000  397.38690    2.51644
            4 2500.00000 1015.13196    2.46273
            5 5000.00000 2044.83789    2.44518
```




```
LActic acid at exp. RT: 3.328
VWD1 A, Wavelength=210 nm
Correlation:              0.99999
Residual Std. Dev.:       3.78115
Formula: y = mx + b
        m:       4.11149e-1
        b:     -11.85710
        x: Amount[mg/l]
        y: Area
```

ภาพที่ ข 2 ตารางมาตรฐานและกราฟมาตรฐานของกรดแลคติก (lactic acid)

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ

***Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม**

ภาพที่ ข 3 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR1465 ที่ถูกห่อหุ้ม โดยใช้วิธี agar well diffusion

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธีการทดสอบชิม (sensory test)

ภาพที่ ข 4 ชุดทดสอบชิมโยเกิร์ตที่มีการบรรจุเม็ดบีด

ภาพที่ ข 5 การทดสอบชิมโยเกิร์ตที่มีการบรรจุและไม่บรรจุเม็ดบีด

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชื่อผลิตภัณฑ์ .....

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่.....เวลา.....

คำชี้แจง กรุณาชิมตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบของตัวอย่างแต่ละปัจจัยที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9=ชอบมากที่สุด 8=ชอบมาก 7=ชอบปานกลาง

6=ชอบน้อย 5=เฉยๆ 4=ไม่ชอบเล็กน้อย

3=ไม่ชอบปานกลาง 2=ไม่ชอบมาก 1=ไม่ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ			
	รหัส	รหัส	รหัส	รหัส
ลักษณะที่ปรากฏ				
สี				
เนื้อสัมผัส				
รสชาติ				
ความชอบรวม				

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ประวัติผู้วิจัย

ผู้วิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล ดร. อัจฉรา เพิ่ม

หน่วยงาน โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ผลงานวิจัย

Phoem, A.N. and Voravuthikunchai, S.P. 2015. Preparation of *Eleutherine americana*-alginate complex microcapsules and application in *Bifidobacterium longum.* Nutrients. 7 : 831-848.

Phoem, A.N. and Voravuthikunchai, S.P. 2015. Applications of microencapsulated *Bifidobacterium longum* with *Eleutherine americana* in fresh milk tofu and pineapple juice. Nutrients. 7 : 2469-2484.

Phoem, A.N. and Voravuthikunchai, S.P. 2013. *Eleutherine americana* as a growth promotor for infant intestinal microbiota. Anaerobe. 20 : 14-19.

Phoem, **A.N.** and Voravuthikunchai, S.P. 2012. Growth stimulation/inhibition effect of medicinal plants on human intestinal microbiota. Food Science and Biotechnology. 21(3) : 739-745.

อัจฉรา เพิ่ม และอาซือนะ บูเก๊ะเจ๊ะลี. (2559). ฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกของส้มโอ มะกรูด และลูกยอต่อจุลินทรีย์บริเวณกระจกและเครื่องสุขภัณฑ์. ประชุมวิชาการระดับชาติ “เทคโนโลยีภาคใต้วิจัย” ครั้งที่ 6 29 มกราคม 2559 วิทยาลัยเทคโนโลยีภาคใต้ จังหวัดนครศรีธรรมราช. หน้า 373-378.

อัจฉรา เพิ่ม พิรดา อาแย สุมิตตรา สันขะหรี พิมพ์ศิริ เตาสัน สุนิษา หลังเกต ปริญญา ทับเที่ยง และเสาวนิตย์ ชอบบุญ. 2558. การยืดอายุการเก็บรักษาน้ำพริกแกงคั่ว น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มปักษ์ใต้. ประชุมวิชาการระดับชาติ “เทคโนโลยีภาคใต้วิจัย” ครั้งที่ 5 23 มกราคม 2558 วิทยาลัยเทคโนโลยีภาคใต้จังหวัดนครศรีธรรมราช. หน้า 411-416.

อัจฉรา เพิ่ม ฟิรฮาร์น เจะแต และวนิดา เหล็มหมาด. 2558. ประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพ และสารสกัดหยาบจากใบน้อยหน่าในการกำจัดปลวกใต้ดิน. ประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ

“ราชภัฏวิจัย” ครั้งที่ 3 20-22 พฤษภาคม 2558 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช. หน้า 165-174.

นาซีบ๊ะ บราเฮง ขวัญหทัย ไชยเพศ และ**อัจฉรา เพิ่ม**. 2557. ประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในการควบคุมหนอนใยผัก. ประชุมวิชาการระดับชาติ “ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา” ครั้งที่ 2 14-15 สิงหาคม 2557 ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองศิริราชสมบัติครบ 60 ปี จังหวัดสงขลา. หน้า 136-147.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. การดูดซับตะกั่วโดยเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่แยกจากน้ำทะเลและน้ำกร่อยบริเวณอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. วารสารคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 3(4) : 1-12.

อัจฉรา หนูเพชร ดวงพร คันธโชติ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย. วารสารสงขลานครินทร์. 26(5) : 659-670.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY