รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 ด้วยอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

Study of alginate encapsulation on survival of probiotic *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 under simulated gastrointestinal condition

นางสาวสุธิดา พิมพ์โคตร รหัสนักศึกษา 5940202134

นางสาวอารยา ปานพรม รหัสนักศึกษา 5940202140

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา สหกิจศึกษา รหัสวิชา 403483

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

ภาคการศึกษาที่ 2 ปีการศึกษา 2562

รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 ด้วยอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

Study of alginate encapsulation on survival of probiotic *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 under simulated gastrointestinal condition

นางสาวสุธิดา พิมพ์โคตร รหัสนักศึกษา 5940202134

นางสาวอารยา ปานพรม รหัสนักศึกษา 5940202140

ปฏิบัติงานสหกิจ ณ

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (IFRPD)

เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
เลขที่ 50 ถ.งามวงศ์วาน แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

6 มีนาคม 2563

เรื่อง ขอส่งรายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา

เรียน ดร.ปิยสุดา เทพนอก อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา สาขาชีววิทยา

ตามที่ข้าพเจ้า นางสาวสุธิดา พิมพ์โคตร และนางสาวอารยา ปานพรม นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ได้ปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ระหว่างวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึงวันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2563 ในตำแหน่งนักศึกษาฝึกงาน ณ ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร และได้รับมอบหมายจากพนักงานที่ปรึกษาให้ศึกษา และจัดทำโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 ด้วยอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง และปฏิบัติงานอื่นๆ ที่ได้รับมอบหมาย

บัดนี้ การปฏิบัติงานสหกิจศึกษาได้สิ้นสุดลงแล้ว ข้าพเจ้าจึงขอส่งรายงานดังกล่าวจำนวน 1 เล่ม เพื่อขอรับคำปรึกษาต่อไป จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

.....

(นางสาวสุธิดา พิมพ์โคตร)

.....

(นางสาวอารยา ปานพรม)

กิตติกรรมประกาศ

การปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ตั้งแต่วันที่ 18 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ถึง วันที่ 6 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2563 ของนักศึกษาหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ได้รับความอนุเคราะห์จากเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ทำให้การฝึกปฏิบัติงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ คุณกัญญรัตน์ กัญญาคำ ตำแหน่งนักวิจัยชำนาญการ จุลชีววิทยาทางอาหาร ที่ให้ความรู้ คอยให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และช่วยเหลือในการจัดทำโครงการทำให้โครงการนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ เป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ฝึกงานในสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ส่งผลให้นักศึกษาได้รับความรู้ และประสบการณ์ต่าง ๆ ที่มีค่าอย่างมากมาย มีประโยชน์สำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา และการประกอบอาชีพในอนาคต

ขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมในการให้ข้อมูล เป็นที่ปรึกษาในการทำรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนให้การดูแลและให้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีวิตของการทำงานจริง คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ ไว้ ณ ที่นี้

สุธิดา พิมพ์โคตร

อารยา ปานพรม

6 มีนาคม 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 ที่ผานกระบวนการทำแห่งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้สารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และตัวอย่างควบคุมที่ไม่ใส่สารป้องกันความเย็น โดยเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC42359 หลังผ่านกระบวนการแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้เครื่อง freeze dryer ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ความดันน้อยกว่า 132 Pa นาน 8 ชั่วโมง โดยผลการทดลองภายหลังการแช่แข็ง พบว่า เชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีสารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนการรอดชีวิตเท่ากับ 1.93 X 10^9 CFU/g และ 1.33 X 10^9 CFU/g ตามลำดับ และตัวอย่างควบคุมที่ไม่ใส่สารป้องกันความเย็น มีจำนวนการรอดชีวิตเท่ากับ 1.37 X 10^9 CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างจากจำนวนเชื้อเริ่มต้น และในขั้นตอนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า เชื้อ *L.paracesei* BCC 42359 ที่มี skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตได้ดีที่สุดเท่ากับ 6.51 X 10^9 CFU/g และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตเท่ากับ 4.70 x 10^9 CFU/g ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างควบคุมที่มีการรอดชีวิตของเชื้อน้อยที่สุดเท่ากับ 9.5 X 10^6 และศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC42359 เมื่อผ่านการทดสอบภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง พบว่า เม็ดบีดที่ห่อหุ้มเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มี skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเชื้อคงเหลือเท่ากับ 6.48 logCFU/g และ 3.32 logCFU/g ตามลำดับ โดยคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 70.69 และ 25.41 ตามลำดับ

คำสำคัญ : โพรไบโอติก ไมโครเอนแคปซูเลชัน การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สารป้องกันความเย็น

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อ.....ข
สารบัญ.....ค
สารบัญตาราง.....จ
สารบัญรูปภาพ.....ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....1
รายละเอียดหน่วยงาน.....1
ตำแหน่งและลักษณะงานที่ได้รับมอบหมายในการปฏิบัติสหกิจศึกษา.....6
พนักงานที่ปรึกษา.....7
ระยะเวลาการปฏิบัติงาน.....7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....7
บทที่ 2 โครงงานวิจัย.....8
การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracesei* BCC 42359 ด้วยอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง.....8
ที่มาและความสำคัญ.....8
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....9
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....9
แผนการดำเนินงาน.....10
นิยามศัพท์เฉพาะ.....10
การทบทวนเอกสาร.....11
ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....25
ผลการทดลอง.....36
สรุปและอภิปราย.....37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 งานอื่นๆ ที่ได้ปฏิบัติ.....38
การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้วิธีไมโครเอนแคปซูเลชันสำหรับการเติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม.....38
การทำแบบประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมโพรไบโอติก.....39
การตรวจวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ซอสพริก.....40
การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ขนมปังอบกรอบ.....43
การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากผักกุ่มดองที่ทดสอบในสภาวะกรดและสภาวะเกลือน้ำดี.....43
จัดกิจกรรมแสดงผลิตภัณฑ์ของสถาบันในงานแถลงข่าว เปิดงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2563 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.....44
จัดกิจกรรมทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรประเภท : ผลิตภัณฑ์ผลไม้อบแห้ง.....45
บทที่ 4 สรุปผลการปฏิบัติงาน.....46
บทที่ 5 ปัญหาและข้อเสนอแนะ.....48
บรรณานุกรม.....49
ภาคผนวก.....50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแผนการดำเนินงานโครงการวิจัย.....10
ตารางที่ 2 แสดงการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ผานกระบวนการทำแห่งแบบแชเยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน.....31
ตารางที่ 3 การคัดเลือกปริมาณผงเชื้อของ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต..... 33
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง..... 35

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แผนที่ตั้งสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร.....2

ภาพที่ 2 โครงสร้างการบริหารงานสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร.....4

ภาพที่ 3 โครงสร้างการแบ่งส่วนราชการสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร.....5

ภาพที่ 4 เชื้อ *L. paracasei*.....14

ภาพที่ 5 แสดงส่วนประกอบและรูปแบบของแคปซูลขนาดเล็ก.....17

ภาพที่ 6 แสดงภาพการทำแคปซูลขนาดเล็กด้วยเทคนิค Extrusion technique.....18

ภาพที่ 7 แสดงเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตแคปซูลขนาดเล็ก.....18

ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Alginate.....19

ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Chitosan.....20

ภาพที่ 10 แสดงการระเหิดของสาร.....21

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสมกับผสม Skim milk ที่แตกต่างกันจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....31

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะของเม็ดแคปซูลที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 % ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสม Skim milk ร้อยละ 10 (w/v) 33

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะของเม็ดแคปซูลที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 % ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสม Maltodextrin ร้อยละ 10 (w/v) 34

ภาพที่ 14 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้วิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน.....37

ภาพที่ 15 การทำแบบประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติก.....38

ภาพที่ 16 การตรวจวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ซอสพริก.....39

ภาพที่ 17 การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ขนมปังอบกรอบ.....42

ภาพที่ 18 จัดแสดงผลิตภัณฑ์ของสถาบันในงานแถลงข่าว เปิดงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2563.....43

ภาพที่ 19 จัดกิจกรรมทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร.....44

บทที่ 1

บทนำ

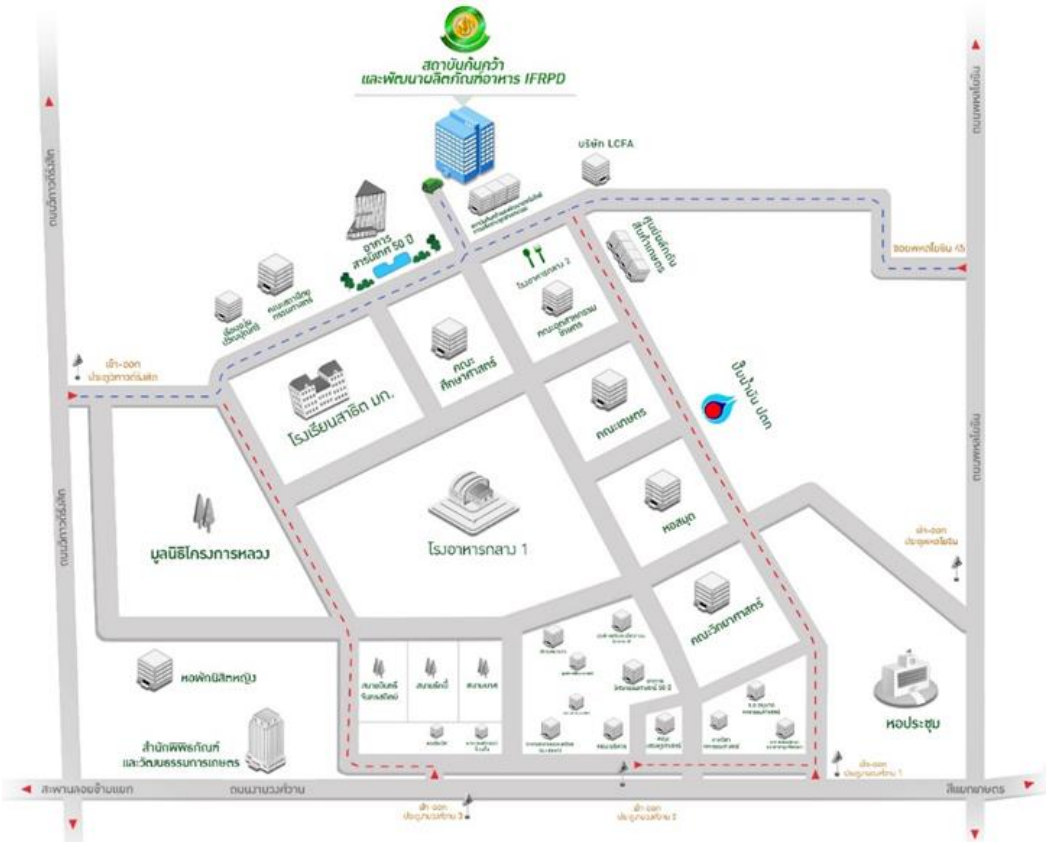
1. รายละเอียดของหน่วยงาน

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นสถานที่วิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร สร้างนวัตกรรมเพื่อส่งเสริมและสนับสนุนอุตสาหกรรมอาหารของประเทศให้บริการประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับการฝึกประสบการณ์วิชาชีพที่จะสามารถทราบถึงปัญหา ลงมือปฏิบัติงานได้จริง และยังนำทฤษฎี หลักการ ความรู้พื้นฐานต่าง ๆ จากการเรียนมาประยุกต์ใช้ในการทำงานในด้านจุลชีววิทยาอีกด้วย

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มีชื่อย่อว่า "สถาบันอาหาร" เดิมคือฝ่ายศึกษาทดลอง และวิจัยขององค์การอาหารสำเร็จรูป (อสร.) ซึ่งมีหน้าที่จัดหาเครื่องจักร อุปกรณ์การผลิตและทดลองผลิตอาหารให้แก่กองทัพ ก่อตั้งขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2498 ณ บริเวณภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยมีนายอมร ภูมิรัตน์ เป็นหัวหน้าฝ่ายศึกษา ทดลอง และวิจัยดังกล่าวต่อมา อสร. ได้จัดตั้งโรงงานขนาดใหญ่ขึ้นที่ อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี จึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ฝ่ายศึกษาทดลองวิจัยอีกต่อไป คณะรัฐมนตรีจึงได้มีมติให้โอนฝ่ายศึกษา ทดลองและวิจัยนี้ให้แก่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2511 ซึ่งขณะนั้นศาสตราจารย์อินทรีย์ จันทรสถิตย์ ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ชื่อภาษาอังกฤษว่า Institute of Food Research and Product Development (IFRPD) ก่อตั้งอย่างเป็นทางการขึ้นเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2511 โดยมี ศาสตราจารย์อมร ภูมิรัตน์ เป็นผู้อำนวยการคนแรก สถาบันอาหารฯ เป็นสถาบันเฉพาะทางทำหน้าที่วิจัยด้านวิทยาศาสตร์การอาหาร จุลชีววิทยาด้านอาหาร และโภชนาการ มีส่วนในการสร้างความเข้มแข็ง และเผยแพร่ความรู้สู่นักวิชาการ นักศึกษา และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันให้แก่ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงกลุ่มเกษตรกรได้อย่างเป็นรูปธรรม ตลอดจนทำการวิจัยตามนโยบายของรัฐบาลเพื่อแก้ไขปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศที่เกี่ยวข้องกับผลิตผลทางการเกษตร วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อแก้ปัญหาทางด้านอาหารต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน

ที่ตั้งของสถาบัน : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร เลขที่ 50
ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
โทรศัพท์ : 02-9428629-35
โทรสาร : 02-5611970
Email : ifr@ku.ac.th
Website : ifrpd.ku.ac.th



ภาพที่ 1 แผนที่ตั้งสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

วิสัยทัศน์

เป็นสถาบันที่ผลิตนวัตกรรมแบบครบวงจรเพื่อขับเคลื่อนอุตสาหกรรมอาหาร

พันธกิจ

1. มุ่งพัฒนางานวิจัยเพื่อสร้างนวัตกรรม
2. มุ่งพัฒนาการให้บริการครบวงจรที่มีมาตรฐานสากล
3. มุ่งพัฒนาความรู้ในการขับเคลื่อนอุตสาหกรรมอาหาร
4. มุ่งพัฒนาระบบสนับสนุนให้มีประสิทธิภาพ

นโยบาย

1. การวิจัยและการพัฒนา การวิจัยและการพัฒนาพัฒนางานวิจัยมุ่งสู่การสร้างนวัตกรรมอาหารผลักดันนักวิจัยรุ่นใหม่ให้มีความสามารถในการผลิตงานวิจัยร่วมกับภาคเอกชน เพื่อรองรับอุทยานวิทยาศาสตร์อาหาร (KU Food Science Park) ส่งเสริมให้มีการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารทั้งใน และต่างประเทศสร้างเครือข่ายงานวิจัยและพัฒนาด้านอุตสาหกรรมอาหารกับหน่วยงานภายนอกโดยเฉพาะภาคเอกชน จัดหางบประมาณอุดหนุนการวิจัยจากแหล่งทุนภายใน และภายนอกประเทศ

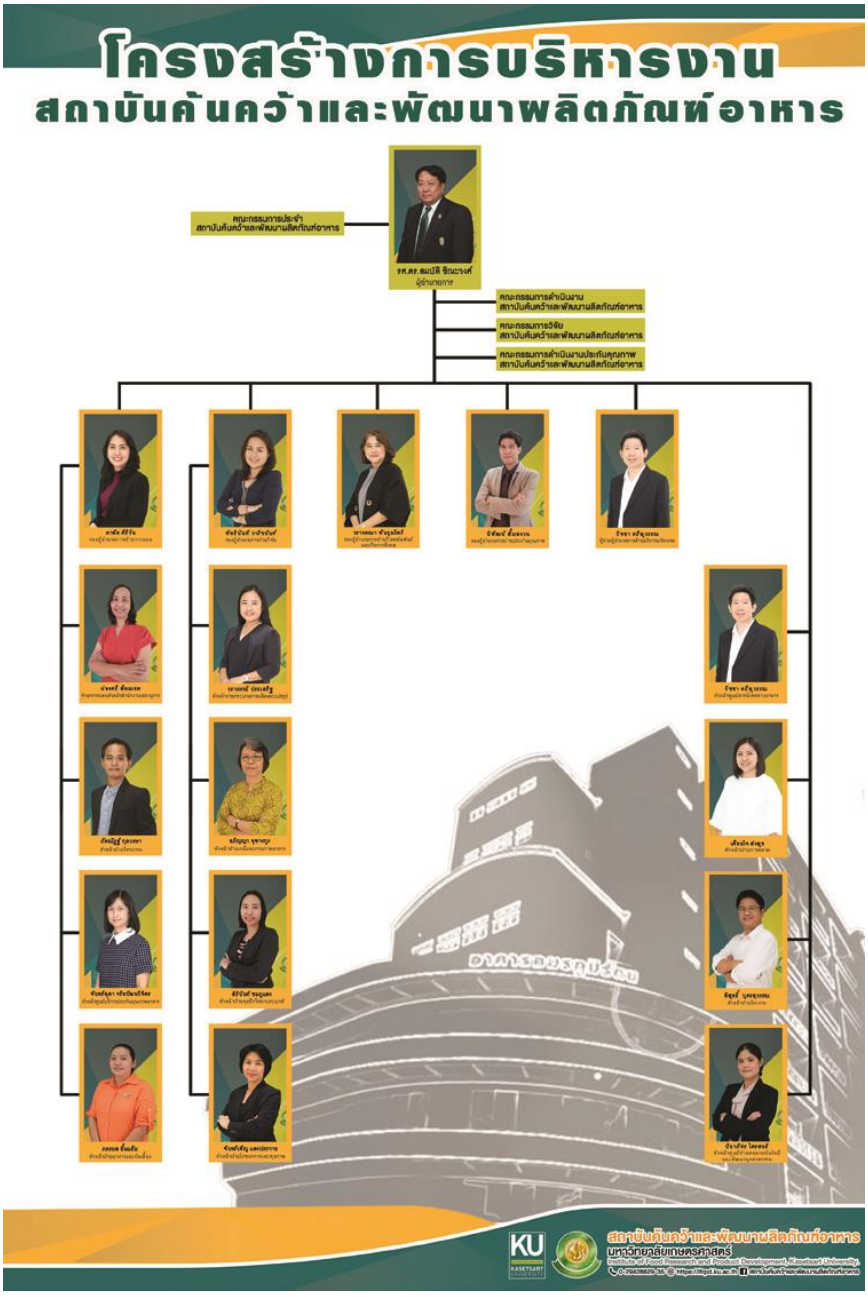
2. การบริการวิชาการ ขยายขีดความสามารถของงานบริการวิชาการสร้างรายได้และพัฒนาทักษะบุคลากร จัดระบบบริหารจัดการทรัพยากรเพื่อให้บริการวิชาการอย่างมีประสิทธิภาพ และส่งเสริมการให้บริการวิชาการที่ตอบสนองต่อสังคม และชุมชน

3. การสนับสนุนการศึกษา ร่วมมือกับภาควิชา/คณะในด้านการเรียนการสอน การสนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์และการฝึกงานเตรียมความพร้อมให้กับหน่วยงานสามารถรองรับการให้นิสิตเข้ามาฝึกงาน และทำงานวิจัย เพื่อรองรับนโยบายการใช้ทรัพยากรร่วมกันของมหาวิทยาลัย

4. การทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม ส่งเสริมกิจกรรมการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรมและกิจกรรมเสริมสร้างความสัมพันธ์ระหว่างบุคลากร เพื่อส่งเสริมให้เกิดอัตลักษณ์ที่ดีของมหาวิทยาลัย

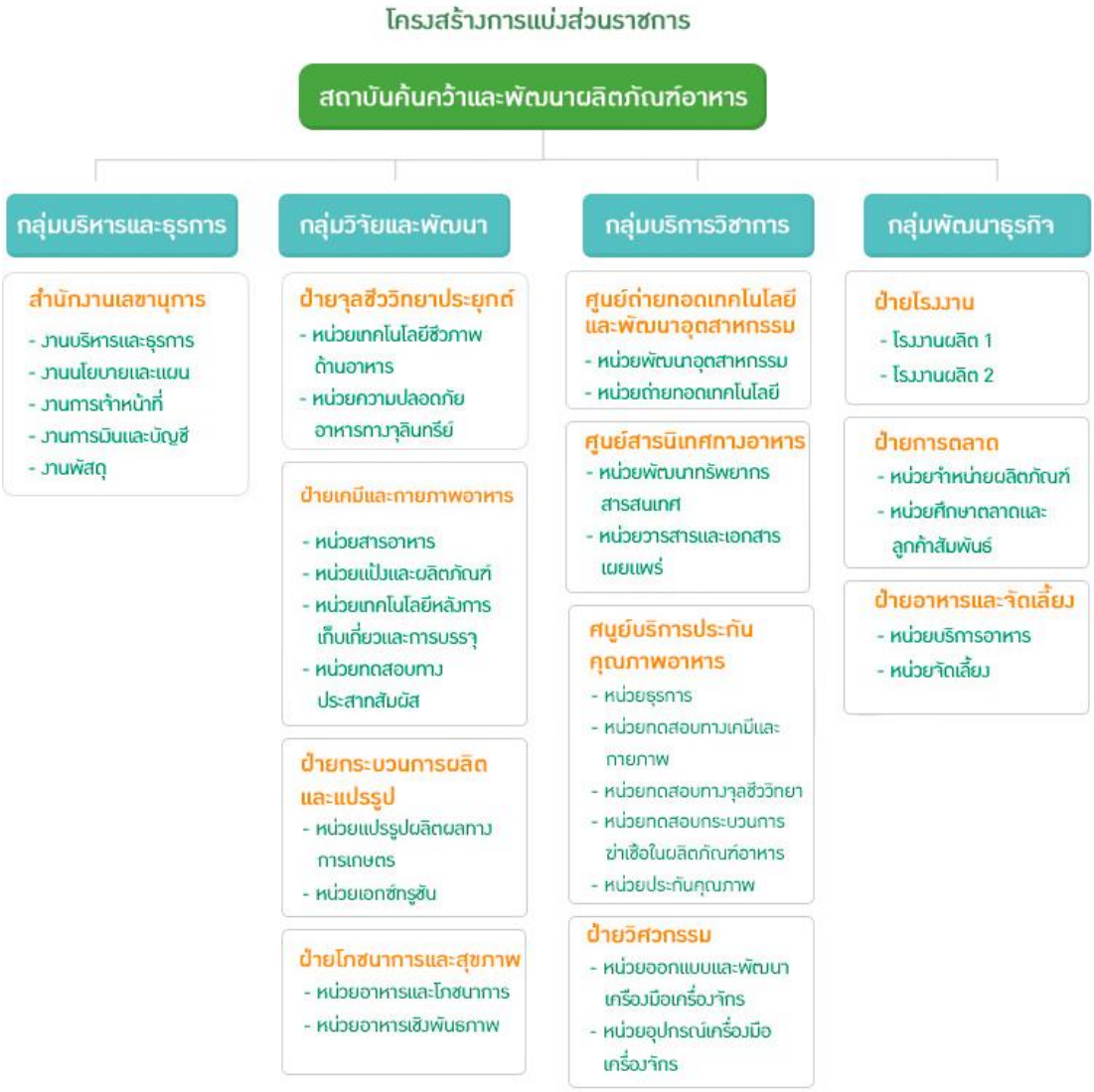
5. การบริหารจัดการ ส่งเสริมการบริหารจัดการให้มีประสิทธิภาพถูกต้องให้สถาบันสามารถเลี้ยงตัวเองได้เน้นการมีส่วนร่วมของบุคลากรพัฒนา และปรับปรุงระบบสารสนเทศ และฐานข้อมูลเพื่อการบริหารจัดการในทุกภารกิจ ส่งเสริมการวิจัยของสถาบันในภารกิจหลัก พัฒนาศักยภาพบุคลากรพร้อมเข้าสู่การเป็นประชาคมอาเซียนพัฒนาการประชาสัมพันธ์ให้เป็นที่รู้จัก และยอมรับในสังคม

โครงสร้างการบริหารงานสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร



ภาพที่ 2 โครงสร้างการบริหารงานสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

โครงสร้างการแบ่งส่วนราชการสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร



ภาพที่ 3 โครงสร้างการแบ่งส่วนราชการสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์ของสถาบัน

ผลิตภัณฑ์ทุกผลิตภัณฑ์ที่สถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตออกจำหน่ายจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลจากการศึกษา ค้นคว้า วิจัย ทดลอง และพัฒนาของนักวิจัยสถาบันฯ ตามหลักวิชาการ อย่างจริงจัง และต่อเนื่อง จนมั่นใจว่าเป็นผลิตภัณฑ์ทีมีคุณภาพ สะอาด ปลอดภัย และได้มาตรฐาน จึงสามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภคได้อย่างแน่นอน นอกเหนือจากผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพแล้ว สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ยังมีบริการต่าง ๆ ที่มีคุณภาพ อีกด้วย ได้แก่

การบริการทางวิชาการ การตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร และวัตถุดิบ การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ (Product R&D) การให้บริการเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์การผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร ให้แก่ผู้ประกอบการทุกระดับ โดยเฉพาะอย่างยิงระดับ SMEs ระดับครัวเรือน ที่ต้องการการสนับสนุนด้านองค์ความรู้และทรัพยากรบุคคล การบริการห้องประชุม พร้อมอุปกรณ์ที่ทันสมัย/ครบครัน และอาหารที่ สะอาด อร่อย ถูกหลักโภชนาการ ในราคาที่เหมาะสม

2. ตำแหน่งและลักษณะงานที่ได้รับมอบหมายในการปฏิบัติสหกิจศึกษา

ตำแหน่งงานที่ได้รับมอบหมายคือ ผู้ช่วยนักวิจัย ลักษณะงาน คือ รับผิดชอบการวิจัย ในฐานะผู้ช่วยนักวิจัย เตรียมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย รายงานปัญหา หรือข้อผิดพลาด ที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง และรายงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงาน บันทึกข้อมูลต่าง ๆ ในการทำการทดลอง วิเคราะห์ผล และสรุปผล รวมทั้งปฏิบัติงานอื่น ๆ ตามที่ได้รับมอบหมาย

3. พนักงานที่ปรึกษา

นางสาวกัญญรัตน์ กัญญาคำ

ตำแหน่ง : นักวิจัยชำนาญการ

กลุ่มวิจัยและพัฒนา : ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์

ความเชี่ยวชาญ : จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic) และการประยุกต์ใช้ในอาหาร การใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันในการห่อหุ้มจุลินทรีย์

ผลงานวิจัย : การห่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เยลลี่เสาวรส การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยพรีไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตในเครื่องดื่มสมุนไพรไทย การพัฒนาข้าวโพดงอกและหมักเพื่อเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวโพด และผลิตภัณฑ์เยลลี่จากน้ำส้มสายชูหมักจากผลไม้

4. ระยะเวลาในการปฏิบัติงานสหกิจ วันที่ 18 พฤศจิกายน 2562 ถึง วันที่ 6 มีนาคม 2563

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ประสบการณ์การทำงานจริงในการทำงานทางด้านจุลชีววิทยา
2. ได้เพิ่มพูนทักษะ และเทคนิควิธีการทดลองต่างๆ ทางด้านจุลชีววิทยา
3. ได้เรียนรู้การปรับตัวให้เข้ากับสังคมในสถานประกอบการ และเรียนรู้การอยู่ร่วมกันกับเพื่อนร่วมงานภายในหน่วยงานเดียวกัน

บทที่ 2

โครงงานวิจัย

โครงงานวิจัย เรื่อง : การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracesei* BCC 42359 ด้วยอัลจิเนตต่อการมีชีวิตรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

1. ที่มาและความสำคัญ

โพรไบโอติกจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค หากได้รับในปริมาณที่เพียงพอ โดยกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมโพรไบโอติกลงไปจะต้องมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 10^6 CFU/g จนกระทั่งถึงวันที่บริโภค (กระทรวงสาธารณสุข. ฉบับที่ 346. 2555) จึงจะมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่เพียงพอและส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค แต่มีงานวิจัย พบว่า โพรไบโอติกหลายสายพันธุ์ มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อผ่านเข้าสู่สภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และสภาวะความเป็นด่างในลำไส้ การทำไมโครเอนแคปซูเลชันจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มโพรไบโอติก ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก เมื่ออยู่กับอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิต และจากการถูกทำลายในสภาวะทางเดินอาหารของมนุษย์ แต่วิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันส่วนใหญ่มีการใช้เชื้อในรูปแบบเชื้อสด ซึ่งจะมีข้อจำกัด คือ มีขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นกว่าเชื้อในรูปแบบผง จึงมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาผ่านกระบวนการทำแห้งซึ่งมีหลายกรรมวิธีด้วยกัน เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอย การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นต้น โดยกระบวนการทำแห้งที่ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาในครั้งนี้คือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เป็นวิธีการทั่วไปที่นิยมใช้กัน เนื่องจากสามารถคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ได้ดี ทั้งยังสะดวกในการนำไปใช้ และการเก็บรักษา โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำได้โดยการแช่แข็งเชื้อจุลินทรียก่อนแล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยการระเหิดที่อุณหภูมิและความดันต่ำ (สุญญากาศ) ซึ่งการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในกระบวนการแช่แข็งอาจมีอัตราการรอดชีวิตลดลง เนื่องจากในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นจะต้องมีการทำให้สารแขวนลอยเซลล์อยู่ในสภาพแข็งซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ โดยเกิดจากผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ทำให้เซลล์แตกเกิดการสูญเสียน้ำสารต่างๆ เกิดการรั่วไหลออกมา และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด ทั้งนี้การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจำเป็นต้องมีสารป้องกันความเย็น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน และศึกษาการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผานกระบวนการทำแหง่แบบแช่เยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน

2. ศึกษาการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อการเหลือรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

1.3. ขอบเขตของโครงงานวิจัย

ศึกษากระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของแบคทีเรียโพรไบโอติก ด้วยสารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน และศึกษาการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยอัลจิเนตต่อการเหลือรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งก่อน และหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

2. ทราบวิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันด้วยวิธี Extrusion

3. สามารถนำกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไปพัฒนาใช้ในการผลิตแบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบผง เพื่อนำไปใช้การทำแคปซูลขนาดเล็กด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชั่น

1.5. ระยะเวลาดำเนินโครงงานวิจัย

เดือนพฤศจิกายน 2562 – เดือนมีนาคม 2563

1.6. แผนการดำเนินงาน

ตารางที่ 1 แสดงแผนการดำเนินงานโครงงานวิจัย

การดำเนินงาน	ระยะเวลาดำเนินงาน				
	พฤศจิกายน	**ธันวาคม**	**มกราคม**	**กุมภาพันธ์**	**มีนาคม**
กำหนดหัวข้องานวิจัย	←	→			
ศึกษาค้นคว้าข้อมูล	←	→	→	→	→
ดำเนินงานวิจัย			←	→	
- วิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก			←	→	
- วิธีการเตรียมสารป้องกันความเย็น			←	→	
- วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง			←	→	
- วิธีการทำแคปซูลขนาดเล็ก			←	→	
- วิธีการทดสอบการเหลือรอดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง			←	→	
วิเคราะห์ผลการทดลอง				←	→
สรุปและอภิปรายผล				←	→

1.7. นิยามศัพท์เฉพาะ

1. โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

2. ไมโครเอนแคปซูเลชัน หมายถึง กระบวนการห่อหุ้มของเหลว และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ด้วยโพลิเมอร์ชั้นบางๆ เช่น อัลจิเนต ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 จนถึง 1,000 ไมครอน

3. การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หมายถึง การทำแห้ง (dehydration) ด้วยการแช่เยือกแข็ง (freezing) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (sublimation) เป็นไอ ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำเท่ากับหรือ ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

4. สารป้องกันความเย็น หมายถึง สารที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยลดจุดเยือกแข็งให้ต่ำลง

2. การทบทวนเอกสาร

2.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายของมนุษย์ในปริมาณที่มากพอแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (FAO/WHO, 2002) ดังนั้นโพรไบโอติก จึงหมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์และมีผลต่อระบบสมดุลภายในลำไส้ ทำให้ระบบขับถ่ายอาหารเกิดความสมดุล ช่วยในเรื่องของการขับถ่าย เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (อัจฉรา, 2550)

2.1.1 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีกลไกการทำงานในการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคดังนี้

1. แย่งพื้นที่ยึดเกาะกับจุลินทรีย์ชนิดใหม่บนผนังลำไส้เล็ก โดยปกติโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารมีความสามารถในการต้านการเกาะของจุลินทรีย์ใหม่บนผนังลำไส้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ด้วยกระบวนการที่เรียกว่า Competitive exclusion หรือ Colonization resistance นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่เข้าไปใหม่ เช่น ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

2. แย่งอาหารกับจุลินทรีย์ชนิดใหม่โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะแย่งอาหารในบริเวณที่เกาะตั้งถิ่นฐานไม่ให้เหลือพอสำหรับจุลินทรีย์ชนิดใหม่

3. ผลิตสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยโพรไบโอติกจะผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารบูดเสีย เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus*

2.1.2 คุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติก

1. สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 เพื่อให้สัมพันธ์กับการหลั่งเกลือน้ำดีภายในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.15 - 0.30 ซึ่งเป็นแหล่งที่โพรไบโอติกแบคทีเรียอาศัยอยู่

2. สามารถเจริญได้ในภาวะความเป็น กรด - ด่าง (ค่าพีเอช pH unit) 2, 3, 4, 8 และ 9 ซึ่งเป็นระดับความเป็นกรด-ด่าง เช่นเดียวกับที่พบในกระเพาะอาหารของมนุษย์ซึ่งมีความเป็นกรดที่ระดับ ค่าพีเอชเท่ากับ 3 หรือต่ำกว่า โดยทั่วไปความต้านทานต่อกรด และพีเอชจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดย *Bifidobacteria* มีความสามารถทนต่อกรดและพีเอชน้อยกว่า *Lactobacillus* ซึ่งแบคทีเรีย ที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญและรอดชีวิตจากภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

3. สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียรวมทั้งหมด 13 ชนิด พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 13 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิง ซึ่งคุณสมบัติของแบคทีเรียจะช่วยให้แบคทีเรีย *L. plantarum* สามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารอาจช่วยในการลดการก่อโรคโดยแบคทีเรีย และป้องกันปัญหาสุขภาพอื่นๆ ที่มีแบคทีเรียก่อโรคสาเหตุ

4. การไม่แก่งแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์โดยการทดสอบความสามารถในการเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวิตามินบี 12 เนื่องจากการดูดซึมวิตามินเข้าสู่ร่างกายมักเกิดที่ลำไส้เล็ก และวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำชนิดหนึ่งที่ถูกดูดซึมในบริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งแหล่งที่มาของ วิตามินบี 12 ในแหล่งอาหารจากธรรมชาตินั้นพบว่ามีเฉพาะในเนื้อสัตว์เท่านั้น ดังนั้นแบคทีเรีย *L. plantarum* จึงสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีวิตามินบี 12 ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียทดสอบนี้ไม่ต้อง อาศัยวิตามินบี 12 ในการเจริญจึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคกลุ่มมังสวิรัติหรือผู้ที่รับประทานอาหาร มังสวิรัติที่ไม่ดื่มนมที่มีระดับวิตามินบี 12 ต่ำ

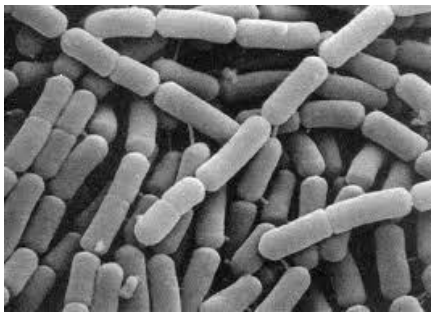
5. สามารถย่อยสารชีวโมเลกลุขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน แป้ง และไขมัน ซึ่งแบคทีเรีย *L. plantarum* ที่ย่อยได้ทั้งแป้งและโปรตีน มีความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุล และส่งเสริมระบบการย่อยอาหารเพื่อดูดซึมไปใช้ประโยชน์แก่ร่างกายต่อไป

6. สามารถเกาะติดผนังลำไส้ของเจ้าบ้านได้เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค เพราะเป็นการเริ่มต้นของการอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต และช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านหรือผู้บริโภค ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถเกาะติดผนังลำไส้ผู้บริโภคได้จะเป็นตัวขับเคลื่อนสำคัญให้แก่ร่างกายผู้บริโภคเกิดกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะในลำไส้มีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกว่าร้อยละ 80 อยู่ บริเวณนี้จึงถือว่าระบบทางเดินอาหารเป็นแหล่งที่มีบทบาทสูงต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตเมื่อแบคทีเรียเข้าไปในร่างกายจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันจดจำว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดดีหรือชนิดที่ไม่ดี และมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน เช่น ถ้าเป็นโพรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่มีประโยชน์ เมื่อผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหารและเกาะติดที่เยื่อบุผิวบริเวณลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันจะจดจำความทนทานและยอมรับให้อยู่ร่วมกันโดยจุลินทรีย์จะอาศัย อาหารในการเจริญเติบโต และผลพลอยได้คือทำให้เจ้าบ้านได้รับประโยชน์ร่วมด้วยเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย โดยโพรไบโอติกสามารถทำให้สภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยมีสภาพเป็นกรดทำให้เชื้อก่อโรคซึ่งไม่ทนกรดนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อย สารอาหารบางชนิด ผลิตวิตามินและสารต้านเชื้อก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ให้สามารถควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Ouwehand et al., 1999; Zubillaga et al., 2001; Holzapfel and Schillinger, 2002; Grajek et al., 2005) แต่จุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ดีหรือเป็นเชื้อโรคระบบภูมิคุ้มกันจะตอบสนองแบบต่อต้านโดยกลไกต่างๆ เช่น เหนี่ยวนำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันมา ทำลายหรือดักจับแล้วขับออกจากร่างกาย หรือเหนี่ยวนำให้ระบบภูมิคุ้มกันสร้างสารมาทำลายเชื้อโรค ถ้ารุนแรงอาจมีการทำลายเซลล์จนเกิดภาวะการอักเสบรุนแรงได้ ฉะนั้นคุณสมบัติการเกาะติดเซลล์ เยื่อบุของโพรไบโอติกจึงเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญเป็นตัวขับเคลื่อนส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค

ดังนั้นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกได้ อาจเรียกว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria : LAB) เช่น แบคทีเรียสกุลแลคโตบาซิลัสที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักที่เป็นที่รู้จักอย่างโยเกิร์ต รวมถึงผลิตภัณฑ์นมเนย และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารแบบต่างๆ ในปัจจุบัน

แล็กโตบาซิลลัส พาราเคเซไอ (*Lactobacillus paracesei*)

Lactobacillus paracasei เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ พบในทางเดินลำไส้ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบได้ตามธรรมชาติในผักดอง นม และเนื้อสัตว์ รักษาและปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร - Recolonizes ลำไส้ในระหว่าง และหลังการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน ช่วยในการรักษาโรคท้องร่วง และช่วยในการรักษาอาการลำไส้แปรปรวน



ภาพที่ 4 เชื้อ *Lactobacillus paracasei*

ที่มา : http://www.mysticalbiotech.com/portfolio/lactobacillus-paracasei-lpc-iio-atcc-27216/

2.1.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

1. เพิ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยปรับสภาวะภายในลำไส้ให้มีความเป็นกรดมากขึ้น ด้วยการผลิตกรดแลคติกออกมา รวมถึงการปล่อย สารยับยั้งการเจริญเติบโตจำพวกแบคเทอริโอซิน

2. ช่วยให้การย่อยอาหารสมบูรณ์ เพิ่มมวลอุจจาระและลดปัญหาในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องผูก ท้องเสีย ลำไส้อักเสบ โดยสร้างสารเคมีออกมากำจัดแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

3. ลดการสร้างสารพิษในจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น อินโดล แอมโมเนีย เอมีน เป็นต้น และลดการดูดซึมสารพิษเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย

4. ส่งเสริมการสร้างภูมิต้านทานตามธรรมชาติ และช่วยให้เม็ดเลือดขาวทำงานได้อย่างมี ประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

5. ช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร รวมถึงสังเคราะห์วิตามินและสารอาหารบางชนิด

6. ยับยั้งการสร้างสารก่อมะเร็ง และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

7. ช่วยลดคลอเลสเตอรอลในเลือด พบว่าในนมหมักมีสารไฮดรอกซีเมทิลกลูตาเมท ช่วยยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์คลอเลสเตอรอล

8. ช่วยให้ผู้ที่มีอาการแพ้นมสามารถรับประทานนมได้ เนื่องจากในนมมีน้ำตาลแลคโตส ซึ่งบางคนไม่สามารถย่อยได้เนื่องจากขาดเอนไซม์แลคเตส โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์เบตา-กาแลกโตซิเดส ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์แลคโตสให้เป็นกลูโคสและกาแลคโตสจากนั้นจึงนำกลูโคสมาใช้ผลิตกรดแลคติก

2.1.4 แหล่งของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกนั้นมีประโยชน์มากมายต่อสิ่งมีชีวิต แต่การที่จะได้มาซึ่งโพรไบโอติกที่ดี และมีประสิทธิภาพจะต้องมีการคัดเลือก และศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพ แหล่งที่มาของโพรไบโอติกเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ เนื่องจากโพรไบโอติกที่มาจากแหล่งที่ต่างกันมีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่แตกต่างกัน

1) มนุษย์ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มี 2 กลุ่ม ทั้งที่เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* และที่ให้โทษต่อร่างกาย เช่น *Clostridia* และ *Staphylococci* ซึ่งการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ถ้าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ให้โทษมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะทำให้ร่างกายเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง โดยปกติกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โพรไบโอติกที่พบในมนุษย์ส่วนใหญ่พบในบริเวณทางเดินอาหาร ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร แต่ละช่วงจะต่างชนิดกัน โดยบริเวณดูโอดินัมมีประมาณ 3-4 log CFU/g เจจูนัมมีประมาณ 5-7 log CFU/g ลำไส้เล็กส่วนปลายพบประมาณ 7-8 log CFU/g และในส่วนลำไส้ใหญ่จะมีจำนวนของจุลินทรีย์หนาแน่นสุดคือประมาณ 10-11 log CFU/g แต่ละบุคคลจะมีชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่างกันออกไปขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น วัย สุขภาพ วิถีชีวิต และรูปแบบการบริโภค เป็นต้น (นิรัญญา บุญติ้น, 2550

2) สัตว์ แบคทีเรียโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะพบมากในทางเดินอาหารของสัตว์เนื่องจากบริเวณนี้มีสภาวะที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดี (ฮาเสี๊ยะ อะยามา, 2557) สามารถแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล เช่น ปลา กุ้ง และปู รวม 20 ชนิด พบว่าแยกโพรไบโอติก ได้ 3 ชนิดคือ *Pediococcus pentosaceus* APa4, *Pediococcus pentosaceus* Ala 1 และ *Enterococcus aecium* ARa1 โดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้

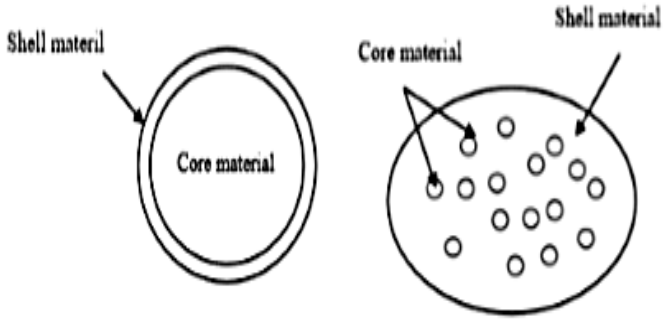
3) ผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเป็นแหล่งธรรมชาติของโพรไบโอติก ส่วนใหญ่พบมากในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต และนมดิบ Sieladie และคณะ (2011) ได้คัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากนมวัวดิบ 32 ตัวอย่างพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทนกรดพีเอช 2-3 และเกลือน้ำดีร้อยละ 0.2 และ 0.4 (w/v) ทั้งหมด 15 โอโซเลท นอกจากนมแล้วอาหารหมักถือได้ว่าเป็นแหล่งของโพรไบโอติกที่สำคัญ เช่นเดียวกัน อัจฉรา หนูเพชร (2546) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักจากพืชและสัตว์จำนวน 23 ชนิดพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 327 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้น พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโพรไบโอติกได้ 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Pediococcus pentosaceus* (LA6) , *Lactobacillus casei* (LA13) , *Lactobacillus plantarum* (LA71) , *Lactobacillus plantarum* (LA102) และ *Lactobacillus delbrueckii* (LA198) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้

2.2. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก (Microencapsulation)

แคปซูลขนาดเล็ก (Microencapsulation) คือ กระบวนการที่ของเหลวหรืออนุภาคถูกห่อหุ้มให้อยู่ในรูปของแคปซูลด้วยโพลิเมอร์เป็นชั้นบาง ๆ เกิดเป็นแคปซูลขนาดเล็กซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1 ไมครอน จนถึง 1,000 ไมครอน การห่อหุ้มเซลล์ เป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันแบคทีเรียโพรไบโอติก จากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย และเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยการห่อหุ้มหรือการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุตรึง สารที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมอัลจิเนต โซเดียมอัลจิเนต เป็นต้น

2.2.1 ส่วนประกอบของ Microencapsulation

แคปซูลจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนหลัก ๆ ดังแสดงในภาพที่ 5 ได้แก่ สาระสำคัญที่บรรจุอยู่ภายในแคปซูล ซึ่งเรียกว่า คอร์ (Core) และผนังที่ห่อหุ้มซึ่งอยู่รอบนอกสารสำคัญ เรียกว่า วอลล์ (Wall) หรือ เชลล์ (Shell) ส่วนของวอลล์นั้น อาจจะเป็นสารเพียงชนิดเดียวหรือประกอบด้วยสารหลายชนิดวัสดุพยุงที่นิยมนำมาห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกนั้นจะเป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น น้ำตาล โปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น

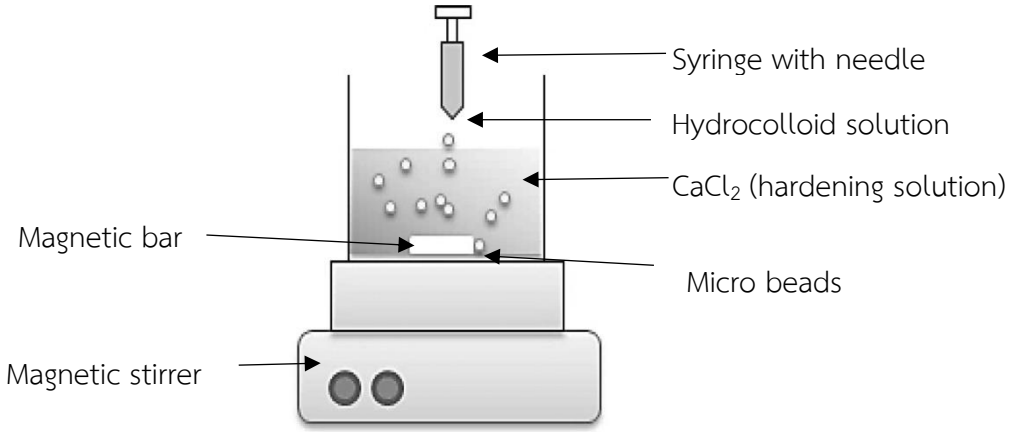


ภาพที่ 5 แสดงส่วนประกอบและรูปแบบของแคปซูลขนาดเล็กจาก Tecnology Promotion Mag. : Microencapsulation เทคโนโลยีจิ๋วแต่แจ๋ว (น. 40), โดย เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล, 2552, กรุงเทพฯ

2.2.2 เทคนิคการทำแคปซูลขนาดเล็ก

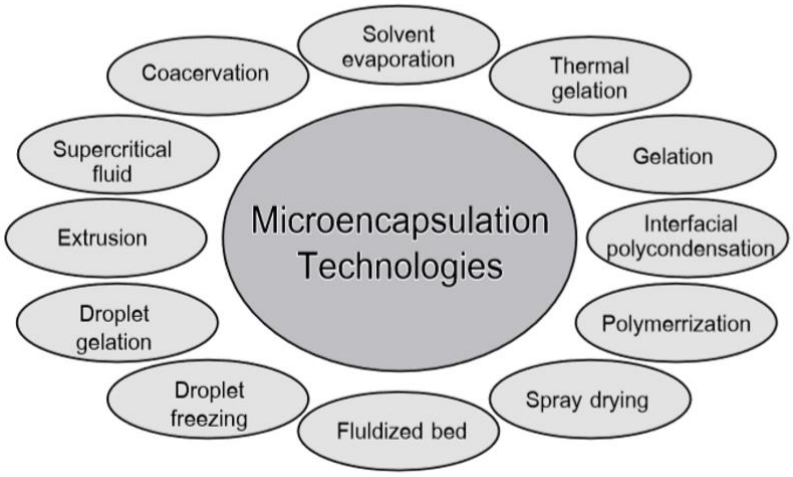
2.2.2.1 Extrusion technique (droplet method)

เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันโดยทั่วไป ในการทำเม็ดเจลด้วย hydrocolloid ทำได้โดยการเตรียมสารละลาย hydrocolloid เช่น อัลจิเนต คาราจีแนน เจราติน และเพคติน แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมให้เข้ากัน และใช้วิธีการปลดปล่อย suspension ขอองเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยดลงในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (hardening solution) เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ สารละลายแคลเซียมคลอรไรด์ ขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับเส้นผ่าศูนย์กลางของเข็มฉีดยา และความสูงของการหยด suspension ของเซลล์ลงใน hardening solution วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้รัยความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากกเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะไม่รุนแรงเซลล์แบคทีเรียจึงมีการรอดชีวิตได้สูง (จุฬาลักษณ์ ชูพรหม, 2553)



ภาพที่ 6 แสดงภาพการทำแคปซูลขนาดเล็กด้วยเทคนิค Extrusion technique
ที่มา : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074216304429

วิธีที่กล่าวมานั้นเป็นเพียงส่วนหนึ่งของเทคนิคในการผลิตแคปซูลขนาดเล็กยังมีเทคนิคอื่นอีกมากมาย ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารภายในแคปซูล และการนำไปใช้งาน ดังแสดงในภาพที่ 4

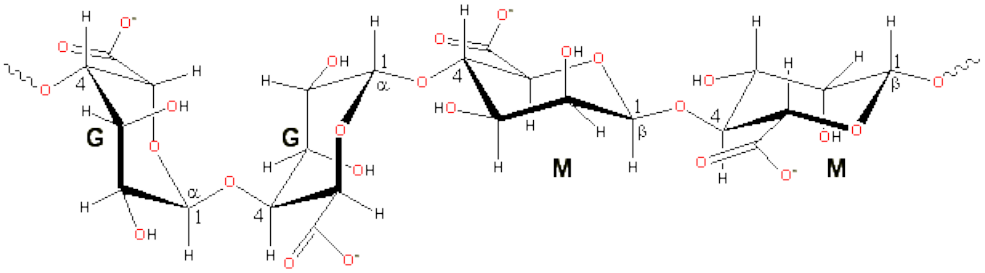


ภาพที่ 7 แสดงเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตแคปซูลขนาดเล็กจาก Tecnology Promotion Mag. : Microencapsulation เทคโนโลยีจิ๋วแต่แจ๋ว (น. 42), โดย เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล, 2552, กรุงเทพฯ

2.2.3 วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก

2.3.1 อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyceae) ประกอบด้วย β-D-แมนนูโรนิก และ α-L-กลูโคโรนิกแอซิด จำนวนและลำดับที่จัดเรียงในสายโพลิเมอร์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของอัลจิเนต จำนวนและลำดับเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นวัสดุพยุงของอัลจิเนต โดยอัลจิเนตจะละลายน้ำได้ดี ให้ความหนืดต่ำ ราคาไม่แพง และใช้ปริมาณน้อย แต่ฟิล์มที่ได้มักจะไม่ค่อยแข็งแรงจะต้องเสริมความแข็งแรงด้วยเกลือแคลเซียมทให้เกิดเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำโดยอัลจิเนตมีการใช้อย่างกว้างขวางในรูป โซเดียมอัลจิเนต แคลเซียมอัลจิเนต และโพแทสเซียมอัลจิเนต เป็นต้น แต่อัลจิเนตยังมีข้อเสีย คือ มีความไวต่อกรด ทำให้ไม่ทนกับสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร การขยายขนาดกระบวนการผลิตทำได้ยาก และเม็ดเจลที่ได้มีรูพรุนมากจึงมีผลเสียต่อการห่อหุ้มเซลล์ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการผสมอัลจิเนตเข้ากับสารประกอบโพลิเมอร์ หรือปรับโครงสร้างของอัลจิเนตโดยใช้สารเติมแต่งที่แตกต่างกัน

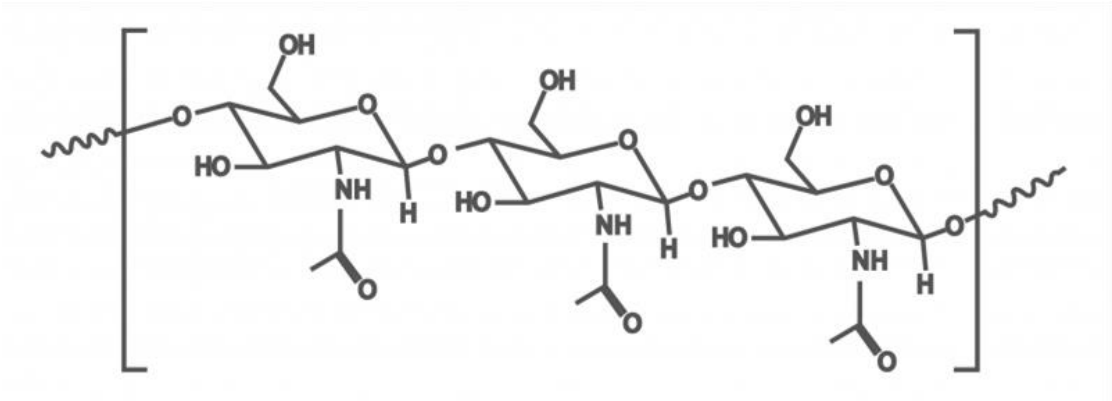


ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ Alginate

ที่มา : http://www1.lsbu.ac.uk/water/alginate.html

2.3.2 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ได้จากการดึงเอาหมู่อะซิทิล (Acetyl Group) ของไคตินออกไปโดยปฏิกิริยาที่เรียกว่า Deacetylation ทำให้โครงสร้างของไคตินที่เป็น N-Acetyl Glucosamine กลายเป็น Glucosamine ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ Active พร้อมจะทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน ในอุตสาหกรรมจะสกัดจากเปลือกกุ้ง, ปู, ปลาหมึก โดยผลิตอยู่ในรูปของผงไคโตซาน ไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของ น้ำตาล N-Acetyl-D-Glucosamineและ Glucosamine อยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่ Acetyl หรือเปอร์เซนต์การเกิด Deacetylation นี้มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซานซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายมีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเป็นต้น (สุธิดา คงทอง. 2552)

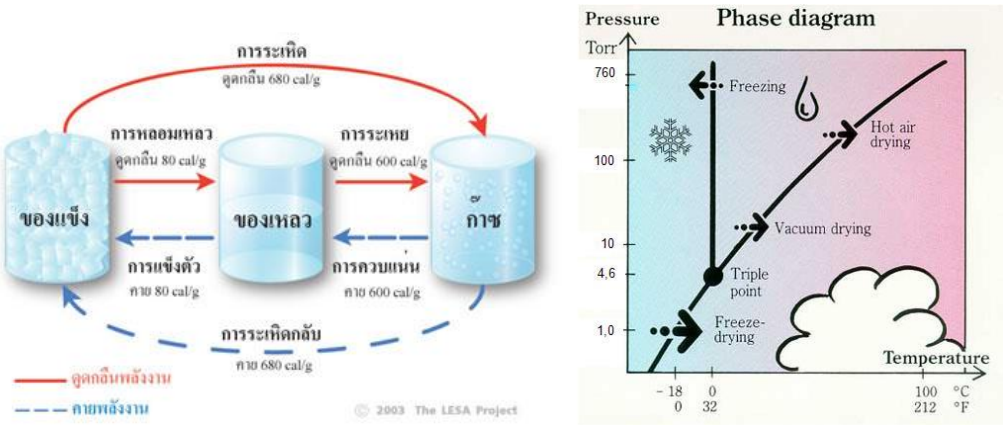


ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ Chitosan

ที่มา : Bannawach Bio-Lme Co.ltd.

2.3. การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying)

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration freeze dry หรือ lyophilization) หมายถึง การทำแห้ง (dehydration) ด้วยการแช่เยือกแข็ง (freezing) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (sublimation) น้ำออกจนแห้งในสภาพสุญญากาศ ขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิ เท่ากับ หรือ ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำแข็งระเหิดที่ความดัน เท่ากับ 4.7 มิลลิเมตรปรอทหรือต่ำกว่า มักนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทำให้แห้งแต่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูงและผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะไม่สูญเสียคุณสมบัติเดิมของศาลนั้น ๆ ลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรียทำให้น้ำหนักของผลิตภัณฑ์ลดลงแต่ปริมาตรไม่เปลี่ยนแปลงส่งผลให้สะดวกและประหยัดต่อการขนส่งนอกจากนี้ยังสามารถนำกลับมาละลายน้ำใหม่ (reconstitute) ได้ง่าย



ภาพที่ 10 แสดงการระเหิดของสาร

ที่มา : http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/การระเหิด

สำหรับกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1) การแช่เยือกแข็ง (freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (freezing point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) ควรเป็นการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกและผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบใช้ลมเย็นเป่า (air blast freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (cryogenic freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (immersion freezing) เป็นต้น

2) การทำแห้งขั้นต้น (primary drying) เป็นการลดปริมาณน้ำ (dehydration) โดยการระเหิด น้ำแข็งให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของสุญญากาศ (vacuum) ควรอยู่ต่ำกว่า 132 Pa และ 132 mPa ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (ice layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระเหิดไปเป็นไอ ทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (dry layer) จากนั้น เป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้ง ออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ระยะเวลาการระเหิด ขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

3) การทำแห้งขั้นที่สอง (secondary drying) เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นที่หลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพื่ออุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออกถึงระดับความชื้นที่ปลอดภัยสำหรับการเก็บรักษา

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในโพรไบโอติกนั้น เป็นวิธีการทำแห้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เชื้อมี shelf life นานขึ้น และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมกับ biological materials เนื่องจากเป็นการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำจึงลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีและลดการถูกทำลายด้วยความร้อน นอกจากนี้การทำให้แห้งยังทำง่าย และสะดวกต่อการขนส่งอีกด้วย

2.4. สารป้องกันความเย็น (Cryoprotectant)

สารป้องกันความเย็น เป็นวัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ห่อหุ้มจุลินทรีย์เพื่อป้องกันการบาดเจ็บ หรือการถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอกโดยช่วยลดค่าออสโมติก ที่แตกต่างกันระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมภายนอกได้และสารป้องกันความเย็นจะทำให้ผลิตน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กลงระหว่างกระบวนการแช่แข็งโดยขณะที่อุณหภูมิลดลงจนกระทั่งน้ำเริ่มเปลี่ยนสถานะกลายเป็นน้ำแข็งจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งจะได้รับผลกระทบและเกิดอาการ cold shock ซึ่งจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มีลักษณะเป็นรูพรุนที่ชอบน้ำ (hydrophilic pores) เป็นผลให้องค์ประกอบของเซลล์รั่วออกไปสู่ภายนอกเพิ่มการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอรวมทั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเพาะกับสภาวะของ cold shock ด้วย เมื่อน้ำเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งทั้งหมด จะทำให้จุลินทรีย์ตายและบาดเจ็บเพิ่มมากขึ้นน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในระยะแรกนั้นจะกลายเป็นน้ำแข็ง เคลือบอยู่ภายนอกเซลล์ต่อมาน้ำภายในเซลล์จะเกิดการแข็งตัวซึ่งจะมีผลทำลายเซลล์และเกิดแรงดันออสโมติกขึ้นภายนอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ขาดน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงไอออน และพีเอชขึ้นในเซลล์ส่วนที่เป็นน้ำโครงสร้างและหน้าที่ขององค์ประกอบภายในเซลล์และสารโมเลกุลใหญ่ถูกทำลายไปเป็นผลให้จุลินทรีย์ตาย นอกจากนี้สารป้องกันความเย็นยังทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ โดยการจับกับน้ำทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายลดลงเกิดการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในปริมาณต่ำช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับเซลล์สารป้องกันความเย็นมีด้วยกันหลายชนิดที่นิยมใช้ได้แก่ นมพร่องมันเนย แลคโตส กลีเซอรอล ซูโครส และกลูโคส เป็นต้น

2.4.1 สารป้องกันความเย็นที่ใช้สำหรับโพรไบโอติก

สารหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเย็นซึ่งสารเหล่านี้ต้องมีความสามารถในการซึมผ่านผนัง membrane และละลายน้ำได้ดี โดยในแต่ละโมเลกุลของสารป้องกันความเย็นจะสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ และมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ต่ำ สารที่มีคุณสมบัติข้างต้น ได้แก่ สารประเภทคาร์โบไฮเดรต พอลิออล หรือ พอลีแอลกอฮอล์ และกรดไฮโดรคลอริกโมโนคาร์บอกซิลิก

2.4.1.1 นมพร่องมันเนย (skim milk) เป็นนมที่ทำจากน้ำนมที่มีการแยกมันเนยออกเกือบหมดนิยมใช้ในการผลิตน้ำนมคืนรูป น้ำนมปรุงแต่ง น้ำนมแปลงไขมัน และผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ ดังนั้นจึงประกอบด้วยสารอาหารหลายอย่างทั้ง โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต สามารถจับกับ membrane ต่างๆ ได้ดีเพราะประกอบด้วยส่วนทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว นอกจากนี้นมพร่องมันเนยยังสามารถเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้

2.4.1.2 มอลโทเดรกซ์ทริน (Maltodextrin) คือ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ประเภท polysaccharide ที่ได้จากการย่อยโมเลกุลของแป้ง (starch) บางส่วนให้เป็นสายสั้นๆ ของน้ำตาลกลูโคส (glucose) วัตถุดิบที่ใช้เพื่อผลิตมอลโทเดกซ์ทรินคือ แป้ง (starch) จากพืชต่างๆ เช่น แป้งจากมันสำปะหลัง (tapioca starch) แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งมันฝรั่ง (potato starch) มีลักษณะเป็นผงหรือเกล็ดสีขาวไม่มีรส หรือมีรสหวานเล็กน้อยสามารถละลายในน้ำได้ดี มอลโทเดกซ์ทริน ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างขว้างขวาง ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ จัดเป็น Functional food ประเภท prebiotic เป็นอาหารสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก อาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน อาหารไขมันต่ำ ในผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง ประเภทอาหารผง เช่น เครื่องดื่มผง เครื่องปรุงรสชนิดผง

3. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ-อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก

Lactobacillus paracesei BCC 42359

2. สารป้องกันความเย็น

2.1 skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.2 maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 de man-Rogosa-Sharpe (MRS) Broth

3.2 de man-Rogosa-Sharpe (MRS) Agar

4. สารเคมี

4.1 Sodium chloride ความเข้มข้น 0.85 % (0.85 % NaCl)

4.2 Sodium alginate ความเข้มข้น 3 %

4.3 Calcium chloride ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M $CaCl_2$)

4.4 Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

4.5 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)

4.6 Hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M HCl)

4.7 Sodium hydroxide ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (1 M NaOH)

4.8 Bile salt

4.9 Pancreatin

4.10 Pepsin

4.11 Chitosan ความเข้มข้น 0.2 %

4.12 Acetic acid

5. อุปกรณ์

5.1 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

5.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)

5.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar flow)

5.4 ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 100, 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

5.5 ออโต้ปิเปตต์ (autopipette) ขนาด 100, 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

5.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

5.7 เมมเบรนฟิลเตอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5.8 เครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter)

5.9 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

5.10 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

5.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่างแบบตั้งโต๊ะ (pH meter)

5.12 เครื่องเขย่าให้อากาศ (shaker incubator)

5.13 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

5.14 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น freeze dryer 8 บริษัท labconco

5.15 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

5.16 เครื่องผสม (vortex mixer)

5.17 เข็มฉีดยาเบอร์ 25G × 1

5.18 จานเพาะเชื้อ (petri dish) 5.19 บีกเกอร์ (beaker)

5.20 หลอดทดลอง (test tube)

5.21 ห่วงเขี่ยเชื้อ (inoculating loop)

5.22 แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)

5.23 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ (microcentrifuge tube หรือ eppendrop)

5.24 หลอดเซนติฟิวจ์ (Centrifuge tube)

5.25 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

5.26 กระบอกตวง (cylinder)

5.27 ขวดแก้วดูแรน (duran bottle)

5.28 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)

5.29 เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. วิธีการเตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 จาก stock มาทำการ Re-streak ในอาหาร MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นแตะเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ถ่ายลงสู่อาหาร MRS broth 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงสู่อาหาร MRS broth 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเชื้อจุลินทรีย์ 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงสู่อาหาร MRS broth 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2. วิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ดูดเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่อยู่ใน MRS broth 100 มิลลิลิตร จากขั้นตอนที่ (1) ใส่ในหลอดเซนติฟิวจ์ หลอดละ 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส่ทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % จำนวน 2 ครั้ง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ผสมกับสารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ตัวควบคุม) โดยผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่เพลทปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ที่ความดันน้อยกว่า 132 Pa นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดให้เป็นผงแล้วเก็บรักษาไว้ในถุงซิปล็อค ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3. วิธีการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก และการเคลือบไคโตซาน

เตรียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 % (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น ชั่งผงเชื้อที่ได้จากขั้นตอนที่ (2) มา 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมกับอัลจิเนต 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ออโตปิเปตที่มีขนาดไมโครปิเปตทิป 1 มิลลิลิตร ดูดแล้วนำมาหยดลงในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่จะต้องกวนผสมตลอดเวลา โดยใช้ Magnetic bar บนเครื่อง Magnetic Stirrer เพื่อไม่ให้เม็ดบีดที่ได้ติดกัน เมื่อหยดเสร็จแช่เม็ดบีดทิ้งไว้ในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยไม่ต้องกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเม็ดบีดที่ได้ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

การเคลือบเม็ดบีดด้วยสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 0.2 % (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยชั่งเม็ดบีด 12 กรัม แช่ในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.2 % 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ นำไปเข้าตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ กำหนดความเร็วที่ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาล้างสารละลายไคโตซานโดยใช้สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % จำนวน 1 ครั้ง นำเม็ดบีดที่ได้ใส่ในถุงซิปล็อค เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4. วิธีการนับจำนวนเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359

3.2.4.1 วิธีการนับจำนวนเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ในกระบวนการก่อนและหลังการแช่แข็ง (freeze zing)

ดูดเชื้อที่ผสมกับสารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำกลั่น (ตัวควบคุม) ไปหาการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในกระบวนการก่อน และหลังการแช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส อย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการนับนวนเชื้อด้วยเทคนิคการ Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็นหน่วย CFU/g

3.2.4.2 วิธีการนับจำนวนผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ในหลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

นำเชื้อผงโพรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในขั้นตอนที่ 2 มาชั่ง 0.1 กรัม ละลายในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการนับจำนวนเชื้อด้วยเทคนิคการ Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็นหน่วย CFU/g

3.2.4.3 วิธีการนับจำนวนเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ในเม็ดบีด

นำเม็ดบีด 1 กรัม แช่ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) pH 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) ผสมจนกว่าสารจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการนับจำนวนเชื้อด้วยเทคนิคการ Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็นหน่วย CFU/g

3.2.5. วิธีการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ภายใต้สภาวะทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง

สภาวะของกรดในกระเพาะอาหารแบบจำลอง (ขั้นที่ 1) ที่ประกอบด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย HCl 1 M จนได้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ มาผสมเอนไซม์เปปซิน 0.3 % และฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำสภาวะจำลองที่ได้ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ต่อ เม็ดบีด 1 กรัม จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกรองเม็ดบีดออก นำไปแช่ต่อในสภาวะเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กแบบจำลอง (ขั้นที่ 2) ที่ประกอบด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วย NaOH 1 M จนได้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และนำมาเติม Bile salt 1 % และ เพนคลีเอติน 0.3 % จากนั้นนำไปกรองด้วยเมมเบรนฟิลเตอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสภาวะจำลองปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในเม็ดบีดที่ได้จากการ (ขั้นที่ 1) และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเม็ดบีดที่ได้ไปหาร้อยละการรอดชีวิตด้วยการนับจำนวนเชื้อดังวิธีการที่แสดงในข้อที่ 4.3 จากนั้นนำไปคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตตามสูตรด้านล่าง

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังผ่านสภาวะทางเดินอาหารจำลองแบบต่อเนื่อง (logCFU/g)}}{\text{จำนวนเซลล์เริ่มต้น (logCFU/}} \times 100$$

4. ผลการทดลอง

4.1. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ผ่านกระบวนการทำแหงแบบแชเยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน

จากการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้สารป้องกันความเย็น 2 ชนิด คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารป้องกันความเย็น โดยเปรียบเทียบจากการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 หลังผ่านกระบวนการต่างๆ ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยมีขั้นตอนเริ่มต้นจากการแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนถึงการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้เครื่อง freeze dryer ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ความดันน้อยกว่า 132 Pa นาน 8 ชั่วโมง ผลการทดลองภายหลังการแช่แข็งของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีการใช้สารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodetrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังเหลือรอดเท่ากับ 1.93×10^9 CFU/g และ 1.33×10^9 CFU/g ตามลำดับ และตัวอย่างควบคุมที่ไม่ใส่สารป้องกันความเย็น มีจำนวนการรอดชีวิตเท่ากับ 1.37×10^9 CFU/g ซึ่งไม่แตกต่างจากจำนวนเชื้อเริ่มต้น และในขั้นตอนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า สารป้องกันความเย็น คือ skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้เชื้อ *L.paracesei* BCC 42359 มีการรอดชีวิตได้ดีที่สุดเท่ากับ 6.51×10^9 CFU/g รองลงมาคือ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตคงเหลือเท่ากับ 4.70×10^9 CFU/g ซึ่งแตกต่างจากตัวควบคุมที่ไม่เติมสารป้องกันความเย็น มีการรอดชีวิตของเชื้อน้อยที่สุด 9.5×10^6 CFU/g ดังนั้น การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของเชื้อจำเป็นต้องมีสารป้องกันความเย็น เพื่อช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์จากผลึกน้ำแข็ง ลดการสูญเสียน้ำของเซลล์ และทำให้ผลการรอดชีวิตของเชื้อสูงขึ้นกว่าการไม่ใส่สารป้องกันความเย็น (ดังแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ผานกระบวนการทำแหงแบบแชเยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน

สารป้องกันความเย็น	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/g)		
	ก่อนการแช่แข็ง	หลังการแช่แข็ง	หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
น้ำกลั่น (ตัวควบคุม)	2.96×10^9	1.37×10^9	9.5×10^6
skim milk	2.29×10^9	1.93×10^9	6.51×10^9
maltodextrin	2.81×10^9	1.33×10^9	4.7×10^9

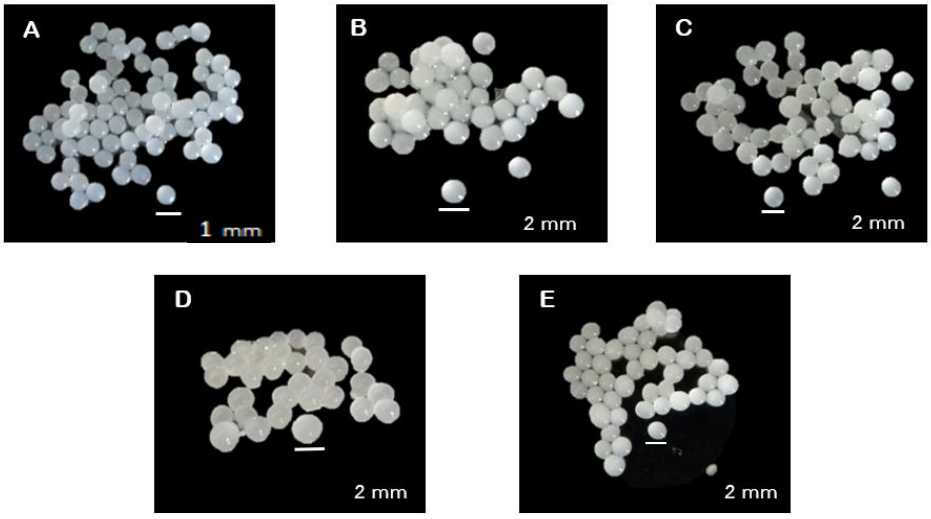
ภาพที่ 11 แสดงลักษณะของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสมกับสารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน ที่ได้จากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (A) ผง *L. paracesei* BCC 42359 ผสม skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (B) ผง *L. paracesei* BCC 42359 ผสม maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ (C) ผง *L. paracesei* BCC 42359 ผสมน้ำกลั่น (ตัวควบคุม)

4.2. ผลการศึกษาปริมาณผงเชื้อของ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต

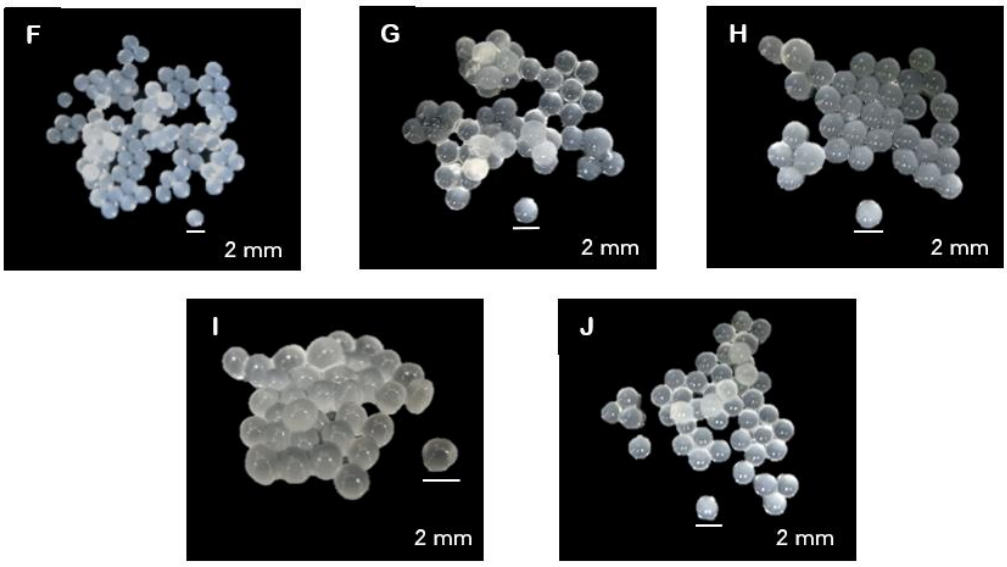
จากการศึกษาปริมาณผงเชื้อของ *L. paracesei* BCC 42359 โดยใช้ปริมาณผงเชื้อร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ผงเชื้อ *L. paracesei* BCC42359 ที่มีสารป้องกันความเย็น คือ skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 9.30×10^7 CFU/g ,7.10×10^7 CFU/g ,9.40×10^7 CFU/g ,1.54×10^8 CFU/g และ 2.61×10^8 CFU/g ตามลำดับ และผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีสารป้องกันความเย็น คือ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 1.25×10^7 CFU/g,4.75×10^7 CFU/g,7.90×10^7 CFU/g,1.09×10^8 CFU/g และ 2.02×10^8 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งพบว่า เชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านเกณฑ์กระทรวงสาธารณสุขที่ได้กำหนดไว้ คือ ผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมโพรไบโอติกลงไปจะต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษา และได้พิจารณาในด้านของคุณลักษณะทางกายภาพรูปร่าง สี กลิ่น ของเม็ดบีด ประกอบด้วย (ดังภาพที่ 8 และ 9) โดยจะคัดเลือกจากปริมาณผงเชื้อที่ทำให้รูปร่างของเม็ดบีดมีลักษณะที่ดี โดยภาพที่ 8 แสดงลักษณะภายนอกของเม็ดมีดที่มีปริมาณผงเชื้อผสมกับ skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในปริมาณต่างๆ เมื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อผงมากขึ้น จะส่งผลให้สีของเม็ดบีดมีสีขุ่นขึ้น แต่ยังคงลักษณะทรงกลมของเม็ดบีดได้ดี และการเพิ่มปริมาณของผงเชื้อ ไม่ได้ส่งผลต่อกลิ่น และภาพที่ 9 แสดงลักษณะภายนอกของเม็ดบีด ที่มีปริมาณผงเชื้อผสมกับ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในปริมาณต่างๆ เมื่อเพิ่มปริมาณของผงเชื้อมากขึ้น เม็ดบีดที่ได้ยังคงใส คงรูปร่างได้ดี และไม่ได้ส่งผลต่อกลิ่น ดังนั้น ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ใช้สารป้องกันความเย็นคือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในปริมาณผงเชื้อร้อยละ 0.5 เนื่องจากต้องการให้เชื้อมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากกว่า 10^6 CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษา และได้พิจารณาจากคุณลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดที่ดี

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณผงเชื้อของ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต

สารป้องกันความเย็น	ร้อยละปริมาณเชื้อผง	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/g)
skim milk	0.1	9.30×10^7
	0.2	7.10×10^7
	0.3	9.40×10^7
	0.4	1.54×10^8
	0.5	2.61×10^8
maltodextrin	0.1	1.25×10^7
	0.2	4.75×10^7
	0.3	7.90×10^7
	0.4	1.09×10^8
	0.5	2.02×10^8



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะเม็ดบีดผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสม skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 % (A) ร้อยละ 0.1, (B) ร้อยละ 0.2, (C) ร้อยละ 0.3, (D) ร้อยละ 0.4 และ (E) ร้อยละ 0.5



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะเม็ดบีดของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ผสม maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 % (F) ร้อยละ 0.1, (G) ร้อยละ 0.2, (H) ร้อยละ 0.3, (I) ร้อยละ 0.4 และ (J) ร้อยละ 0.5

4.3. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเม็ดบีดที่ห่อหุ้มเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีสารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามีจำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนการเข้าสู่สภาวะทางเดินอาหารจำลองเท่ากับ 8.02 logCFU/g และ 7.87 logCFU/g ตามลำดับ เมื่อนำเม็ดบีดมาทดสอบภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง ได้แก่ ผ่านกรดในกระเพาะอาหารจำลองเปปซิน (pH 2) และผ่านเกลือน้ำดีในลำไส้จำลองเกลือน้ำดีและแพนครีเอติน (pH8) พบว่า เม็ดบีดที่ห่อหุ้มเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีสารป้องกันความเย็น คือ skim milk และ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีจำนวนเชื้อลดลงคงเหลือเท่ากับ 5.67 logCFU/g และ 2.00 logCFU/g โดยคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 70.69 และ 25.41 ตามลำดับ สรุปได้ว่า การใช้สารป้องกันความเย็น คือ skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้เชื้อโพรไบโอติกมีอัตราการเหลือรอดมากกว่าการใช้ maltidextrin ดังแสดงในตารางที่ 4

สารป้องกันความเย็น	**จำนวนเชื้อเริ่มต้น (logCFU/g)**	**จำนวนเชื้อหลังผ่านสภาวะทางเดินอาหารจำลอง (logCFU/g)**	**ร้อยละการรอดชีวิต**
skim milk	8.02	5.67	70.69
maltodextrin	7.87	2.00	25.41

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ภายใต้สภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาการรอดชีวิตด้วยวิธีการทำไมโครเอนแคปซูเลชันของผงเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 ที่มีสารป้องกันความเย็นแตกต่างกัน เม็ดบีดที่ได้มีขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร และการใช้สารป้องกันความเย็นในการทำแห้งของเชื้อ *L. paracesei* BCC 42359 เพื่อช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์จากผลึกน้ำแข็ง ลดการสูญเสียน้ำของเซลล์ สามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าการไม่ใส่สารป้องกันความเย็น ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ M. Jalali และคณะ ได้ศึกษาผลของสารป้องกันความเย็นที่แตกต่างกัน ที่ประกอบด้วยนมพร่องมันเนย, ทรีฮาโลสและโซเดียมแอสคอร์เบตต่ออัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการอบแห้งด้วยความเย็นต่อเชื้อ *L. paracasei* subsp. และ *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* ในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เชื้อที่ไม่ใส่สารป้องกันความเย็น มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 2-3 % และลดลงอย่างต่อเนื่อง และการเติมสารป้องกันความเย็นช่วยให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดได้ถึง 20 % มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracesei* BCC 42359 ที่ผานกระบวนการทำแห่งแบบแช่เยือกแข็งโดยเปรียบเทียบสารป้องกันความเย็นที่ต่างกัน พบว่าสารป้องกันความเย็น คือ skim milk ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้เชื้อ *L.paracesei* BCC 42359 มีการรอดชีวิตได้ดีที่สุดเท่ากับ 6.51 X 10^9 CFU/g รองลงมาคือ maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baokun Li และคณะ ได้ศึกษาผลของสารป้องกันความเย็น คือ ซูโครส 15% (w/v), trehalose 5 % (w/v), trehalose 10 % (w/v) และ skim milk 10 % (w/v) ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อโพรไบโอติกก พบว่า สารป้องกันความเย็นที่มีการป้องกันที่ดีที่สุดนั้นคือ skim milk 10 % และ Trehalose 10 % ซึ่งทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด

บทที่ 3

งานอื่นๆ ที่ได้ปฏิบัติ

1. การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้วิธีไมโครเอนแคปซูเลชันสำหรับการเติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

โดยการนำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมาทำการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตให้มีลักษณะเป็นเม็ดแคปซูล นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาผสมกับอัลจิเนต 3 % ใช้ออโตปิเปตที่มีขนาดไมโครปิเปตทิป 1 มิลลิลิตร ดูดแล้วนำมาหยดลงใน $CaCl_2$ 0.1 M ที่จะต้องกวนผสมตลอดเวลาโดย Magnetic bar เพื่อไม่ให้เม็ดแคปซูลที่ได้ติดกัน เมื่อหยดเสร็จทิ้งเม็ดแคปซูลไว้ในสารละลาย $CaCl_2$ 0.1 M โดยไม่กวนนาน 30 นาที จากนั้นล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และทำการเคลือบเม็ดแคปซูลโดยชั่งเม็ดแคปซูล 12 กรัม แช่ในสารละลายไคโตซาน 0.2 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ นำไปเข้าเครื่องเขย่าให้อากาศที่ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลาล้างออกด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % จำนวน 1 ครั้ง นำแคปซูลขนาดเล็กที่ได้ไปเก็บในถุงซิปล็อค เพื่อใช้ในการเติมลงในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

ภาพที่ 14 การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกโดยใช้วิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน

2. การทำแบบประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมโพรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีการเสริมโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชันที่นำมาทำการทดสอบชิมทางประสาทสัมผัส ได้แก่ นมเปรี้ยว, นมรสจืด, น้ำสับปะรดเสาวรส และน้ำอัญชันใบเตย โดยมีการเติมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ คือ จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ห่อหุ้มเป็นลักษณะเม็ดบีดลงไปในผลิตภัณฑ์ ซึ่งโปรไบโอติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตและนำมาใช้เป็นอาหารในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีบทบาทในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยทำการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ซึ่งมีผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ใช้เกณฑ์การให้คะแนนความชอบ 1-9 คะแนน จาก คะแนน 1 คะแนน (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 คะแนน (ชอบมากที่สุด) โดยพิจารณาจาก ลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส รวมถึงความชอบโดยรวม เพื่อเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีคะแนนความชอบโดยรวมที่ดีที่สุด

ภาพที่ 15 การทำแบบประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติก

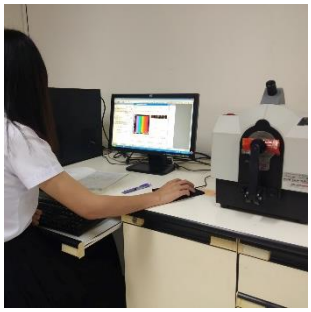
3. การตรวจวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ซอสพริก

โดยเปรียบเทียบระหว่างซอสพริกปกติ และซอสพริกทดลอง โดยทำการวัดค่าสี ค่าความชื้น วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และการไทเทรตหาปริมาณเปอร์เซนต์กรดทั้งหมดเทียบกับกรดอะซิติก และส่งผลิตภัณฑ์ซอสพริกตรวจที่ศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร เพื่อให้ได้มาตรฐานของอาหาร

ภาพที่ 16 การตรวจวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ซอสพริก

การวิเคราะห์ทางกายภาพ ประกอบด้วย

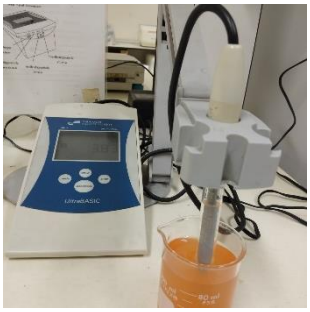
การวัดค่าสี



การวัดค่าความชื้น

การวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย

- การวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง



- การไทเทรตหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดเทียบกับกรดอะซิตริก

ไทเทรตตัวอย่างซอสพริกคือตัวอย่างปกติ และตัวอย่างทดลอง เพื่อหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดเทียบกับกรดอะซิตริก ด้วย 0.1 N NaOH ซึ่งต้องชั่งตัวอย่างซอสพริกแต่ละตัวอย่างลงในขวดรูปชมพู่ 3 g จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 ml แล้วหยด 0.1 % Phenolphthalein 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน และนำมาไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH ที่เตรียมไว้ไทเทรตจนถึงจุดยุติ และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด เทียบกับกรดอะซิตริกตามสูตรดังต่อไปนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

M_1 = ความเข้มข้นของกรดอะซิตริก

V_1 = ปริมาตรของน้ าผลไม้

M_2 = ความเข้มข้นของ NaOH

V_2 = ปริมาตร NaOH

ตัวอย่าง ซอสพริกสูตรทดลอง ไทเทรตโดยใช้ปริมาตร 0.1 N NaOH 5.3 มิลลิลิตร และน้ำผลไม้หนัก 3.03 กรัม

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$$M_1 = \frac{M_2V_2}{V_1}$$

$$= \frac{0.1x5.3}{3.03}$$

$$= 0.175$$

หาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดเทียบกับกรดอะซิตริก

$$mol = \frac{g}{MW} \times \frac{CV}{1000}$$

$$g = \frac{mol \times MW \times CV}{1000}$$

$$= \frac{M \times 60.052 \times 100}{1000}$$

$$= \frac{0.175 \times 60.052 \times 100}{1000}$$

$$= 1.12\ \%$$

4. การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ขนมปังอบกรอบ

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ขนมปังอบกรอบของผู้ประกอบการ โดยมี 3 รสชาติ คือ ขนมปังอบกรอบรสสตอเบอรี่ชีสเค้ก , ขนมปังอบกรอบรสมะพร้าวใบเตย และขนมปังอบกรอบรสกล้วยหอมคาราเมล ซึ่งทำการตรวจวัดค่าความชื้นโดยใช้เครื่อง Lab-Masters-aw ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ซึ่งมีผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ใช้เกณฑ์การให้คะแนนตามลำดับความชอบในช่วง 1-9 ที่มีผลต่อ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

ภาพที่ 17 การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ขนมปังอบกรอบ

5. การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากผักกุ่มดองที่ทดสอบในสภาวะกรดและสภาวะเกลือน้ำดี

โดยทดสอบเชื้อทั้งหมด 5 ชนิด แต่ละชนิดจะถูกแช่ในสภาวะของกระเพาะอาหารแบบจำลอง ที่ประกอบด้วย Phosphate buffer saline pH เท่ากับ 2 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ มาผสมเอนไซม์เปปซิน 0.3 % กรองฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนในสภาวะของลำไส้เล็กแบบจำลอง ที่ประกอบด้วย Phosphate buffer saline pH เท่ากับ 8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อและนำมาเติม Bile salt 1 % และ เพนคลีเอติน 0.3 % กรองฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ จากนั้นนำสารที่ได้มา 9 มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินานเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาจากทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทำการนับเชื้อด้วยเทคนิคการ Spread plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น log CFU/g

6. จัดกิจกรรมโชว์ผลิตภัณฑ์ของสถาบันในงานแถลงข่าว เปิดงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2563 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมภายใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นประธานแถลงข่าวการจัดงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2563 ภายใต้แนวคิด “นวัตกรรมใหม่ เพื่อเกษตรไทยยั่งยืน” ระหว่างวันที่ 31 ม.ค.–8 ก.พ. 2563 ณ บริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางการเกษตร ผลงานนวัตกรรม งานวิจัยใหม่ ๆ 97 ผลงาน 10 กลุ่มสู่เกษตรกร และประชาชน รวมทั้งนิสิตและอาจารย์ได้นำหลักวิชาการในห้องเรียน มาใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานนอกห้องเรียนด้วย ณ ห้องประชุมกำพลอดุลวิทย์ อาคารสารนิเทศ 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน โดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้เข้าร่วมโชว์ผลิตภัณฑ์ ในฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์ เช่น การผลิตน้ำส้มสายชู, วุ้นสวรรค์, ซอสปรุงรส จากน้ำหางกะทิ

ภาพที่ 18 จัดแสดงผลิตภัณฑ์ของสถาบันในงานแถลงข่าว เปิดงานเกษตรแฟร์ ประจำปี 2563 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. จัดกิจกรรมทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรประเภท : ผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปอบแห้ง (มะม่วงอบแห้ง) ในงานเกษตรแฟร์ ณ อาคารจักรพันธ์เพ็ญศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จัดกิจกรรมทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปอบแห้ง (มะม่วงอบแห้ง) ในงานเกษตรแฟร์ จัดขึ้นเมื่อวันที่ 3 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จัดกิจกรรมดีๆ ในงานเกษตรแฟร์ เปิดให้ผู้ชมงานมาทดสอบความชอบ ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร ประเภทอาหาร : ผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปอบแห้ง : มะม่วง ณ อาคารจักรเพ็ญศิริ เพื่อสนับสนุน ส่งเสริมผู้ประกอบการขนาดเล็กหรือวิสาหกิจชุมชนประเภทอาหารที่ผลิตภัณฑ์อาหารได้มาตรฐานการผลิตมีคุณภาพและมีความปลอดภัยตามเกณฑ์มาตรฐาน จากผู้ประกอบการส่งมา 24 ตัวอย่างผ่านเกณฑ์ 5 ตัวอย่าง โดยผู้ทดสอบความชอบ จำนวน 100 คน ผู้ประกอบการที่ผ่านเกณฑ์ประเภทดีเด่น ดี และชมเชยจะได้รับเงินรางวัลและใบประกาศนียบัตร ในวันที่ 7 ก.พ.เวลา 11.00 น. ณ อาคารจักรพันธ์

ภาพที่ 19 จัดกิจกรรมทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์ในโครงการคัดเลือกผู้ประกอบการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตรประเภท : ผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปอบแห้ง (มะม่วงอบแห้ง)

บทที่ 4
สรุปผลการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงาน ณ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ในฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์ ส่งผลให้เกิดประโยชน์ในหลายๆ ด้านดังนี้

1. ด้านทฤษฎีและการปฏิบัติงาน

ด้านทฤษฎี

- ได้ความรู้จากการวางแผนการปฏิบัติงาน เพื่อให้เกิดความคล่องแคล่ว ว่องไว สามารถลดข้อผิดพลาดของการปฏิบัติงานได้
- ได้ศึกษาความรู้ในเรื่องของ การทำไมโครเอนแคปซูเลชัน การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ด้านปฏิบัติงาน

- ได้รับความรู้ใหม่ และประสบการณ์ ทักษะและเทคนิคใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้น ในสภาวะการปฏิบัติงานจริง
- ฝึกฝนให้เป็นคนช่างสังเกตและรู้จักปรับปรุงการพัฒนาการทำงานของตน
- ได้ทำการวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ การไทเทรต การวัดความเป็นกรดด่าง
- ได้ใช้เครื่องมือใหม่ๆ เช่น เครื่องวัดสี เครื่องวัดความชื้น เครื่องวัดปริมาณน้ำตาล และเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

2. ด้านสังคมและสิ่งแวดล้อม

- ได้เรียนรู้การทำงานร่วมกับผู้อื่น วัฒนธรรมขององค์กรที่ทำงาน
- ได้เรียนรู้สิ่งใหม่ๆ จากการฝึกงานมากมาย
- ได้มีโอกาสรู้จักผู้คนมากขึ้น และได้มิตรภาพที่ดีกับผู้ร่วมงาน
- มีมนุษย์สัมพันธ์ที่ดีมากขึ้น และฝึกฝนการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในการทำงาน

3. ด้านบุคลิกภาพ

- พัฒนาบุคลิกภาพ ช่วยสร้างความมั่นใจในการทำงาน การกล้าแสดงออก และการแสดงความคิดเห็นมากขึ้น

- สร้างเสริมการมีบุคลิกภาพที่ดี และการวางตัวที่เหมาะสม

- สร้างเสริมลักษณะนิสัยให้เป็นคนตรงต่อเวลามากยิ่งขึ้น

การฝึกงานในครั้งนี้ทำให้ประประโยชน์กับเรามาก ทำให้เรามีความรับผิดชอบต่อ หน้าที่ที่ได้รับมอบหมาย ตรงต่อเวลา มีระเบียบวินัย และสามารถนำประสบการณ์นี้ไปใช้ได้กับทุกสถานที่ทำงาน เพื่อเป็นแบบอย่างในการทำงานที่ดีอีกด้วย

บทที่ 5
ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. ปัญหา

จากการปฏิบัติงานในสถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหารนั้น มีอุปกรณ์และเครื่องมือเครื่องใช้ที่ใหม่ การใช้งานจึงเกิดข้อผิดพลาดเล็กน้อย และมีเจ้าหน้าที่คอยดูแลเพื่อป้องกันการเกิดอันตราย และได้มีการใช้เครื่องมืออย่างระมัดระวังมากขึ้น นอกเหนือจากนั้นการฝึกงานที่ผ่านมาราบรื่นดี เพราะมีการแบ่งหน้าที่ที่ได้รับผิดชอบ และมีการวางแผนก่อนการปฏิบัติงานทุกครั้ง เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาในการปฏิบัติงาน

2. ข้อเสนอแนะ

จากการปฏิบัติงานในสถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหารนั้น นักศึกษาอยากให้มีการแนะนำการปฏิบัติงานในด้านต่างๆ แขนงต่างๆ เพิ่มเติม การใช้เครื่องมือที่ไม่เคยใช้ เพื่อนำไปปรับใช้ในการทำงานในอนาคตได้

บรรณานุกรม

Baokun Li, Fengwei Tian, Xiaoming Liu, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Wei Chen. 2553. Effects of cryoprotectants on viability of Lactobacillus reuteri CICC 6226. Biology, Medicine

He Chen, Mengqi Tian, Li Chen, Xiuxiu Cui, Jiangpeng Meng & Guowei Shu. 2561. Optimization of composite cryoprotectant for freeze-drying *Bifidobacterium bifidum* BB01 by response surface methodology. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal.

J.Bardosa P. , Teixeira s. ,Borges, M.Amorim, M.J.Pereira, A. Oliveira, M.E.Pintado. 2557. Conparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. Journsl of Functional Foods.

Sang Hoon Kim, Haeun Gye, Ju Kyoung Oh, In-Chan Hwang, and Dae-Kyung Kang. 2561. Protective Effect of Cryoprotectants on the Viability of Freeze- Dried *Lactobacillus fermentum* SK152. J. Milk Sci. Biotechnol. 2019;37(3):206-212.

Stefanello, Nabeshima, Iamanaka, Ludwig, Martins Fries, Bernardi, Copetti. 2561. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. Food Research International 115, 90-94, 2019

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS (de Man–Rogosa-Sharpe)

Dextrose	20 g
Proteose peptone	10 g
Beef extract	10 g
Sodium acetate	5 g
Yeast extracts	5 g
Dipotassium phosphate	2 g
Tween 80	1 g
Ammonium citrate	2 g
Magnesium sulfate	0.10 g
Manganese sulfate	0.05 g
Distilled water	1,000 ml

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55 กรัม ละลายกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 17 กรัม ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) pH 2 และ pH 8

$Na_2 HPO_4$ (สาร A)	7.098 g	ในน้ำกลั่น	1,000 ml
$NaH_2PO_4 .H_2O$ (สารB)	6.899 g	ในน้ำกลั่น	1,000 ml

นำสาร A และ สาร B ที่ได้ผสมกัน โดย เติมสาร A ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับ สาร B ปริมาตร 46 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชให้ได้ PBS pH 2 ด้วย 1M HCl และ PBS pH 8 เติม สาร A ปริมาตร 47.36 มิลลิลิตร ผสมกับสาร B ปริมาตร 2.65 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชให้ได้ pH 8 ด้วย 1M NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายไคโตซาน (Chitosan)

ชั่งไคโตซาน 0.2 % แบบหยาบ โดยชั่งมา 1 กรัม : น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยจะละลายในไคโตซาน 250 มิลลิลิตร ใส่กรดอะซิติก 6 มิลลิลิตร กวนด้วย Menetic bar จนละลาย แล้วปรับ pH ด้วย NaOH 1 M ให้ได้ pH ประมาณ 5.7-6.0 จากนั้นทำการเติมน้ำและปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. การเตรียมโซเดียมอัลจิเนต

เตรียมโซเดียมอัลจิเนต ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และละลายด้วย เครื่อง Magnetic stirrer จนละลาย จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

5. การเตรียมสารป้องกันความเย็น

เตรียม Skimm milk และ Maltodextrin ร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

6. การเตรียมสารในสภาวะทางเดินอาหารแบบจำลอง

6.1 สภาวะในกระเพาะอาหารแบบจำลอง

ส่วนประกอบ

PBS pH 2 100 มิลลิลิตร

เปปซิน 0.3 กรัม

6.2 สภาวะในลำไส้เล็กแบบจำลอง

ส่วนประกอบ

PBS pH 8 100 มิลลิลิตร

เกลือน้ำดี 1 กรัม

แพนคลีเอติน 0.3 กรัม

วิธีการเตรียม

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 2 และ pH 8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที พร้อมกับการฆ่าเชื้อขวดเปล่า จากนั้นนำสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 2 มาละลายเปปซิน และนำสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ pH 8 มาละลายเพนคลีเอติน และเกลือน้ำดี นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน ฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวดปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้

7. สารที่ใช้ละลายเม็ดมีด

$Na_2 HPO_4$ (สาร A)	7.098 g	ในน้ำกลั่น	1,000 ml
$NaH_2PO_4 .H_2O$ (สารB)	6.899 g	ในน้ำกลั่น	1,000 ml

วิธีการเตรียม

การเตรียม PBS pH 7 โดยเติมสาร A ปริมาตร 30.50 มิลลิลิตร ผสมกับ สาร B ปริมาตร 19.50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชให้ได้ PBS pH 7 ด้วย 1M NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

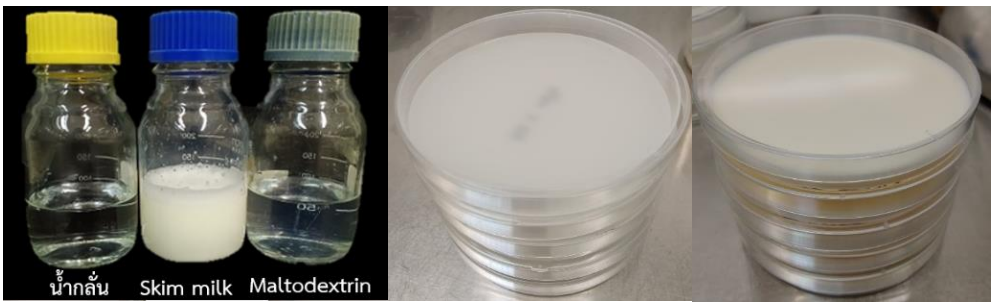
วิธีการเตรียมการทำแบบแช่เยือกแข็ง

1. วิธีการเตรียมการทำแบบแช่เยือกแข็ง

1.1 การเตรียมเชื้อ *L. paracesei* BCC42359 ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำเชื้อ *L. paracesei* BCC42359 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth 100 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหลอดละ 25 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ตะกอนเซลล์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างออกด้วย NaCl 0.85 % 2 ครั้ง

เมื่อได้ตะกอนเซลล์ นำมาผสมกับสารป้องกันความเย็นและน้ำกลั่น (ตัวควบคุม) โดยทำการ Vortex ให้เข้ากัน นำใส่ plate เพื่อนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



เมื่อครบเวลา นำไปเข้าเครื่อง freeze dryer รุ่น 8 ยี่ห้อ labconco® อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ความดันน้อยกว่า 132 Pa นาน 8 ชั่วโมง

จากนั้นใช้ช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบดให้เป็นผง แล้วทำการเก็บในถุงซิบล็อก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส