

การเตรียมไมโครแคปซูลของแคลเซียมอัลจินเตเคลือบด้วย เจลาติน และ คัปปาคาราจีแนน
เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในน้ำมะเข็ญ

Cleistocalyx nervosum var. *paniala*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF MICROENCAPSULATED CALCIUM ALGINATE COATED WITH
GELATIN AND KAPPA CARRAGEENAN TO INCREASE SURVIVAL OF POTENTIAL
PROBIOTIC BACTERIA IN MAKIANG JUICE *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Common Course

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมไมโครแคปซูลของแคลเซียมอัลจินตเคลือบด้วย เจลาติน และ คีปาการาจีแนนเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในน้ำมะเขีง <i>Cleistocalyx nervosum</i> var. <i>paniala</i>
โดย	น.ส.ภัสริน หัตถยาภิชาติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันท์ประทีป นภทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

ภัสริน ทัญยาภิชาติ : การเตรียมไมโครแคปซูลของแคลเซียมอัลจิเนตเคลือบด้วย เจลาติน และ คัปปาคาราจีแนนเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในน้ำมะเกี๋ย *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*. (PREPARATION OF MICROENCAPSULATED CALCIUM ALGINATE COATED WITH GELATIN AND KAPPA CARRAGEENAN TO INCREASE SURVIVAL OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IN MAKIANG JUICE *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.สุเมธ ดันตระเจียร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ศึกษาการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในน้ำมะเกี๋ย *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* ที่มีกรด และ ฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับตัว (Adaptation) ในเมี่ยงหมัก *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *assamica*. ที่มีสภาวะ ฟีนอลิกสูง และ มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก ซึ่งสามารถคัดแยกได้ 6 ไอโซเลท เมื่อนำมาเพิ่มจำนวน ยีนส์เป้าหมายด้วย 16S ribosomal RNA และ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคล้ายคลึงกับแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีความคล้ายคลึงที่ 98-100% ซึ่งทำการศึกษา การลดลงของเซลล์ที่มีชีวิต ในน้ำมะเกี๋ย ของแบคทีเรียที่เป็นเซลล์อิสระ 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย *L. plantarum* MF ที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก และ กลุ่ม *Lactobacillus* sp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่าในเวลา 24 ชั่วโมง *L. plantarum* MF 105 มีอัตราการลดลงของเชื้อ 20.10% ซึ่ง แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* TISTR 2074 มีอัตราการลดลงของเชื้อ 61.41% จึงนำมาศึกษาการยืดอายุโดยการห่อหุ้มในไมโครแคปซูล โดยเตรียมไมโครแคปซูล ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 2% อัลจิเนตบีด (2% AI) 2% อัลจิเนตบีดเคลือบด้วยเจลาตินชั้นเดียว (ACG) 2% อัลจิเนตบีดเคลือบด้วยเจลาตินชั้นคู่ (ACGD) 2% อัลจิเนตบีดเคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนนชั้นเดียว (ACC) และ 2% อัลจิเนตบีดเคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนนชั้นคู่ (ACCD) จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพ และ ทางเคมี ของเม็ดบีด ที่ไม่ได้เติมเชื้อโปรไบโอติก ในน้ำมะเกี๋ย ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน โดยพบว่า เม็ดบีดทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณแอนโธไซยานินที่แทรกซึมเข้าเม็ดบีดในเวลา 15-40 นาที ซึ่งเม็ดบีดชนิด ACGD มีปริมาณแอนโธไซยานินที่แทรกซึมเข้าเม็ดบีดได้ในปริมาณที่ คงที่ 4.36 ± 0.59 mg/g ซึ่ง มีปริมาณที่น้อยกว่า เม็ดบีด ชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) แต่ เม็ดบีดทั้ง 5 ชนิด จะมีการเปลี่ยนแปลง ของค่า pH จนมีค่าคงที่ในวันที่ 2-3 และ ในขณะที่เดียวกัน ขนาด ความแข็ง ยังมีค่าที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05) ซึ่งค่าสี (L*, a*, b*) ของเม็ดบีดที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงจากตัวอย่างควบคุม ที่มีสีแดงของแอนโธไซยานินในน้ำมะเกี๋ยเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อทำการแช่เม็ดบีดทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ซึ่ง ส่งผลต่อลักษณะการเกิดรูพรุนของพื้นผิวเม็ดบีดที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดบีด ของพันธะ mannuronic unit ซึ่ง เป็นโครงสร้างที่สำคัญของอัลจิเนตบีด ซึ่ง ACGD และ ACCD ยังคงรักษาคุณสมบัติลักษณะทางกายภาพ และ ทางเคมีของเม็ดบีด ได้มากกว่าเม็ดบีดชนิดอื่นๆ ให้มีความสามารถคงทนได้ในสภาวะน้ำมะเกี๋ยที่มี กรด และ ฟีนอลิก เป็นองค์ประกอบ ระหว่างเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน และ พบว่า ACGD ยังมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* MF 105 และ แบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 2074 ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาที่ 5 วัน และ 2 วัน ตามลำดับ และ ยังพบว่า ฟีนอลิกที่มีอัตราการแทรกซึมเข้าเม็ดบีดได้อย่างรวดเร็วกว่าการแทรกซึมของกรด ดังนั้น โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครบีด เซลล์จะได้รับผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตจากฟีนอลิกในน้ำมะเกี๋ยก่อนได้รับผลกระทบจากกรด

สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6072175723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Alginate, Microencapsulation, *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*, Probiotic, Gelatin, Kappa-carrageenan

Passarin Hattayapichat : PREPARATION OF MICROENCAPSULATED CALCIUM ALGINATE COATED WITH GELATIN AND KAPPA CARRAGEENAN TO INCREASE SURVIVAL OF POTENTIAL PROBIOTIC BACTERIA IN MAKIANG JUICE *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*. Advisor: Assoc. Prof. Sumate Tantratian, Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. Paramaporn Kerdsap, Ph.D.

The aim of this study was to improve survival potential probiotic bacteria in making juice *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*, which has high acidic and phenolic compounds concentration. The screening of potential probiotic bacteria from miang, fermented tea leaves *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *assamica*, which contained high phenolic compounds revealed 6 isolates of LAB-MF. These isolates were identified with 16s rRNA sequencing and found similarity to the strain of *Lactobacillus plantarum* in GenBank database with 98-100%. The reduction of viability of the isolates *L. plantarum* MF and 6 probiotic *Lactobacillus* sp. in making juice for 24 h was indicated that among the isolates *L. plantarum* MF 105 showed least reduction of 20.10% while among known probiotic bacteria *L. plantarum* TISTR 2074 showed least reduction of 61.41%. These bacteria were encapsulated with 5 types of microcapsules which were 2% alginate bead (2%Al), 2% alginate bead coated with single layer gelatin (ACG), 2% alginate bead coated with double layer gelatin (ACGD), 2% alginate bead coated with single layer kappa-carrageenan (ACC) and 2% alginate bead coated with double layer kappa-carrageenan (ACCD). The changes in physical and chemical characteristics of the beads before encapsulation of probiotic cells in making juice at 4 °C for 30 days were observed. The results was shown that the diffusion of anthocyanins in the beads to optimum concentration within 15-40 minutes, all types of bead. ACGD bead had the amount of anthocyanins content in bead at 4.36 ± 0.59 mg/g, which was least ($p \leq 0.05$) concentration than other beads. All 5 types of beads had a change in pH until constant within 2-3 days. The size and hardness were also significantly reduced ($p \leq 0.05$) through 30 days of storage. All beads showed noticeable increase in red color which related to the diffusion of anthocyanin from making juice. During soaking in making juice, the pore size on the surface of beads was increased. All of beads has change in chemical structure of the mannuronic unit bond that is important for alginate structure. ACGD and ACCD retains the physical and chemical properties of the beads better than other types of bead. The encapsulation of bacterial cells in beads, ACGD was found to be the most effective in cell protection. The bacterial cells of the isolate *L. plantarum* MF 105 and *L. plantarum* TISTR 2074 had the shelf life of 5 days and 2 days, respectively. It was also found that phenolic compounds in making juice can be absorbed into beads faster than acid. Thus, the high concentration of phenolic affected on cell viability of potential probiotic bacteria.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จาก ทุน 90ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ THE 90TH ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund)

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้วิจัยได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูง จาก รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และ คำแนะนำ อบรมสั่งสอน ให้ข้อคิดที่ดีในการทำงานวิจัย เสมอมา ตลอดจนดูแลเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัย ตระหนักถึงความตั้งใจจริง และ ความทุ่มเทของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภاطر และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณาเป็น คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบ กลับกรอง และ แก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และ ข้อเสนอแนะ รวมถึงอำนวยความสะดวกด้านการทำวิจัยต่างๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน และ ให้ความช่วยเหลือที่ดีเสมอมา

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และ ครอบครัว ที่ให้ความสนับสนุน เป็นกำลังใจ ในด้านที่ดีเสมอมา

ภัสริน ทัทยาภิชาติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	
กิตติกรรมประกาศ.....จ	
สารบัญ.....ฉ	
บทที่ 1 บทนำ.....	17
ความเป็นมา และ ความสำคัญของปัญหา.....	17
วัตถุประสงค์.....	18
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	19
2.1 มะเกี๋ยง.....	19
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของผลมะเกี๋ยง.....	19
2.2 น้ำผลไม้เสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	22
2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในน้ำผลไม้.....	24
2.3 การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในสภาวะความเป็นกรด และ สารประกอบฟีนอล.....	25
2.3.1 กระบวนการปรับตัวของแบคทีเรีย (Adaptation).....	25
2.3.1.1 แบคทีเรียที่มีกระบวนการปรับตัว (Adaptation) ในสภาวะเครียด.....	26
2.3.1.2 แบคทีเรียที่มีกระบวนการปรับตัว (Adaptation) ในเมื่อย.....	27
2.3.2 เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลชัน (Microencapsulation).....	29
2.3.2.1 เทคนิค Extrusion.....	30
2.3.2.2 วัสดุที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย.....	31
2.3.2.2.1 อัลจิเนต.....	31

2.3.2.3 การปรับปรุงรูปทรงของไมโครแคปซูลอัลจินตด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต	33
2.3.2.4 วัสดุที่ใช้เคลือบอัลจินตปิด.....	34
2.3.2.4.1 เจลาติน (Gelatin).....	34
2.3.2.4.2 คัปปาคาราจีแนน (K-carrageenan)	36
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	40
3.1 วัสดุ และ อุปกรณ์.....	40
วัตถุดิบ.....	40
แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	40
สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	40
อุปกรณ์.....	41
3.1.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	43
3.1.1.1 การเตรียมน้ำมะเขีง.....	43
3.1.1.2 การเตรียมเมล็ดปิด.....	43
3.1.1.3 การเคลือบอัลจินตปิดด้วยวัสดุพอลิเมอร์ชนิดต่างกัน.....	44
3.1.1.3.1 การเคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นเดียว.....	44
3.1.1.3.2 การเคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นคู่.....	44
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	46
3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกจากเมียงหมัก.....	46
3.2.2 การทดสอบแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก.....	46
3.2.2.1 การทนสภาวะกรด และ น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร.....	46
3.2.2.2 การทนต่อเกลือน้ำดี.....	47
3.2.2.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค	47
3.2.2.4 การจำแนกเชื้อโดยวิธี 16S rRNA sequencing.....	48

3.2.3 การทนในสภาวะน้ำมะเข็ญ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก และ แบคทีเรียโปรไบโอติก กลุ่ม <i>Lactobacillus</i> sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ	48
3.2.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิดระหว่างเก็บรักษาในน้ำมะเข็ญ.....	49
3.2.4.1 การแทรกซึมของแอนโธไซยานินเข้าเม็ดปิด	49
3.2.4.2 การวัดค่าความเปลี่ยนแปลงของเม็ดปิด	49
3.2.5 การทนในสภาวะน้ำมะเข็ญของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก และ แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม <i>Lactobacillus</i> sp. ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูลแต่ละชนิด	50
3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	50
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	51
4.1 แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากเมี่ยงหมัก	51
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก.....	53
4.2.1 การทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร	53
4.2.2 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี.....	53
4.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค	53
4.2.4 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก....	57
4.3 การทนในสภาวะน้ำมะเข็ญ ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> MF และ แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม <i>Lactobacillus</i> sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ	60
4.4 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิดระหว่างเก็บรักษาในน้ำมะเข็ญ	72
4.4.1 การแทรกซึมของแอนโธไซยานินเข้าเม็ดปิด	72
4.4.2 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในเม็ดปิด.....	75
4.4.3 ค่าความแข็ง และ ขนาดของเม็ดปิด.....	77
4.4.4 ค่าสีของเม็ดปิด.....	81
4.4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดปิดภายใต้กล้อง FE-SEM	85

4.4.6 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดปิด	92
4.5 การทนในสภาวะน้ำมะเคี้ยวของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> MF 105 และ แบคทีเรียโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> TISTR 2074 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูลแต่ละชนิด.....	99
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	108
บรรณานุกรม	112
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ.....	128
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	131
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ.....	136
ประวัติผู้เขียน	144



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ผลมะเกี๋ยง	19
รูปที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของผลมะเกี๋ยง.....	20
รูปที่ 3 เมียงหมัก	28
รูปที่ 4 ภาพแผนผังวิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิค Extrusion	31
รูปที่ 5 โครงสร้างอัลจินตปิดที่เกิดเป็น Egg box	32
รูปที่ 6 การเคลือบอัลจินตด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต.....	34
รูปที่ 7 โครงสร้างของอัลจินต และ เจลาติน	35
รูปที่ 8 อัลจินตรวมกับคัปปาคาราจีแนนห่อหุ้ม BSA	39
รูปที่ 9 ภาพตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมียงหมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย100 เท่า	51
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก กลุ่ม <i>Lactobacillus</i> sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 สายพันธุ์ ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	64
รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> MF คัดแยกได้จากเมียงหมัก และมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 ไอโซเลท ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C	67
รูปที่ 12 ปริมาณแอนโธไซยานินของน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 ที่แทรกซึมเข้าเม็ดปิดแต่ละชนิด ในเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	73
รูปที่ 13 ภาพเม็ดปิด 5 ชนิด ที่ไม่ผ่านการแช่ (control) และ หลังแช่ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	84
รูปที่ 14 ภาพเม็ดปิด 2% Al ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้กล้อง FE-SEM	87

รูปที่ 15 ภาพเม็ดปิด ACG ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้กล้อง FE-SEM	88
รูปที่ 16 ภาพเม็ดปิด ACC ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้กล้อง FE-SEM	89
รูปที่ 17 ภาพเม็ดปิด ACGD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้กล้อง FE-SEM.....	90
รูปที่ 18 ภาพเม็ดปิด ACCD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ภายใต้กล้อง FE-SEM.....	91
รูปที่ 19 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด 2%Al ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	94
รูปที่ 20 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด ACG ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	95
รูปที่ 21 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด ACC ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	96
รูปที่ 22 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด ACGD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	97
รูปที่ 23 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด ACCD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	98
รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ของแบคทีเรียโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> TISTR 2074 ที่ห่อหุ้มเซลล์ไมโครแคปซูล ด้วยเม็ดปิดชนิดแตกต่างกันในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	100
รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> MF 105 ที่ห่อหุ้มเซลล์ไมโครแคปซูลด้วยเม็ดปิดชนิดแตกต่างกันในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	102

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารละลายที่ใช้ในการเตรียมเม็ดปิดแต่ละชนิด.....45

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก ความสามารถในการติดสีแกรม และ ความสามารถในการสร้าง catalase.....52

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเมี่ยงหมักเป็นจำนวน 15 ไอโซเลทในสภาพเลียนแบบน้ย่อยในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....54

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเมี่ยงหมักจำนวน 15 ไอโซเลท ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 % w/v, pH 8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง..55

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 6 ไอโซเลท56

ตารางที่ 6 รหัสชื่อไอโซเลท LAB-MF แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่จำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ DNA และ เปรียบเทียบความเหมือนทางสายพันธุ์ใน GenBank...57

ตารางที่ 7 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 สายพันธุ์ ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C.....65

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดซิตริกในน้ำมะเกี๋ยง หลังจากแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. เกิดกระบวนการหมักในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C.....66

ตารางที่ 9 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 ไอโซเลท ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C.....68

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของกรดซิตริกในน้ำมะเกี๋ยง หลังจากแบคทีเรีย *L. plantarum* MF เกิดกระบวนการหมัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C.....69

ตารางที่ 11 ค่าคงที่ปริมาณแอนโธไซยานินของน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 ที่แทรกซึมเข้าเม็ดปิดแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 4 °C..... 74

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในเมล็ดปัดแต่ละชนิดหลังจากแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 4 °C.....	76
ตารางที่ 13 ค่าความแข็งของเมล็ดปัด หน่วย (g) หลังจากแช่เมล็ดปัดในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	79
ตารางที่ 14 ขนาดของเมล็ดปัด หน่วย (mm) หลังจากแช่เมล็ดปัดในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	80
ตารางที่ 15 ค่าสีของเมล็ดปัดหลังจากแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	83
ตารางที่ 16 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> TISTR 2074 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์โดยไมโครแคปซูล 5 ชนิด แช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	101
ตารางที่ 17 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก <i>L. plantarum</i> MF 105 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์โดยไมโครแคปซูล 5 ชนิด แช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C.....	103

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมา และ ความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคมีความใส่ใจรักสุขภาพมากยิ่งขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้รับความนิยมอย่างยิ่ง เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เป็นต้น แต่เนื่องจากผู้บริโภคในกลุ่มที่แพ้แลคโตสในผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากนม (dairy product) ไม่สามารถที่จะบริโภคผลิตภัณฑ์เหล่านั้นได้ จึงมีการพัฒนาเป็น ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ผลิตจากนม (non-dairy product) เช่น น้ำผลไม้เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก จากงานวิจัยพบว่า ผลไม้ในตระกูลเบอร์รี่ มีสีแดง ซึ่งเป็นแอนโทไซยานิน และ ทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ จึงให้ความสนใจกับมะเกี๋ยง พืชพื้นเมืองของ ภาคเหนือ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* เป็นผลไม้ที่เมื่อสุกมีสีม่วงแดง รสเปรี้ยว มีค่า pH อยู่ระหว่าง 2.9-3.1 อีกทั้งประกอบด้วยวิตามินหลากหลายชนิดที่จำเป็นต่อร่างกาย และ สารประกอบฟีนอลิก ที่ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็ง โคเลสเตอรอล และ โรคหัวใจ แต่มะเกี๋ยงสดเน่าเสียได้ง่าย คนท้องถิ่นจึงนิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น น้ำมะเกี๋ยง ที่ง่ายต่อการรับประทาน และ หากทำการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในน้ำมะเกี๋ยงก็ยิ่งทำให้ ผลิตภัณฑ์มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น แต่ปัญหาพบว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติกไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานในน้ำผลไม้ที่มีฟีนอลิก และ มีค่าความเป็นกรดสูง จึงต้องมีการนำเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้ การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น เมี่ยงหมัก *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *assamica* ที่มีสภาวะความเป็นกรด และ ฟีนอลิกสูง ประกอบกับการใช้ เทคโนโลยีไมโครแคปซูล โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตเป็นวัสดุแกนกลาง และ เคลือบด้วย เจลาติน หรือ คัปปาคาราจีแนน เนื่องจากเมื่อสภาวะความเป็นกรดสูงจะเกิดปฏิกิริยาการแทนที่แคลเซียมไอออนที่เชื่อมระหว่าง β -D-mannuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G) ภายในโครงสร้างแยกออกจากกันทำให้โครงสร้างของอัลจิเนตเกิดการเสื่อมสภาพได้ในสภาวะความเป็นกรด จึงมีการเสริมด้วย เจลาติน หรือ คัปปาคาราจีแนน เพื่อคงความเป็นเมทริกซ์ไฮโดรเจล และ เพื่อจะสามารถปกป้องเซลล์โปรไบโอติกจากสภาวะความเครียดในน้ำมะเกี๋ยง

วัตถุประสงค์

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ทางกายภาพ ของเม็ดบีดที่เตรียมได้จากวัสดุพอลิเมอร์ ชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งจะนำมาห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. และ แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก ที่คัดแยกได้จากเมียงหมัก เพื่อทำการยืดอายุแบคทีเรียระหว่างเก็บรักษา ในน้ำมะเกี๋ยง



บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 มะเกี๋ยง

มะเกี๋ยงเป็นผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ (รูปที่ 1) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ลักษณะเฉพาะของมะเกี๋ยงมีรสหวานอมเปรี้ยว และ เมื่อผลสุกจะมีสีแดง ซึ่งนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายเฉพาะในภาคเหนือของประเทศไทย (Thongma, 2002) ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และน่าน ในแต่ละปี มะเกี๋ยงจะออกผล ช่วงเดือน เมษายน จนถึง กรกฎาคม ซึ่งมีนักวิจัยทำการศึกษาข้อมูลในด้านต่างๆของมะเกี๋ยง



รูปที่ 1 ผลมะเกี๋ยง

ผลของ มะเกี๋ยงอุดมไปด้วยแอนโธไซยานินและให้ประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการซึ่งลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน โรคข้ออักเสบ มะเร็ง และ โรคเกี่ยวกับระบบประสาท (Sukprasansap et al., 2017)

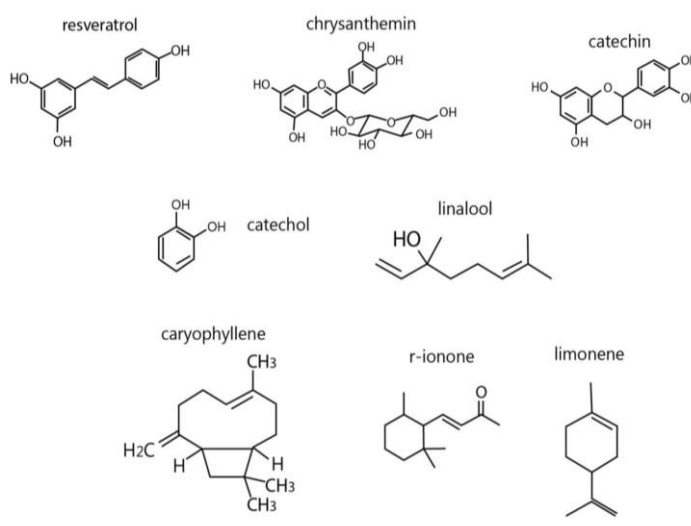
2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของผลมะเกี๋ยง

ซึ่งแอนโธไซยานิน ชนิด cyanidin-3-glucoside มีอยู่ในผลไม้หลายชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลีแดง บลูเบอร์รี่ แบล็คเคอแรนท์ มัลเบอร์รี่ เชอร์รี่ เบอร์รี่สีดำ ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค

มากมายเนื่องจากสามารถเป็นสื่อกลางในการตอบสนองการอักเสบ บรรเทาโรคอ้วน และภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้อง (Lee et al., 2017)

ผลมะเกี๋ยง มีปริมาณ cyanidin-3-glucoside 24.06 mg/100 g ของน้ำหนักแห้ง (Sukprasansap et al., 2017) ปริมาณกรดมาลิก และ กรดซิตริก ของมะเกี๋ยงมีค่าเท่ากับ 0.12-0.19 และ 1.57-1.82% ตามลำดับ (Liawruangrath, 2005)

Belancic (1997) และ Reynolds (1995) พบสารต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่นในผลของมะเกี๋ยง ได้แก่ glucopyranoside, caffeoylquinic acid, gallic acid, monogalloyldigluconide, methoxymethylgallate, ellagic acid, resveratrol, tannin, catechol, catechin และ quercetin kaempferol (รูปที่ 2) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจาก มะเกี๋ยง ประกอบด้วยกรดแกลลิก (35.34 ± 17.31 mg / 100 g ของน้ำหนักแห้ง) คาเทชิน (346.55 ± 12.02 mg / 100 กรัม ของน้ำหนักแห้ง) และรูติน (104.68 ± 14.64 mg / 100g น้ำหนักแห้ง) (Poontawee et al., 2016) เมล็ดของ มะเกี๋ยง มีแทนนินซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันมะเร็ง (Belancic, 1997 ; Reynolds, 1995) cyanidin 3-glucoside (chrysanthemim) ในเปลือกต้นพบสาร tannin ยังมีองค์ประกอบที่สำคัญ linalool, r-terpinene, r-ionone และ caryophyllene, terpinene-4-ol-, limonene, linalool ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี ตามรูปที่ 2



รูปที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของผลมะเกี๋ยง

ที่มา : มะเกี๋ยง ประโยชน์ดีๆ สรรพคุณเด่น ๆ และ ข้อมูลงานวิจัย (2564)

น้ำมะเกี๋ยง แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ $93.49 \pm 0.24\%$ scavenging activity การทดสอบ Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) ได้ $91.06 \pm 3.35 \mu\text{mol}$ ของ trolox / g ของน้ำหนักแห้ง และการทดสอบ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ได้ $42.89 \pm 0.85 \mu\text{mol}$ ของ trolox / g ของน้ำหนักแห้ง โดยพบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ $535.91 \pm 0.09 \text{ mg}$ เทียบเท่ากับกรดแกลลิก (GAE) / 100 g ของน้ำหนักแห้ง และ ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดเท่ากับ $50.49 \pm 0.64 \text{ mg}$ ของ cyanidin-3-glucoside / 100g น้ำหนักแห้ง (Sukprasansap et al., 2017) และ น้ำมะเกี๋ยงมีปริมาณฟีนอลิก 54.10 mg/L และ น้ำมะเกี๋ยงที่เติมเมล็ดมะเกี๋ยง มีปริมาณฟีนอลิก อยู่ที่ 65.05 mg/L (ดำเนิน วัฒนา และ เรวดี จอวีระ, 2543)

Tantratian et al. (2019) ได้ทำการวิจัย โดยนำเอทานอลสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงให้มีความเข้มข้นขึ้น พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ และ สารประกอบฟีนอลิกสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดที่ไม่เข้มข้น ซึ่งสารสกัดดังกล่าวแสดงฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการต่อต้านเชื้อก่อโรค เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ต่อมาการศึกษาของ Tantratian and Balmuang (2021) ทำการสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง และ พบว่า มีฟีนอลิกในเมล็ดมะเกี๋ยง คือ gallic acid 44.73 mg/L, catechin 467.16 mg/L, ferulic acid 6.05mg/L, epicatechin 12.79 mg/L, tannic acid 6.91mg/L, chlorogenic acid 56.49 mg/L, rutin 139.91 mg/L, quecetin 89.15 mg/L และ apigenin 23.02 mg/L ซึ่งมีการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงนี้โดยการแช่แคนดาลูปัตต์แต่งลงในสารสกัด ซึ่งพบว่า สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* (แบคทีเรียแกรมลบ) ในแคนดาลูปัตต์แต่งได้

ผลของการเก็บรักษา มะเกี๋ยง เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลไม้ถูกเก็บเกี่ยวจากสองจังหวัดในประเทศไทย คือ ลำปาง และ เชียงราย นอกจากนี้ การเก็บรักษาผลไม้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งไม่ได้มีผลทำให้ ปริมาณฟีนอลิกลดลง และ ยังมีความสามารถในการดูดซับอนุมูลอิสระของออกซิเจน (ORAC) ในทำนองเดียวกัน มะเกี๋ยงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 10 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความชื้นและปริมาณฟีนอลิก แต่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Patthamakanokporn et al., 2008) ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายแอนโธไซยานิน ที่เกิดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น (Chaiyasut et al., 2016)

ผลของ มะเกี๋ยง ใช้สำหรับเตรียมเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในอุตสาหกรรม อาหาร เครื่องดื่ม และ เครื่องสำอาง เนื้อผลไม้สกัดสามารถแปรรูปเป็นแยมผลไม้ที่มีรสหวานอมเปรี้ยว น้ำมันหอมระเหยสามารถสกัดได้จากเมล็ดมะเกี๋ยง อีกทั้งในส่วนที่เหลือของผลไม้และเมล็ดสามารถนำไปใช้ในการเตรียมสไป และ ผลิตภัณฑ์โรมาเทอร์ราพี ดังนั้น มะเกี๋ยง จึงมีมูลค่าทางการค้า สำหรับการในรูปแบบเชิงพาณิชย์ (Chaisawadi and Methawiriyasilp, 2008)

2.2 น้ำผลไม้เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก

ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ได้กลายเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร และ เครื่องดื่ม จากข้อมูลของ European Fruit Juice Association (AIJN) การบริโภคทั้งน้ำผลไม้และน้ำหวานทั่วโลกอยู่ที่ 36,247 ล้านลิตรในปี 2560 ในขณะที่ประเทศในสหภาพยุโรป บริโภคน้ำผลไม้รวม 9,187 ล้านลิตร (Žuntar et al., 2020) โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำผลไม้มีเส้นใยอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิก แร่ธาตุ และ วิตามินในปริมาณที่มาก นอกจากนี้การเพิ่มโปรไบโอติกจะช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของน้ำผลไม้ และ เพิ่มคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่ม สิ่งนี้เพิ่มเติมจากการลด pH ในลำไส้ ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของอาหารการดูดซึมแคลเซียม เหล็ก และ แมกนีเซียมจากเมทริกซ์ผลไม้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์อย่างยิ่งจากแง่มุมทางโภชนาการ (Nagpal et al., 2012 ; Pimentel et al., 2019 ; Šárka et al., 2018) ทั้งนี้กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) ที่มีผลในการป้องกันการลดจำนวนของโปรไบโอติกด้วย (Shah et al., 2010) ดังนั้นการผสมผสานที่เป็นประโยชน์ดังกล่าวจึงดูเหมือนจะเป็นทางเลือกทางโภชนาการที่ดี ซึ่งการบริโภคเครื่องดื่มดังกล่าวเติบโตอย่างรวดเร็วในตลาดโลก (Coman et al., 2010)

ในปี ค.ศ. 1996 บริษัท Valio ได้ทำการทดลองพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งทำการเติมเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GG และ *Propionibacterium freudenreichii* ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิตู้เย็น ได้นานถึง 5 สัปดาห์ นอกจากนี้แล้ว ยังมี บริษัท Tine Ba ในประเทศนอร์เวย์ ทำการผลิตเครื่องดื่มน้ำผลไม้ Biola เป็นน้ำผลไม้ที่ประกอบด้วย 95% สารสกัดจากผลไม้ และไม่มีการเจือจางด้วยน้ำ ซึ่งผู้ผลิต ผลิตออกมาจำหน่ายหลากหลายรสชาติ ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการเสริม เชื้อโปรไบโอติก *L. rhamnosus* GG (Prado et al., 2008) และ ผลิตภัณฑ์ Hardaliye เป็นเครื่องดื่มที่หมักจากน้ำองุ่นแดง ซึ่งเติมเมล็ดมีสตาร์ด และ กรดเบนโซอิก ลงไปในผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของยีสต์ ซึ่งหลังกระบวนการหมัก ผลิตภัณฑ์จะถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C แบคทีเรียแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*,

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus sanfransisco* และ *Lactobacillus vaccinostrercus* (Arici and Coskun, 2001)

Yoon et al. (2004) ได้ทำการศึกษา น้ำมะเขือเทศที่ทำการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 และ *Lactobacillus delbrueckii* D7 โดยทำการผสมเชื้อจุลินทรีย์ ที่เจริญเติบโตแล้ว 24 ชั่วโมง ใส่ลงไปนน้ำมะเขือเทศ ทำการบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งนักวิจัยในกลุ่มเดียวกันได้ทำการศึกษา โดยนำผักกาดแดงมาผลิตเครื่องดื่มที่ทำการผสม โปรไบโอติกแบคทีเรีย จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยพบว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* มีความสามารถสร้างกรดแลคติกได้เร็วกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และจะทำให้ ค่า pH ของผักกาดแดง ซึ่งมีค่า pH 6.3 ลดลงต่ำกว่า pH 4.5 โดยพบว่า หมักที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Yoon et al. (2006) ศึกษาโดยนำเชื้อแลคติก *L. plantarum* C3, *L. casei* A4 และ *L. delbrueckii* D7 หมักกับ น้ำกะหล่ำปลี และบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า *L. casei* จะสามารถสร้างกรดแลคติกได้น้อยกว่า *L. delbrueckii* และ *L. plantarum* ซึ่ง ตรวจพบปริมาณกรด ที่ 0.60 ± 0.03 0.74 ± 0.03 และ 0.76 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในปี 2006 ผลิตภัณฑ์ Vita Biosa ผลิตมาจากพืชสมุนไพรที่มีกลิ่นหอม ซึ่งจะไม่มีการเติมน้ำตาล และ คาร์บอนไดออกไซด์ลงในผลิตภัณฑ์หลังจากนั้น นำสมุนไพรนี้หมักด้วยแบคทีเรียแลคติก และ ยีสต์ เครื่องดื่ม Vita Biosa ที่ผลิตได้มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งยังเป็นเครื่องดื่มที่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับอีกด้วยว่ามี ส่วนในด้าน การปรับสมดุลของในระบบย่อยอาหาร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อีกด้วย (Prado et al., 2008)

Rakin et al. (2007) ทำการศึกษา ผลิตเครื่องดื่มที่ผสม บีทรูท แครอท และ ยีสต์ ก่อนทำการเข้าสู่กระบวนการหมักด้วย โปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* พบว่า แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการหมักนี้ อีกทั้งช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการหมัก และ ช่วยเพิ่มปริมาณ กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และ สารต้านอนุมูลอิสระ

Mousavi et al. (2011) ศึกษาการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* มีความสามารถหมักได้อย่างรวดเร็ว และมีชีวิตเหลือรอด ในระยะการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิทำให้ผลที่ดีกว่า *L. paracasei* และ *L. acidophilus* และได้เสนอว่า จำเป็นต้อง

ทำการคัดเลือก สายพันธุ์ของโปรไบโอติกที่สามารถทนกรด และ pH ที่ต่ำในน้ำผลไม้ (Antunes et al., 2013 ; Saarela et al., 2011) เพื่อส่งเสริมการอยู่รอดของโปรไบโอติกในน้ำผลไม้ ที่ให้ผลดี

2.2.1 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในน้ำผลไม้

จากการทดลองของ Fenster et al. (2019) พบข้อจำกัดของการเสริมจุลินทรีย์ โปรไบโอติก ในน้ำผลไม้คือ ความเป็นกรดสูง โปรไบโอติกไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานในน้ำผลไม้ (Rodríguez et al., 2014) ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติก ในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาจนวันสิ้นอายุ โปรไบโอติกควรมีชีวิตขั้นต่ำในช่วง 10^5 ถึง 10^6 CFU / mL หรือกรัม (Buruleanu CL, 2012) สามารถส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ได้อย่างเพียงพอ (Arup and Shantanu, 2013 ; Kailasapathy and Chin, 2000) แต่โดยแท้จริงแล้วผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกแต่ละชนิดควรระบุจำนวนของเชื้อที่เติมลงในผลิตภัณฑ์ และวันสิ้นอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ เพื่อเป็นประโยชน์อันสูงสุดต่อสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2002 ; Vasudha and Mishra, 2013) แม้ว่าน้ำผลไม้จะมีสารอาหารที่จำเป็นบางอย่าง เช่น แร่ธาตุ วิตามิน เส้นใยอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระ แต่ก็มีปัจจัยที่อาจจำกัดการอยู่รอดของโปรไบโอติกในน้ำผลไม้

Tripathi and Giri (2014) พบว่าค่า pH เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของโปรไบโอติก น้ำผลไม้มีกรดอินทรีย์ในระดับสูง และมี pH ต่ำ โดยทั่วไป พบว่า *Lactobacillus sp.* จะต้านทาน และ อยู่รอดได้ในน้ำผลไม้ที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง pH 3.7 ถึง 4.3 ในทางกลับกัน *Bifidobacteria* มีความทนทานต่อกรดน้อยกว่า และ pH ประมาณ pH 4.6 จะเป็นอันตรายต่อการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรีย

อย่างไรก็ตาม ค่า pH อาจเป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก แต่ยังมีโปรไบโอติกบางสายพันธุ์ ยังคงมีชีวิตรอดได้นานในน้ำผลไม้ที่ประเภทต่างๆ ได้ ซึ่งมีการอธิบายเพิ่มเติมโดย Nualkaekul et al. (2011) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิต *B. longum* ในน้ำผลไม้ ได้แก่ ส้ม แอปเปิ้ลเคอแรนท์ สับปะรด ทับทิม และ สตรอเบอร์รี่ หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า *B. longum* ในน้ำส้ม เกรปฟรุ้ต แอปเปิ้ลเคอแรนท์ และ สับปะรด ลดลงน้อยกว่า $0.8 \log \text{CFU/mL}$ โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดที่พบในน้ำส้ม และ น้ำสับปะรด นอกจากนี้ยังพบข้อมูลที่ขัดแย้งกันเกี่ยวกับผลกระทบของ pH เนื่องจากเกรปฟรุ้ตลดลงเพียง $0.5 \log \text{CFU/mL}$ แม้ว่าจะมี pH ต่ำ ที่ pH 3.21 และ กรดซิตริกมีความเข้มข้นสูง (15.3 g/L) ในทางกลับกัน โปรไบโอติกลดจำนวนลงหลังจาก 1 สัปดาห์ในทับทิม และ 4 สัปดาห์ในน้ำสตรอเบอร์รี่

ผลลัพธ์เหล่านี้ ชี้ให้เห็นว่าการอยู่รอดเป็นผลมาจากการกระทำเสริมฤทธิ์กัน และ เป็นปฏิกิริยาของ พารามิเตอร์บางอย่าง และ สารประกอบฟีนอลิกอาจมีบทบาทสำคัญ โดยทั่วไป ค่า pH มีผลเสีย แต่ โปรตีน และ โยอาหารสามารถปกป้องเซลล์จากความเครียดที่เป็นกรดได้ บทบาทของกรดซิตริก และ กรดมาลิกยังเป็นที่ยกเถียงกันอยู่ เนื่องจากดูเหมือนว่าจะสามารถปกป้องโปรไบโอติกได้ ในขณะที่ ฟีนอลิกอาจทำให้สูญเสียจำนวนเซลล์โปรไบโอติกเป็นอย่างมาก

แม้ว่าค่า pH จะเป็นอุปสรรคต่อการอยู่รอดของโปรไบโอติกในน้ำผลไม้ แต่ Ranadheera et al. (2014) สันนิษฐานว่าการรวมตัวของแบคทีเรียกรดแลคติกเข้ากับน้ำผลไม้ที่มีค่า pH ต่ำอาจเพิ่ม การต้านทานของแบคทีเรียต่อสภาวะที่เป็นกรดที่ก่อให้เกิดความเครียดตามมาได้ เช่น แบคทีเรียที่ สามารถทนได้ในระบบทางเดินอาหาร

ออกซิเจนทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการก่อตัวของ ออกซิเจนชนิดปฏิกิริยา (ROS) เช่น H_2O_2 หรือ ไอออนซูเปอร์ออกไซด์ นักวิจัยหลายคนเสนอให้ ปรับเปลี่ยนบรรยากาศของผลิตภัณฑ์ โดยเพิ่ม CO_2 (Corbo et al., 2014) นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระอาจเป็นตัวการที่ดีในการจำกัดผลกระทบด้านลบจากการได้รับออกซิเจน นักวิจัยจึง ประเมินผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ ฟีนอลิก ประเภท catechin, epigallocatechin gallate และ สารสกัดจากชาเขียว (GTE) ต่อการเจริญเติบโต และ การอยู่รอดของสายพันธุ์ โปรไบโอติกบางสายพันธุ์ที่มีความไวต่อออกซิเจนต่างกัน (Nag and Das, 2013)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในสภาวะความเป็นกรด และ สารประกอบฟีนอล

2.3.1 กระบวนการปรับตัวของแบคทีเรีย (Adaptation)

ในกระบวนการวิวัฒนาการจุลินทรีย์ได้ปรับสภาพการเจริญเติบโตให้เหมาะสมกับการทำงาน ของเซลล์ ที่มีความผิดปกติ แม้แต่การตายของเซลล์อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ภายนอก เช่น pH (Beales, 2004) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถอยู่รอด และ ปรับตัวให้เข้ากับการ เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของ pH ณ สิ่งแวดล้อมนั้นๆ ในขณะที่ความทนทานต่อกรดที่เหนียวน่า อาจเกิดขึ้นได้เมื่อ pH ของสิ่งแวดล้อมลดลงเรื่อย ๆ

กรดอินทรีย์เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ หรือ ผลพลอย ได้จาก สภาพแวดล้อมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เมื่อกรดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (Wang

and Yang, 2013 ; Yáñez et al., 2008) และ จะส่งผลในทางลบต่อผลผลิตของกระบวนการทางชีวภาพ กรดอาจเข้าสู่เซลล์แล้วแตกตัวออกเป็นโปรตอน และ ไอออน ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของความเป็นกรดภายในเซลล์ (Geng et al., 2017 ; Trček et al., 2015) เช่น กรดในกระเพาะอาหาร จะทำให้โปรไบโอติกเกิดความเครียด และ ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นความสามารถในการทนต่อกรดสูงจึงเป็นสิ่งสำคัญ สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ของโปรไบโอติก ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

สภาวะความเป็นกรดเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้สำหรับจุลินทรีย์ในระหว่างอยู่ในขั้นตอนการหมักในผลิตภัณฑ์ มีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการผลิต GABA สูง แสดงให้เห็นว่า pH ที่ต่ำจะมีผลต่อกระบวนการ glutamate decarboxylase ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ GABA ในแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นสายพันธุ์ที่ทนกรดมักจะผลิต GABA ในปริมาณสูง (Komatsuzaki et al., 2008)

2.3.1.1 แบคทีเรียที่มีกระบวนการปรับตัว (Adaptation) ในสภาวะเครียด

การอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกควรทนต่ออุณหภูมิในการเก็บรักษา และ ความเป็นพิษของออกซิเจนซึ่งมีรายงานว่าขึ้นอยู่กับความเครียดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ด้วย (Mohammadi et al., 2011) ซึ่งสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. มีความต้านทานต่อสภาพอุณหภูมิต่ำ ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *Bifidobacteria* (Ritter et al., 2009)

Ritter et al. (2009) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bifidobacterium* ได้แก่ *B. breve*, *B. dentium*, *B. longum* และ *B. animalis* subsp แสดงให้เห็นว่าอัตราการรอดชีวิตต่ำในเครื่องปฏิกรณ์แบบจำลองเดี่ยวที่เลียนแบบทางเดินจากกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เฉพาะ *B. animalis* subsp. และ *B. lactis* สามารถต้านทานได้นานถึง 40 นาทีที่ pH 2.0 แต่การเจริญเติบโตลดลงประมาณ $\log 3$ CFU/mL เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ระบบเครื่องปฏิกรณ์อัตโนมัติได้รับการออกแบบมาเพื่อทดสอบอิทธิพลของกรด เกลื่อน้ำดี และ ตับอ่อน ในสภาพแวดล้อมของระบบทางเดินอาหาร จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเหลือรอด และ ความเสถียรของเซลล์สูงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่เสริมโปรไบโอติก (Tamime et al., 2006) สิ่งสำคัญคือต้องสังเกตว่าจำนวนที่เหลือรอดชีวิตของโปรไบโอติกจะยังคงอยู่จนกว่าจะถึงเวลาที่บริโภค สายพันธุ์ที่มีชีวิตอยู่รอดได้สูง จะมีจำนวนแบคทีเรียที่เพียงพอต่อในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Godward et al., 2000) (Talwalkar et al., 2004)

ผลงานวิจัยของ Gobbetti et al. (2010) แสดงให้เห็นว่า โพรไบโอติกที่ทนต่อความเครียดในระดับรุนแรงสามารถทำให้เกิดการต่อต้าน และ การตอบสนองต่อความเครียดแบบปรับตัวได้สอดคล้องกับ การทดลองของ Perricone et al. (2014) ประสบความสำเร็จในการทดสอบวิธีการนี้เช่นเดียวกัน คือ นักวิจัยประเมิน การยังมีชีวิตของ *L. reuteri* DSM 20016 ใน น้ำสับปะรด ส้ม แอปเปิ้ลเขียว และ น้ำผลไม้สีแดง ซึ่งพบว่าโพรไบโอติกสูญเสียความสามารถในการมีชีวิตอย่างมากในน้ำผลไม้สีแดง อันเนื่องมาจากผลรวมของ pH ต่ำ และ ฟีนอลิก ดังนั้น นักวิจัยจึงใช้วิธีการปรับปรุง คือ การเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำผลไม้สีแดงในปริมาณที่แตกต่างกัน (มากถึง 50%) หรือเติมด้วย กรดวานิลลิก (ความเครียดจากฟีนอลิก) หรือทำให้เป็นกรดถึง pH 5.0 (ความเครียดจากกรด) วิธีการเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการยืดอายุของ *L. reuteri* ได้ 5 วัน จากความเครียดในสภาวะฟีนอลิก และ สามารถทนได้ 11 วัน จากความเครียด ใน pH ต่ำ

2.3.1.2 แบคทีเรียที่มีกระบวนการปรับตัว (Adaptation) ในเมี่ยง

เมี่ยงหมัก *Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *assamica* (รูปที่ 3) เป็นกระบวนการหมักอาหารแบบดั้งเดิมของภาคเหนือในประเทศไทย ทำจากใบชาอัสสัม ผ่านกระบวนการหมักแบบพิเศษ (Kawakami et al., 1987; Khanongnuch et al., 2017) และมักบริโภคโดยการกินหรือเคี้ยว หลังอาหาร เป็นส่วนหนึ่งของวัฒนธรรมการบริโภคอาหารทางสังคมของชาวล้านนาในภาคเหนือของประเทศไทยเมื่อหลายร้อยปีก่อน และ มักจะเสิร์ฟในงานเฉลิมฉลองทุกงาน (Kanpiengjai et al., 2016)

กระบวนการหมักจะแตกต่างกันไปตามพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ของภาคเหนือ ประเทศไทย นอกจากนี้ความหลากหลายทางชาติพันธุ์ของผู้ผลิตเมี่ยงส่งผลให้กระบวนการผลิตเมี่ยงมีความหลากหลาย อย่างไรก็ตามกระบวนการโดยรวมสามารถแบ่งออกเป็นสองกระบวนการใหญ่ ๆ (1) กระบวนการที่ใช้เชื้อราแบบมีเส้นใย หรือกระบวนการหมักแบบสองชั้นตอนและ (2) กระบวนการที่ใช้เชื้อราแบบไม่มีเส้นใย หรือกระบวนการหมักชั้นตอนเดียว (Khanongnuch et al., 2017) ผลิตภัณฑ์เมี่ยงที่บริโภคโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก ๆ เรียกว่าเมี่ยงผาด และ เมี่ยงเปรี้ยว (เมี่ยงส้ม) การหมักเมี่ยงมักผ่านกรรมวิธีโดยไม่ต้องเติมสารอาหารอื่น ๆ และ กระบวนการหมักจะดำเนินการโดยจุลินทรีย์แลคติก (Kawakami et al., 1987) ส่วนประกอบทางโภชนาการในใบชา เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และ ไขมันถูกนำไปใช้โดยกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวเคมีด้วยเอนไซม์ของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้สารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตที่ใช้งานได้ กระบวนการเปลี่ยนรูปทาง

ชีวภาพเหล่านี้โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมผสานทำให้เกิดกลิ่น และ รสชาติที่หอมเป็นเอกลักษณ์ของอาหารหมัก (Ana et al., 2016)



รูปที่ 3 เมียงหมัก

ที่มา : Khanongnuch et al. (2017)

คุณภาพทางเคมีของเมียงหมัก มีค่า pH 3.83–4.90, ความชื้น 81.4375 85.0664%, ปริมาณ total polyphenols 8.668 – 14.233% dry wt., tannins 0.963 – 1.831% dry wt., Mg 633.59 – 915.96 ppm, Ca 213.47 – 993.52ppm, K 8,125.09 – 25,499.92 ppm, theanine 1.602 – 3.886 %dry wt., caffeine 0.747 – 1.428% dry wt., total catechins 0.767 – 3.543% dry wt. (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2560)

Okada et al., (1986) ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า LAB มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรวมสูง เช่นเดียวกับ ยีสต์ และ ราในช่วง 10^6 – 10^{10} CFU / g จากตัวอย่างเมียงที่เก็บจากอำเภอต่างๆใน จังหวัดเชียงราย ประเทศไทย (Ketwal et al., 2014) รายงานว่า จากตัวอย่าง 11 ตัวอย่างที่เก็บได้จากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแพร่ ของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมีเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต ที่ทำงานได้เกินมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมถึง 10^4 CFU / g นอกจากนี้ยังได้ผลลัพธ์ที่คล้ายกันสำหรับยีสต์และรา ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. จากตัวอย่าง แต่ยังพบโคลิฟอร์มแบคทีเรียบางส่วน

กลุ่มจุลินทรีย์สำคัญที่รู้จักกันทั่วไป คือ แบคทีเรียแลคติก ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักเมี่ยง ในรายงาน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* ในเมี่ยงทำให้ นักวิจัยเกิดความสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับบทบาทแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักเมี่ยง อย่างไรก็ตามยังพบสายพันธุ์ *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus vaccineinostercus*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus caseliflavus* และ *Enterococcus sp.* ยังมีรายงานในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการหมักเมี่ยงอีกด้วย (Ketwal et al., 2014)

Sukontasing et al. (2007) ซึ่งมีรายงานว่าพบแบคทีเรีย และ ยีสต์ ในตัวอย่างเมี่ยงที่เก็บจากภาคเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบ ได้แก่ *E. camelliae*, *L. thailandensis*, *L. camelliae* และ *Pediococcus siamensis* (Kanpiengjai et al., 2016) ใบชาเมี่ยงนั้น มีแทนนิน และ สารประกอบฟีนอลิกปริมาณที่สูง ซึ่งเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้น จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเมี่ยง และ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ จึงเป็นที่สนใจในการศึกษา เนื่องจาก สารอาหารบางชนิดในเมี่ยงหมักเป็นสารตั้งต้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และ หากทำการคัดแยกแบคทีเรียในเมี่ยงหมักได้ ก็จะได้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก และสามารถทนต่อสภาวะความเครียด เช่น กรด และ ฟีนอลิก ในเมี่ยงได้ ซึ่งสามารถคัดแยกสายพันธุ์นั้นๆ ไปใช้งานต่อได้ในอุตสาหกรรม (Khanongnuch et al., 2017)

นอกจากการคัดแยกจุลินทรีย์ ในเมี่ยงหมัก ที่ใช้กระบวนการปรับตัว เพื่อความอยู่รอด โดยการ Adaptation ซึ่งยังมีอีกหนึ่งกระบวนการที่สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติก คือ การใช้เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูลเช่น Microencapsulation (Antunes et al., 2013 ; Ding and Shah, 2008)



2.3.2 เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูล (Microencapsulation)

การห่อหุ้มในรูปไมโครแคปซูล (Microcapsule) คือ กระบวนการตรึงสารสำคัญที่ใช้ให้อยู่ในรูปของแคปซูลที่ห่อหุ้ม เมทริกซ์ แกนกลางเมทริกซ์ หรือ เปลือกหุ้มจะใช้เป็นส่วนเชื่อมประสานเพื่อรักษาการคงตัว และ ห่อหุ้มเพื่อป้องกันสารสำคัญภายใน เช่น วิตามิน ยารักษาโรค สารต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ และ เซลล์โปรไบโอติก ตลอดจนเป็นตัวขัดขวางเพื่อให้มีเฉพาะสารประกอบบางอย่างเท่านั้นที่แพร่เข้ามาอย่างส่วนประกอบได้ เพื่อประโยชน์ในการคงตัวของสารตลอดการใช้งาน การห่อหุ้มสารที่มีความไวต่อสิ่งแวดล้อมเช่น การไวต่อแสง สารที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่าย อุณหภูมิ และ

ความเป็นกรดต่าง เป็นต้น รวมทั้งสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารไปสู่บริเวณที่ต้องการในเวลาที่เหมาะสมได้ ซึ่งนิยมใช้ อัลจิเนตในการมาห่อหุ้มในกระบวนการนี้ (Gbassi et al., 2009)

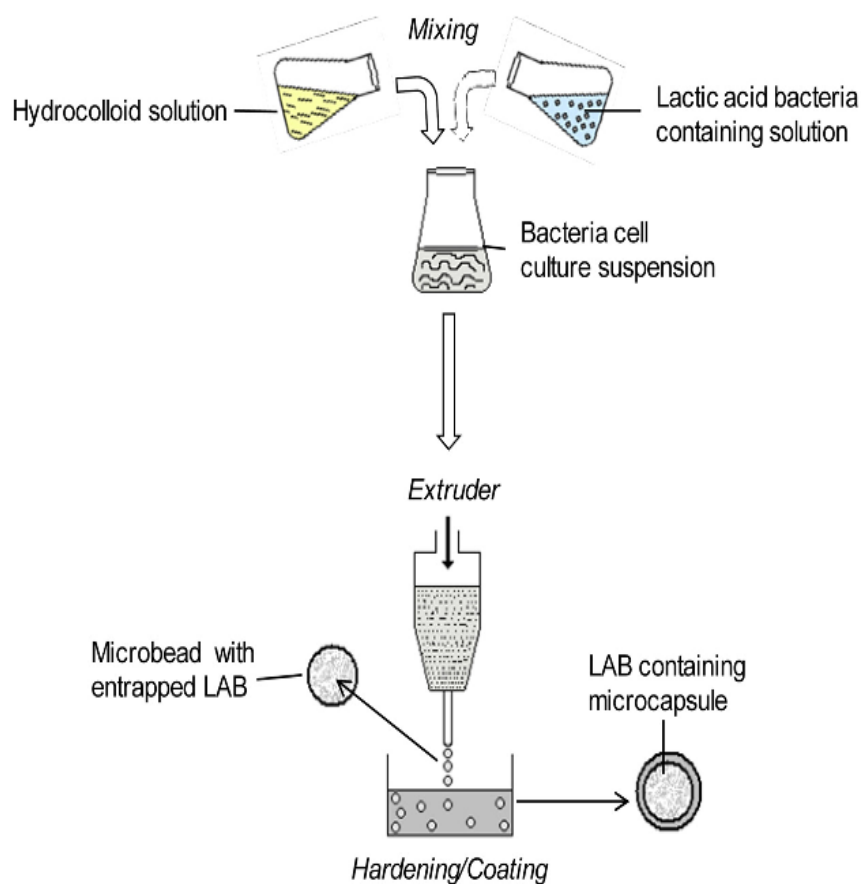
เทคโนโลยีไมโครแคปซูลได้รับการออกแบบและนำไปใช้ได้สำเร็จโดยใช้เมทริกซ์ต่างๆ เพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากความเสียหายที่เกิดจากสภาพแวดล้อมภายนอก นักวิจัยรายงานว่า ไมโครแคปซูลอาจให้สภาพแวดล้อมที่ไม่ใช้ออกซิเจน เหมาะกับสภาพแวดล้อมในการอยู่รอดสำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติก เช่นเดียวกับ การส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิด จากสภาวะที่เป็นกรดที่รุนแรงในน้ำผลไม้ (Perricone et al., 2015)

2.3.2.1 เทคนิค Extrusion

กระบวนการนี้จะดำเนินการโดย เพิ่มสารแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายอัลจิเนต หรือ พอลิเมอร์อื่นๆ จากนั้นสารละลายจะถูกอัดผ่านเข็มหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตามรูปที่ 4 แสดงแผนผังของกระบวนการนี้ ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้งานง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง สามารถผลิตเม็ดปิดให้มีรูปร่าง และ ขนาดสม่ำเสมอได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขนาดของเม็ดปิดให้ใหญ่ขึ้น เป็นเรื่องยากเนื่องจากการฟอร์มตัวที่ค่อนข้างช้าของเม็ดปิด (Krasaekoopt et al., 2003 ; Martinsen et al., 1989)

ในระดับอุตสาหกรรม ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้สร้างเจลโดยทั่วไปจะแปรผันระหว่าง 0.6-3% และ 0.05-1.5 M ตามลำดับ (Krasaekoopt et al., 2003 ; Nualkaekul et al., 2012) ขนาด และ รูปร่างของเม็ดปิดที่ขึ้นรูปขึ้นอยู่กับความหนืดของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม และ ระยะห่างระหว่างกระบอกฉีดยากับแคลเซียมสารละลายคลอไรด์ (Anal and Singh, 2007) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 mm. (Krasaekoopt et al., 2003)

Lee and Heo (2000) ศึกษาการอยู่รอดของ *B. longum* ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2%, 3% และ 4% และพบว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตและขนาดของเม็ดปิดส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ในระหว่างการสัมผัสกับน้ำย่อย และ เคลื่อนน้ำดีจำลองในระบบทางเดินอาหาร



รูปที่ 4 ภาพแผนผังวิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยใช้เทคนิค Extrusion ในการทำไมโครเอนแคปซูลชั้น

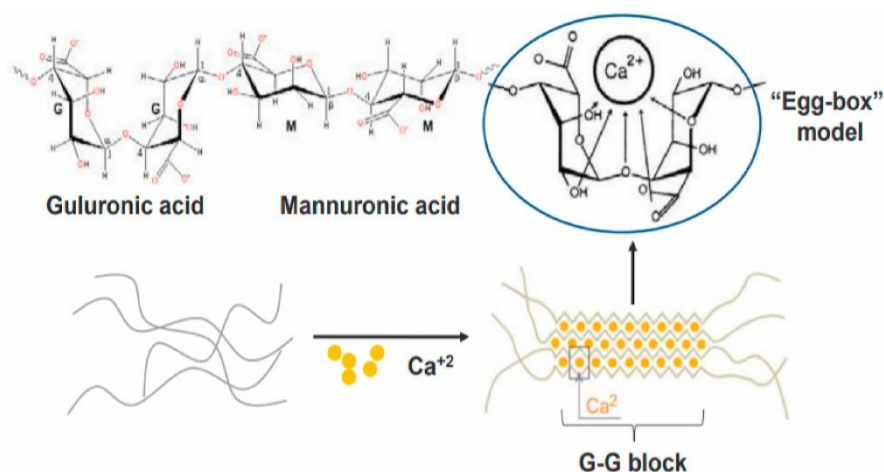
ที่มา : Kwak (2013)

2.3.2.2 วัสดุที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย

2.3.2.2.1 อัลจิเนต

อัลจิเนตเป็นพอลิแซคาไรด์ประจุลบที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล ประกอบด้วย monomer 2 ชนิด คือ β -D-mannuronic acid (M) และ α -L-guluronic acid (G) ในโมเลกุล ประกอบด้วยบริเวณที่มีพอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวของ G และ M ที่เรียกว่า G-blocks และ M-blocks ตามลำดับ (Ruvinov and Cohen, 2016) และ บางส่วนของโมเลกุลเป็น MG-blocks สัดส่วนของพอลิเมอร์รวมและโครงสร้างที่แตกต่าง จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของอัลจิเนต เช่น ถ้าในสายโซ่มีพอลิเมอร์ G ในปริมาณสูงจะมีสมบัติเป็นเจลแข็งที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ ของประจุบวกของโลหะ แต่ถ้าในสายโซ่มีพอลิเมอร์ M ในปริมาณสูง เจลที่เกิดจะมีแนวโน้มอ่อนนุ่ม และมีสถานะใน

การเกิดเจลที่กว้างกว่าสายโซ่ที่มีพอลิเมอร์ G ปริมาณสูง อัลจินเตเกิดเจลได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โครงสร้างของเจลที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ (egg box) ตามรูปที่ 5 โดยมี Ca^{2+} เกาะอยู่กับสายโซ่พอลิเมอร์ สมบัติที่ดีของอัลจินเตเมื่อเกิดเป็นเจล คือ เจลที่ได้จะไม่สามารถผันกลับ (irreversible gel) ในน้ำเย็นที่มีแคลเซียมไอออนอยู่ได้ (Etchepare et al., 2015) อนุภาคที่ผลิตโดยการอัดขึ้นรูปเป็นเม็ดบีด มักมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 500 μm ถึง 3 mm และ ขนาดของเม็ดบีดที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มที่ใช้หยด สารละลายรวมถึงความหนืดและความเข้มข้นของสารละลายอัลจินเตนอกเหนือจากระยะห่างระหว่าง เข็มฉีดยา และ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีกด้วย (Burey et al., 2008)



รูปที่ 5 โครงสร้างอัลจินเตบีดที่เกิดเป็น Egg box

ที่มา : Ruvinov and Cohen (2016)

การศึกษาในหลอดทดลอง แสดงให้เห็นถึงข้อดีของไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้ม โปรไบโอติกโดยใช้อัลจินเตเป็นวัสดุเคลือบผิว Kim et al. (2008) ทำการศึกษาโดย รายงานว่า *L. acidophilus* ATCC 43121 ที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล การรอดชีวิตของแบคทีเรียระหว่างการสัมผัสกับระบบทางเดินอาหารเทียม และ การเปลี่ยนแปลงความไวต่อความร้อน นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการดูดซึมโคเลสเตอรอล และการยึดเกาะในลำไส้ของ *L. acidophilus* ATCC 43121 ที่ไม่ห่อหุ้ม เซลล์ และ ห่อหุ้มเซลล์ไว้เพื่อสำรวจผลของไมโครแคปซูล พบว่าเซลล์ที่ไม่ถูกห่อหุ้ม จะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้เมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยเทียม (AGJ) ที่ pH 1.2 และ 1.5 ในขณะที่ pH ต่ำนี้ลดจำนวนเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเพียง 3 log CFU/mL ซึ่งเซลล์ที่ห่อหุ้มมีความทนทานต่อ ระบบกลืนน้ำดี ที่จำลองสภาวะลำไส้ (AJ) และการให้ความร้อน จะมีอัตราการทนในสภาวะที่สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญ (Kim et al., 2008)

งานวิจัย หลากหลายงาน มีการศึกษา ไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มโปรไบโอติกในอาหารหลายชนิด Khalil and Mansour (1998) ศึกษาโดยนำ *Bifidobacteria* ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และ ใส่เม็ดปิด ในมายองเนส ผลการประเมินการอยู่รอดของเซลล์ระหว่างการเก็บ ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และ ผลการทดลองพบว่า ยังพบเซลล์โปรไบโอติกที่สูงกว่า 10^6 CFU /mL ซึ่งในการศึกษาอื่น ของ Özer et al. (2009) ทำการห่อหุ้ม *L. acidophilus* ใน 2% อัลจิเนต โดยเทคนิคการอัดขึ้นรูปในชีส และ ทำการวิเคราะห์ตลอด 90 วัน ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และสามารถตรวจวัดจุลินทรีย์ได้สูงกว่า 10^6 CFU /g

การศึกษา การตรึงโปรไบโอติกในน้ำผลไม้โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ หากเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระปกติที่เติมในน้ำผลไม้ และ การเตรียมน้ำมะเขือเทศ สิ่งนี้สามารถอธิบายได้ด้วยผลของปริมาณออกซิเจน และ ค่า pH ต่ำ ที่มีความเป็นกรดสูง เนื่องจากการสัมผัสกับโปรไบโอติกโดยตรงกับเซลล์อิสระ (Tsen et al., 2004) ซึ่งเป็นการยากที่จะรักษา อัตราการรอดชีวิตของ โปรไบโอติกในน้ำผัก และ ผลไม้ในระหว่างการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม สามารถปรับปรุงได้ด้วยการห่อหุ้มโปรไบโอติกด้วยอัลจิเนต ซึ่งผู้บริโภคยอมรับน้ำผลไม้เหล่านี้ในระดับที่สูง (Wang et al., 2012)

แม้ว่าไฮเดียมอัลจิเนตจะเหมาะสำหรับการห่อหุ้ม แต่เจลก็มีความเป็นรูพรุนและความไวต่อ pH ที่ pH ต่ำ ซึ่งอาจส่งผลทั้งการปลดปล่อย และ การป้องกันเซลล์ (Etchepare et al., 2015) ซึ่งมีหลายวิธีในการปรับปรุงเสถียรภาพของเม็ดปิดที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์ เช่น การเคลือบอนุภาคด้วยเจลไอออนิกด้วยพอลิเมอร์ผ่านปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต (Patil, 2010)

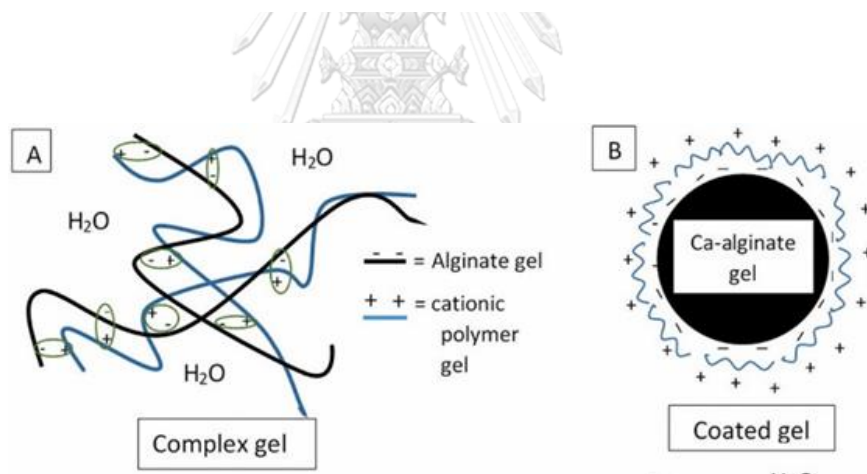
2.3.2.3 การปรับปรุงรูพรุนของไมโครแคปซูลอัลจิเนตด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต

ปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตเกิดขึ้นระหว่างพอลิเมอร์ที่มีประจุตรงข้ามกัน ในกรณีส่วนใหญ่ ระบบของพอลิเมอร์ที่ใช้ รวมถึงโมเลกุลโปรตีนเป็นพอลิอิเล็กโทรไลต์ ประจุเชิงบวก และ โมเลกุลพอลิแซ็กคาไรด์ เป็น พอลิอิเล็กโทรไลต์ ประจุเชิงลบ (Jun-xia et al., 2011) ในบริบทนี้ทำให้เกิดวิธีการที่เรียกว่า สัมผัสกันที่ละชั้นซึ่งใช้กับพื้นที่ของไมโครแคปซูลสำหรับการผลิตพอลิอิเล็กโทรไลต์หลายชั้น เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับ การดูดซับอย่างต่อเนื่องของชั้นสลับของพอลิอิเล็กโทรไลต์ที่มีประจุไฟฟ้าในเชิงบวก และ เชิงลบบนอนุภาค และ มีแรงผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต (รูปที่ 6) (Kreft et al., 2007)

การเคลือบอัลจิเนต และ วัสดุอื่นๆสองชั้น สามารถเพิ่มการป้องกันอัลจิเนตที่เป็นแกนหลัก จากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากการลดขนาดรูพรุนบนพื้นผิวของวัสดุ และ ลด

อัตราการแพร่ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และ น้ำดี ที่แพร่ เข้าไปในเม็ดปิด (Chaikham et al., 2013 ; Lee et al., 2014)

เม็ดปิดที่เคลือบไคโตซาน เทียบกับเม็ดปิดที่ไม่เคลือบผิว เมื่อแช่ในน้ำทับทิมหลังจาก 6 สัปดาห์ของการเก็บรักษา พบว่าเซลล์โปรไบโอติกยังมีชีวิตที่สูงกว่า $5.5 \log \text{CFU/mL}$ สำหรับเม็ดปิดเคลือบ ชั้นเดี่ยว และ ชั้นคู่ ในขณะที่เซลล์อิสระ และ เม็ดปิด ที่ไม่ได้เคลือบผิว เซลล์จะตายภายใน 4 สัปดาห์ของการเก็บรักษา ในกระเพาะอาหารจำลอง และ น้ำทับทิม อย่างไรก็ตาม มีการสังเกตแนวโน้มตรงกันข้ามสำหรับน้ำทับทิมซึ่งแสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ระหว่างการอยู่รอดของเซลล์ และ ความแข็งของเม็ดปิด สาเหตุที่เป็นไปได้มากที่สุดสำหรับ เชื้อที่ลดจำนวนลง ที่สัมพันธ์ กับเม็ดปิดที่มีความแข็งลดน้อยลง คือ ในน้ำผลไม้ มีซิเตรตไปแทนที่แคลเซียมไอออน ซึ่งส่งผลให้เกิดการแลกเปลี่ยน ด้วยไอออนโมโนวาเลนต์ที่ไม่ก่อให้เกิดเจล ด้วยเหตุนี้จึงแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของแคลเซียมจะลดน้อยลง และ เม็ดปิดมีความแข็งลดลงหลังจากการใส่เม็ดปิดลงในน้ำผลไม้ ซึ่งผลการทดลองทั้งหมด ระบุว่า การเลือกวัสดุเคลือบจะส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษา ของเม็ดปิด (Nualkaekul et al., 2013)



รูปที่ 6 การเคลือบอัลจินเตดด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต

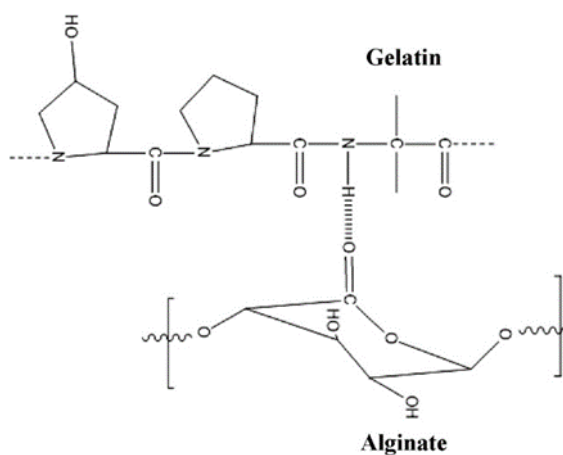
ที่มา : Ramdhan et al. (2020)

2.3.2.4 วัสดุที่ใช้เคลือบอัลจินเตดปิด

2.3.2.4.1 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินซึ่ง เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งถูกนำมาใช้ในการห่อหุ้มโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารประกอบอื่น ๆ เนื่องจากมีลักษณะเป็นแอมโฟเทอริก จึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการใช้ร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบ เช่น อัลจินเต ไฮโดรคอลลอยด์เหล่านี้สามารถผสมกันได้ที่ pH สูงกว่า pH 6 เนื่องจากทั้งสองมีประจุลบสุทธิ และ ขับไล่ซึ่งกัน และ กัน ตามรูปที่ 7 อย่างไรก็ตาม

ก็ตาม ประจุสุทธิของเจลาตินจะกลายเป็นค่าบวกเมื่อ pH ถูกปรับให้ต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก และทำให้เกิดปฏิกิริยากับเจล ที่มีประจุลบ (Anal and Singh, 2007 ; Krasaekoopt et al., 2003)



รูปที่ 7 โครงสร้างของอัลจิเนต และ เจลาติน

ที่มา : Sathisaran and Balasubramanian (2020)

เจลาตินได้รับการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกลของเจลอัลจิเนต เนื่องจากมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษ และมีลักษณะแอมโฟเทอริก ซึ่งทำให้เหมาะสำหรับการผสมกับพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ (Li et al., 2009) ตามรูปที่ 7 เจลาตินเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ได้มาจากคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีเส้นใยของสัตว์ เช่น กระดูกอ่อน เส้นใยกล้ามเนื้อ และ ผิวหนัง ที่ pH ต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของเจลาติน (IP) เจลาตินที่มีประจุบวกสามารถสร้างเจลเชิงซ้อนกับอัลจิเนต ในขณะที่ค่า pH ที่สูงกว่า IP ของเจลาติน พอลิเมอร์ทั้งสองจะมีประจุเท่ากัน (Tolstoguzov, 1995) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเจลาตินจะเป็นโปรตีน แต่ก็ทำหน้าที่เหมือนพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าโปรตีน

เจลาตินสามารถรวมตัวแบบ Co-linking กันกับรอยต่อ Egg box ตามรูปที่ 7 ของอัลจิเนตได้เนื่องจากอัลจิเนต และ เจลาตินมีแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตอย่างแรง ระหว่างสายแอลจิเนตในเม็ดบีด ซึ่งจะมีความหนาแน่นน้อยลง และ การนำเจลาตินไปยังรอยต่อของโครงสร้างเจลอัลจิเนตนั้นจะปรับปรุงคุณภาพของโครงสร้างให้เสถียรภาพความเป็นไฮโดรเจลได้ดีขึ้น (Fang et al., 2011)

Nualkaekul et al. (2013) นำอัลจิเนตเสริมกับพอลิเมอร์ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ gelatin, ซึ่งพบว่า อัลจิเนตบีดที่เสริมร่วมกับ เจลาติน ในน้ำทับทิม และ น้ำแครนเบอร์รี่ ที่อุณหภูมิ 4 °C ค่าความแข็ง และ ขนาดของเม็ดบีด ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกได้ และมีอายุการเก็บ 6 สัปดาห์ ในขณะที่อัลจิเนตบีดมีอายุการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ในน้ำ

แครนเบอร์รี่ และ 4 สัปดาห์ในน้ำทับทิม ซึ่งอัลจินเตปิดที่เสริมร่วมกับ gelatin มีอายุการเก็บที่มากกว่า อัลจินเตที่เสริมด้วยพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆอีกด้วย

ไมโครบิต อัลจินเต เคลือบเจลาติน ถูกผลิตขึ้นเพื่อห่อหุ้มโปรไบโอติก (Annan et al., 2008) ป้องกันการเสื่อมสภาพของเม็ดปิด ที่เกิดจากเปปซิน ในน้ำย่อยจำลอง (pH 2.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ส่งผลให้จำนวนโปรไบโอติกรอดชีวิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) หลังทำการทดสอบในกระเพาะอาหารจำลอง 1 ชั่วโมง และ สภาวะจำลองในลำไส้ pH 7.4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตคือ $7.6 \log \text{CFU} / \text{g}$ สำหรับไมโครแคปซูลเคลือบเจลาติน ในขณะที่เดียวกัน อัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติก คือ 6.7 และ $6.4 \log \text{CFU} / \text{g}$ สำหรับเซลล์ในไมโครบิต อัลจินเตที่ไม่เคลือบด้วยเจลาติน และ เซลล์อิสระตามลำดับ

การห่อหุ้มสามารถปกป้องโปรไบโอติกจากส่วนประกอบอาหาร และ ปรับปรุงความสามารถในการดำรงชีวิตของแบคทีเรียในระหว่างการผลิต และ การเก็บรักษาในอาหาร อัลจินเต ซึ่งเป็นหนึ่งในพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีการศึกษามากที่สุด ได้แสดงให้เห็นถึงการปกป้องโปรไบโอติกจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมของอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ มีการรายงานจำนวนประมาณ $5.2 \log \text{CFU} / \text{mL}$ สำหรับ *Lactobacillus* sp. 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. rahnmosus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *L. paracasei* ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจินเต และ รวมเข้ากับน้ำส้มหลังจากเก็บรักษาในตู้เย็น 6 สัปดาห์ ในขณะที่เซลล์อิสระลดลงหลังจากผ่านไป 3 สัปดาห์ ดังนั้นการห่อหุ้มด้วยอัลจินเตจึงให้การปกป้องโปรไบโอติกได้ดี (Ding and Shah, 2008)

2.3.2.4.2 คัปปาคาราจีแนน (K-carrageenan)

คัปปาคาราจีแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์เชิงเส้นที่ประกอบด้วย 3,6-anhydrogalactose ทั้งที่มีซัลเฟตและไม่มีซัลเฟต มาต่อกันด้วย glycosidic links (1,3) และ (1,4) ที่ได้มาจากสาหร่ายสีแดง (*Rhodophyceae* sp.) คัปปาคาราจีแนนมักใช้แลมบ์ดาเป็นสารเพิ่มความข้น ในขณะที่ คัปปาคาราจีแนนจะสร้างเจลที่แน่นแข็งเมื่อมีโพแทสเซียมไอออน และ คัปปาคาราจีแนนเพียงน้อยนิดต้องใช้แคลเซียมไอออนเพื่อสร้างเจลที่ยืดหยุ่นได้ เนื่องจาก คัปปาคาราจีแนนสามารถ สร้างเจลที่มีความแข็ง ดังนั้นการศึกษาส่วนใหญ่จึงใช้เป็นวัสดุผสมสำหรับเจลอัลจินเต (Hennink and van Nostrum, 2002) เนื่องจากคัปปาคาราจีแนน และ ไอโอตาคาราจีแนนสามารถสร้างเจลที่มีไอออนบวกได้ การผสมคัปปาคาราจีแนน และ อัลจินเตจะสร้างเจลแบบผสม (Tolstoguzov, 1995)

คัปปาคาราจีแนนสามารถละลายได้ในน้ำร้อน และ เกลือโซเดียมสามารถละลายได้ในน้ำเย็น ในการสร้างเจลเมทริกซ์ คัปปาคาราจีแนนจะถูกไฮเดรตที่อุณหภูมิสูงก่อน จากนั้นในช่วงอุณหภูมิ 40-60 °C จะสร้างเนื้อเจล เจลคัปปาคาราจีแนนจะอ่อนหรือจะสูญเสียความแข็งแรงที่ pH น้อยกว่า pH 4.5 และ ความแข็งแรงของเจลจะลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิสูง และ ที่ระดับไอออนบวกต่ำ อย่างไรก็ตาม ที่ pH มากกว่า 4.5 เจลคัปปาคาราจีแนนมีความคงตัว (Hennink and van Nostrum, 2002 ; Ramdhan et al., 2020)

มีรายงานว่า การเพิ่มคัปปาคาราจีแนนทำให้เกิดเม็ดเจลคอมโพสิตอัลจิเนตทรงกลมซึ่งมีโครงสร้างพื้นผิวเป็นรูพรุนมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคัปปาคาราจีแนนเพิ่มขึ้น (Chi et al., 2008 ; Popa et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกด้วยว่าการบวมของเม็ด อัลจิเนต และ คัปปาคาราจีแนน เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคัปปาคาราจีแนนเพิ่มขึ้น (Mahdavinia et al., 2014) ประสิทธิภาพการห่อหุ้มของการเติมเอนไซม์ leusine aminopeptidase (LAP) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในคอมโพสิตเจลเมื่อเปรียบเทียบกับเจลอัลจิเนต (Chi et al., 2008) แม้ว่าคัปปาคาราจีแนนจะสร้างเจลที่แน่นแข็งเมื่อมีโพแทสเซียมไอออน การมีคัปปาคาราจีแนนเป็นส่วนผสมจะส่งผลให้เจลอัลจิเนตนุ่มขึ้น (Popa et al., 2011)

โดยส่วนมากมักจะนำ คัปปาคาราจีแนน ผสมใน ขนม และ อาหารเพื่อเพิ่มความคงตัว และ เนื้อสัมผัส ให้มีความ เป็นเยลลี่ เหมาะสำหรับผู้บริโภค ซึ่งมีการศึกษาค่าความคงตัวของ อัลจิเนตปิด และ อัลจิเนตที่เสริม kappa carrageenan โดยมีสารสกัดแก้วมังกร (pH 4.88 ± 0.05) หลังจากนั้น เก็บเม็ดปิดที่ได้ ในภาชนะ HDPE แช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 °C และ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -24 °C เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า อัลจิเนตที่เสริม kappa carrageenan ยังมีความคงตัว ค่าความแข็ง ไม่ได้มีความเปลี่ยนแปลงจากวันที่ 0 สามารถปกป้องสารสกัดแก้วมังกร ภายในเม็ดปิด จากการแช่เย็น และ แช่แข็งได้ อีกทั้งการเก็บในระยะเวลา 5 วัน อัลจิเนตที่เสริม kappa carrageenan มีเนื้อสัมผัสที่ดีกว่า อัลจิเนตปิด (Bubin and Mat, 2019)

ความเข้มข้นของคัปปาคาราจีแนนยังจำกัดโครงสร้าง และ ประสิทธิภาพของระบบนำส่ง ในการศึกษาการเตรียมไมโครปิดที่เกิดจากโซเดียมเคซิเนต และ คัปปาคาราจีแนนเพื่อห่อหุ้ม β -carotene ได้มีการกล่าวถึงอิทธิพลของความเข้มข้น คัปปาคาราจีแนนต่อสัณฐานวิทยาของไมโครปิด ด้วยการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น คัปปาคาราจีแนนไมโครปิดมีแนวโน้มที่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และ เป็นทรงกลมมากขึ้น คัปปาคาราจีแนนที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v) ได้รับการคัดเลือกเพื่อผลิต

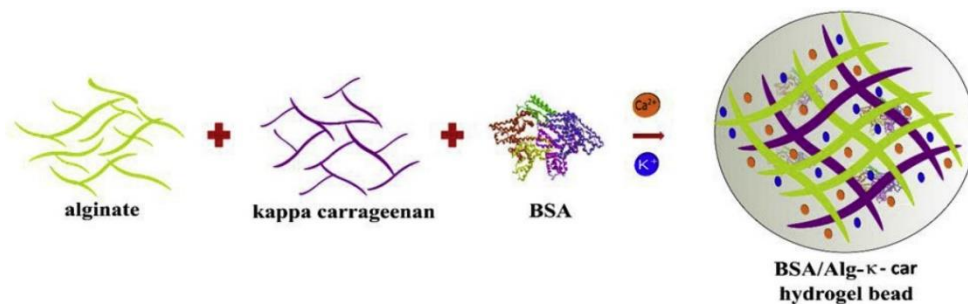
ไมโครบิตที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมมากขึ้น (Perrechil et al., 2020) ความเข้มข้นของคัลปาคาราจีแนนส่งผลกระทบต่อส่วนผสมออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ห่อหุ้มในแง่ของอัตราการคงอยู่ การห่อหุ้ม และ ประสิทธิภาพการบรรจุในกระบวนการเตรียมไฮโดรเจลที่ประกอบด้วยเวย์โปรตีนรวมคัลปาคาราจีแนนสำหรับการนำส่งเคอร์คูมินไปยังลำไส้ใหญ่ การศึกษาพบว่าเคอร์คูมินย่อยสลายน้อยกว่าในเวย์โปรตีน เมื่อรวมไฮโดรเจลที่มี 0.55% คัลปาคาราจีแนน มีผลในการป้องกันโปรตีนในระหว่างการย่อยในหลอดทดลอง ซึ่งจำกัดการเข้าถึงของเอนไซม์ย่อยอาหารเข้าไปในไฮโดรเจล และด้วยเหตุนี้จึงนำไปสู่การลดการทำลายเมทริกซ์ของเจล และ การปลดปล่อยเคอร์คูมิน (Alavi et al., 2018)

การศึกษาอื่นตรวจสอบผลของความเข้มข้นของคัลปาคาราจีแนนต่อการห่อหุ้ม และ ประสิทธิภาพการบรรจุส่วนผสมที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อพัฒนาเม็ดบีดไฮโดรเจลอัลจิเนต และ คัลปาคาราจีแนนสำหรับการนำส่งไซโตไคน์แอสโตรลูติน Y (IgY), Gu et al. (2021) ยังเน้นที่ผลกระทบของความเข้มข้นของคัลปาคาราจีแนนต่อการห่อหุ้ม และ ประสิทธิภาพการบรรจุ ผลการวิจัยพบว่าการห่อหุ้ม และ ประสิทธิภาพการบรรจุ IgY นั้นดีที่สุดที่ 0.3% คัลปาคาราจีแนน จากนั้นประสิทธิภาพการบรรจุจะลดลงเล็กน้อยที่ความเข้มข้น คัลปาคาราจีแนน ที่สูงขึ้น (Gu et al., 2021)

นอกจากนี้ อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ยังส่งผลกระทบต่อส่วนประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ห่อหุ้ม ในการวิจัย ที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีนถั่วเหลือง และ คัลปาคาราจีแนนห่อหุ้ม *B. longum* นักวิจัยได้ตรวจสอบผลของอัตราส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองที่แยกได้ต่อคัลปาคาราจีแนนเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม และ ความมีชีวิตของ *B. longum* ที่ซับซ้อนที่มีโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต ต่อ อัตราส่วนมวลคัลปาคาราจีแนน 10:1 แสดงให้เห็นโครงสร้างจุลภาคที่มีขนาดกะทัดรัดมากขึ้น ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการแทรกซึมจากสภาวะภายนอกไม่ให้แพร่เข้าไปในไมโครแคปซูล และ ปกป้องแบคทีเรียโปรไบโอติกจากความเครียดต่างๆ ได้ดีขึ้น (Mao et al., 2019)

Sariyer et al. (2020) ทำการศึกษา โดยนำ Bovine Serum Albumin (BSA) ห่อหุ้มเป็นเม็ดบีดไฮโดรเจลของอัลจิเนต และ คัลปาคาราจีแนน รูปที่ 8 ที่มีการเชื่อมสภาพใน pH ต่ำ โดยมีวิธีการเตรียม ใช้อัตราส่วน CaCl_2 และ KCl ที่ pH ต่างกัน และ พบว่า การปลดปล่อย BSA ในสภาวะกระเพาะอาหารแบบ จำลอง (SGF) และ สภาวะในลำไส้จำลอง (SIF) อัลจิเนต ร่วมกับ คัลปาคาราจีแนนทำให้การปล่อย BSA เข้าสู่ SIF ช้าลง หากเปรียบเทียบกับ อัลจิเนตบีดที่ไม่เคลือบ ซึ่งกลุ่มซัลเฟตบนคัลปาคาราจีแนนปรับปรุงสภาพต้านทานต่อสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

การห่อหุ้มด้วย อัลจิเนต และ คัปปาคาราจีแนน ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงสุด (83–89%) เนื่องจาก เม็ดบีดไฮโดรเจลเตรียมที่ pH ต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของ BSA จึงสามารถควบคุมการปลดปล่อย ได้อย่างช้าๆ



รูปที่ 8 อัลจิเนตรวมกับคัปปาคาราจีแนนห่อหุ้ม BSA

ที่มา : Sariyer et al. (2020)



บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ และ อุปกรณ์

วัตถุดิบ

ผลมะเขียง สวนคุณย่ายุพิน กสิกรรมธรรมชาติ จากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

เมี่ยงหมัก (ใบชาหมัก) โรงงานสุรียใบชาหมัก จากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

Escherichia coli ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 1311, *Salmonella enteritidis* DMST 15676, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Lactobacillus plantarum* TISTR 2074, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365, *Lactobacillus salivarias* TISTR 1112, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272, *Lactobacillus casei* TISTR 1340 และ *Lactobacillus paracasei* ATCC 393 stock culture จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 95% Ethyl alcohol (Merck, USA)
- Absolute alcohol (Loba chemie, India)
- Acetic acid (Loba chemie, India)
- Bile salt (Merck, USA)
- Calcium carbonate (Konochima chemical Co., Ltd., Japan)
- Calcium chloride (Loba chemie, India)
- Citric acid monohydrate (Merck, USA)
- Crystal violet solution (Merck, USA)
- de Man, Rogosa and Sharpe Agar (Himedia laboratories, India)
- de Man, Rogosa and Sharpe Broth (Himedia laboratories, India)
- Gelatin food grade (Konochima chemical Co., Ltd., Japan)
- GF- Bacterial DNA extraction kit (100 preps) (Vivantis, Malaysia)

- Hydrochloric (Merck, USA)
- Hydrogen peroxide solution (Merck, USA)
- Iodine solution (Merck, USA)
- Kappa carrageenan food grade (Focus Technology Co., Ltd., China)
- Nutrient Agar (Himedia laboratories, India)
- Nutrient broth (Himedia laboratories, India)
- Pepsin (Sigma, USA)
- Phenolphthalein (Merck, USA)
- Plate Count Agar (Himedia laboratories, India)
- Potassium chloride (Merck, USA)
- Safranin solution (Merck, USA)
- Sodium Alginate (Focus Technology Co., Ltd., China)
- Sodium chloride (Merck, USA)
- Sodium citrate (Focus Technology Co., Ltd., China)
- Sodium hydroxide (Focus Technology Co., Ltd., China)

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Thailand)
- เครื่อง pH meter (LAQUAtwin-pH-22, Horiba, Japan)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Platform shaker, (Hercuvan, UK)
- เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo Kogyo, SX-700, Japan)
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo Kogyo, SX-700, Japan)
- เครื่องตรวจเอกลักษณ์สารพันธุกรรม Gel documentation and analysis software syngene model in Genius (Syngene, USA)
- เครื่องตีปั่น Stomacher 400 circulator (Seward, England)
- เครื่องทำน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, WNB22, Germany)

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Tuttlingen, Germany)
- เครื่องผสมสาร Vortex Genie (Scientific industries model No. G560E Electrophoresis minigel; Hercuvan, UK)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR Bio RAD T100tm thermal cycle (Bio-Rad, Singapore)
- เครื่องวัดค่าความแข็ง Texture Analyzer (TA-XT2i; Stable Micro Systems, England)
- เครื่องวัดสี Chroma meter (Konica minolta model : CR-400, Japan)
- เครื่องอบลมร้อน Hot air oven (Heraeus, Germany)
- เครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Freeze dryer, Scientific promotion
- ตู้แช่แข็ง -20 °C (Sharp, FC-28U, Thailand)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ Temperature controller (Mettler, Germany)
- ตู้เย็น 4 °C (Pattana Intercool, LU-45YU, Thailand)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ Autoclave model sx-700 (Tomy Digital Biology, Japan)
- หัวกรอง Filter membrane ขนาด 0.2 micron Minisart cellulose acetate Syringe Filter (Göttingen, Germany)
- อุปกรณ์บ่มเชื้อแบคทีเรียแบบสภาวะไร้อากาศ Anaerobic jar (Darmstadt, Germany)
- Biosafety cabinet class II (Labonics system Ltd., England)
- Centrifuge universal 320/320R (Vagas Biotech, China)
- Field Emission Scanning Electron Microscopes (FE-SEM; HiTACHI SU-8010; Fabsurplus, Italy)
- Micrometer (Fowler IP54, USA)
- Microplate Reader UVM 340 , Scientific promotion (Biochrom Ltd, England)
- Thermo Scientific Nicolet™ iS5™ FT-IR spectrometer (Coleparmer, England)

3.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.1.1.1 การเตรียมน้ำมะเกี๋ยง ประยุกต์จากวิธีของ Jambrak et al. (2017) และ Sukprasansap et al. (2017)

นำผลมะเกี๋ยงสุก มาทำเป็นน้ำมะเกี๋ยงที่ห้องปฏิบัติการวิจัย และ พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยใส่ผลมะเกี๋ยง 9 kg (รวมน้ำหนักผลสุก และ เมล็ด) ในน้ำปริมาตร 10 L เพื่อทำการ pasteurized ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 20 นาที พักให้เย็นบนอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที และ กรองผลมะเกี๋ยงออก ให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็น น้ำมะเกี๋ยง หลังจากนั้นทำให้ น้ำมะเกี๋ยงที่ได้ มีความเข้มข้นขึ้น โดย ใส่ผลมะเกี๋ยง 9 kg และ ต้มน้ำมะเกี๋ยง ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 20 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง รวมทั้งหมดใช้ผลมะเกี๋ยง 18 kg) ก็จะได้ น้ำมะเกี๋ยงเข้มข้น จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ครั้ง และ นำน้ำมะเกี๋ยงเข้มข้นนี้ เจือจางด้วย น้ำปริมาตร 20 L และ นำไป Centrifuge 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสของน้ำมะเกี๋ยง (สีแดง) วัดค่าได้ pH 2.9 ± 0.2 มีค่าความหวาน 1.90 ± 0.1 °Brix มีค่าความเป็นกรด 0.85% และ มีปริมาณฟีนอลิก 40 ± 0.2 mg/L โดยจะต้องเก็บ น้ำมะเกี๋ยงให้พ้นแสง โดยใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท และ ปิดผนึกด้วย ฟลอยด์ทึบ ซึ่งจะเก็บ stock ที่อุณหภูมิ -20 °C หากต้องการนำตัวอย่างน้ำมะเกี๋ยงนำไปใช้ในการทดลอง ให้ทำการตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนน้ำแข็งละลาย และ นำไปใช้ในการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.1.2 การเตรียมเม็ดปิด

เตรียมสารละลาย 2% อัลจิเนต ปริมาตร 200 mL (สำหรับทำเม็ดปิด) และ 0.1 % อัลจิเนต (สำหรับเคลือบเม็ดปิดชั้นคู่) กวนสารละลายด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 80 rpm โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 °C พักให้เย็นตัวลงในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที และ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนสังเกตได้ว่า ไม่มีฟองอากาศของสารละลาย นำสารละลาย 2% อัลจิเนต หยด ผ่านเข็มขนาด 0.9 mm (20G needle sterilized) ลงใน สารละลาย 0.15 M Calcium chloride (CaCl_2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 mL ทำการกวนเบาๆ ด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 40 rpm ที่อุณหภูมิห้อง โดยให้ปลายเข็มจะต้องห่างจากสารละลาย 10 cm ใช้ความเร็วในการหยดสารละลาย 5 mL/min ทิ้งไว้ ให้เม็ดปิดแข็งตัว 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างเม็ดปิดใน

สารละลาย 0.85% Sodium chloride (NaCl) เป็นเวลา 10 นาที จะได้เม็ดบีด 2%Al (ตารางที่ 1) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 mm

3.1.1.3 การเคลือบอัลจินเตบีดด้วยวัสดุพอลิเมอร์ชนิดต่างกัน

3.1.1.3.1 การเคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นเดียว

ทำการเตรียมสารละลาย 0.2% เจลาติน หรือ สารละลาย 0.2% คัปปาคาราจีแนน ปริมาตร 200 mL กวนสารละลาย ด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 60 rpm และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 20 นาที สารละลายมีลักษณะผสมเข้าด้วยกันเป็นสารละลายสีใส จากนั้นพักให้เย็นตัวลง ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที นำอัลจินเตบีดชนิด 2% Al ที่เตรียมได้ ใส่ลงในสารละลาย 0.2% เจลาติน หรือ สารละลาย 0.2% คัปปาคาราจีแนนในอัตราส่วน 50 g/100 mL ทำการเขย่าขวดสารละลาย ด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองเม็ดบีดออก และ ล้างเม็ดบีดด้วยสารละลาย 0.85%NaCl ในอัตราส่วน 50 g/100 mL ซึ่งจะล้างเม็ดบีดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นจะได้เม็ดบีดที่เคลือบด้วย เจลาติน หรือ คัปปาคาราจีแนนชั้นเดียว คือ เม็ดบีดชนิด ACG และ ACC (ตารางที่ 1) ซึ่งจะได้ขนาดของเม็ดบีด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 – 3 mm

3.1.1.3.2 การเคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นคู่

นำเม็ดบีดที่เคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นเดียว ทำการเคลือบด้วย สารละลาย 0.1% อัลจินเต ในอัตราส่วน 50 g/100 mL ทำการเขย่าขวดสารละลาย ด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองเม็ดบีดออก และ ล้างเม็ดบีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 50 g/100 mL ซึ่งจะล้างเม็ดบีดทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้น นำเม็ดบีดที่เคลือบด้วยสารละลายอัลจินเต ใส่ลงใน สารละลาย 0.2%เจลาติน หรือ สารละลาย 0.2% คัปปาคาราจีแนนในอัตราส่วน 50 g/100 mL ทำการเขย่าขวดสารละลาย ด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองเม็ดบีดออก และ ล้างเม็ดบีดด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ในอัตราส่วน 50 g/100 mL ซึ่งจะล้างเม็ดบีดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นจะได้เม็ดบีดที่เคลือบด้วย เจลาติน หรือ คัปปาคาราจีแนน ชั้นคู่ คือ ACGD และ ACCD (ตารางที่ 1) จะได้ขนาดของเม็ดบีด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 – 3 mm ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเม็ดบีดในการทดลองจะได้ เม็ดบีดชนิดที่แตกต่างกันทั้งหมด 5 ชนิด

ตารางที่ 1 สารละลายที่ใช้ในการเตรียมเม็ดบีตแต่ละชนิด

	Type of beads	Abbreviation
1	2% w/v Alginate bead	2% Al
2	2% w/v Alginate bead, coating: 0.2% w/v gelatin	ACG
3	2% w/v Alginate bead, coating: 0.2% w/v kappa carrageenan	ACC
4	2% w/v Alginate bead, coating: 0.2% w/v gelatin - double coating 0.1% w/v alginate-0.2% w/v gelatin	ACGD
5	2% w/v Alginate bead, coating: 0.2% w/v kappa carrageenan - double coating 0.1% w/v alginate-0.2% w/v kappa carrageenan	ACCD

2% Al = 2%อัลจิเนตบีต

ACG = อัลจิเนตบีตเคลือบเจลาตินชั้นเดียว

ACC = อัลจิเนตบีตเคลือบคัปปาการาจีแนนชั้นเดียว

ACGD = อัลจิเนตบีตเคลือบเจลาตินชั้นคู่

ACCD = อัลจิเนตบีตเคลือบคัปปาการาจีแนนชั้นคู่

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกจากเมี่ยงหมัก ประยุกต์จากวิธีของ Haghshenas et al. (2017) และ Chang et al. (2010)

นำเมี่ยงหมัก ชั่งน้ำหนัก 25 g ใส่ลงในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 225 mL ตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย stomacher ใช้ความแรง 230 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใส ปริมาตร 1 mL นำมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ซึ่งจะใช้วิธีการทำ serial dilution และ เลือก สารละลายเจือจางที่เหมาะสม มา spread plate บนอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar) ที่ เติม 1% CaCO₃ หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เข้าไปใน anaerobic jar และ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ทำการแยกโคโลนี เดียวที่เกิดรอบวงใสมาตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยทดสอบการติดสีของผนังเซลล์ (ภาคผนวก ค. 2) และ ทดสอบการสร้างคะตะเลส (ภาคผนวก ค.3) ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียได้จากการติดสี ผนังเซลล์ เป็นสี crystal violet หรือ สีม่วงน้ำเงิน มีรูปร่างเป็นแท่ง ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะต้องมีคุณสมบัติที่ สร้างเอนไซม์คะตะเลส หรือ ไม่เกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ให้ผลเป็น (-) จะได้แบคทีเรีย ที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียที่มี ศักยภาพเป็นโปรไบโอติก



3.2.2 การทดสอบแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก ประยุกต์จากวิธีของ Lee et al. (2016) และ Somashekaraiah et al. (2019)

3.2.2.1 การทดสอบสภาวะกรด และ น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

เตรียมสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 mL เติม 0.3% pepsin และ ปรับให้มีค่า pH 2 และ 3 โดยใช้ 1N Hydrochloric (HCl) หรือ 1N Sodium chloride (NaOH) ในการปรับ pH จากนั้นนำเซลล์ แขนวลอยของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จาก ข้อ 3.2.1 ปรับให้มีจำนวน เชื้อ 10⁸ CFU/mL (ภาคผนวก ค.1) ปริมาตร 1 mL ในสารละลายในสภาวะเลียนแบบกระเพาะ อาหาร pH 2 และ 3 ผสมกัน และ นำหลอดไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นับจำนวน เชื้อที่เหลือรอดโดยดูด MRS broth ที่มีเชื้อ มา 1 mL จะเจือจางเชื้อ ด้วย 0.85% NaCl ซึ่งจะใช้ วิธีการทำ serial dilution เลือกสารละลายเจือจางที่เหมาะสม และ นำมา spread plate บนจาน อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เข้าไปใน anaerobic jar และ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดชีวิตของ เชื้อแบคทีเรีย สามารถคำนวณได้ตามสมการที่ 5 (ภาคผนวก ค.4) โดยต้องมีจำนวนเชื้อเหลือรอด

มากกว่า หรือเท่ากับ 60% จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนสภาวะเปลี่ยนแปลงในกระเพาะอาหาร (pH 2 และ 3) มาทดสอบประสิทธิภาพการทนต่อเกลือในขั้นตอนถัดไป

3.2.2.2 การทนต่อเกลือน้ำดี

เตรียมสารละลายเกลือน้ำดีด้วย 0.3% bile salt และ 0.3% oxgall ผสมกับ MRS broth ปริมาตร 10 mL ปรับค่า pH 8 เติมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จาก ข้อ 3.2.2.1 โดยมีความเข้มข้นของเชื้อเริ่ม 10^8 CFU/mL ปริมาตร 1 mL (ภาคผนวก ค.1) หลังจากนั้นนำหลอดไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดโดย ดูด MRS broth มา 1 mL เจือจางเชื้อ ด้วย 0.85% NaCl ซึ่งจะใช้วิธีการทำ serial dilution เลือกลำละลายเจือจางที่เหมาะสม และ นำมา spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เข้าไปใน anaerobic jar และ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ คำนวณเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย สามารถคำนวณได้ตามสมการที่ 5 (ภาคผนวก ค.4) โดยต้องมีจำนวนเชื้อเหลือรอดมากกว่า หรือเท่ากับ 60% จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทนสภาวะเกลือน้ำดีมาทดลองในขั้นตอนถัดไป

3.2.2.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ประยุกต์จากวิธีของ Karimi et al. (2018) โดยใช้แบคทีเรีย สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. enteritidis* และ *B. cereus* เตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 10^6 CFU/mL (ภาคผนวก ค.1) เพื่อใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป ซึ่งการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียโดยจะใช้วิธี Agar disc diffusion โดยใช้ cotton swab จุ่มแบคทีเรียที่เตรียมไว้ นำมาป้ายให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) จากนั้น นำแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก จากข้อ 3.2.2.2 เตรียมเชื้อ ตามภาคผนวก ค.1 นำมาปั่นเหวี่ยงเซลล์ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C และ ปิเปต เฉพาะ supernatant 20 μ l หยดลงบน paper disk ปลอดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ปล่อยให้แห้งก่อนวางลงบนอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งขนาดของรอบวงใส (clear zone) และ รายงานผลเป็นประสิทธิภาพการยับยั้งโดยคำนวณ ได้ตามสมการที่ 6 (ภาคผนวก ค.5)

3.2.2.4 การจำแนกเชื้อโดยวิธี 16S rRNA sequencing ประยุกต์จากวิธีของ Lee et al. (2016) และ Somashekaraiyah et al. (2019)

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกซึ่งผ่านการทดสอบคุณสมบัติ โพรไบโอติก ที่คัดเลือกได้จากเมี่ยงหมักมาทำการสกัด DNA (ตามภาคผนวก ค.6) เพิ่มจำนวนยีนส์ เป้าหมาย คือ 16S ribosomal RNA โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI เลือกโหมด GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง หรือความ เหมือน (% identity) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากเมี่ยงหมัก กับ ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกใน ฐานข้อมูล GenBank จะสามารถทราบถึงสายพันธุ์ที่แน่นอน (ภาคผนวก ค.6) โดยจะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสามารถ ทนสภาวะกรด และ น้ำย่อยใน กระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือ น้ำดี และ มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค นำมาทดสอบ การทนในสภาวะน้ำมะเขีง (เซลล์อิสระ) ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 การทนในสภาวะน้ำมะเขีง ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก และ แบคทีเรียโพรไบโอติก กลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ ประยุกต์จากวิธีของ Nualkaekul et al. (2013)

นำน้ำมะเขีง pH 2.9 ± 0.2 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วย filter membrane ขนาด 0.2 micron ปริมาตรหลอดละ 10 mL จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอย ของแบคทีเรีย จากการ ทดลองที่ 3.2.2.4 และ แบคทีเรียโพรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ซึ่งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเมื่อ เติมลงในน้ำมะเขีง เท่ากับ 10^8 CFU/mL (ภาคผนวก ค.1) ใช้ปริมาตรของเชื้อชนิดละ 1 mL ผสม ในน้ำมะเขีง 10 mL ปิดฝาหลอดที่มิดชิด และห่อหุ้มหลอดด้วยฟลอยด์ทึบ จากนั้นเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 °C โดยให้พ้นแสง ซึ่งจะทำให้การสุมตัวอย่างใน เวลาที่ 0, 2, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยการ วัดค่ากรดในน้ำมะเขีง รายงานผลเป็น เปอร์เซ็นต์กรดซิตริก ด้วยวิธี Titratable acidity (ภาคผนวก ข.2) และ นำหลอดน้ำมะเขีงที่มีเชื้อ ดูด มา 1 mL เจือจางเชื้อ ด้วย 0.85% NaCl ซึ่ง จะใช้วิธีการทำ serial dilution เลือกสารละลายเจือจางที่เหมาะสม และ นำมา spread plate บน จานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เข้าไปใน anaerobic jar และ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิต โดย รายงานผลเป็น \log_{10} CFU/mL ซึ่งจะคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถทนต่อ ในสภาวะน้ำมะเขีง

ได้ดี โดยคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อ สมการที่ 7 (ภาคผนวก ค.8) และ คัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มละ 1 สายพันธุ์ มาทำการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูล ที่ทำการเตรียมได้ในการทดลองที่ 3.2.5

3.2.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิดระหว่างเก็บรักษาในน้ำมะเขี๋ยง

3.2.4.1 การแทรกซึมของแอนโธไซยานินเข้าเม็ดปิด ประยุกต์จากวิธีของ Puguan et al. (2015) และ Jiapong and Sudarat (2012)

ซังเม็ดปิด แต่ละชนิด จากตารางที่ 1 น้ำหนัก 1 g ลงใน ฟลากร์ขนาด 50 mL โดยจะซังเม็ดปิดแต่ละชนิด แยกฟลากร์ ชนิดละ 13 ฟลากร์ แต่ละฟลากร์ เติมน้ำมะเขี๋ยงลงไป ปริมาตร 10 mL หลังจากนั้น นำฟลากร์ทั้งหมดไป เขย่าด้วยเครื่อง shaking incubator ความเร็ว 70 rpm ที่ อุณหภูมิ 4 °C เก็บตัวอย่างน้ำมะเขี๋ยง ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 , 50, 60, 80, 100, 120 และ 140 นาที นำน้ำมะเขี๋ยงแต่ละตัวอย่างไปวัดค่าปริมาณทั้งหมดของแอนโธไซยานิน โดยใช้วิธี pH-differential method คำนวณปริมาณแอนโธไซยานินในน้ำมะเขี๋ยง ได้ตามสมการที่ 2 และ สมการที่ 3 (ภาคผนวก ข.3) หลังจากนั้น คำนวณปริมาณแอนโธไซยานิน ในเม็ดปิด ตามสมการที่ 4 (ภาคผนวก ข.3)

3.2.4.2 การวัดค่าความเปลี่ยนแปลงของเม็ดปิด ประยุกต์จากวิธีของ Abdallah et al. (2018), Liu et al. (2002), Rasel and Hasan (2012) Nualkaekul et al. (2013), Moraes et al. (2012) และ Sanyer et al. (2020)

เตรียมสภาวะในการทดสอบ ได้แก่ น้ำมะเขี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 ทำการฆ่าเชื้อ และเตรียมใส่หลอดละ 10 mL จากนั้นใส่เม็ดปิด ที่เตรียมได้ จากตารางที่ 1 ซังน้ำหนักเม็ดปิด 1 g ลงในหลอด ปิดหลอดให้สนิท และ หุ้มหลอดด้วยฟลอยด์ทึบ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C นำตัวอย่างแต่ละหลอด ที่เวลา 0, 1, 7, 14, 21 และ 30 วัน กรองเม็ดปิดแต่ละตัวอย่าง ทำการวัดค่าต่างๆ ได้แก่ ค่า pH (ภาคผนวก ข.1) ขนาดของเม็ดปิด ค่าความแข็ง (ภาคผนวก ก.2) และ วัดค่าสี (ภาคผนวก ก.1) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดปิดโดยใช้เครื่องมือ Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (ภาคผนวก ก.4) ประกอบกับ วิเคราะห์ลักษณะ สัณฐานวิทยา ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field Emission Scanning Electron Microscopes (FE-SEM) (ภาคผนวก ก.3) จากนั้นเปรียบเทียบเม็ดปิดก่อน และ หลัง การกักเก็บในน้ำมะเขี๋ยง ซึ่งสามารถอธิบายกลไกการเสื่อมสภาพ และ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมี และ ทางกายภาพของเม็ดปิด

3.2.5 การทนในสภาวะน้ำมะเกี๋ยงของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก และแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูลแต่ละชนิด ประยุกต์จากวิธีของ Nualkaekul et al. (2013)

ทำการเตรียม สารละลาย 2% อัลจิเนต โดยชั่งอัลจิเนต 1 g ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 40 mL กวนสารละลาย ด้วย magnetic stirrer ความเร็ว 60 rpm และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นพักให้เย็นตัวลงที่อ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลอง ที่ 3.2.3 กลุ่มละ 1 สายพันธุ์เตรียมโดยมีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/mL (ภาคผนวก ค.1) นำสารแขวนลอยของเชื้อ ปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันกับสารละลายอัลจิเนตที่เตรียมไว้ และ นำไปทำให้เป็นเม็ดบีด ทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งทำการเตรียมได้จาก วิธีการเตรียมเม็ดบีด (ตามตารางที่ 1) หลังจากนั้น นำเม็ดบีดแต่ละชนิด ชั่ง 1 g และ ใส่ลงในหลอดน้ำมะเกี๋ยง 10 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย filter membrane 0.2 ไมครอน ปิดฝาหลอดมิดชิด และ ห่อหุ้มหลอดด้วยฟลอยด์ทึบ จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ซึ่ง จะทำการสุ่มตัวอย่างใน เวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดย วัดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดชีวิตในเม็ดบีด (ภาคผนวก ค.7) โดยรายงานผลเป็น \log_{10} CFU/g และ คำนวณอัตราการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย สมการที่ 7 (ภาคผนวก ค.8)

3.2.6 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

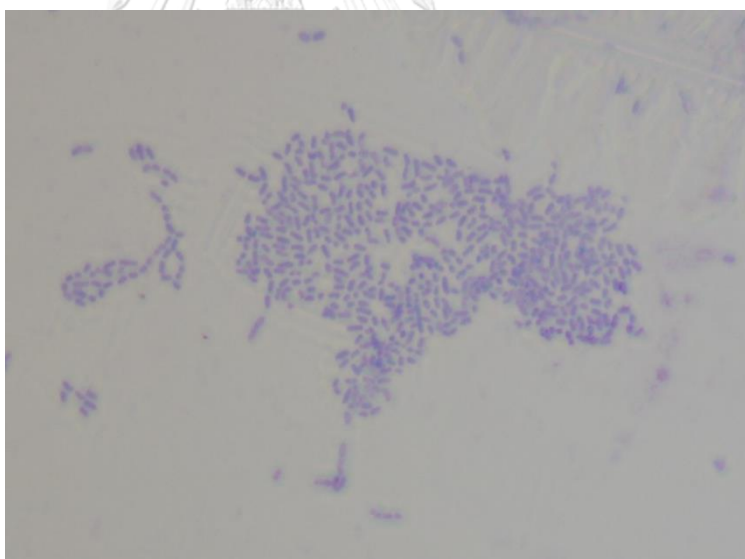
ออกแบบการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ใช้การประมวลผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages For The Social Science, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, Released 2013, Armonk, NY: IBM Corp.) วิเคราะห์ค่าแปรปรวน (Analysis of variance; One-way ANOVA) ใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ ทุกการทดลอง ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำต่อชุดตัวอย่าง

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากเมี่ยงหมัก

จากตัวอย่างเมี่ยงหมัก สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก (LAB-MF) ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท เนื่องจากเกิดการสร้าง รอบวงใส (clear zone) ตามตารางที่ 1 หลังจากนั้นเมื่อทำการย้อมแกรมดูการติดสีของผนังเซลล์ พบว่า LAB-MF จำนวน 21 ไอโซเลท ติดสีของ crystal violet ซึ่งมีสีน้ำเงิน ม่วง และมีรูปร่างเป็นแท่ง ตามรูปที่ 9 และ เมื่อนำแบคทีเรีย ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบว่า แบคทีเรีย 21 ไอโซเลท สร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งให้ผลเป็น (-) แต่เนื่องจากต้องการ แบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดน้อย จึงทำการคัดเลือก แบคทีเรีย ที่มีขนาดรอบวงใส ให้ผลเป็น (+) ซึ่งสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) นำไปทำการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 9 ภาพตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า แสดงการติดสี crystal violet ที่ผนังเซลล์ และ รูปร่างของแบคทีเรีย

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก ความสามารถในการติดสีแกรม และ ความสามารถในการสร้าง catalase

ไอโซเลท	ขนาดของ รอบวงใส Clear zone	Gram stain	ไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์
LAB-MF 103	+	+	-
LAB-MF 104	+	+	-
LAB-MF 105	+	+	-
LAB-MF 108	+	+	-
LAB-MF 109	++	+	-
LAB-MF 110	++	+	-
LAB-MF 111	++	+	-
LAB-MF 112	+	+	-
LAB-MF 114	+	+	-
LAB-MF 117	+	+	-
LAB-MF 119	+	+	-
LAB-MF 120	+	+	-
LAB-MF 121	+	+	-
LAB-MF 123	+	+	-
LAB-MF 124	+	+	-
LAB-MF 125	++	+	-
LAB-MF 126	++	+	-
LAB-MF 127	++	+	-
LAB-MF 128	+	+	-
LAB-MF 129	+	+	-
LAB-MF 130	+	+	-

วิเคราะห์ผล ขนาดของ Clear Zone : 8-10 mm ให้ผลเป็น (+), 11-15 mm ให้ผลเป็น (++) และ ถ้าหากไม่พบ clear zone ให้ผลเป็น (-)

Gram stain : (+) ผนังเซลล์แบคทีเรียติดสี crystal violet และ (-) ผนังเซลล์แบคทีเรียติดสี Safranin

ปฏิกิริยา ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ : (+) เกิดปฏิกิริยาฟองก๊าซ, (-) ไม่เกิดปฏิกิริยาฟองก๊าซ

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก

4.2.1 การทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ 15 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะความเป็นกรดที่ pH 2 พบว่า มีจำนวน 15 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดมากกว่าหรือเท่ากับ 60% และ มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL โดยพบว่า ไอโซเลท LAB-MF 105 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 89.11% เช่นเดียวกับ การทดสอบที่ pH 3 โดยไอโซเลท LAB-MF 105 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 95.57% ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) ไปทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.2.2 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

จากการนำแบคทีเรียแลคติกข้อ 4.2.1 จำนวน 15 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.30% w/v พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 60% และ มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL และพบว่าเชื้อ LAB-MF 105 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 80.32% จึงทำการคัดเลือกเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลท (ตารางที่ 4) ไปทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค

จากการนำแบคทีเรียแลคติกข้อ 4.2.2 จำนวน 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 1311, *S. enteritidis* DMST 15676, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 6633 ได้ทั้ง 6 ไอโซเลท โดยมีขนาดของรอบวงใสการยับยั้ง อยู่ระหว่าง 5.33-15.35 mm (ตารางที่ 5) จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค นำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเมี่ยงหมักเป็นจำนวน 15 ไอโซเลทในสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ไอโซเลท	การอยู่รอดของเชื้อ ที่ pH 2 (%)	การอยู่รอดของเชื้อ ที่ pH 3 (%)
LAB-MF 103	62.90±3.2	75.76±3.7
LAB-MF 104	70.21±2.4	81.78±2.1
LAB-MF 105	89.11±1.4	95.57±2.5
LAB-MF 108	80.89±1.5	91.21±1.7
LAB-MF 112	82.11±2.6	90.65±2.3
LAB-MF 114	64.33±1.3	78.32±3.1
LAB-MF 117	73.51±1.4	84.31±2.0
LAB-MF 119	70.93±2.6	80.45±1.2
LAB-MF 120	64.21±1.5	70.32±1.0
LAB-MF 121	69.08±1.3	75.21±1.2
LAB-MF 123	68.44±2.6	77.23±1.3
LAB-MF 124	83.54±2.1	90.65±2.1
LAB-MF 128	79.23±1.3	89.89±1.4
LAB-MF 129	72.90±1.1	82.34±1.2
LAB-MF 130	75.95±1.3	84.77±1.3

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเมี่ยงหมักจำนวน 15 ไอโซเลท ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 % w/v, pH 8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ไอโซเลท	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
LAB-MF 103	54.23±1.4
LAB-MF 104	52.99±1.2
LAB-MF 105	80.32±1.5
LAB-MF 108	70.34±2.0
LAB-MF 112	73.09±1.4
LAB-MF 114	46.45±2.5
LAB-MF 117	70.89±2.2
LAB-MF 119	53.21±1.5
LAB-MF 120	52.05±2.1
LAB-MF 121	43.23±1.6
LAB-MF 123	55.57±2.4
LAB-MF 124	73.34±1.8
LAB-MF 128	65.05±1.4
LAB-MF 129	52.23±1.1
LAB-MF 130	41.03±1.7

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ขนาดของวงใสการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (mm)									
	<i>E.coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>B. cereus</i>	
	ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 1311	DMST 15676	ATCC 6633					
LAB-MF 105	15.35±1.2	12.33±1.7	10.78±2.1	13.54±2.1	11.20±1.3					
LAB-MF 108	10.34±1.5	13.85±1.0	8.21±2.6	14.21±2.5	15.21±2.6					
LAB-MF 112	10.65±2.4	10.33±1.3	5.33±2.2	7.21±1.1	9.78±2.3					
LAB-MF 117	11.45±1.5	12.87±2.2	8.32±2.5	9.24±2.2	10.32±1.5					
LAB-MF 124	14.65±1.7	9.43±1.8	13.84±1.4	13.10±2.3	10.43±2.1					
LAB-MF 128	8.34±2.2	10.43±2.6	10.32±1.7	14.76±1.3	12.44±1.9					

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.4 ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก

เมื่อทำการสกัดเชื้อ DNA ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจำนวน 6 ไอโซเลท พบว่ามีความเข้มข้นของเชื้อ 20 ng/ μ L มีขนาด ประมาณ 160 bp (ภาคผนวก ค.6) ซึ่งเป็นขนาดที่สามารถ นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ เนื่องจาก ปริมาณของ DNA ที่สามารถสกัดได้ ขึ้นแถบ DNA บน Agarose gel (ภาคผนวก ค.6) ซึ่งหลังจากนำ PCR product ที่ได้ ทำการ DNA Sequencing จะพบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง หรือความเหมือน (% identity) ซึ่งพบว่า แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 รหัสเชื้อไอโซเลท LAB-MF แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่จำแนกด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ DNA และ เปรียบเทียบความเหมือนทางสายพันธุ์ใน GenBank

ไอโซเลท	แบคทีเรียอ้างอิงในฐานข้อมูล	Identity %
LAB-MF 105	<i>Lactobacillus plantarum</i> KC 332	98.09%
LAB-MF 108	<i>Lactobacillus plantarum</i> HBUAS 52314	100%
LAB-MF 112	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain SLDL-287	99.36%
LAB-MF 117	<i>Lactobacillus plantarum</i> PB 23	100%
LAB-MF 124	<i>Lactobacillus plantarum</i> LB 11	98.10%
LAB-MF 128	<i>Lactobacillus plantarum</i> partial	99.35%

จากการที่นำแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก มาทดสอบคุณสมบัติที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกมาทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่การทดสอบการทนต่อสภาพเลียนแบบในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมจำนวน และ ชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร เพราะแบคทีเรียส่วนใหญ่จะไม่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด หรือมีค่า pH ที่ต่ำ ซึ่งสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดอย่างรุนแรงของกระเพาะอาหารนั้นจะเป็นผลร้ายต่อเซลล์แบคทีเรีย (Jin et al., 1998) ดังนั้นการคัดแยกจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ให้ก่อประโยชน์ ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดนี้ ตลอดจนจะต้องสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Holzapfel et al., 1998) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้

จากเมื่อยงหมัก สามารถทนได้ในสภาวะจำลองน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่ pH 2 และ pH 3 โดยมีจำนวนที่สูงกว่า 60% ทั้ง 2 สภาวะ โดยยังมีปริมาณเชื้อรอดชีวิต ที่ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/mL ซึ่งในปริมาณนี้ เป็นปริมาณของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เพียงพอ และ เหมาะสมต่อร่างกายของมนุษย์ ที่จะเกิดผลที่ดีต่อสุขภาพ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Erkkilä and Petäjä (2000) ที่ทำการทดสอบการทนต่อกรด โดยทำการทดลองในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารโดยใช้สารละลาย phosphate buffer saline ที่มีค่า pH 1-5 และ พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactidi* (P2) สามารถที่จะรอดชีวิตได้ในสภาวะ ที่ pH 3 และ นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ยังมีประสิทธิภาพที่มีการทนกรดที่แตกต่างกัน โดยสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gilliland (1979) ซึ่งได้รายงานไว้ว่า การทนกรดในกระเพาะอาหารของแบคทีเรียแลคติกในสายพันธุ์ชนิดต่างๆกัน ซึ่งได้แก่ *L. casei* สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ คือสามารถอยู่รอดในสภาวะสารละลาย gastric juice สังเคราะห์ pH 3 ที่อุณหภูมิ 37 °C ในส่วนของเชื้อ สายพันธุ์ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* สามารถทนทานต่อกรดได้ดีเช่นเดียวกันอีกด้วย

ซึ่งเมื่อนำแบคทีเรียที่สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้แล้ว จึงนำมาทดสอบการทนต่อสภาวะเกลื่อน้ำดี โดยมี เกลื่อน้ำดีอยู่ 0.3% เนื่องจากในร่างกายมนุษย์มีความเข้มข้นของเกลื่อน้ำดีอยู่ 0.15-0.3% (Erkkilä and Petäjä, 2000) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า นำแบคทีเรียที่เหลือรอดในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร คัดเลือกได้ 15 ไอโซเลท และ นำมาทดสอบในสภาวะการทนต่อเกลื่อน้ำดี โดยพบว่า มีเพียง 6 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อเกลื่อน้ำดีได้โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการเหลือรอดมากกว่า 60% และ ยังมีปริมาณเชื้อเหลือรอดชีวิต ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/mL ทั้งนี้ การเหลือรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์กับการหลั่งของเกลื่อน้ำดีในลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะเป็นแหล่งที่โปรไบโอติกแบคทีเรียที่จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และ สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Erkkilä and Petäjä (2000) ที่ทำการทดสอบการทนต่อเกลื่อน้ำดี โดยเตรียมแบบจำลองสภาวะทางเดินอาหารภายในลำไส้เล็ก ซึ่งใช้ MRS broth มีค่า pH 4-7 ผสมเกลื่อน้ำดี ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.30 และ นักวิจัยได้พบว่า *L. sake* (RM10) และ *P. acidilactidi* (p2) สามารถทนต่อเกลื่อน้ำดีได้ เนื่องจากเชื้อที่สามารถทนต่อเกลื่อน้ำดีได้นั้น สร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) ซึ่งการสร้างนี้แสดงถึง ความสามารถในการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกระหว่าง โปรไบโอติกเดินทางมายังระบบทางเดินอาหารนั้นขึ้นอยู่กับความทนทานต่อเกลื่อน้ำดี (Gilliland et al., 1984)

ซึ่งนอกจากแบคทีเรียจะทนต่อเกลือแร่ได้แล้ว แบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ (Spelhaug and Harlander, 1989) ดังนั้นสารอินทรีย์จำพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติกที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นมา จึงมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ในวงกว้าง ซึ่งการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นนั้น อันเนื่องมาจาก แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก) ได้ในปริมาณที่มาก ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ ยังมีการยับยั้ง เนื่องจากสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากขึ้น ซึ่งกรดแลคติก และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสามารถยับยั้งเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ แกรมลบได้ โดยจะมีกลไกการยับยั้งคือ การแพร่เข้าของกรดอินทรีย์ในไซโตพลาสซึม ซึ่งจะทำให้ pH ในไซโตพลาสซึมลดลง และมีสภาพเป็นกรด ส่งผลให้การทำงานของเซลล์หยุดการทำงาน อันเนื่องมาจาก ค่า pH ในไซโตพลาสซึมลดลง และ ยังมีสภาพที่มีความเป็นกรด จึงส่งผลทำให้ การทำงานหรือระบบกลไกต่างๆของเซลล์แบคทีเรียหยุดการทำงานลง เนื่องจากมีค่า pH ไม่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ต่างๆในระบบ (Podolak et al., 1996)

โดยเมื่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากเมี่ยงหมัก มีคุณสมบัติที่สามารถเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ โดยจากผลการทดลองจะพบแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* ในเมี่ยงหมัก โดยที่จากการเปรียบเทียบใน GenBank พบว่ามีความเหมือน หรือคล้ายคลึงกัน 98-100% ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการทดลองของ Sarker et al. (2010) ที่พบแบคทีเรียโปรไบโอติก สายพันธุ์ *L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *B. subtilis* ที่มีชีวิตอยู่รอดในสภาวะใบชาหมัก ซึ่ง ใบชาเมี่ยงนั้น มีแทนนินจำนวนมากซึ่งถือเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเมี่ยงจึงเป็นที่สนใจในการศึกษา เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และ หากทำการคัดแยกแบคทีเรียในเมี่ยงหมักได้ ก็จะได้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก และสามารถทนต่อสภาวะความเครียด เช่น กรด และ ฟีนอลิกได้ ซึ่งสามารถคัดแยกสายพันธุ์นั้นๆไปใช้งานต่อได้ในอุตสาหกรรม (Khanongnuch et al., 2017)

4.3 การทนในสภาวะน้ำมะเขีง ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF และ แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ

จากผลการ คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากเมี่ยงหมัก จำนวน 6 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับ แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF 6 ไอโซเลท มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ซึ่ง จากการวัดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำมะเขีง pH 2.9 ± 0.2 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท LAB-MF 105 มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL (รูปที่ 11)

แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 2074, *L. acidophilus* TISTR 2365, *L. salivarias* TISTR 1112, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. casei* TISTR 1340 และ *L. paracasei* ATCC 393 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยพบว่า *L. plantarum* TISTR 2074 และ จะไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่ง *L. acidophilus* TISTR 2365, *L. reuteri* ATCC 23272 และ *L. salivarias* TISTR 1112 จะมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL เพียง 4 ชั่วโมงแรก และยังคงมีการลดลงของจำนวนเชื้อเรื่อยๆ *L. acidophilus* TISTR 2365 จะตายลงหลังจากผ่านไป 16 ชั่วโมง แต่ *L. reuteri* ATCC 23272 และ *L. salivarias* TISTR 1112 จะไม่มีชีวิตเหลือรอดหลังจาก 10 ชั่วโมง ซึ่ง *L. casei* TISTR 1340 และ *L. paracasei* ATCC 393 จะมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/mL ในเวลา 10 ชั่วโมง และ จะมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือเพียง 10^3 CFU/mL และ 10^4 CFU/mL ตามลำดับ (รูปที่ 10)

เมื่อทำการเปรียบเทียบ เพอร์เซ็นต์อัตราการลดลงของแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ จะพบว่า ในเวลา 24 ชั่วโมง *L. plantarum* TISTR 2074 มีอัตราการลดลงน้อยที่สุด คือ 61.41 % ซึ่ง *L. acidophilus* TISTR 2365 มีอัตราการลดลงของเชื้อ 69.98% ที่มากกว่า *L. plantarum* TISTR 2074 ในขณะที่ โปรไบโอติก สายพันธุ์อื่นๆ มีอัตราการลดลงของเชื้อ 100%

แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF พบว่า แบคทีเรีย *L. plantarum* MF 105 มีอัตราการลดลงของเชื่อน้อยที่สุด คือ 20.10% ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ จะ มีอัตราการลดลงของเชื้อ มากกว่า ไอโซเลท *L. plantarum* MF 105 อยู่ที่ 34.89-85.97% ตาม

ตารางที่ 9 ซึ่งชนิดของน้ำผลไม้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการอยู่รอดของเซลล์โปรไบโอติก เนื่องจากผลไม้บางชนิดมีสารประกอบที่ทำให้เซลล์ตาย ซึ่งรายงานการศึกษาวิจัยของ Shori (2016) นำน้ำผลไม้สตอเบอร์รี่ สับปะรด กีวี และ แครนเบอร์รี่ เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก และ พบว่า น้ำผลไม้เหล่านี้จะทำให้ลดความสามารถในการมีชีวิตของโปรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษาน้ำผลไม้ ซึ่งน้ำแครนเบอร์รี่ มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกมากที่สุด เนื่องจาก pH ต่ำมากของน้ำผลไม้ (pH 2.50) ซึ่ง มีค่า pH ที่ต่ำกว่าน้ำมะเขีงในการทดลอง แต่น้ำแครนเบอร์รี่ มีน้ำตาล 13 g/ 100 mL ค่าความหวานอยู่ที่ 12-15 °Brix (Nualkaekul et al., 2013) ในขณะที่ น้ำมะเขีงมีค่าความหวานเพียง 1.90 ± 0.1 °Brix ซึ่งการที่เติมน้ำตาลในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้ จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่รอดได้นาน การที่ทดสอบความทนของโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus sp.* 6 สายพันธุ์ และ แบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากเมียงหมัก ในน้ำมะเขีง เป็นไปได้ว่า ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้มีจำนวนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจาก น้ำมะเขีงที่ทำการเตรียมในการทดลองนี้ ไม่ได้มีการเติมน้ำตาล หรือสารอาหารอื่นๆเพิ่มเติม และ พบว่าสายพันธุ์ของโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus sp.* มีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน เนื่องจากโปรไบโอติกบางชนิดสามารถเผาผลาญกรดซิตริกได้ และ เส้นใยสามารถป้องกัน เซลล์โปรไบโอติกจากความเสียหายที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมในสภาวะที่ทำให้โปรไบโอติกเกิดความเครียด เนื่องจากโปรไบโอติกสามารถยึดติดกับ พอลิแซ็กคาไรด์ได้ (Costa et al., 2017) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำผลไม้มีความสัมพันธ์กับ การเหลือรอดชีวิตของโปรไบโอติกเป็นหลัก ทั้งนี้โปรตีน และ โยอาหารสามารถปกป้องเซลล์จากความเครียดที่มีสภาวะความเป็นกรด บทบาทของกรดซิตริก และ กรดมาลิก เป็นเรื่องที่ขัดแย้งกัน เนื่องจากดูเหมือนว่าจะสามารถปกป้องเซลล์โปรไบโอติกได้ ในขณะที่ฟีนอลิกอาจทำให้เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (Perricone et al., 2015)

อีกสาเหตุที่ทำให้โปรไบโอติกตาย อันมาจากการขาดโปรตีน ดังที่ Nualkaekul et al. (2011) รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ความเข้มข้นขั้นต่ำ ของโปรตีนเพื่อรักษาความสามารถในการมีชีวิตของโปรไบโอติกคือ 0.3% การเลือกสายพันธุ์ที่จะใช้ใ้ในน้ำผลไม้ก็มีความสำคัญ เนื่องจากสายพันธุ์ที่ทนต่อกรด และ ออกซิเจนมีความแตกต่างกัน *Lactobacillus sp.* โดยทั่วไปมีความทนทานมากกว่า สายพันธุ์อื่นๆ และ มีชีวิตอยู่ได้ในน้ำผลไม้ที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.7 ถึง 4.3 ในทางกลับกัน *Bifidobacterium* มีความทนทานต่อกรดน้อยกว่า และ pH ประมาณ 4.6 เป็นอันตรายต่อเซลล์ จึงเป็นสาเหตุที่ควรเลือกใช้สายพันธุ์ *Lactobacillus sp.* ทำการทดลองการทนต่อในสภาวะน้ำมะเขีงมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่ง *L.plantarum* TISTR 2074 สามารถทนต่อในสภาวะน้ำมะเขีงได้

มากที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Perricone et al. (2015) พบว่า *L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *L. casei* สามารถเติบโตได้ในเมทริกซ์ผลไม้เนื่องจากความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด

แต่เมื่อเซลล์โปรไบโอติกอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่า pH ต่ำ ต่ำกว่า pH 4.5 จำเป็นต้องใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้นเพื่อรักษาค่า pH ภายในเซลล์ ส่งผลให้ขาดอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (ATP) สำหรับการทำงานที่สำคัญอื่นๆ และ ด้วยเหตุนี้ทำให้เซลล์ตาย (Nualkaekul et al., 2011)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงผลอัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติก ในน้ำมะเขีงที่ pH ต่ำ และไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นาน จากรายงานวิจัยพบว่า ค่า pH ต่ำของน้ำผลไม้ชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 3.7 (Nualkaekul et al., 2011) และ จะมีผลต่อความสามารถในการมีชีวิตรอดของโปรไบโอติก (Nualkaekul et al., 2011) ซึ่งน้ำมะเขีงมีค่า pH ที่อยู่ใน pH 2.9 ± 0.2 และ ค่าความเป็นกรดที่สูงนี้จึง ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของโปรไบโอติกลดลง

นอกจากสภาวะความเป็นกรดสูงในน้ำมะเขีง ยังมีปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย คือ สารประกอบฟีนอลิก เป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของจุลินทรีย์ ซึ่งในน้ำมะเขีง มีสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด ได้แก่ ประกอบด้วยกรดแกลลิก (35.34 ± 17.31 mg / 100 g ของน้ำหนักแห้ง) คาเทชิน (346.55 ± 12.02 mg / 100 g ของน้ำหนักแห้ง) และ รุติน (104.68 ± 14.64 mg / 100 g น้ำหนักแห้ง) (Poontawee et al., 2016) จึงเป็นไปได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ทำให้เชื้อตาย แต่ น้ำมะเขีงในการทดลองไม่ได้มีการเติมน้ำตาล เชื้อจุลินทรีย์จึงมีจำนวนที่ลดลงได้อย่างช้าๆ ตามระยะเวลา ไม่ได้ทำให้เซลล์ตายในทันที ในนาที่ 0 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์อาจใช้สารประกอบฟีนอลิกในน้ำมะเขีงแทนน้ำตาล เป็นอาหาร เพื่อรักษาระดับความอยู่รอดของเซลล์

โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Nualkaekul and Charalampopoulos (2011) พบว่าโปรไบโอติกมีความสามารถในการรอดชีวิตได้ต่ำมากในน้ำผลไม้ ประกอบกับการทดลองของการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ส่วนใหญ่ในเยื่อของผลไม้ Red pitaya ที่เข้าสู่กระบวนการหมักโดย *L. acidophilus* LA-05 หรือ *B. lactis* BB-12 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น กรดฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ อาจใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ metabolism ของจุลินทรีย์ Morais et al. (2019)

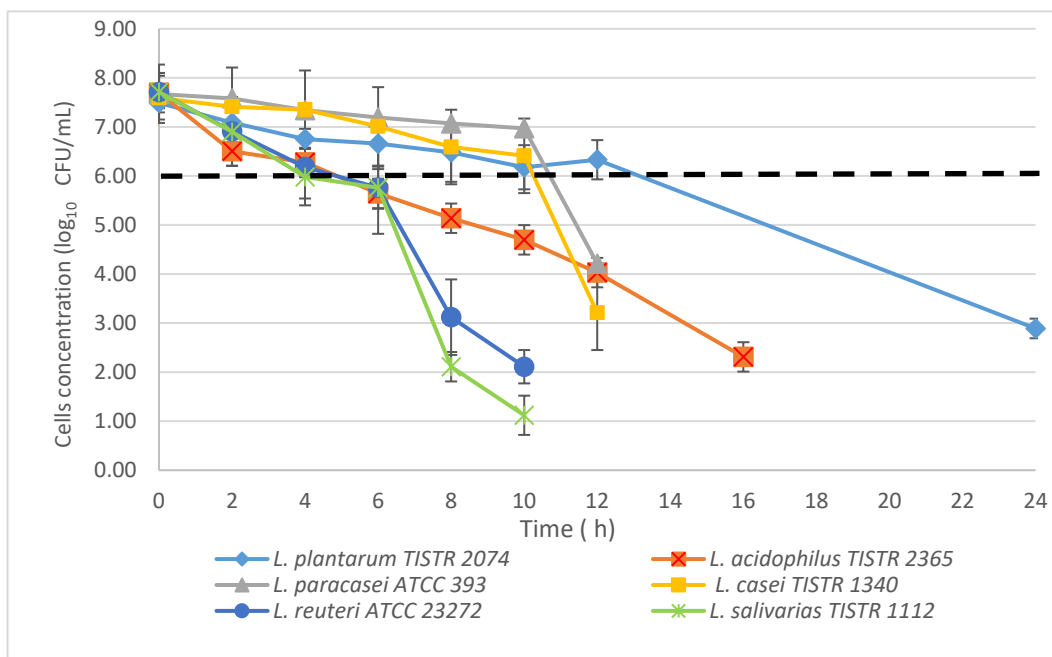
Hashemi et al. (2017) ประเมินอิทธิพลของ *L. plantarum* LS5 ในน้ำมะนาวหวาน และ สังเกตเห็นการลดลงของสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดหลังจาก 48 ชั่วโมงของการบ่มอุณหภูมิ

37 °C ซึ่งสอดคล้องกับ Campanella et al. (2017) รายงานการลดลงของสารประกอบฟีนอลิก ในอุณหภูมิหลังการหมักโดย *L. plantarum* 12A, *L. paracasei* 14A และ *B. breve* 15A ซึ่งแนะนำว่า แบคทีเรียเหล่านี้ใช้ฟีนอลบางชนิดในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การลดลงของปริมาณ ฟีนอลิก ที่ตรวจพบได้ ซึ่งเป็นอย่างแน่นอนว่า แบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก จาก รูปที่ 10 และ แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็น โพรไบโอติก รูปที่ 11 แม้ว่าในน้ำมะเกี๋ยง ค่าความหวานวัดได้เพียง 1.90 ± 0.1 °Brix แต่ยังคงมีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ จุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มนี้จึงใช้ฟีนอลิก เป็นอาหารในการที่จะมีชีวิตอยู่รอดในน้ำมะเกี๋ยง

จุลินทรีย์ที่สามารถทนในสภาวะในน้ำมะเกี๋ยงได้ เหมาะสมต่อการนำไปเสริมผลิตภัณฑ์ น้ำผลไม้ชนิดอื่นๆ ที่มีสารประกอบฟีนอลิกเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาวิจัยด้วยฟีนอลิก ที่สกัดจาก เปลือกแอปเปิ้ล แสดงให้เห็นว่าในคุณสมบัติการยึดเกาะของ *Lactobacillus* sp. ซึ่งบ่งชี้ว่าสารเหล่านี้อาจส่งเสริมการยึดเกาะของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ต่อร่างกาย หรือ จุลินทรีย์ในลำไส้ (Volstatova et al., 2017) และ ยังเกิดจากการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Papadimitriou et al., 2015) ในทางกลับกัน สารประกอบฟีนอลิก ที่ไม่ถูกดูดซึมภายในเซลล์ อาจถูกแปลงโดย microbiota ให้อยู่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์มากขึ้น และ ทำให้เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ (Cheng et al., 2016)

จากการรายงานผลการทดลองของ Tantratian and Balmuang (2021) ทำการสกัดสาร ฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยงพบว่า มีฟีนอลิกประเภท catechin ที่ปริมาณมากที่สุด คือ 467.16 mg/L ซึ่ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Poontawee et al. (2016) ทำการทดลอง และ พบว่า ฟีนอลิกในน้ำมะเกี๋ยงที่พบ คือ catechin มีปริมาณ 346.55 mg/L และ เมียงหมัก ก็ยังพบ คาเทชิน ที่เป็นสารประกอบหลักด้วยเช่นกัน จึงเป็นสาเหตุทำให้ยังคงมีแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ที่ยังมีชีวิตอยู่ในเมียงหมัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการ ที่พบว่า *L. plantarum* ใช้เติมลงในกระบวนการหมักเมียง (Ketwal et al., 2014) จึงสามารถคัดแยกเชื้อเหล่านั้นออกมาได้ จากการทดลอง เมื่อแบคทีเรีย สามารถเจริญเติบโต และมีชีวิตอยู่รอดได้ในเมียงที่มีสารประกอบ ฟีนอลิก คาเทชิน (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2560) เมื่อ เซลล์โพรไบโอติก อยู่ในสภาวะน้ำมะเกี๋ยงที่มีคาเทชิน แบคทีเรียเหล่านั้นจึงใช้คาเทชินเป็นแหล่งอาหารหลัก เป็นสาเหตุ ที่ว่า กลุ่ม *Lactobacillus* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ จะมีช่วงอายุที่สั้นกว่า แบคทีเรียที่มีศักยภาพ เป็นโพรไบโอติก ที่คัดแยกได้จากเมียงหมัก (LAB-MF)

ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 2074 และแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก ไอโซเลท *L. plantarum* MF 105 ที่สามารถทนในสภาวะน้ำมะเกี๋ยงได้ดี ไปทำการห่อหุ้มเซลล์เพื่อยืดอายุแบคทีเรียให้เก็บได้ในน้ำมะเกี๋ยงได้นานขึ้น



รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก กลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 สายพันธุ์ ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

--- แสดงถึงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/mL หรือ g ซึ่งเป็นจำนวนเชื้อที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาจนถึงผู้บริโภค

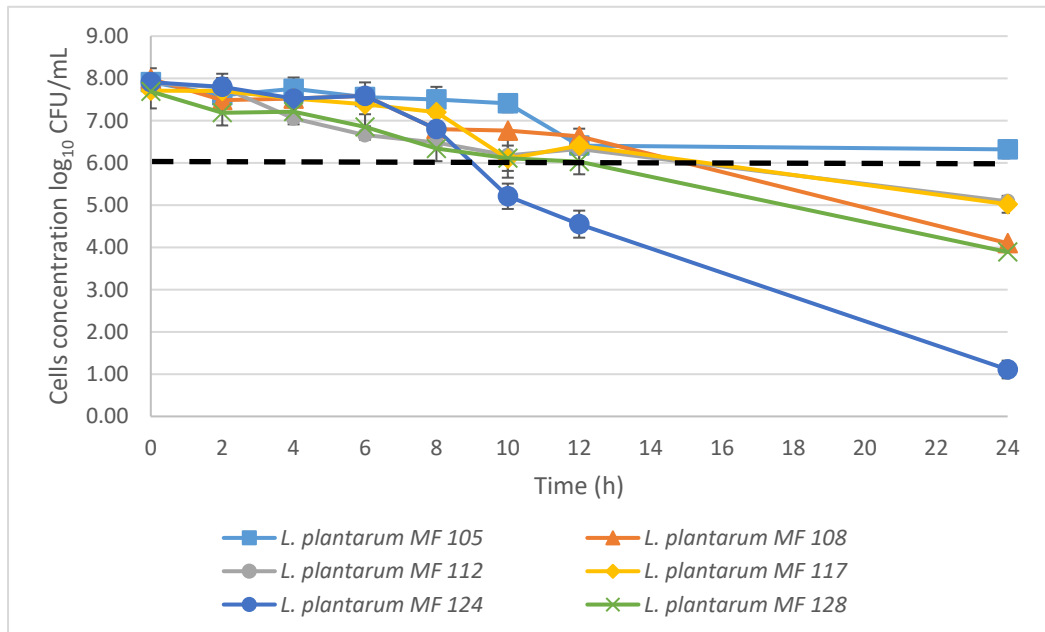
ตารางที่ 7 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์(%) ของแบคทีเรียไปรโอโตคอกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 สายพันธุ์ ในน้ำมะเขียง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C

Strain	Percentage (%) reduction of <i>Lactobacillus</i> sp. (free cell) viability							
	0	2	4	6	8	10	12	24
<i>L. plantarum</i> TISTR 2074	0.00	5.38	9.84	11.09	13.47	17.53	15.48	61.41
<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	0.00	15.49	21.85	31.56	33.24	38.96	47.64	69.98
<i>L. paracasei</i> ATCC 393	0.00	1.17	4.30	6.26	7.82	9.13	45.11	100.00
<i>L. casei</i> TISTR 1340	0.00	2.37	3.16	7.64	13.18	15.55	57.71	100.00
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	0.00	10.38	19.84	25.29	59.53	72.63	100.00	100.00
<i>L. salivarias</i> TISTR 1112	0.00	10.51	22.44	25.29	72.63	85.47	100.00	100.00

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดซิตริกในน้ำมะเข็ญ หลังจากแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. เกิดกระบวนการหมักในน้ำมะเข็ญ pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C

Strain	% Acidity (citric acid) in makiang juice									
	0	2	4	6	8	10	12	24		
Control	0.86±0.32	0.86±0.21	0.85±0.14	0.84±0.12	0.86±0.13	0.86±0.21	0.83±0.11	0.86±0.13		
<i>L. plantarum</i> TISTR 2074	0.85±0.35	1.02±0.43	1.02±0.34	1.09±0.43	1.02±0.31	1.02±0.32	1.02±0.43	1.10±0.15		
<i>L. acidophilus</i> TISTR 2365	0.86±0.46	1.02±0.23	1.15±0.65	1.15±0.27	1.09±0.24	1.09±0.31	1.09±0.32	1.30±0.32		
<i>L. reuteri</i> ATCC 23272	0.83±0.23	1.02±0.33	1.09±0.24	1.09±0.22	1.22±0.33	1.22±0.23	1.30±0.24	1.30±0.24		
<i>L. salivarius</i> TISTR 1112	0.86±0.25	1.02±0.23	1.04±0.35	1.02±0.46	1.22±0.34	1.22±0.35	1.30±0.21	1.30±0.32		
<i>L. paracasei</i> ATCC 393	0.85±0.13	1.02±0.14	1.04±0.46	1.02±0.31	1.15±0.21	1.15±0.32	1.20±0.22	1.30±0.35		
<i>L. casei</i> TISTR 1340	0.84±0.45	1.02±0.03	1.04±0.32	1.02±0.36	1.09±0.23	1.09±0.31	1.20±0.12	1.40±0.32		

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ของแบคทีเรีย *L. plantarum* MF คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก และมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 ไอโซเลท ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

--- แสดงถึงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/mL หรือ g ซึ่งเป็นจำนวนเชื้อที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาจนถึงผู้บริโภค

ตารางที่ 9 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF ที่เป็นเซลล์อิสระ จำนวน 6 ไอโซเลท ใน น้ำมะเขียง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C

Isolate	Percentage (%) reduction of <i>L. plantarum</i> MF (free cell) viability								
	0	2	4	6	8	10	12	24	
<i>L. plantarum</i> MF 105	0.00	3.92	2.00	4.44	5.18	6.32	18.96	20.10	
<i>L. plantarum</i> MF 108	0.00	6.29	5.86	5.06	14.88	15.33	17.01	48.68	
<i>L. plantarum</i> MF 112	0.00	1.31	10.62	15.61	17.87	21.72	19.77	35.49	
<i>L. plantarum</i> MF 117	0.00	0.13	2.45	4.21	6.61	20.88	16.86	34.89	
<i>L. plantarum</i> MF 124	0.00	1.39	4.92	4.11	14.03	34.13	42.48	85.97	
<i>L. plantarum</i> MF 128	0.00	6.55	6.21	10.91	17.55	20.54	21.58	49.41	

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของกรดซิตริกในน้ำมะเขือ หลังจากแบคทีเรีย *L. plantarum* MF เกิดกระบวนการหมัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C

Isolate	% Acidity (citric acid) in makiang juice										
	Time (h)										
	0	2	4	6	8	10	12	24			
Control	0.84±0.12	0.82±0.14	0.81±0.23	0.84±0.23	0.87±0.43	0.85±0.24	0.86±0.43	0.86±0.21			
<i>L. plantarum</i> MF 105	0.84±0.34	0.93±0.23	0.89±0.23	0.90±0.20	1.03±0.33	1.01±0.38	1.03±0.45	1.01±0.42			
<i>L. plantarum</i> MF 108	0.86±0.42	0.90±0.31	0.91±0.43	1.00±0.42	1.00±0.21	1.15±0.42	1.15±0.41	1.15±0.32			
<i>L. plantarum</i> MF 112	0.86±0.25	0.90±0.23	1.09±0.36	1.00±0.35	1.00±0.32	1.10±0.34	1.10±0.35	1.10±0.34			
<i>L. plantarum</i> MF 117	0.82±0.43	1.02±0.21	1.04±0.34	1.02±0.47	1.00±0.23	1.00±0.32	1.11±0.43	1.12±0.44			
<i>L. plantarum</i> MF 124	0.86±0.24	1.02±0.35	1.04±0.37	1.02±0.39	1.15±0.22	1.12±0.24	1.16±0.17	1.11±0.35			
<i>L. plantarum</i> MF 128	0.86±0.21	1.03±0.43	1.01±0.40	1.02±0.48	1.03±0.14	1.01±0.32	1.03±0.34	1.03±0.31			

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดได้นาน เนื่องจากกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนกรด โดยพบว่า แบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. มียีนส์ที่หลากหลายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ซึ่งมียีนส์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องนั้น จะหยุดทำงานเมื่อเกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูงมาก แบคทีเรียจะเริ่มมีการปรับตัว และ เริ่มเตรียมความพร้อมในการต้านทานสภาพดังกล่าว กลไกเหล่านี้ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ในไซโตพลาสซึมเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะกรด (Nualkaekul et al., 2011) โดยปกติแล้ว แบคทีเรียจะมีค่าบัฟเฟอร์ เพื่อรักษาระดับความคงตัวของค่า pH ให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพที่มีความเป็นกรด ซึ่งสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. จะมีการปรับตัวด้วยการปล่อยให้ pH ภายในเซลล์ลดลงตามค่า pH ภายนอกเซลล์ (Siegumfeldt et al., 2000) ซึ่งในการทดลองนั้น ความเป็นกรดในน้ำมะเขีง แสดงให้เห็นว่า โปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มีการ ผลิตรกรดที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8 และ 10) ตามระยะเวลาต่างๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบ *L. plantarum* TISTR 2074 กับสายพันธุ์อื่นๆ จะพบว่า *L. plantarum* TISTR 2074 สามารถทนสภาวะความเป็นกรดได้ดี มีการผลิตรกรดได้น้อย ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกัน แม้ว่า LAB-MF บางไอโซเลทที่สามารถผลิตรกรดได้มากกว่า *L. plantarum* TISTR 2074 แต่ยังคงมีอัตราการลดลงของเขื่อน้อยกว่า *L. plantarum* TISTR 2074 เนื่องจาก การทนกรดของ *L. plantarum* MF สามารถทนกรดได้ pH 3.8 (ตามสภาวะเมียงหมัก) แต่ *L. plantarum* TISTR 2074 จะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อ pH ภายในเซลล์ มีค่าลดต่ำลง จนถึง pH 4.6-4.8 (McDonald et al., 1990) ซึ่งมีความสามารถทนกรดได้น้อยกว่าแบคทีเรียกลุ่ม *L. plantarum* MF

นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกส่วนมากจะมีการปรับตัวในสภาวะ ที่มีความเป็นกรดสูง โดยจะเลือกวิธีที่ใช้พลังงาน ATP น้อย และ ยังมี อีก 1 ระบบ ได้แก่ระบบ Glutamate Decarboxylation ซึ่งเป็นกระบวนการ เปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตาเมท ให้เป็น GABA Gad มีหน้าที่สำคัญในการต้าน สภาวะที่เป็นกรดภายนอกเซลล์ และ เปลี่ยนกลูตาเมทให้เป็น GABA ที่มีความเป็นกรดที่ต่ำเพื่อที่จะลดสภาวะความเป็นกรด (Cotter et al., 2001; Huang et al., 2007) ถ้านำแบคทีเรียโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. เปรียบเทียบกับ แบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก จะเห็นได้ว่า เชื้อแบคทีเรีย LAB-MF 105 สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า *L. plantarum* TISTR 2074 และ *L. plantarum* MF ไอโซเลทอื่นๆ เนื่องจาก *L. plantarum* MF 105 มีการผลิตรกรดได้น้อย ส่งผลทำให้น้ำมะเขีงมีกรดที่เพิ่มขึ้นได้ช้ากว่า *L. plantarum* MF 105 ถึงแม้ว่า จะมีการปรับกระบวนการปรับตัว เช่นเดียวกันกับ *L. plantarum* MF ไอโซเลทอื่นๆ แต่

L. plantarum MF 105 จะสามารถทนสภาวะความเป็นกรดได้มากกว่า *L. plantarum* MF ไอโซเลทอื่นๆ ระบบการปรับตัวของเชื้อ คือ กระบวนการ ADI (Arena et al., 1999) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการปรับตัวของแบคทีเรียให้รอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด จากผลการทดลองแบคทีเรีย *L. plantarum* MF จึงมีชีวิตรอดได้ในเมี่ยงหมักที่มีสภาวะความเป็นกรดเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการศึกษาจะพบว่า กระบวนการ ADI มีความเข้มข้น แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ แบคทีเรียที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่า pH แตกต่างกันอีกด้วย ซึ่ง *L. plantarum* เป็น แบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative (Arena et al., 1999) โดยมีรายงานว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้เมื่อทำการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์หมักดองที่มีแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ จะไม่มีระบบการสลาย arginine แต่ในขณะเดียวกันแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากส้ม จะพบระบบ ADI ซึ่ง ส้มที่มีสภาวะที่ใกล้เคียงกับ เมี่ยงหมัก จึงทำให้ระบบ ADI ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากเมี่ยงหมักจึงทำงานได้ดีเช่นเดียวกัน ดังนั้น แบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากใบเมี่ยงหมัก ไอโซเลท *L. plantarum* MF 105 และ แบคทีเรียโพรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 2074 จึงเหมาะสมที่นำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

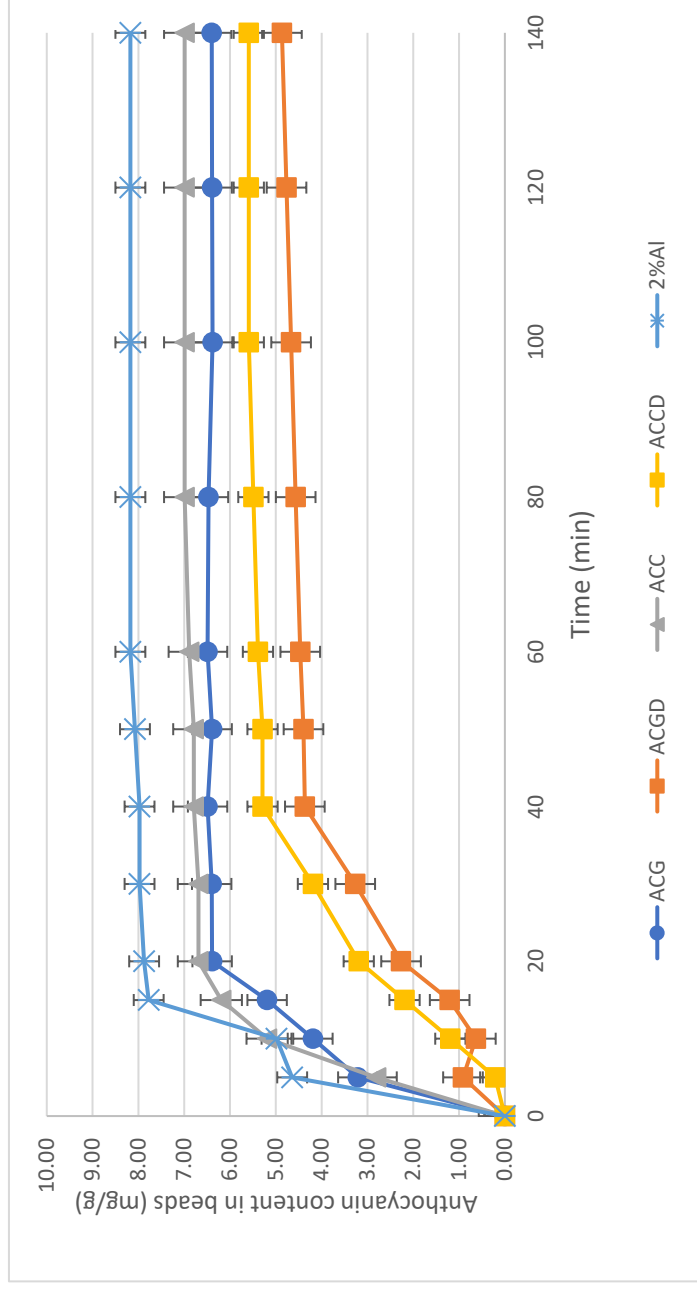
4.4 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิดระหว่างเก็บรักษาในน้ำมะเขี๋ยง

4.4.1 การแทรกซึมของแอนโธไซยานินเข้าเม็ดปิด

เมื่อคำนวณปริมาณแอนโธไซยานิน เป็นองค์ประกอบในน้ำมะเขี๋ยง หลังจากการแช่เม็ดปิดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 140 นาที พบว่าเม็ดปิด ชนิด 2% Al เริ่มนาที่ที่ 0 มีค่าปริมาณแอนโธไซยานินในเม็ดปิด 0 mg/g และเวลา 15 นาที จนถึงเวลา 140 นาที มีค่าอยู่ในช่วง 7.77 ± 0.45 mg/g ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่งปริมาณแอนโธไซยานินจะซึมเข้าสู่เม็ดปิด 2% Al ตั้งแต่ 15 นาทีแรก (รูปที่ 12) จึงทำการนำพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ มาปกป้องอัลจินเตปิดให้การซึมของน้ำมะเขี๋ยงเข้าไปในเม็ดปิดได้อย่างช้าๆ ซึ่งพบว่า หลังจากแช่เม็ดปิดชนิด ACG ในน้ำมะเขี๋ยง ซึ่งเริ่มนาที่ที่ 0 จะมีปริมาณแอนโธไซยานิน 0 mg/g และเวลา 20 นาที จนถึงเวลา 140 นาที มีค่าปริมาณแอนโธไซยานินที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.39 ± 0.32 mg/g และ เมื่อนำเม็ดปิด ACGD แช่ในน้ำมะเขี๋ยง เริ่มทำการวัดค่าปริมาณแอนโธไซยานิน ในนาที่ที่ 0 จะมีค่า 0 mg/g และเวลา 40 นาที จนถึงเวลา 140 นาที มีปริมาณแอนโธไซยานินในเม็ดปิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง 4.36 ± 0.59 mg/g

ในขณะเดียวกัน หลังจากแช่เม็ดปิด ACC ในน้ำมะเขี๋ยง ปริมาณแอนโธไซยานินในเม็ดปิดในนาที่ที่ 0 มีค่า 0 mg/g และเวลา 20 นาที จนถึงเวลา 140 นาที ปริมาณแอนโธไซยานิน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) จะมีค่าอยู่ในช่วง 6.69 ± 0.37 mg/g ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกับ อัลจินเตเคลือบด้วยเจลาตินแบบชั้นคู่ แต่ให้ผลที่ใกล้เคียงกับ ACG จึงปรับปรุงโดยการนำอัลจินเตปิดมาเคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนนชั้นคู่ (ACCD) ผลที่ได้คือ ปริมาณแอนโธไซยานิน ซึ่งเริ่มนาที่ที่ 0 จะมีค่า 0 mg/g และ เวลา 20 นาที จนถึงเวลา 140 นาที มีปริมาณแอนโธไซยานินมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง 5.20 ± 0.44 mg/g

จะสังเกตได้ว่า อัลจินเตปิดที่เคลือบด้วย เจลาติน หรือ คัปปาคาราจีแนนแบบชั้นคู่ (ACGD , ACCD) จะสามารถป้องกันการแทรกซึมของแอนโธไซยานินน้ำมะเขี๋ยงได้มากกว่าเม็ดปิดชนิดอื่นๆ เนื่องจากปริมาณแอนโธไซยานินในเม็ดปิดชนิด ACGD และ ACCD มีปริมาณที่น้อย โดยสรุปค่าได้ ตามตารางที่ 11 ซึ่งจะนำเม็ดปิดแต่ละชนิด เก็บรักษาในน้ำมะเขี๋ยงต่อไปเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ และ การเปลี่ยนแปลงทางสมบัติทางด้านเคมีของเม็ดปิดแต่ละชนิด ในขั้นตอนถัดไป



รูปที่ 12 ปริมาณแอนโธไซยานินของน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 ที่แทรกซิมเข้าเม็ดปิดแต่ละชนิด ในเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 °C

ตารางที่ 11 ค่าคงที่ปริมาณแอนโทไซยานินของน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 ที่แทรกซึมเข้าเม็ดปิดแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Type of beads	Anthocyanin content in beads (mg/g)
2%Al	7.77 ± 0.45^d
ACG	6.39 ± 0.32^c
ACGD	4.36 ± 0.59^a
ACC	6.69 ± 0.37^c
ACCD	5.20 ± 0.44^b

แสดง ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a-d ค่าความแตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันของตาราง แสดงถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในเม็ดปิด

เม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด คือ 2%Al, ACG, ACGD, ACC และ ACCD เริ่มต้น เวลาที่ 0 มีค่า pH 5.86 ± 0.10 ซึ่งมีค่า pH ภายในเม็ดปิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) (จากตารางที่ 12) แต่เมื่อทำการแช่เม็ดปิดในน้ำมะเขีง ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 วัน พบได้ว่า เม็ดปิด 3 ชนิด คือ 2%Al, ACG และ ACC มีค่า pH 4.07 ± 0.14 ซึ่งมีค่า pH ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จาก เวลาที่ 0 และ เมื่อทำการแช่เม็ดปิดทั้ง 3 ชนิดนี้ ในเวลา 2 วัน พบว่า ค่า pH อยู่ในช่วง pH 3.15 ± 0.11 และ ในวันที่ 2 จนถึง วันที่ 14 ไม่พบค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

ซึ่ง อัลจินเตปิดที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชั้นคู่มีค่า pH ที่ลดลงใกล้เคียงกัน โดยพบว่า ACGD และ ACCD มีค่า pH อยู่ในช่วง pH 4.45 ± 0.06 ซึ่งในวันที่ 2 ค่า pH ของเม็ดปิด ทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังมี ค่า pH ที่ลดลง ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.49 ± 0.10 และ พบว่า ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 14 ค่า pH มีค่า คงตัว และ ไม่มีค่า pH ในเม็ดปิดที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

แสดงให้เห็นว่า การเคลือบอัลจินเตด้วยวัสดุพอลิเมอร์แบบชั้นคู่ จะมีความสามารถทำให้ค่า pH ของเม็ดปิด ลดลงได้อย่างช้าๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12) ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดที่มีค่า pH เปลี่ยนแปลงไปในวันที่ 1 และ ลดลงจนถึงวันที่ 2 และ วันที่ 3 ในขณะที่ การแทรกซึมของแอนโธไซยานินในน้ำมะเขีง เข้าเม็ดปิดได้ในเวลาที่ 15-40 นาที รูปที่ 12 และ เม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณแอนโธไซยานินที่แตกต่างกัน ตารางที่ 9 ซึ่งเป็นที่แน่นอนว่า แอนโธไซยานินมีอัตราการแพร่เข้าไปในเม็ดปิดได้รวดเร็วกว่ากรด

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของ pH ในเม็ดบีดแต่ละชนิดหลังจากแช่ในน้ำมะเขือ pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 4°C

Type of beads	pH in beads													
	Storage time (Day)													
Control	0	1	2	3	4	5	6	7	14	14	14	14	14	14
2% Al	6.37 ± 0.15^a	5.86 ± 0.10^a	4.00 ± 0.16^a	3.18 ± 0.08^a	3.15 ± 0.13^a	2.90 ± 0.11^a	2.90 ± 0.17^a	2.91 ± 0.06^a	2.90 ± 0.04^a					
ACG	6.27 ± 0.13^a	5.81 ± 0.14^a	4.07 ± 0.14^a	3.19 ± 0.14^a	3.13 ± 0.09^a	3.10 ± 0.09^a	3.16 ± 0.12^a	3.13 ± 0.09^a	3.10 ± 0.06^a					
ACGD	6.22 ± 0.10^a	5.81 ± 0.11^a	4.45 ± 0.06^b	3.49 ± 0.10^b	3.18 ± 0.08^a	3.03 ± 0.15^a	3.03 ± 0.05^a	3.03 ± 0.05^a	3.00 ± 0.10^a					
ACC	6.35 ± 0.16^a	5.83 ± 0.12^a	4.04 ± 0.16^a	3.15 ± 0.11^a	3.13 ± 0.11^a	3.04 ± 0.06^a	3.04 ± 0.10^a	3.05 ± 0.06^a	3.04 ± 0.11^a					
ACCD	6.21 ± 0.11^a	5.82 ± 0.14^a	4.40 ± 0.11^b	3.45 ± 0.10^b	3.10 ± 0.12^a	3.00 ± 0.13^a	3.00 ± 0.18^a	3.00 ± 0.04^a	2.90 ± 0.13^a					

แสดงค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a-b ค่าความแตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันของตาราง แสดงถึงมีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.4.3 ค่าความแข็ง และ ขนาดของเม็ดบีด

เม็ดบีด ชนิด 2%Al ในวันที่ 1 ค่าความแข็ง มีค่าอยู่ที่ $22.9 \pm 0.9g$ ซึ่งค่าความแข็งยังไม่ได้มีค่าที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ เม็ดบีด 2% Al control ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 13) ซึ่งจะเริ่มมีค่าความแข็งที่ลดลงเรื่อยๆตั้งแต่วันที่ 7 จนถึง วันที่ 30 จะพบว่า ค่าความแข็ง มีค่า $14.1 \pm 0.6g$

หากเปรียบเทียบกับ การนำ เจลาติน และ คัปปาคาราจีแนนมาเคลือบเม็ดบีด โดยพบว่า เม็ดบีด ACG, ACGD, ACC และ ACGD มีค่าความแข็งที่เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน เม็ดบีดที่มีการเคลือบ ก็จะมีค่าความแข็งที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เม็ดบีด ACG เริ่มวันที่ 1 มีค่าความแข็ง $29.8 \pm 0.6 g$ และ เริ่มมีค่าความแข็งที่ลดลงเรื่อยๆตั้งแต่วันที่ 7 และ วันที่ 30 พบว่า ค่าความแข็ง มีค่า $20.4 \pm 0.6g$ ซึ่ง มีค่าความแข็งที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ หากพิจารณา เม็ดบีด ACGD เริ่ม วันที่ 1 มีค่าความแข็ง $30.6 \pm 0.5g$ และ มีความเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีความแข็งที่ลดลง ในวันที่ 21 เมื่อสิ้นสุดการแช่เม็ดบีดในน้ำมะเขี๋ยง ในวันที่ 30 จะพบว่า มีค่าความแข็ง $23.0 \pm 0.9 g$ ซึ่ง มีค่าความแข็งที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) หากทำการเปรียบเทียบกับ อัลจิเนตที่เคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนน พบว่า เม็ดบีด ACC เริ่มวันที่ 1 มีค่าความแข็ง $27.6 \pm 0.7g$ และ เริ่มมีค่าความแข็งที่ลดลง ตั้งแต่วันที่ 7 และ วันที่ 30 มีค่าความแข็ง $19.9 \pm 0.7 g$ แต่ความคงตัวของเม็ดบีดจะมีประสิทธิภาพดีมากยิ่งขึ้นเมื่อทำการเคลือบคัปปาคาราจีแนนชั้นคู่ ซึ่งจะพบว่า เม็ดบีด ACCD เริ่มวันที่ 1 มีค่าความแข็ง $28.2 \pm 0.7 g$ ค่าความแข็งลดลงในวันที่ 21 ซึ่งในวันที่ 30 จะพบว่า มีค่าความแข็ง $22.6 \pm 0.9 g$ ซึ่ง เม็ดบีด ACGD และ ACCD มีค่าความแข็งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเก็บเม็ดบีดในน้ำมะเขี๋ยง 30 วัน

หากพิจารณาขนาดของเม็ดบีด ชนิด 2%Al พบว่า เม็ดบีดชนิดนี้ จะมีขนาดเล็กที่สุด (ตารางที่ 14) ซึ่งหากทำการเคลือบเม็ดบีดชั้นเดี่ยว ก็จะมีขนาดที่ใหญ่ขึ้น แม้จะเป็นพอลิเมอร์ที่ต่างชนิดกัน แต่ก็พบว่า ACG และ ACC ในวันที่ 1 มีขนาด $2.8 \pm 0.2 mm$ ไม่ได้มีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่ง ACG และ ACC จะมีขนาดที่เล็กลงในวันที่ 14 และ ในวันที่ 30 วัดขนาดได้ $2.3 \pm 0.2 mm$

แต่เมื่อมีการเคลือบวัสดุพอลิเมอร์แบบชั้นคู่ เม็ดปิดชนิด ACGD และ ACCD วันที่ 1 มีขนาด 3.2 ± 0.2 mm จะพบว่าเม็ดปิดมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดปิด 2%Al, ACG และ ACC แต่หากพิจารณาขนาดที่ลดลงของเม็ดปิด ที่เคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชนิดที่แตกต่างกันจะพบว่า เม็ดปิด ACGD และ ACCD มีขนาดลดลงในวันที่ 21 และ วันที่ 30 ACGD และ ACCD มีขนาด 2.9 ± 0.1 mm ซึ่งมีขนาดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

จากการที่แอนโธไซยานินแพร่เข้าสู่เม็ดปิดชนิด 2 % Al ได้อย่างรวดเร็วมากกว่าเม็ดปิดชนิดอื่นๆ เนื่องจาก การเตรียมเม็ดปิด เริ่มตั้งแต่เม็ดปิด control ตามตารางที่ 14 จะพบว่าเม็ดปิดค่อนข้างมีขนาดเล็ก ซึ่งหากเปรียบเทียบกับเม็ดปิดชนิดที่ทำการเคลือบพอลิเมอร์ชั้นเดี่ยว และการเคลือบพอลิเมอร์ชั้นคู่ จึงทำให้น้ำมะเข็ญแพร่เข้าสู่เม็ดปิดที่ขนาดเล็กนี้ได้อย่างรวดเร็ว มากกว่าเม็ดปิดที่มีขนาดใหญ่กว่า

สอดคล้องกับ Nualkaekul et al. (2013) ที่นำอัลจินเตปิดทำการเคลือบด้วยวัสดุพอลิเมอร์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เคลือบด้วย ไคโตซาน เจลาติน และกลูโคมาแนน โดยพบว่า อัลจินเตที่เคลือบด้วยวัสดุพอลิเมอร์ชั้นคู่ จะมีเม็ดปิดที่ขนาดใหญ่กว่า เคลือบแบบชั้นเดี่ยว และ เม็ดปิดที่ไม่เคลือบผิว และ อัลจินเตที่มีขนาดเล็กจะทำให้เม็ดปิดเสื่อมสภาพได้เร็วขึ้นเช่นกัน

ซึ่งค่าความแข็งที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเก็บรักษา ก็จะส่งผลต่อขนาดของเม็ดปิดที่จะมีขนาดเล็กลงเพราะเกิดการหดตัวลงเรื่อยๆของเม็ดปิด ประกอบกับ ค่า pH ของเม็ดปิด ตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่า เม็ดปิดจะมีค่า pH ที่ลดลงเรื่อยๆ ค่า pH ในเม็ดปิดที่เปลี่ยนแปลงไปนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เม็ดปิดเกิดความเสื่อมสภาพ อันเนื่องมาจากน้ำมะเข็ญที่มีองค์ประกอบเป็นกรดซिटริก เมื่ออัลจินเตอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงมากจนมีค่า pKa ต่ำกว่า β -D-mannuronic acid และ α -L-guluronic acid (3.6 และ 3.7 ตามลำดับ) จะส่งผลให้อัลจินเตเปลี่ยนเป็นกรดอัลจินิกซึ่งจะไม่มีคุณสมบัติในการจับกับ Ca^{2+} ทำให้เม็ดปิดไม่มีความคงตัว และ โครงสร้างของอัลจินเตปิดเกิดความเสียหายได้อย่างรวดเร็ว (Annan et al., 2008)

ตารางที่ 13 ค่าความแข็งของเม็ดบีด หน่วย (g) หลังจากแช่เม็ดบีดในน้ำมะเขือเทศ pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

Type of beads	Hardness (g)				
	Control	1	7	14	30
2% Al	22.9 ± 0.9 ^a	22.7 ± 0.4 ^a	20.6 ± 0.9 ^a	22.6 ± 0.2 ^a	14.1 ± 0.6 ^a
ACG	29.8 ± 0.6 ^c	29.9 ± 0.5 ^c	26.9 ± 0.8 ^c	25.3 ± 0.8 ^b	20.4 ± 0.6 ^b
ACGD	30.6 ± 0.5 ^c	30.6 ± 1.1 ^c	30.8 ± 1.3 ^d	29.6 ± 0.6 ^c	23.0 ± 0.9 ^c
ACC	27.6 ± 0.7 ^b	26.9 ± 0.9 ^b	24.0 ± 1.5 ^b	23.8 ± 0.6 ^a	19.9 ± 0.7 ^b
ACCD	28.2 ± 0.7 ^{bc}	27.8 ± 1.2 ^{bc}	26.7 ± 1.2 ^c	25.6 ± 1.1 ^b	22.6 ± 0.9 ^c

แสดง ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a-d ค่าความแตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันของตาราง แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 14 ขนาดของเม็ดบีด หน่วย (mm) หลังจากแช่เม็ดบีดในน้ำมะเขือขีng pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

Type of beads	Size (mm)				
	Control	1	7	14	30
2% Al	2.4 ± 0.2 ^a	2.4 ± 0.2 ^a	2.2 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.1 ^a
ACG	2.8 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.3 ^b	2.8 ± 0.3 ^b	2.5 ± 0.3 ^b	2.3 ± 0.2 ^b
ACGD	3.2 ± 0.2 ^c	3.1 ± 0.3 ^c	3.1 ± 0.2 ^c	3.1 ± 0.2 ^c	2.9 ± 0.1 ^c
ACC	2.8 ± 0.2 ^b	2.7 ± 0.3 ^b	2.7 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.3 ^b	2.4 ± 0.2 ^b
ACCD	3.3 ± 0.2 ^c	3.2 ± 0.1 ^c	3.1 ± 0.1 ^c	3.1 ± 0.1 ^c	2.8 ± 0.1 ^c

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a-c ค่าความแตกต่างกันแน่งตั้งแถวเดียวกันของตาราง แสดงถึงมีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

4.4.4 ค่าสีของเม็ดปิด

เม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด เก็บในน้ำมะเกลือเป็นระยะเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยเปรียบเทียบตัวอย่างระหว่างกลุ่ม ที่นำมาวัดค่าสีทุกๆสัปดาห์ จากตารางที่ 15 โดยพิจารณาค่าสีที่สำคัญของเม็ดปิด คือ L^* และ a^* ซึ่ง 2%Al, ACG, ACGD, ACC และ ACCD เริ่มวันที่ 1 มีค่า L^* 49.22 ± 0.2 ($p \geq 0.05$) และมีแนวโน้มว่าเม็ดปิดแต่ละชนิด จะมีค่า L^* ลดลงแตกต่างกันตามระยะเวลาของการเก็บในน้ำมะเกลือ ได้อย่างชัดเจน ในวันที่ 7 เม็ดปิด 2%Al มีค่า L^* 30.55 ± 0.3 และมีค่า L^* ในวันที่ 30 น้อยกว่าเม็ดปิด ชนิดอื่นๆ คือ L^* 20.95 ± 0.7 เนื่องจาก ค่า a^* ของเม็ดปิด 2%Al เริ่มวันที่ 1 มีค่า a^* 40.31 ± 0.3 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วันพบว่า มีค่า a^* 51.31 ± 0.7 ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของสีแดง และ ความสว่างที่ลดลงมากกว่าเม็ดปิดชนิดอื่นๆ

เม็ดปิดที่ถูกเคลือบด้วย เจลาติน และ คัปปาคาราจีแนนชั้นเดียว คือ เม็ดปิดชนิด ACG และ ACC จะพบว่า ค่า L^* และ ค่า a^* มีความเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป เช่นเดียวกับกับเม็ดปิด 2%Al แต่เมื่อทำการแช่เม็ดปิด ACG และ ACC เป็นเวลา 30 วัน จะพบว่าค่า L^* 47.12 ± 0.3 และ ค่า a^* 49.45 ± 0.6 ซึ่งเม็ดปิด ACG และ ACC มีการติดสีแดงให้ผลที่ใกล้เคียงกัน และไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) แต่มีการติดสีแดงที่น้อยกว่า เม็ดปิด 2%Al ($p \leq 0.05$)

ซึ่งเมื่อพิจารณา เม็ดปิดที่เคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นคู่ คือ เม็ดปิดชนิด ACGD และ ACCD จะพบว่า ในวันที่ 7 ACGD มีค่า L^* ลดลงจาก วันที่ 1 แต่ในวันที่ 7-14 ไม่ได้มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) จนถึง วันที่ 30 มีค่า L^* 33.65 ± 0.3 ในขณะที่เดียวกัน ACCD มีค่า L^* เปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 7 ซึ่งมีค่า L^* 36.31 ± 0.5 และ ใน วันที่ 30 ค่า L^* 30.21 ± 0.2 ซึ่งค่า L^* ที่ลดลงนี้ สอดคล้องกับ เริ่มวันที่ 1 ACGD มีค่า a^* 30.42 ± 0.3 และ จะมีค่าเพิ่มขึ้นใน 7 วัน แต่ก็จะมีค่า a^* ที่คงตัวโดยไม่ได้มีค่า a^* ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 14-21 แต่จะมีค่า a^* ที่เพิ่มขึ้นอีกในวันที่ 30 ซึ่งจะมีค่า a^* 38.31 ± 0.6 และ จะเห็นได้ว่า หากเปรียบเทียบกับ ACCD จะพบว่า ในวันที่ 1 มีค่า a^* 32.72 ± 0.2 ซึ่งก็มีความใกล้เคียงกับเม็ดปิดชนิด ACGD แต่ เม็ดปิด ACCD มีค่า a^* ที่เริ่มเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 7 จนถึง วันที่ 30 มีค่า a^* 45.29 ± 0.3 ซึ่ง ACCD ยังมีค่า a^* ที่ มากกว่า ค่า a^* ของ ACGD (ตารางที่ 15)

แม้ว่า ACCD จะมีค่า L^* และ a^* ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 7 แต่ก็ยังมีค่า L^* ที่ลดลง และ การเพิ่มขึ้นของค่า a^* น้อยกว่า ค่า L^* และ ค่า a^* ของ เม็ดปิดชนิด ACG

ACC และ 2%Al ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า b^* ของเม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด เริ่มวันที่ 1 จนถึงวันที่ 30 พบว่า ค่า b^* ค่อนข้างที่จะให้ผลที่ใกล้เคียงกัน คือ มีค่าอยู่ในช่วง $7.59 \pm 0.4 - 10.98 \pm 0.5$ ซึ่งสามารถสังเกตลักษณะภายนอกเม็ดปิด ของการติดสีแดงที่ได้จากแอนโทไซยานินในน้ำมะเขี๋ยง (รูปที่ 13) แม้ว่าเม็ดปิดแต่ละชนิดมีปริมาณแอนโทไซยานินในเม็ดปิดที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) แต่เมื่อทำการเก็บเม็ดปิดทุกชนิด ในน้ำมะเขี๋ยงเป็นเวลานานขึ้นเรื่อยๆ ก็จะทำให้เม็ดปิด มีสีออกแดง มากยิ่งขึ้น และ จะมีแนวโน้มว่า เม็ดปิดจะมีสีแดงเข้ม ซึ่งมีค่า L^* ที่ลดลงเรื่อยๆ (ตารางที่ 15) เนื่องจาก เม็ดปิดเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นที่แน่นอนว่า แอนโทไซยานินในน้ำมะเขี๋ยงมีผล ร่วมกับกรดที่ทำให้เม็ดปิดเสื่อมสภาพ และ มีลักษณะทายกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลา การเก็บรักษา จากผลการทดลองข้างต้นจะพบว่า ACCG และ ACCD มีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดปิด แตกต่างกัน แต่ค่อนข้างที่จะให้ผลการปกป้องเม็ดอัลจินตปิดจากการแพร่ของน้ำมะเขี๋ยงที่ใกล้เคียง กัน

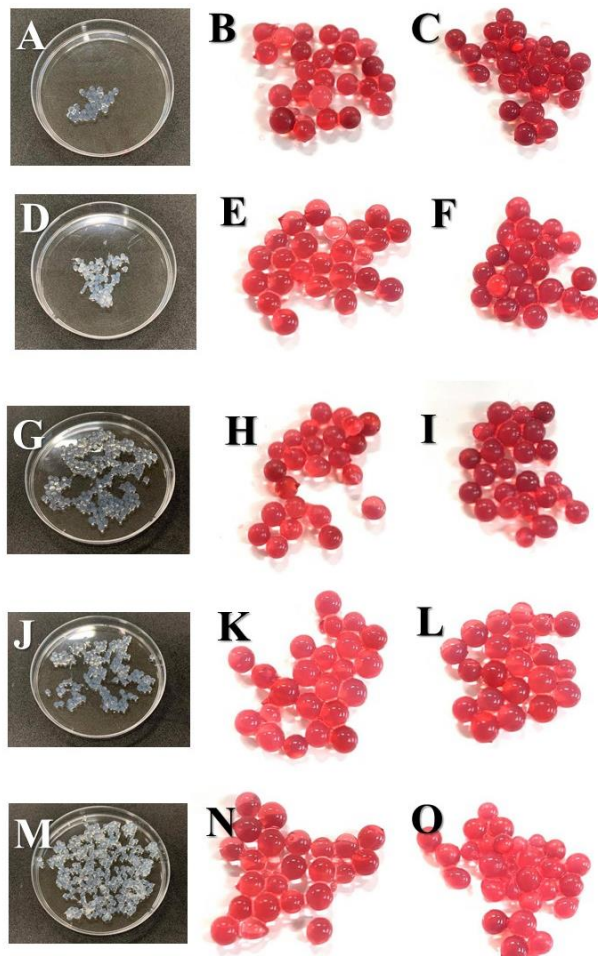


ตารางที่ 15 ค่าสีของเมล็ดปืตหลังจากแช่ในน้ำมะเขือเทศ pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

		Color measurement					
		Storage time (Day)					
Lightness (L*)		Control	1	7	14	21	30
2% Al		60.52 ± 0.3 ^a	45.45 ± 0.2 ^a	30.55 ± 0.3 ^a	26.89 ± 0.3 ^a	22.25 ± 0.5 ^a	20.95 ± 0.7 ^a
ACG		60.55 ± 0.6 ^a	46.95 ± 0.3 ^a	34.53 ± 0.4 ^b	30.33 ± 0.4 ^b	26.51 ± 0.6 ^b	27.76 ± 0.7 ^b
ACGD		60.02 ± 0.3 ^a	49.22 ± 0.2 ^b	39.97 ± 0.6 ^c	38.91 ± 0.5 ^c	36.25 ± 0.7 ^d	33.65 ± 0.3 ^c
ACC		59.99 ± 0.4 ^a	47.12 ± 0.3 ^{ab}	31.43 ± 0.4 ^a	30.49 ± 0.5 ^b	26.85 ± 0.8 ^b	26.33 ± 0.9 ^b
ACCD		59.03 ± 0.7 ^a	47.31 ± 0.4 ^{ab}	36.31 ± 0.5 ^{bc}	31.77 ± 0.6 ^b	30.73 ± 0.9 ^c	30.21 ± 0.2 ^{bc}
Redness (a*)							
2% Al		0.05 ± 0.4 ^a	40.31 ± 0.3 ^c	46.22 ± 0.4 ^c	48.16 ± 0.5 ^c	48.28 ± 0.6 ^c	51.31 ± 0.7 ^d
ACG		0.02 ± 0.5 ^a	32.21 ± 0.5 ^b	38.52 ± 0.3 ^b	42.25 ± 0.2 ^b	44.50 ± 0.5 ^b	49.45 ± 0.6 ^c
ACGD		0.01 ± 0.7 ^a	30.42 ± 0.3 ^a	34.55 ± 0.6 ^a	34.17 ± 0.4 ^a	35.41 ± 0.5 ^a	38.31 ± 0.6 ^a
ACC		0.02 ± 0.6 ^a	33.63 ± 0.5 ^b	39.38 ± 0.6 ^b	42.81 ± 0.7 ^b	44.87 ± 0.8 ^b	48.21 ± 0.9 ^c
ACCD		0.03 ± 0.4 ^a	32.72 ± 0.2 ^b	40.21 ± 0.7 ^b	42.12 ± 0.5 ^b	44.81 ± 0.9 ^b	45.29 ± 0.3 ^b
Yellowness (b*)							
2% Al		0.05 ± 0.3 ^a	7.59 ± 0.4 ^a	8.23 ± 0.5 ^a	8.92 ± 0.6 ^a	10.33 ± 0.7 ^{ab}	11.25 ± 0.8 ^b
ACG		0.06 ± 0.7 ^a	7.39 ± 0.8 ^a	9.46 ± 0.5 ^a	10.48 ± 0.4 ^{ab}	9.51 ± 0.7 ^a	8.92 ± 0.8 ^a
ACGD		0.02 ± 0.5 ^a	7.54 ± 0.2 ^a	9.51 ± 0.5 ^a	9.94 ± 0.4 ^a	9.25 ± 0.5 ^a	9.58 ± 0.2 ^a
ACC		0.04 ± 0.5 ^a	7.47 ± 0.4 ^a	9.49 ± 0.3 ^a	11.22 ± 0.6 ^b	10.98 ± 0.2 ^{ab}	9.92 ± 0.8 ^a
ACCD		0.03 ± 0.7 ^a	7.20 ± 0.6 ^a	10.54 ± 0.5 ^a	13.19 ± 0.7 ^c	11.21 ± 0.7 ^b	10.98 ± 0.5 ^{ab}

แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a-d ค่าความแตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันของตารางในชุด L*, a* และ b* แต่ละชุด แสดงถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



รูปที่ 13 ภาพเม็ดปัด 5 นาที ที่ไม่ผ่านการแช่ (control) และ หลังแช่ในน้ำมะนาว pH 2.9 ± 0.2

เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

(A) 2%Al control (B) 2%Al แช่น้ำมะนาว (Day1)

(C) 2%Al แช่น้ำมะนาว (Day30)

(D) ACG control (E) ACG แช่น้ำมะนาว (Day1) (F) ACG แช่น้ำมะนาว (Day30)

(G) ACC control (H) ACC แช่น้ำมะนาว (Day1) (I) ACC แช่น้ำมะนาว (Day30)

(J) ACGD control (K) ACGD แช่น้ำมะนาว (Day1) (L) ACGD แช่น้ำมะนาว (Day30)

(M) ACGD control (N) ACGD แช่น้ำมะนาว (Day1)

(O) ACGD แช่น้ำมะนาว (Day30)

4.4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเม็ดปิดภายใต้กล้อง FE-SEM

เม็ดปิด 2% Al ภายใต้กล้อง FE-SEM รูปที่ 14 AC พบว่าเม็ดปิดที่ไม่ผ่านการเคลือบผิวด้วยวัสดุพอลิเมอร์ เม็ดปิดค่อนข้างมีลักษณะเป็นรูพรุนบนพื้นผิว สันนิษฐานได้ว่ารูพรุนที่เกิดบนพื้นผิว เม็ดปิดนี้อาจเกิดจากกระบวนการระหว่างที่เตรียมเม็ดปิด ซึ่งเมื่อนำเม็ดปิด 2% Al ที่มีรูพรุน ไปแช่ในน้ำมะเกลือที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 วัน จะพบว่า รูปที่ 14 B1 พื้นผิวมีลักษณะเป็นรอยแยก แต่ลักษณะของเม็ดปิด รูปที่ 14 A,B ยังเป็นลักษณะทรงกลม เช่นเดียวกับ รูปที่ 14 C เมื่อแช่เม็ดปิดนี้ เป็นเวลา 30 วัน แต่จะพบว่า จากพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นรอยแยก (รูปที่ 14 B1) และ กลายเป็นรูโพรงที่ใหญ่มากขึ้น (รูปที่ 14 C30)

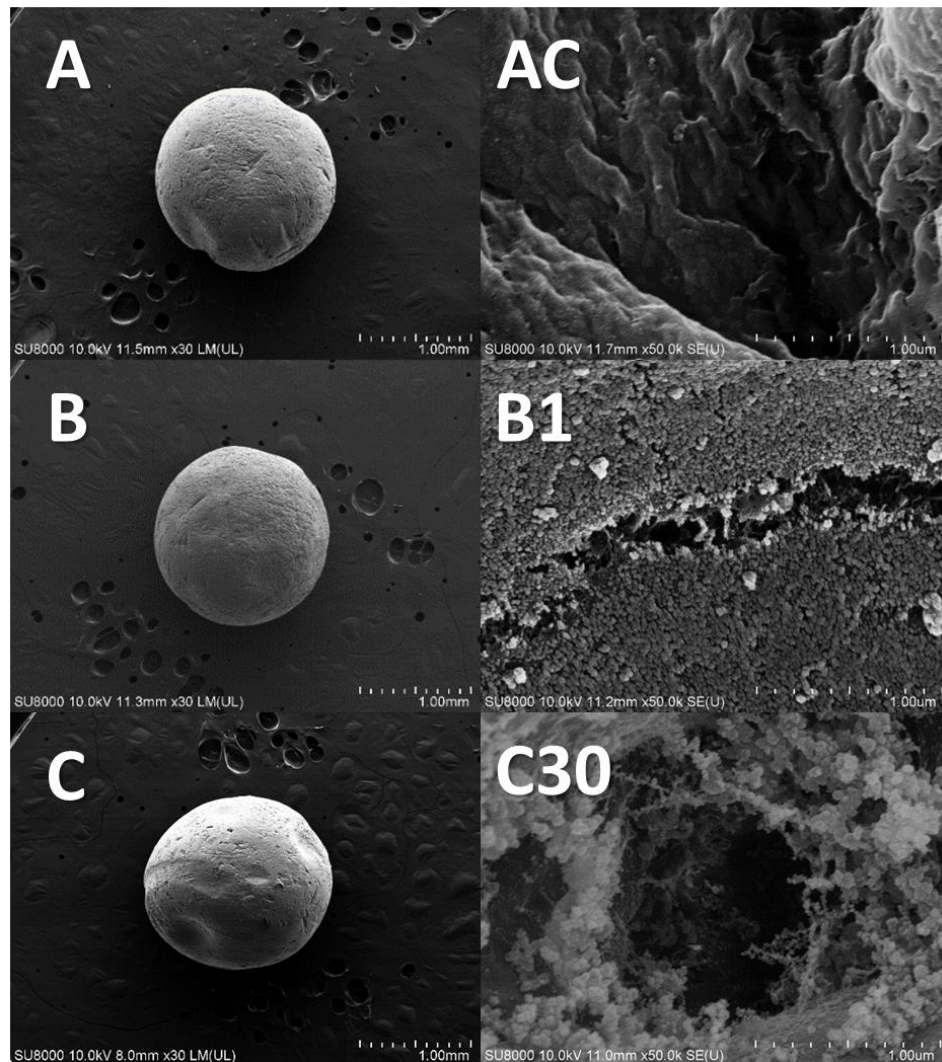
ในขณะที่เกี่ยวกับการเคลือบ เม็ดปิด ด้วยวัสดุพอลิเมอร์ชั้นเดียว พบว่า เม็ดปิดชนิด ACG (รูปที่ 15 DC) และ ACC (รูปที่ 16 GC) จะสามารถทำให้เม็ดปิดอัลจินตมีขนาดรูพรุนที่เล็กลง แต่ยังคงมีรูพรุนที่บริเวณพื้นผิวเล็กน้อย ซึ่งการเคลือบอัลจินตด้วยเจลาติน และ ทำการแช่เม็ดปิด 30 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเม็ดปิดจากเม็ดปิด control (รูปที่ 15 D, E และ F) ซึ่งยังคงเป็นเม็ดปิดทรงกลม เช่นเดียวกับ อัลจินตที่เคลือบด้วย คัปคาราคีแนนชั้นเดียว (รูปที่ 16 G, H และ I) แต่จะพบการเปลี่ยนแปลงพื้นผิว เมื่อทำการแช่เม็ดปิด ACG ละ ACC เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งพบว่า เม็ดปิด ACG (รูปที่ 15 E1) จะเกิดรูพรุนที่ใหญ่มากขึ้น แต่มีขนาดที่เล็กกว่า รูพรุนของ เม็ดปิด ACC (รูปที่ 16 H1) แต่ เม็ดปิด ACG และ ACC ยังคงไม่เกิดรูพรุนแบบรอยแยกดังเช่น เม็ดปิด 2%Al (รูปที่ 14 B1) แต่เมื่อแช่เม็ดปิด ACG และ ACC เป็นระยะเวลา 30 วัน จะพบบริเวณพื้นผิวเป็นลักษณะเป็นรูโพรงที่กว้างขึ้นเช่นเดียวกัน

หากทำการ เคลือบอัลจินตแบบชั้นคู่ จะพบว่า เม็ดปิด ACGD รูปที่ 17 J มีลักษณะทรงกลม และ มีขนาดที่ใหญ่กว่า 2%Al ACG และ ACC เนื่องจาก อัลจินต ถูกเคลือบด้วยเจลาตินแบบชั้นคู่ และ พบว่า พื้นผิวของ ACGD รูปที่ 17 JC เป็นลักษณะที่ไม่มีรูพรุน แต่เมื่อทำการแช่เม็ดปิด ACGD เป็นเวลา 1 วันจะพบว่า มีรูพรุนเป็นรูเล็กๆทั่วทั้งพื้นผิว รูปที่ 17 K1 แต่ยังไม่พบรอยแยก ซึ่งเมื่อ แช่ในน้ำมะเกลือเป็นเวลา 30 วัน พบว่า รูพรุนเล็กๆจะเกิดเป็นรอยแยกเล็กน้อย (รูปที่ 17 L30) และ พบว่า เม็ดปิดยังคงมีรูปร่างลักษณะทรงกลมไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับ เม็ดปิด control (รูปที่ 17 J, K และ L)

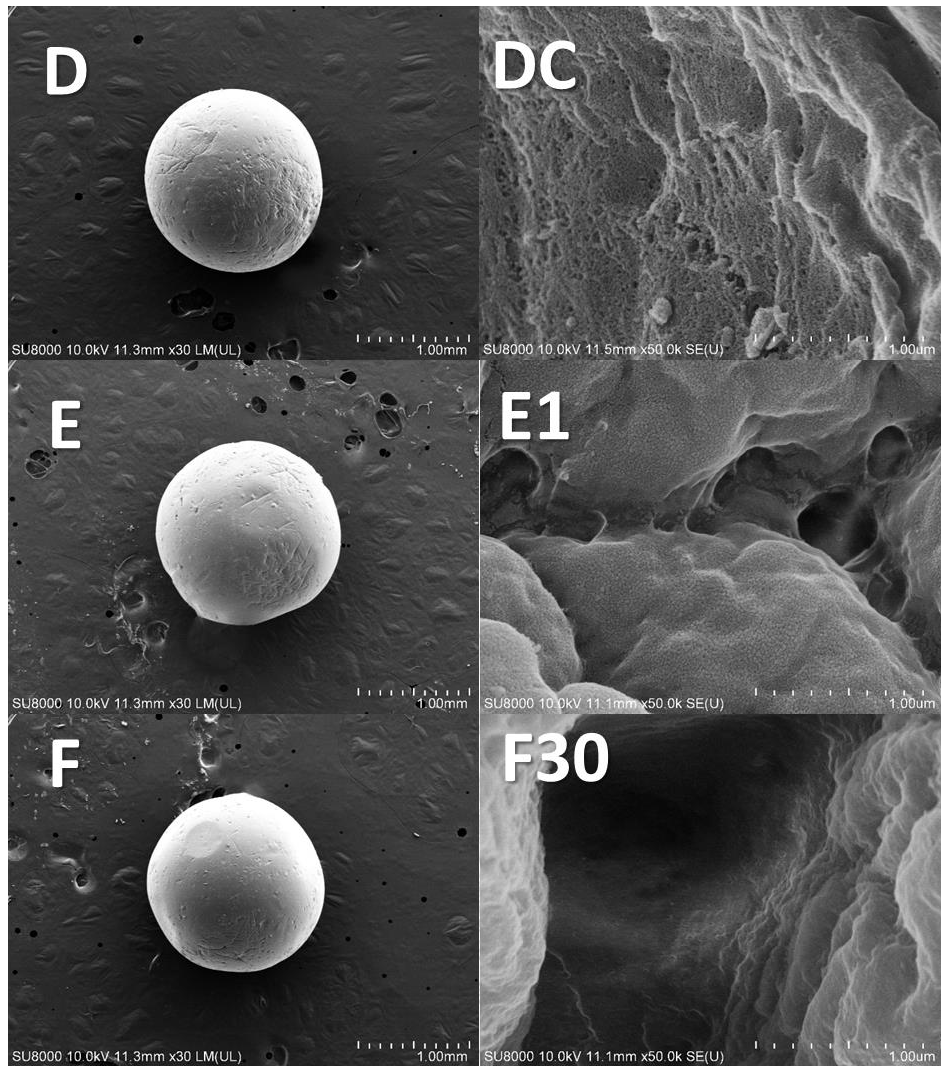
ยังพบว่า เม็ดปิด ACCD มีลักษณะทรงกลมเช่นเดียวกัน (รูปที่ 18 M) และ มีขนาดที่เทียบเท่ากับ เม็ดปิด ACGD เนื่องจากเม็ดปิด ACCD ทำการเคลือบด้วยคัปคาราคีแนนแบบชั้นคู่

เช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาพื้นผิวของเม็ดบีดจะพบว่า การเคลือบด้วยคัลปาการาจีแนนยังเกิดรูพรุนเล็กน้อย (รูปที่ 18 MC) และ เมื่อทำการแช่เม็ดบีดเป็นเวลา 1 วัน จะพบว่ามีรูพรุนที่มีรูที่ใหญ่ขึ้น (รูปที่ 18 N1) มากกว่า ขนาดรูพรุนของ ACGD แต่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่า 2%Al ACG และ ACC ซึ่งเมื่อพิจารณาเม็ดบีด ACCD ที่แช่ในน้ำมะเขีงเป็นเวลา 30 วัน จะพบว่า เม็ดบีดยังคงมีรูปร่างลักษณะทรงกลม (รูปที่ 18 O) ไม่มีรูปร่างแตกต่างจากเม็ดบีด control และ เม็ดบีดที่แช่ในน้ำมะเขีง 1 วัน (รูปที่ 18 M และ N) แต่รูพรุนที่เกิดขึ้นบนพื้นผิวจะมีลักษณะที่เริ่มมีการเกิดเป็นรอยแยก แต่ยังมีลักษณะที่ไม่เกิดเป็นโพรงใหญ่ (รูปที่ 18 O30)

ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อ pH ภายในเม็ดบีด (ตารางที่ 12) เกิดความเปลี่ยนแปลง และ ลดลงจนถึง มีค่า pH ที่คงตัว เมื่อเม็ดบีดมีค่า pH ที่เท่ากับค่าความเข้มข้นภายนอกเม็ดบีด คือ น้ำมะเขีงที่ $\text{pH } 2.9 \pm 0.2$ และถ้าทำการแช่เม็ดบีดต่อไปในระยะเวลาเพิ่มขึ้น จึงทำให้ความคงตัวของเม็ดบีดน้อยลง สอดคล้องกับ ค่าความแข็ง และ ขนาด ของเม็ดบีดที่มีการลดลงเรื่อยๆอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งวิเคราะห์ความเสียหายของเม็ดบีดได้จากภาพที่วิเคราะห์ด้วย FE-SEM ซึ่งรูพรุนบนพื้นผิว และ ความกว้างรูพรุน ของเม็ดบีดแต่ละชนิดจะมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บในน้ำมะเขีง ซึ่ง ปัจจัยที่ทำให้เกิดรูพรุนบนพื้นผิวของเม็ดบีด เนื่องจากการมีโครงสร้างบางพันธะของเม็ดบีดที่เปลี่ยนแปลงไปตามรูปที่ 19-23



รูปที่ 14 ภาพเม็ดปิด 2% Al ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะนาว pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้กล้อง FE-SEM
 (A) 2%Al control กำลังขยาย 30 เท่า (AC) 2%Al control กำลังขยาย 50,000 เท่า
 (B) 2%Al แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 30 เท่า
 (B1) 2%Al แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 50,000 เท่า
 (C) 2%Al แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 30 เท่า
 (C30) 2%Al แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 50,000 เท่า



รูปที่ 15 ภาพเมื่อดัด ACG ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้กล้อง FE-SEM

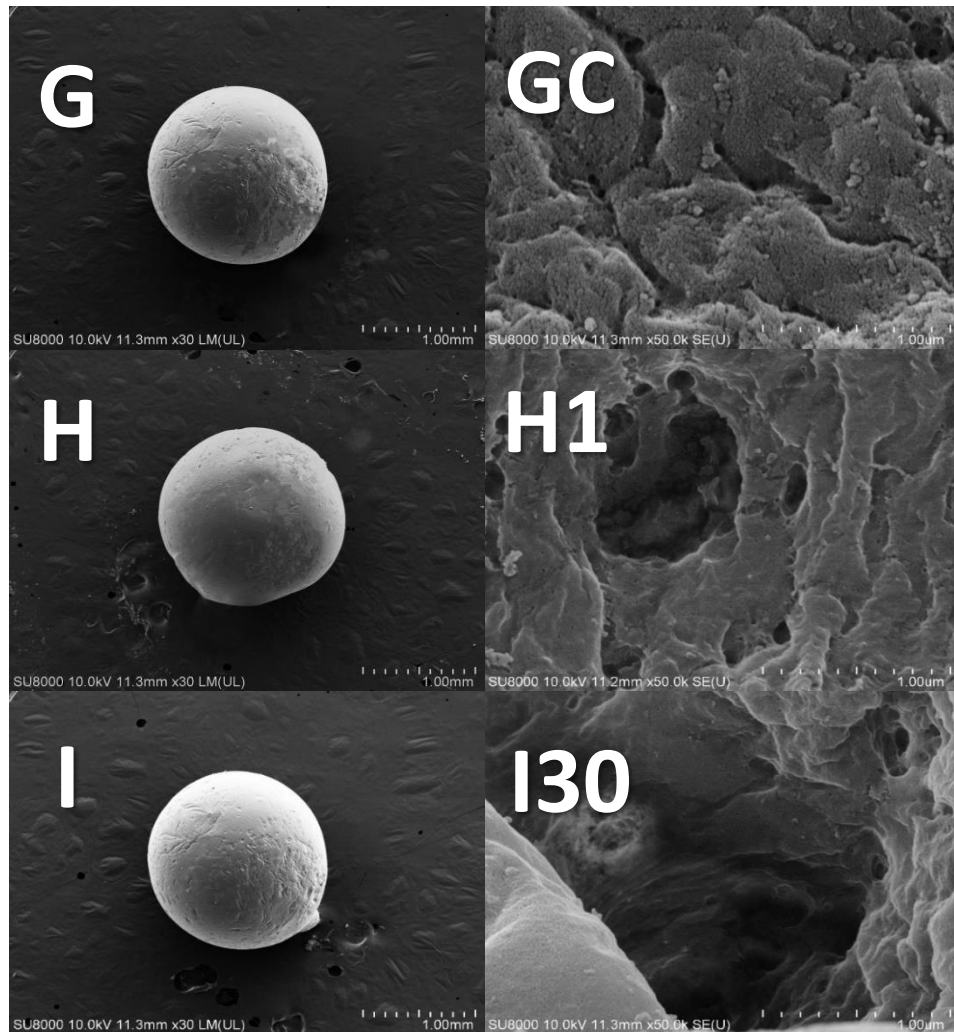
(D) ACG control กำลังขยาย 30 เท่า (DC) ACG control กำลังขยาย 50,000 เท่า

(E) ACG แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day1) กำลังขยาย 30 เท่า

(E1) ACG แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day1) กำลังขยาย 50,000 เท่า

(F) ACG แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day30) กำลังขยาย 30 เท่า

(F30) ACG แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day30) กำลังขยาย 50,000 เท่า



รูปที่ 16 ภาพเม็ดปิด ACC ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้กล้อง FE-SEM

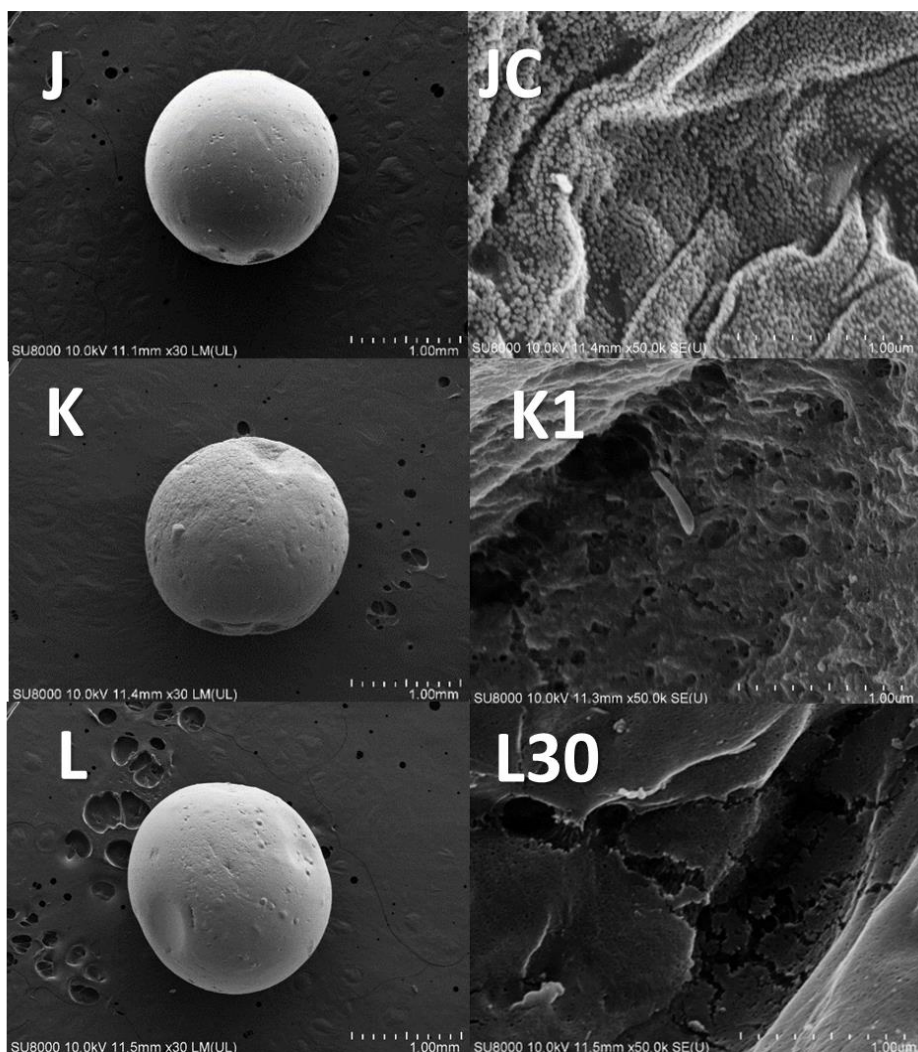
(G) ACC control กำลังขยาย 30 เท่า (GC) ACC control กำลังขยาย 50,000 เท่า

(H) ACC แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day1) กำลังขยาย 30 เท่า

(H1) ACC แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day1) กำลังขยาย 50,000 เท่า

(I) ACC แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day30) กำลังขยาย 30 เท่า

(I30) ACC แช่ในน้ำมะเขี๋ยง (Day30) กำลังขยาย 50,000 เท่า



รูปที่ 17 ภาพเม็ดปิด ACSD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะนาว pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้กล้อง FE-SEM

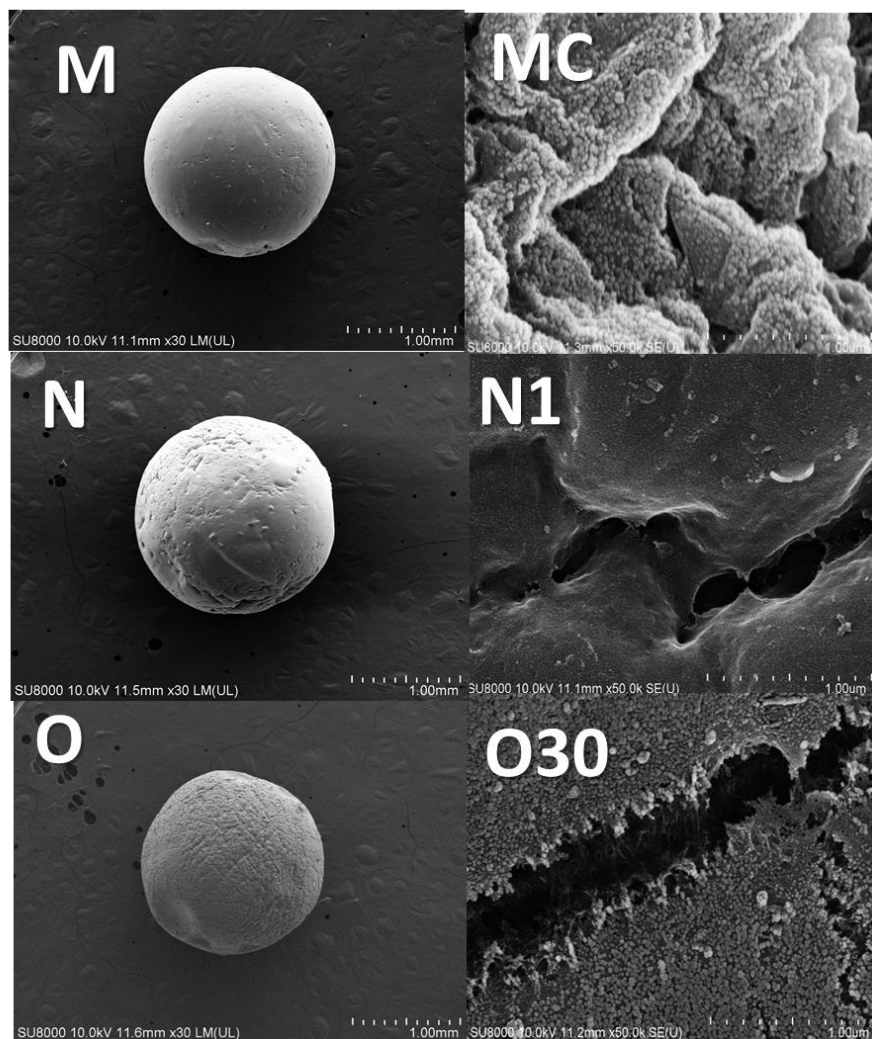
(J) ACSD control กำลังขยาย 30 เท่า (JC) ACSD control กำลังขยาย 50,000 เท่า

(K) ACSD แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 30 เท่า

(K1) ACSD แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 50,000 เท่า

(L) ACSD แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 30 เท่า

(L30) ACSD แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 50,000 เท่า



รูปที่ 18 ภาพเม็ดปิด ACCD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังแช่ในน้ำมะนาว pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้กล้อง FE-SEM

(M) ACCD control กำลังขยาย 30 เท่า (MC) ACCD control กำลังขยาย 50,000 เท่า

(N) ACCD แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 30 เท่า

(N1) ACCD แช่ในน้ำมะนาว (Day1) กำลังขยาย 50,000 เท่า

(O) ACCD แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 30 เท่า

(O30) ACCD แช่ในน้ำมะนาว (Day30) กำลังขยาย 50,000 เท่า

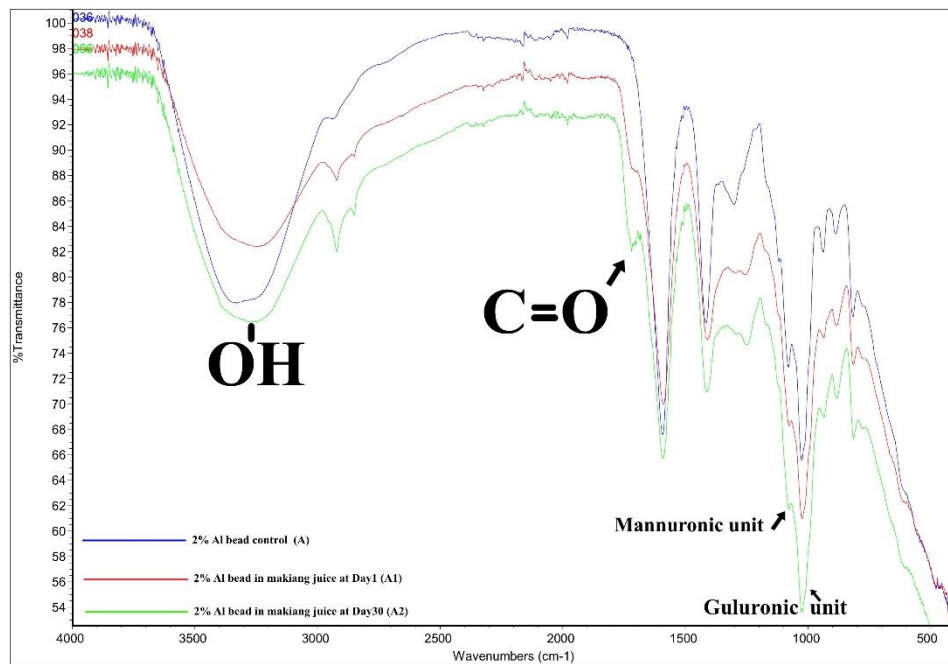
4.4.6 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดปิด

กรดในน้ำมะเขีง สามารถแตกตัวให้เป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) ซึ่ง H^+ มีการแทนที่ Ca^{2+} ที่ทำหน้าที่ยึด 2 สายพอลิเมอร์ ระหว่าง mannuronic unit และ guluronic unit ในโครงสร้างของอัลจินเตปิด (Egg box) และ เมื่อมีความเข้มข้นของกรดที่มากขึ้น พันธะของอัลจินเตบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลง โดยการแทนที่ไอออนประจุบวกบนตำแหน่งไฮโดรเจนของหมู่คาร์บอกซิลในโครงสร้างอัลจินเต โครงสร้างของอัลจินเตที่ถูกแทนที่ไปแล้ว จึงไม่สามารถจับกับประจุบวกของแคลเซียมไอออนได้อีก (Tsai et al., 2017) ซึ่งมีการเกิดปฏิกิริยาที่ Ca^{2+} เปลี่ยนเป็น calcium citrate จึงทำให้ โครงสร้างของ Egg box ที่มีแรงไอออนของแคลเซียม ที่เชื่อมขวางเป็นพันธะที่ไม่มีความแข็งแรง จึงก่อให้เกิดไฮโดรเจลในลักษณะที่มีความแข็งที่ลดน้อยลง (Nualkaekul et al., 2013) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control เม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด ยังไม่เกิดการสั่นสะเทือนของ พิคพันธะ C=O ในโครงสร้าง (รูปที่ 19A, 20B, 21C, 22D, 23E) แต่เมื่อแช่เม็ดปิดเป็นระยะเวลา 1 วัน จะพบว่า มีพิคการสั่นสะเทือนของ พันธะ C=O เกิดขึ้นในโครงสร้าง (รูปที่ 19 A1, 20 B1, 21 C1, 22 D1, 23 E1) ซึ่งมีความหมายว่า กรดได้เข้าไปในโครงสร้างของอัลจินเตปิดตั้งแต่วันที่ 1 และ จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะการสั่นสะเทือนของพิคพันธะ C=O ชัดมากขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 30 (รูปที่ 19 A2, 20 B2, 21 C2, 22 D2, 23 E2)

จากการที่ Ca^{2+} เปลี่ยนเป็น calcium citrate และ เกิดปฏิกิริยากับ ไอออนที่เชื่อมขวางระหว่าง mannuronic และ guluronic ทำให้ electron ของอัลจินเตเกิดเป็น free radical สังกเกตได้จาก พันธะของ mannuronic unit มีการเปลี่ยนแปลง พบว่าการสั่นสะเทือนของพิค IR สเปกตรัม มีลักษณะพิคที่ลดลง เมื่อกรดเข้ามาในโครงสร้างอัลจินเต และไปทำปฏิกิริยากับ หมู่ OH ของโครงสร้าง และจะเกิดปฏิกิริยาการดึงน้ำออก เพราะฉะนั้น ความเข้มข้น ของหมู่ OH ที่สังเกตได้จาก % transmittance ของ IR สเปกตรัม พบว่ามีความเข้มข้นของหมู่ OH ที่ลดลง เพราะมีการแทนที่ของกรดในโครงสร้างที่มากขึ้น เมื่อทำการเก็บเม็ดปิดในน้ำมะเขีง ในระยะเวลาที่นานขึ้น ซึ่ง โครงสร้างของอัลจินเตปิดยังคงอยู่ แต่จะมีเพียงบางพันธะในโครงสร้างเท่านั้นที่มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างทีกล่าวมาข้างต้น โดยสันนิษฐานได้ว่า หากแช่เม็ดปิดในน้ำมะเขีงต่อไปในระยะเวลา มากกว่า 30 วัน จะทำให้พันธะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ และทำให้ Ca^{2+} ในโครงสร้างลดน้อยลง และ บางพันธะ อาจมีการฟอร์มตัวกลายเป็นพันธะอื่นได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งเม็ดปิด

ทั้ง 5 ชนิด มีความเปลี่ยนแปลงพันธะภายในโครงสร้างของอัลจินเตบีด ค่อนข้างเป็นไปได้ในทางเดียวกัน และ เป็นที่แน่นอนว่า เมื่อโครงสร้างไม่มีความแข็งแรง จึงเป็นผลร่วมกับการแสดงออกทางลักษณะกายภาพของเม็ดบีด ได้แก่ ค่าความแข็ง ขนาด ค่าสี และ สภาพพื้นผิวที่เกิดรูพรุนของเม็ดบีด ซึ่งสาเหตุปัจจัยที่ทำให้เสื่อมสภาพนั้น เป็นผลมาจากการที่แอนไฮไดรชัน แพร่เข้าเม็ดบีดได้อย่างรวดเร็ว รวมถึง ค่า pH ที่ลดลงในเม็ดบีดอีกด้วย



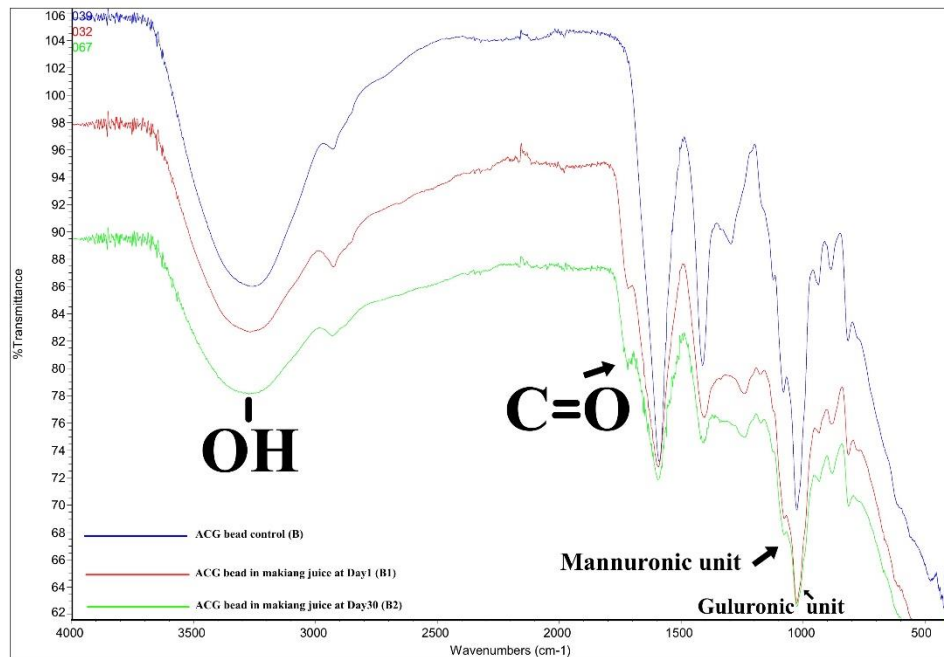


รูปที่ 19 IR สเปกตรัมของ เม็ดบีด 2%Al ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

(A) เม็ดบีด 2%Al control

(A1) เม็ดบีด 2%Al แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day1)

(A2) เม็ดบีด 2%Al แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day30)



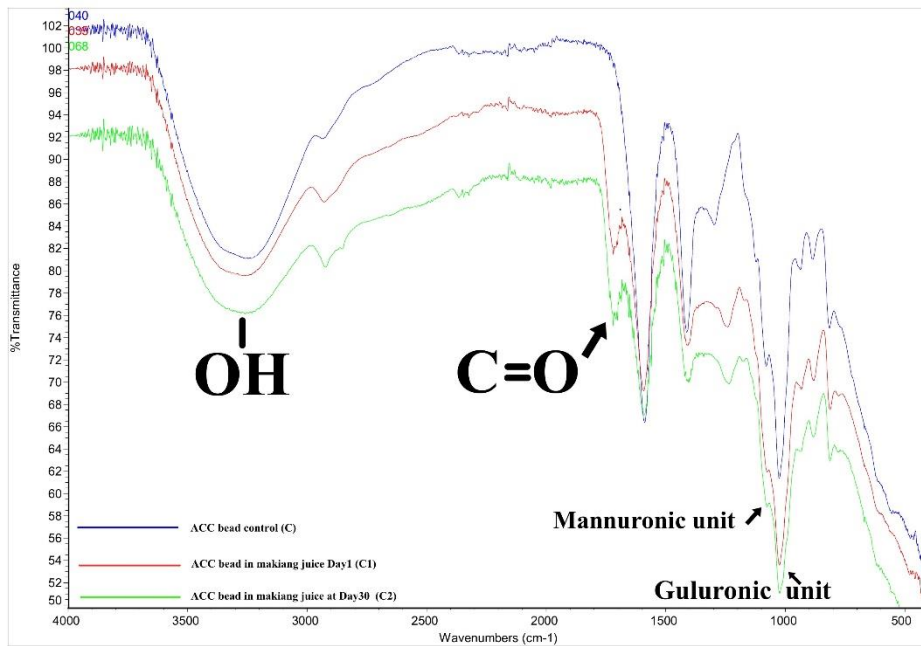
รูปที่ 20 IR สเปกตรัมของ เม็ดบีด ACG ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

(B) เม็ดบีด ACG control ไม่ผ่านการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

(B1) เม็ดบีด ACG แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day1)

(B2) เม็ดบีด ACG แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day30)



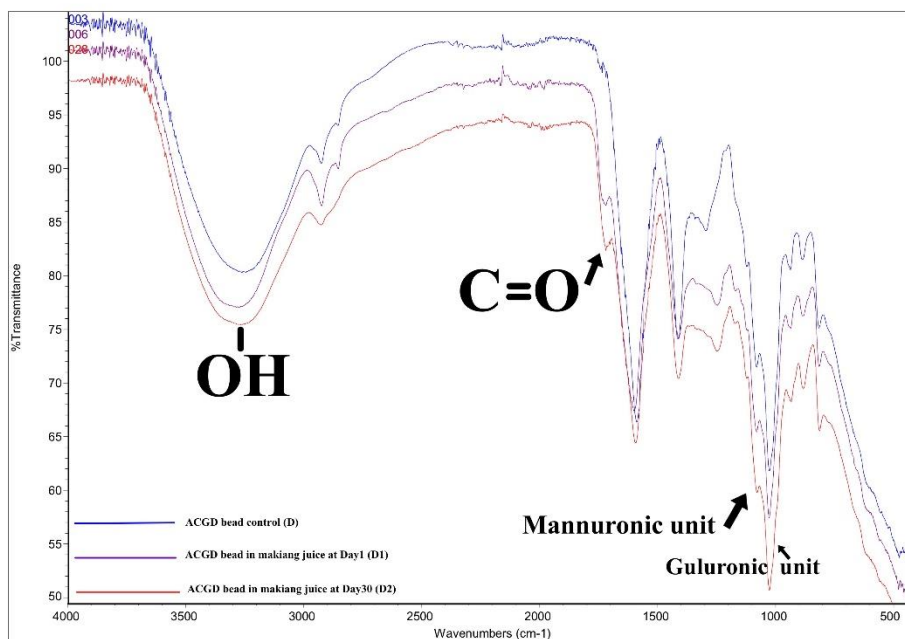
รูปที่ 21 IR สเปกตรัมของ เม็ดบีต ACC ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

(C) เม็ดบีต ACC control ไม่ผ่านการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

(C1) เม็ดบีต ACC แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day1)

(C2) เม็ดบีต ACC แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day30)



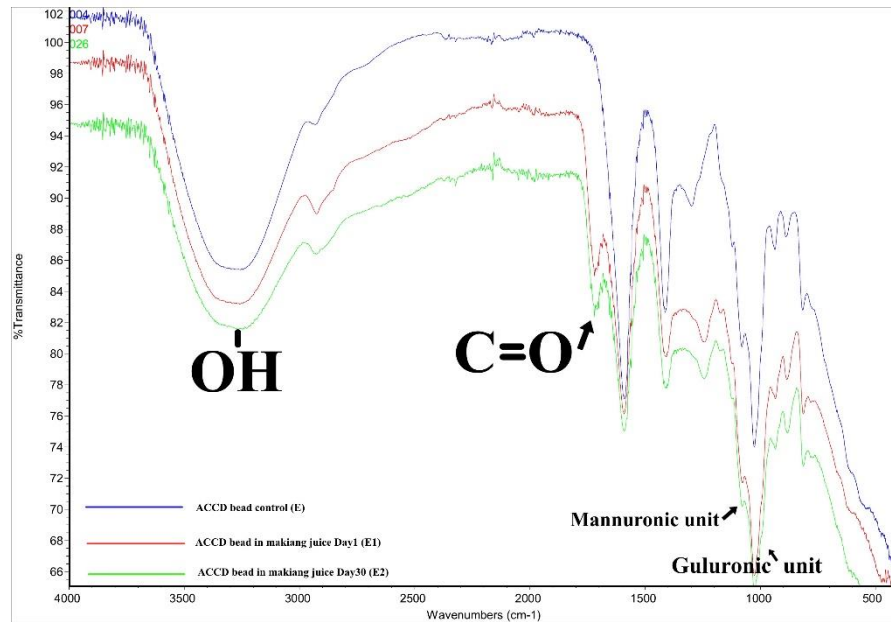
รูปที่ 22 IR สเปกตรัมของ เม็ดปิด ACGD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

(D) เม็ดปิด ACGD control ไม่ผ่านการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

(D1) เม็ดปิด ACGD แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day1)

(D2) เม็ดปิด ACGD แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day30)



รูปที่ 23 IR สเปกตรัมของ เม็ดปัด ACCD ที่ไม่ผ่านการแช่ และ หลังการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

(E) เม็ดปัด ACCD control ไม่ผ่านการแช่ในน้ำมะเกี๋ยง

(E1) เม็ดปัด ACCD แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day1)

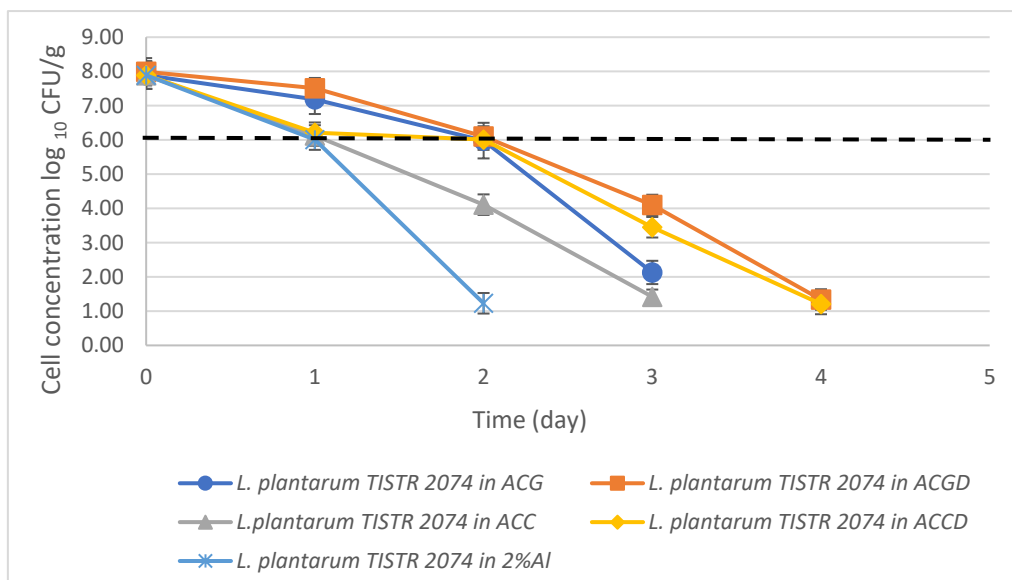
(E2) เม็ดปัด ACCD แช่ในน้ำมะเกี๋ยง (Day30)

4.5 การทนในสภาวะน้ำมะเข็ญของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF 105 และ แบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูล แต่ละชนิด

การอยู่รอดของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* TISTR 2074 ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำเกลือ pH 2.9 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งเป็นเซลล์อิสระ (รูปที่ 10) พบว่า ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีจำนวนเหลือรอด ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/mL และ หลังจาก 24 ชั่วโมง *L. plantarum* TISTR 2074 จะตรวจไม่พบเชื้อที่เหลือรอดชีวิต ซึ่งแตกต่างจาก *L. plantarum* MF 105 ที่ยังคงมีจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต 10^6 CFU/g ที่ เวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 11) จึงได้ทำการศึกษาการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* TISTR 2074 และ *L. plantarum* MF 105 ที่คัดแยกได้จากเมี่ยง ซึ่งมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก ในเม็ดบีด 5 ชนิด ซึ่งพบว่า *L. plantarum* TISTR 2074 สามารถมีชีวิตอยู่รอด ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/g ได้ที่เวลา 2 วัน ในเม็ดบีด ACGD และ ACCD ซึ่ง ในวันที่ 4 *L. plantarum* TISTR 2074 มีจำนวนชีวิตเหลือรอดที่ 10^1 CFU/g ซึ่งแตกต่างจาก การเคลือบวัสดุพอลิเมอร์ชั้นเดียว คือ ACC และ ACG จะพบว่า ในวันที่ 1 จนถึง วันที่ 2 *L. plantarum* TISTR 2074 ยังคงมีจำนวนชีวิตเหลือรอด ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/g แต่ในวันที่ 3 จุลินทรีย์มีจำนวนที่ลดลง เหลือเพียง 10^1 - 10^2 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาเม็ดบีด 2%Al จะพบว่า ยังคง มีอัตราการรอดชีวิต ในวันที่ 1 โดยมีจำนวน 10^6 CFU/g และ ในวันที่ 2 มีจำนวนลดลง เหลือ 10^1 CFU/g และ หลังจากวันที่ 4 เม็ดบีดทั้ง 5 ชนิด ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดในเม็ดบีด (รูปที่ 24)

หากพิจารณาอัตราการลดลงของเชื้อตามตารางที่ 16 พบว่า ในวันที่ 4 *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วย ACGD และ ACCD มีอัตราการลดลงที่ 83.23% และ 84.66% ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. plantarum* MF 105 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก ซึ่งคัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก (รูปที่ 25) มีจำนวนชีวิตที่เหลือรอดได้ดีที่สุดในเม็ดบีด ACGD ในวันที่ 5 ซึ่งตรวจพบว่า มีจำนวนที่เหลือรอด 10^6 CFU/g ซึ่งหลังจากวันที่ 7 พบว่า เซลล์จะไม่สามารถมีชีวิตเหลือรอดได้ ซึ่ง ACCD แม้ว่าการห่อหุ้ม *L. plantarum* TISTR 2074 จะให้ผลการปกป้องเซลล์ได้ดีใกล้เคียงกับ ACGD แต่ เมื่อนำ ACCD มาห่อหุ้ม เซลล์ *L. plantarum* MF 105 พบว่าเซลล์มีจำนวนชีวิตเหลือรอด 10^6 CFU/g ในวันที่ 4 และ เซลล์ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 โดยที่ ACCD มีอัตราการลดลงของเชื้อ 97.34% ในวันที่ 6 ซึ่งพบว่า ACGD มีอัตราการลดลงของเชื้อ 84.98% ในวันที่ 6 และ มีอัตราการลดลง ที่ 95.99% ในวันที่ 7 (ตารางที่ 17) ซึ่งเม็ดบีดที่ทำการเคลือบพอลิเมอร์ชั้นเดียว เซลล์ยังคงมีอัตราการลดลงเร็วกว่า เม็ดบีดที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ชั้นคู่

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่การเคลือบเม็ดบีดแบบชั้นเดี่ยว ก็ยังให้ผลที่ดีมากกว่า เม็ดบีด 2%Al เช่นเดียวกัน

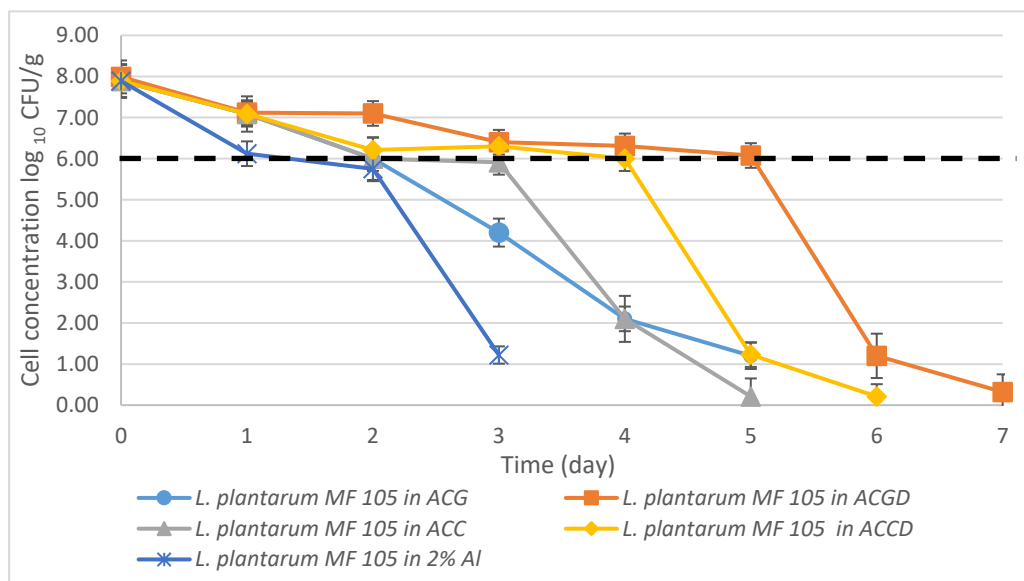


รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ห่อหุ้มเซลล์ไมโครแคปซูลด้วยเม็ดบีดชนิดแตกต่างกัน ในน้ำมะเขี๋ยง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

--- แสดงถึงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/mL หรือ g ซึ่งเป็นจำนวนเชื้อที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาจนถึงผู้บริโภค

ตารางที่ 16 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์โดยไมโครแคปซูล 5 ชนิด แช่ในน้ำมะเขือเทศ pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

Percentage (%) reduction of <i>L. plantarum</i> TISTR 2074 (microcapsule) viability								
Type of beads	Time (day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
2% Al	0.00	23.83	84.41	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ACG	0.00	8.92	24.21	73.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ACGD	0.00	6.01	23.65	48.68	83.23	100.00	100.00	100.00
ACC	0.00	22.30	47.91	82.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ACCD	0.00	21.29	23.83	56.27	84.66	100.00	100.00	100.00



รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF 105 ที่ห่อหุ้มเซลล์ไมโครแคปซูล ด้วยเม็ดปิดชนิดแตกต่างกันในน้ำมะกึ่ง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

--- แสดงถึงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ 10^6 CFU/mL หรือ ๑ ซึ่งเป็นจำนวนเชื้อที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาจนถึงผู้บริโภค

ตารางที่ 17 อัตราการลดลงแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก *L. plantarum* MF 105 ที่ถูกห่อหุ้มเซลล์โดยไมโครแคปซูล 5 ชนิด แช่ในน้ำมะเขือเทศ pH 2.9±0.2 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C

Percentage (%) reduction of <i>L. plantarum</i> MF 105 (microcapsule) viability								
Type of beads	Time (day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
2% Al	0.00	22.43	27.09	84.54	100.00	100.00	100.00	100.00
ACG	0.00	10.19	23.95	46.77	73.38	84.79	100.00	100.00
ACGD	0.00	10.89	11.14	19.90	21.02	23.95	84.98	95.99
ACC	0.00	10.19	23.95	25.09	73.38	97.34	100.00	100.00
ACCD	0.00	10.19	21.29	20.15	23.95	84.41	97.34	100.00

จากการที่ เซลล์มีอัตราการลดลง ตั้งแต่วันที่ 1 แต่ค่า pH ในเม็ดปิด 5 ชนิด ในวันที่ 1 มีค่า pH อยู่ในช่วง pH 4.00-4.45 (ตารางที่ 12) จึงส่งผลทำให้เชื้อโปรไบโอติกมีอัตราการลดลง แต่ *L. plantarum* MF 105 ที่ผ่านกระบวนการปรับตัวในเมียงหมัก จะสามารถทนต่อความเป็นกรด ได้ดีกว่า *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการปรับตัว โดยปกติ *L. plantarum* สามารถทนต่อค่า pH ได้ประมาณ pH 4.6-4.8 เมื่อ pH ในเม็ดปิด ต่ำลงกว่า pH 4.6 จึงทำให้เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดปิด มีจำนวนลดลงมากตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป แต่จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากเมียงสามารถทนต่อค่า pH ได้ ประมาณ pH 3.8 (ซึ่งเป็นสภาวะของเมียงหมัก) ถึงแม้ว่าจะปรับปรุงการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยนำเทคโนโลยีไมโครแคปซูล มาห่อหุ้มเชื้อจุลินทรีย์ แต่การยืดอายุจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ จะมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เมื่อห่อหุ้มจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการปรับตัวในสภาวะความเป็นกรด และ ฟีนอลิกสูง ซึ่งจะยิ่งทำให้ จุลินทรีย์มีอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์ได้นานมากกว่า การห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการปรับตัว ซึ่งเม็ดปิดที่ถูกเคลือบด้วยวัสดุพอลิเมอร์แตกต่างกัน ได้แก่ การเคลือบเม็ดปิดด้วย เจลาติน และ คัปปาการาจีแนน เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างแกนกลางของ อัลจิเนต และ ผลกระทบต่อการอยู่รอดของเซลล์ รวมถึง คุณสมบัติทางกายภาพ และ ทางเคมีของเม็ดปิด แสดงให้เห็นว่าวัสดุเคลือบปรับปรุง และ ป้องกัน วัสดุหลักอย่างอัลจิเนตได้อย่างมาก พิจารณาจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิต ระหว่างการเก็บรักษาเซลล์ที่ทำการแช่เม็ดปิดในน้ำมะเขีง ชนิดของวัสดุเคลือบมีผลต่ออัตราการลดลงของเชื้อ คือ เม็ดปิดที่ไม่ผ่านการเคลือบ มีประสิทธิภาพ การปกป้องเซลล์น้อยกว่าเม็ดปิดที่ทำการเคลือบ ในขณะที่การเคลือบสองชั้นนั้นดีกว่าการเคลือบชั้นเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการลดลงของเชื้อ และ พบว่า สำหรับการป้องกันเซลล์ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และประสิทธิภาพการปกป้องอัลจิเนตปิดจากสภาวะความเป็นกรด และ ฟีนอลิก ในกรณีของเม็ดปิดเคลือบ เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดปิดที่ไม่เคลือบ คือ ความสามารถที่เพิ่มขึ้นของสารเชิงซ้อนโพลีอิเล็กโทรไลต์ที่เกิดขึ้นระหว่างแกนกลาง และ พอลิเมอร์เคลือบเพื่อความเป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งสารประกอบที่เป็นกรด และ ฟีนอลิก ขณะที่การแพร่ของน้ำมะเขีงแทรกซึมเข้าไปในเม็ดปิด สิ่งนี้แสดงให้เห็นในงานวิจัยของ Cook et al. (2013) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล และ บีบริฟที่ติดฉลากเรืองแสงซึ่งติดอยู่กับเม็ดปิดเคลือบโคโตซาน ข้างต้นสามารถอธิบายข้อเท็จจริงที่ว่า การผสมผสานระหว่างแกนกลาง และ พอลิเมอร์เคลือบต่างๆ ให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกัน และ เม็ดปิดแบบเคลือบสองชั้นให้การปกป้องได้ดีกว่าเม็ดปิดแบบเคลือบชั้นเดียว และ ไม่เคลือบ อาจเป็นเพราะปฏิริยาระหว่างพอลิเมอร์ของวัสดุเคลือบที่เป็นทั้งประจุบวก และ ประจุลบมีปฏิริยาไฟฟ้า

สถิต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตที่เกิดขึ้น ระหว่างอัลจินต เคลือบ เจลาตินนั้นให้ผลที่ดีมากกว่า อัลจินตที่เคลือบคัปปาคาราจีแนน แต่เมื่อทำการวัดค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป ประสิทธิภาพการป้องกันกรด และ แอนโธไซยานินที่แทรกซึมเข้าสู่เม็ดบีด ของ ACGD และ ACCD จะให้ประสิทธิภาพที่ดีใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำมาหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้ว พบได้ว่า อัตราการลดลงของเชื้อโปรไบโอติก ในเม็ดบีด ACGD มีอัตราการลดลงน้อยกว่าเม็ดบีด ACCD ซึ่งเป็นไปได้ว่า คัปปาคาราจีแนนเป็นพอลิเมอร์ประจุลบ (Sariyer et al., 2020) เมื่อนำมาเคลือบร่วมกับอัลจินตที่เป็นประจุลบเช่นกัน จึงไม่เกิดแรงไฟฟ้าสถิตระหว่างวัสดุ 2 สิ่งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับภาพจากกล้อง FE-SEM แสดงให้เห็นว่า เม็ดบีด ชนิด ACCD control ยังคงมีรูพรุนเล็กน้อยที่บริเวณพื้นผิว แต่ยังคงมีรูพรุนที่น้อยกว่าเม็ดบีด 2% Al ACG และ ACC และ ลักษณะรูพรุนของเม็ดบีดแต่ละชนิดที่มีความกว้างที่แตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้ การแพร่ของน้ำมะเกี๋ยงที่มีโมเลกุลกรด และ ฟีนอลิก เข้าไปในเม็ดบีด และทำให้โปรไบโอติกมีชีวิตเหลือรอดได้น้อยลง

สาเหตุที่ ACCD มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับ ACGD เนื่องจาก คัปปาคาราจีแนน จะสามารถทนต่อค่า pH ได้ไม่ต่ำกว่า pH 4.5 (Hennink and van Nostrum, 2002 ; Ramdhan et al., 2020) ซึ่งค่า pH มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกในน้ำผลไม้ แม้ว่าปัจจัยอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำผลไม้ที่มีสารประกอบฟีนอลิกที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกด้วย (Nualkaekul and Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul et al., 2011) แต่การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ฟีนอลิกในน้ำมะเกี๋ยง จะสามารถแทรกซึมได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ เวลา 15-40 นาที ในขณะที่โมเลกุลของกรดจะแทรกซึมเข้าเม็ดบีดแบบอิมมิดิเอตในวันที่ 2-3 และ ในวันที่ 3 เป็นต้นไปจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในเม็ดบีดทุกชนิด

การรอดชีวิตของเซลล์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในน้ำมะเกี๋ยง สอดคล้องกับผลการทดลองของ (Nualkaekul et al., 2013) ซึ่งทำการทดลองห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกด้วยเม็ดบีด และ แช่ลงในน้ำแคเรนเบอร์รี่ และ น้ำทับทิม พบว่าความเข้มข้นของฟีนอลทั้งหมดจะลดลง แต่ก็มีแนวโน้มว่า ฟีนอลิกในน้ำผลไม้ นั้น ยังมีปริมาณที่สูงพอที่จะ เป็นปัจจัย ทำให้อัตราการลดลงของเซลล์แบคทีเรียสูง สืบเนื่องจากการเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ หลังจากมีความเปลี่ยนแปลงค่า pH แบบไดนามิกภายในเม็ดบีด และ บทบาทการป้องกัน เม็ดบีดแกนหลักของการเคลือบพอลิเมอร์ (Cook et al., 2013)

อีกทั้ง สอดคล้องกับ การทดลองของ Nualkaekul et al. (2013) ทำการทดลองโดยนำเม็ด ปิดแช่ลงในกรดแกลลิก โดยแท้จริงแล้วแสดงให้เห็นแล้วว่าเม็ดปิดเคลือบสองชั้น โดยทำการเคลือบเจลาติน สามารถยับยั้งการแทรกซึมของกรดแกลลิกภายในเม็ดปิด เมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดปิดเคลือบแบบเดี่ยว และ เม็ดปิดที่ไม่เคลือบ ซึ่งกรดแกลลิกถูกใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลแบบจำลอง เนื่องจากแสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Borges et al., 2012) และ มีแนวโน้มว่าจะมีกรดแกลลิกอยู่ในน้ำผลไม้ นี่เป็นกลไกที่เป็นไปได้อีกอย่างหนึ่งที่เม็ดปิดสามารถปกป้องเซลล์ ในกรณีนี้การทดลอง ตามรูปที่ 24-25 จากฤทธิ์การยับยั้งของฟีนอลที่มีอยู่ในมะเกี๋ยง ซึ่ง สารสกัดของเมล็ดมะเกี๋ยง จะมี แกลลิก อยู่ที่ประมาณ 44.73 mg/L (Tantratian and Balmuang, 2021) และ น้ำมะเกี๋ยง จะมี แกลลิก อยู่ที่ 535.91 ± 0.09 mg/L (Sukprasansap et al., 2017)

ขนาด และ ความแข็งของเม็ดปิดเป็นลักษณะทางกายภาพที่สำคัญ เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะมีอิทธิพลต่อความเสถียร และ ผลต่อคุณสมบัติทางการแทรกซึมของน้ำผลไม้ เม็ดปิดที่ไม่เคลือบผิวมีขนาดเล็ก (2%Al) และ ความแข็งที่น้อยกว่า เม็ดปิดที่เคลือบผิวแบบชั้นคู่ ตารางที่ 13-14 ซึ่งหลังจากเก็บในน้ำมะเกี๋ยงไป 30 วัน ซึ่งมีแนวโน้มว่า 2%Al จะมีความเปลี่ยนแปลงมากที่สุดเนื่องจากการลดลงของ Ca^{2+} การเชื่อมขวางระหว่างการเคลือบ ส่งผลให้มีขนาดเพิ่มขึ้น และ ความแข็งลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ซึ่งบ่งชี้ว่าอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เป็น อัลจินตหลักกำลังอ่อนแอลง สังเกตได้จาก การสั่นสะเทือนของพีค IR สเปกตรัม ที่แสดงถึง มีการเปลี่ยนแปลงพันธะในโครงสร้างของอัลจินตปิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการเคลือบสองชั้นหลังจากแช่เม็ดปิดลงในน้ำมะเกี๋ยงแล้ว ความแข็งมีความเปลี่ยนแปลง น้อยกว่าเม็ดปิดที่ไม่เคลือบ และ เม็ดปิดที่เคลือบชั้นเดี่ยว ซึ่งจากการแพร่ของแอนโธไซยานินที่เข้าสู่เม็ดปิดในปริมาณที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อค่าความแข็ง และ ขนาดของเม็ดปิด ซึ่งหากมีอัตราการแพร่ของน้ำมะเกี๋ยงเข้าสู่เม็ดปิดได้มาก และ ในเวลาที่รวดเร็ว ก็จะทำให้เกิดความเสียหายของโครงสร้างเม็ดปิดได้เร็วเช่นกัน และ เมื่อทำการเก็บรักษาในน้ำมะเกี๋ยงเป็นระยะเวลานาน ก็จะทำให้เม็ดปิด เกิดความเสียหายทางโครงสร้างทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพมากยิ่งขึ้น สังเกตได้จาก ผลการทดลอง ลักษณะสัญญาณวิทยาพื้นผิวของเม็ดปิด ที่มีความกว้างรูพรุนเม็ดปิด มากขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาการเก็บรักษา และ เป็นปัจจัยที่ทำให้เม็ดปิดไม่สามารถกักเก็บจุลินทรีย์ในแมทริกซ์ไฮโดรเจลได้

เม็ดปิด ACGD และ ACCD เป็นเม็ดปิดที่แข็ง ที่สุดในการทดลองนี้ ซึ่งอีกสาเหตุหนึ่งอาจเป็นความจริงที่ว่าความเข้มข้นของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีการแทนที่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ จึงส่งผลให้เจลอัลจินตไม่เสถียรในน้ำผลไม้ที่มีทั้งกรด และ สารประกอบฟีนอลิก (Nualkaekul et al., 2011)

อย่างไรก็ตาม การเคลือบอัลจินเตด้วยเจลาติน และ คัปปาคาราจีแนนจะสามารถปรับปรุงอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ให้มีชีวิตอยู่รอดได้นานมากขึ้นกว่า เซลล์อิสระ แต่ปัญหาก็คือ การที่น้ำมะเขีงมีค่า pH ที่ต่ำมาก และ ไม่มีการเติมน้ำตาล ส่งผลต่อความเสียหายทางด้านกายภาพ และ ทางด้านเคมีของเม็ดปิด แม้ว่าจะมีการเคลือบด้วยวัสดุพอลิเมอร์ ที่เคลือบคัปปาคาราจีแนน และ มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัญญาณวิทยา โดยมีรูพรุนที่เกิดเป็นลักษณะรอยแยกมากกว่า เม็ดปิดที่เคลือบด้วยเจลาติน ซึ่งยังเป็นปัญหาสำคัญสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ อาจแก้ไขได้โดยใช้ส่วนผสมของพอลิเมอร์ที่มีแรงประจุไอออนิกที่เป็นขั้วตรงข้ามกัน และ พอลิเมอร์ชนิดที่สามารถที่ทนต่อ pH ต่ำได้ (Sandoval Castilla et al., 2010)



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษา การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในน้ำมะเขี๋ยง ที่มีกรด และ ฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการปรับตัว (Adaptation) ในสภาวะที่มีฟีนอลิกสูง ซึ่งทำการคัดเลือก แบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติกจากเมี่ยงหมัก พบว่ามีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท (LAB-MF) มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแลคติก และ โปรไบโอติก เนื่องจาก แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ มีการสร้างกรด มีการติดสีของผนังเซลล์ เป็นสี crystal violet ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร pH 2 และ 3 ได้ในเวลา 3 ชั่วโมง โดยมี อัตราการรอดชีวิตของเชื้อมากกว่า 60% และสามารถทนต่อสภาวะเกลือ น้ำดี 0.3% ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 60% เช่นเดียวกัน อีกทั้งยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ทั้ง 5 ชนิดได้ คือ *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 1311, *S. enteritidis* DMST 15676, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* ATCC 6633 โดยพบว่าเกิดการยับยั้งโดยมีรอบวงใส (clear zone ประมาณ 5.33-15.35 mm) ซึ่งเมื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และพบว่า LAB-MF มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* ในระดับ 98-100%

เมื่อได้นำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (LAB-MF) 6 ไอโซเลท ที่เป็นเซลล์อิสระเปรียบเทียบกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. 6 สายพันธุ์ ที่เป็นเซลล์อิสระ ทดสอบการทนในสภาวะน้ำมะเขี๋ยง พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากเมี่ยงหมัก *L. plantarum* MF 105 สามารถทนในสภาวะน้ำมะเขี๋ยงได้มากกว่า ไอโซเลทอื่นๆ มีอัตราการลดลงของเชื้อ 20.10% ในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งโปรไบโอติกกลุ่ม *Lactococcus* sp. พบว่า *L. plantarum* TISTR 2074 มีความสามารถทนต่อ กรด และ ฟีนอลิก ในน้ำมะเขี๋ยง มากกว่า สายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน แต่มีอัตราการลดลงของเชื้อ ต่ำกว่า 10^6 CFU/mL ในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเทียบได้ว่ามีอัตราการลดลงของเชื้อ คือ 61.41%

เมื่อน้ำมะเขี๋ยง มีผลต่ออัตราการลดลงของจำนวนแบคทีเรียในน้ำมะเขี๋ยง จึงนำ เทคโนโลยี ไมโครแคปซูล มาช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียเช่นเดียวกัน ซึ่งทำการศึกษา การเตรียม ไมโครแคปซูล ที่สามารถป้องกัน กรด และ ฟีนอลิก ในน้ำมะเขี๋ยงที่แพร่เข้าสู่เม็ดปัด โดยศึกษา

การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ ลักษณะทางกายภาพของเม็ดปิด หลังจากแช่ในน้ำมะเขีง ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยมีการเตรียมเม็ดปิดด้วยแคลเซียมอัลจินเต ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 2% อัลจินเตปิด (2%Al) 2%อัลจินเตปิดเคลือบด้วยเจลาตินชั้นเดี่ยว (ACG) 2%อัลจินเตปิดเคลือบด้วยเจลาตินชั้นคู่ (ACGD) 2%อัลจินเตปิดเคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนนชั้นเดี่ยว (ACC) และ 2% อัลจินเตปิดเคลือบด้วยคัปปาคาราจีแนนชั้นคู่ (ACG) ซึ่งพบว่าเม็ดปิดทั้ง 5 ชนิด มีอัตราการแพร่ของแอนโรโซยานินในน้ำมะเขีง ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยทำการวัดปริมาณแอนโรโซยานินในน้ำมะเขีง และ นำมาคำนวณเป็นปริมาณแอนโรโซยานินในเม็ดปิด ซึ่งเม็ดปิดแต่ละชนิดจะมีปริมาณแอนโรโซยานินที่แตกต่างกัน โดยจะแทรกซึมเข้าเม็ดปิด ตั้งแต่เวลา 15-40 นาที ซึ่งพบว่า เม็ดปิด ACGD และ ACCD มีปริมาณแอนโรโซยานิน 4.36 ± 0.59 mg/g และ 5.20 ± 0.44 mg/g ซึ่งน้อยกว่าเม็ดปิดชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการลดลงของ pH ในเม็ดปิด ซึ่ง ACGD และ ACCD จะมี pH ลดลงเรื่อยๆ จนถึง pH ที่คงที่ ในวันที่ 3 เปรียบเทียบกับเม็ดปิดชนิดอื่นๆ ที่มี pH ลดลงตั้งแต่ วันที่ 1-2 ซึ่งขนาด และ ค่าความแข็งของเม็ดปิดแต่ละชนิด พบว่า ACGD และ ACCD มีขนาด ค่าความแข็ง และ สีของเม็ดปิด (L^*, a^*, b^*) ที่มีความเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกัน เมื่อแช่เม็ดปิดในน้ำมะเขีง ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งเม็ดปิด ACG, ACC และ 2%Al จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมี และ กายภาพมากกว่า เม็ดปิด ACGD และ ACCD ตามลำดับ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างทางเคมี ของเม็ดปิด ทั้ง 5 ชนิด พบว่ามีการพบว่าโครงสร้างอัลจินเตไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปทั้งหมด มีเพียงการเปลี่ยนแปลงบางพันธะของโครงสร้างอัลจินเตเท่านั้น เมื่อทำการแช่เม็ดปิดทั้ง 5 ชนิดนี้ ในน้ำมะเขีง pH 2.9 ± 0.2 เป็นเวลา 30 วัน และพบว่าเมื่อนำเม็ดปิดทั้ง 5 ชนิดนี้ ตรวจลักษณะสัณฐานวิทยา โดยกล้อง FE-SEM ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า จะพบว่าเม็ดปิด 2%Al ในตัวอย่างควบคุม มีรูพรุน เล็กน้อย หากทำการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ชนิดที่แตกต่างกันแบบชั้นเดี่ยว จะสามารถปิดรูพรุนนั้นได้ แต่จะมีประสิทธิภาพการปิดรูพรุนได้ดีมากยิ่งขึ้น เมื่อนำอัลจินเตเคลือบด้วยวัสดุพอลิเมอร์แบบชั้นคู่ แต่เมื่อทำการแช่เม็ดปิด ลงในน้ำมะเขีง พบว่า ACGD จะมีรอยแยก และ รูพรุนเล็กกว่าเม็ดปิด ACCD AACG ACC และ 2%Al ตามลำดับ

เมื่อทำการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* MF 105 และ *L. plantarum* TISTR 2074 ด้วยเม็ดปิดแต่ละ ชนิด และ แช่ลงในน้ำมะเขีงจะพบว่า ACGD สามารถปกป้องเซลล์ ทั้ง 2 กลุ่ม ได้ดีมากกว่า เม็ดปิดชนิดอื่นๆ และเม็ดปิด ACCD สามารถปกป้องเซลล์ ได้ดีในลำดับรองลงมา เช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่า การนำแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการปรับตัวจากเมียงหมัก และ เพิ่มอัตรา

การรอดชีวิตด้วยไมโครแคปซูล จะมีเซลล์ที่ยังมีชีวิตเหลือรอดไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/mL ซึ่งมีอายุเก็บรักษา 5 วัน เปรียบเทียบกับเซลล์ โปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* TISTR 2074 ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการปรับตัว เมื่อห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูล จะมีอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์ได้ 2 วัน และมีอัตราการลดลงของเชื้อได้เร็วกว่า แบคทีเรีย *L. plantarum* MF และ ยังพบว่า ฟีนอลิกที่มีอัตราการแทรกซึมเข้าเม็ดปิดได้อย่างรวดเร็วกว่าการแทรกซึมของกรด ดังนั้น โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครปิด เซลล์จะได้รับผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตจากฟีนอลิกในน้ำมะเข็ญก่อนได้รับผลกระทบจากกรด

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การปรับรสชาติของน้ำมะเข็ญให้มีรสชาติที่เหมาะสมต่อการบริโภค เนื่องจาก รสชาติของผลิตภัณฑ์ เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่จะทำให้ผู้บริโภคยอมรับ อีกทั้งจะต้องมีการปรับ ค่า pH ของน้ำมะเข็ญให้มีความเป็นด่างเพิ่มมากขึ้น หรือ พัฒนาเม็ดปิด ให้สามารถทนสภาวะน้ำมะเข็ญได้ดีมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะสามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียให้มีชีวิตอยู่รอดได้นาน หรือ ร่วมกับการเสริม โปรไบโอติก ก็จะทำให้สามารถยืดอายุจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้ดีมากยิ่งขึ้นเช่นกัน



บรรณานุกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

ดำเนิน วัฒนา และ เรวดี จอวีระ. ผลกระทบของการแปรรูปผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มมะเกี๋ยงที่มีต่อคุณภาพบางประการของผลิตภัณฑ์และการยอมรับของผู้บริโภค. ปัญหาพิเศษ, คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง, 2543.

มะเกี๋ยง ประโยชน์ดีๆ สรรพคุณเด่นๆ และข้อมูลงานวิจัย 2564. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<https://www.disthai.com/17105294/%E0%B8%A1%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%B5%E0%B9%8B%E0%B8%A2%E0%B8%87> [2 มิถุนายน 2564]

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. การบูรณาการงานวิจัยเมืองเพื่อสืบสานภูมิปัญญาท้องถิ่นและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ Integrated Research of Miang (Camellia sinensis var. assamica) for Local Wisdom Inheritance and Economic Value. 2560

ภาษาอังกฤษ

Abdallah, M.R., Mohamed, M.A., Mohamed, H. and Emara, M.T. Application of alginate and gelatin-based edible coating materials as alternatives to traditional coating for improving the quality of pastirma. Food Science and Biotechnology 27(6) (2018): 1589-1597.

Alavi, F., Emam-Djomeh, Z., Yarmand, M.S., Salami, M., Momen, S. and Moosavi-Movahedi, A.A. Cold gelation of curcumin loaded whey protein aggregates mixed with k-carrageenan: Impact of gel microstructure on the gastrointestinal fate of curcumin. Food Hydrocolloids 85 (2018): 267-280.

Ana, P. O., Jose, M.B.F., Jullyana, Q. *Camellia sinensis* (L.) Kuntze: A Review of Chemical and Nutraceutical Properties. Natural Products : Research Reviews 4 (2016): 1-56.

Anal, A.K. and Singh, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology 18(5) (2007): 240-251.

Annan, N.T., Borza, A.D. and Hansen, L.T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food

Research International 41(2) (2008): 184-193.

- Antunes, A.E.C., Liserre, A.M., Coelho, A.L.A., Menezes, C.R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K. and Azambuja, N.C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. LWT - Food Science and Technology 54(1) (2013): 125-131.
- Arena, M.E., Saguir, F.M. and Manca de Nadra, M.C. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. International Journal of Food Microbiology 47(3) (1999): 203-9.
- Arici, M. and Coskun, F. Hardaliye: fermented grape juice as a traditional Turkish beverage. Food Microbiology 18(4) (2001): 417-421.
- Arup, N. and Shantanu, D. Delivery of probiotic bacteria in long life ambient stable foods using a powdered food ingredient. British Food Journal 115(9) (2013): 1329-1341.
- Beales, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (2004): 1-20.
- Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A., and Bayonove, C. . Influence of sun exposure on the aromatic composition of chileanmuscat grape cultivars moscatel de alejandria and moscatelrosada. American Journal of Enology and Viticulture 48 (1997): 181-186.
- Borges, A., Saavedra, M.J. and Simões, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. Biofouling 28(7) (2012): 755-767.
- Bubin, S.F.A., Ali, S.M., Shukri, R., Ibadullah, W.Z.W., Ramli, N.S., Mustapha, N.A. and Rashedi, I.F.M. Characterization and stability of pitaya pearls from hydrocolloids by reverse spherification. International Journal of Food Properties 22(1) (2019): 1353-1364.
- Burey, P., Bhandari, B.R., Howes, T. and Gidley, M.J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48(5) (2008): 361-377.
- Buruleanu CL, G.G. and Nicolescu CL. Model predictions related to the survival of

- some probiotic bacteria in lactic acid fermented vegetable juices. AWERProcedia Information Technology and Computer Science 1 (2012): 763-8.
- Campanella, D., Rizzello, C., Fasciano, C., Gambacorta, G., Pinto, D., Marzani, B., Scarano, N., Angelis, M.D. and Gobbetti M. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. Food Microbiology 65 (2017): 25-35.
- Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Worametachanon, S., Supraditareporn, W., Chokiatirote, E. and Van der Wiele, T. Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(9) (2013): 2229-38.
- Chaisawadi, S., and Methawiriyasilp, W. Clean production of commercial 'Makiang' juice processing for medicinal herbs and health benefits. Acta Horticulturae 786 (2008): 201-208.
- Chaiyasut, C., , Sivamaruthi, B.S., Pengkumsri, N., Sirilun, S., Peerajan, S., Chaiyasut, K. and Kesika, P. Anthocyanin profile and its antioxidant activity of widely used fruits, vegetables, and flowers in Thailand. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 9(6) (2016): 218-224.
- Chammanee, P., Sombatsompop, K., Kositchaiyong, A. and Sombatsompop, N. Effects of anti-bacterial agents, sample preparation and contact time on anti-bacterial efficacy in MDPE Film. Journal of Macromolecular Science, Part B 48(4) (2009): 755-765.
- Chang, J.H., Shim, Y.Y., Cha, S.K. and Chee, K.M. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. Journal of Applied Microbiology 109(1) (2010): 220-30.
- Cheng, J.-R., Liu, X.-M., Chen, Z.-Y., Zhang, Y.-S. and Zhang, Y.-H. Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics. Food Chemistry 213 (2016): 721-727.
- Chi, M.-C., Lyu, R.-C., Lin, L.-L. and Huang, H.-B. Characterization of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase immobilized in Ca-alginate/k-carrageenan beads. Biochemical Engineering Journal 39(2) (2008): 376-382.

- Coman, M., Silvi, S., Verdenelli, M., Cecchini, C., Orpianesi, C. and Cresci, A. Fruit and vegetable juices tested as possible probiotic beverage. in, 2010.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V.V. Production and Evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. Biomacromolecules 12(7) (2011): 2834-2840.
- Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F.P. and Sinigaglia, M. Functional beverages: the emerging side of functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13(6) (2014): 1192-1206.
- Costa, R.S., Lins, M.O., Le Hyaric, M., Barros, T.F. and Velozo, E.S. In vitro antibacterial effects of *Zanthoxylum tingoassuiba* root bark extracts and two of its alkaloids against multiresistant *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Farmacognosia 27(2) (2017): 195-198.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G. and Hill, C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Molecular Microbiology 40(2) (2001): 465-75.
- De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan D., Piccioni M., Traina G., Pagiotti R., and Pietrella D. Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2018 (2018): 1756308.
- Ding, W.K. and Shah, N. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. International Food Research Journal 15 (2008): 219-232.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Sci 55(3) (2000): 297-300.
- Etchepare, M., Barin, J.S., Cichoski, A.J., Lopes, E.J., Wagner, R., Fries, L.L.M. and Menezes, C.R. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. Ciência Rural 45 (2015): 00-00.
- Fang, Y., Li, L., Vreeker, R. and Yao, X. Rehydration of dried alginate gel beads: Effect of the presence of gelatin and gum arabic. Carbohydrate Polymers 86(3) (2011): 1145-1150.

- FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002: London, Ontario, Canada.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R. and Ouwehand, A.C. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. Microorganisms 7(3) (2019): 83.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. International Journal of Food Microbiology 129(1) (2009): 103-105.
- Geng, P., Zhang, L. and Shi, G.Y. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33(5) (2017): 94.
- Gilliland, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts (1,) (2). Journal of Food Protection 42(2) (1979): 164-167.
- Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct1. Journal of Dairy Science 67(12) (1984): 3045-3051.
- Gobbetti, M., Di Cagno, R. and De Angelis, M. Functional microorganisms for functional food quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 50 (2010): 716-27.
- Godward, G., Sultana, K., Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R. and Reynolds, N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. Milchwissenschaft 55 (2000): 441-445.
- Gu, L., McClements, D.J., Li, J., Su, Y., Yang, Y. and Li, J. Formulation of alginate/carrageenan microgels to encapsulate, protect and release immunoglobulins: Egg Yolk IgY. Food Hydrocolloids 112 (2021): 106349.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R. and Yari Khosroushahi, A. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. Journal of Applied Microbiology 118(4) (2015): 1048-57.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A. and

- Khosroushahi, A.Y. Isolation and characterization of probiotics from dairies. Iranian journal of microbiology 9(4) (2017): 234-243.
- Hashemi, S.M.B., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Nemati, Z., Sohrabi Shokofti, S. and Alizadeh, F. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. Journal of Functional Foods 38 (2017): 409-414.
- Hennink, W.E. and van Nostrum, C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. Advanced Drug Delivery Reviews 54(1) (2002): 13-36.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J.H. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology 41(2) (1998): 85-101.
- Huang, J., Mei, L., Sheng, Q., Yao, S. and Lin, D. Purification and Characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk supported by the national natural science foundation of China (No.30570411) and the research plan of Zhejiang Province, China. Chinese Journal of Chemical Engineering 15(2) (2007): 157-161.
- Jambrak, A.R., Šimunek, M., Petrović, M., Bedić, H., Herceg, Z. and Juretić, H. Aromatic profile and sensory characterisation of ultrasound treated cranberry juice and nectar. Ultrasonics Sonochemistry 38 (2017): 783-793.
- Jiapong, S. and Sudarat, J. Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. International Food Research Journal 19 (2012): 215-221.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A. and Jalaludin, S. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Animal Feed Science and Technology 70(3) (1998): 197-209.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y. and Jian, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. Food Chemistry 125(4) (2011): 1267-1272.
- Kailasapathy, K. and Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol

Cell Biol 78(1) (2000): 80-8.

- Kanpiengjai, A., Chui-Chai, N., Chaikaew, S. and Khanongnuch, C. Distribution of tannin tolerant yeasts isolated from Miang, a traditional fermented tea leaf (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in northern Thailand. International Journal of Food Microbiology 238 (2016): 121-131.
- Karimi, S., Azizi, F., Nayeb-Aghaee, M. and Mahmoodnia, L. The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157:H7. Electronic physician 10(3) (2018): 6548-6553.
- Kawakami, M., Chairote, G. and Kobayashi, A. Flavor constituents of pickled tea, miang, in Thailand. Agricultural and Biological Chemistry 51(6) (1987): 1683-1687.
- Ketwal, S., Chueamchaitrakun, P., Theppakorn, T. and Wongsakul, S. Contents of Total Polyphenol, Microorganisms and Antioxidant Capacities of Pickled Tea (Miang) Commercially Available in Chiang Rai, Thailand. 2014.
- Khalil , A.H. and Mansour, E.H. Alginate encapsulated *Bifidobacteria* survival in mayonnaise. Journal of Food Science 63(4) (1998): 702-705.
- Khanongnuch, C., Unban, K., Kanpiengjai, A. and Saenjum, C. Recent research advances and ethno-botanical history of miang, a traditional fermented tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) of northern Thailand. Journal of Ethnic Foods 4(3) (2017): 135-144.
- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, I. S., Cha, D.S. and Park, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. LWT - Food Science and Technology 41(3) (2008): 493-500.
- Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T. and Shima, J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (GABA) producer, *Lactobacillus paracasei*. Biosci Biotechnol Biochem 72(2) (2008): 278-85.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. International Dairy Journal 13(1) (2003): 3-13.
- Kreft, O., Prevot, M., Möhwald, H. and Sukhorukov, G.B. Shell-in-Shell Microcapsules: a novel tool for integrated, spatially confined enzymatic reactions. Angewandte

Chemie International Edition 46(29) (2007): 5605-5608.

Kwak, H. Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria (LAB) Andreas Feucht. in, 2013.

Lee, K.-Y. and Heo, T.-R. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Applied and environmental microbiology 66(2) (2000): 869-873.

Lee, K.W., Shim, J.M., Park, S.-K., Heo, H.-J., Kim, H.-J., Ham, K.-S. and Kim, J.H Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. LWT - Food Science and Technology 71 (2016): 130-137.

Lee, S.Y., Jo, Y.-J., Choi, M.-J., Lee B.-Y., Han J.-K., Lim J.K. and Oh J.-W. Effect of Coating Method on the Survival Rate of *L. plantarum* for Chicken Feed. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 34(2) (2014): 230-7.

Lee, Y.-M., Yoon, Y., Yoon, H., Park, H.-M., Song, S. and Yeum, K.-J. Dietary Anthocyanins against obesity and inflammation. Nutrients 9(10) (2017): 1089.

Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J. and Liu, C.S. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate gelatin and its properties. Journal of microencapsulation 26(4) (2009): 315-324.

Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Thongchai, W., and Machan, T. . Determination of malic acid and citric acid in ripe berries of *Eugenia paniaia* Roxb. by high performance liquid chromatography. in he 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Technopolis Nakhon Ratchasima. Suranaree University of Technology, 2005.

Liu, X., Yu, W.Y., Zhang, Y., Xue, W.M., Yu, W.T., Xiong, Y., Ma, X.J., Chen, Y. and Yuan, Q. Characterization of structure and diffusion behavior of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. Journal of microencapsulation 19 (2002): 775-82.

Mahdavinia, G.R., Rahmani, Z., Karami, S. and Pourjavadi, A. Magnetic/pH-sensitive K-carrageenan/sodium alginate hydrogel nanocomposite beads: preparation, swelling behavior, and drug delivery. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 25(17) (2014): 1891-1906.

Mao, L., Pan, Q., Yuan, F. and Gao, Y. Formation of soy protein isolate-carrageenan

- complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and in vitro digestion. Food Chemistry 276 (2019): 307-314.
- Martinsen, A., Skjåk-Braek, G. and Smidsrød, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnol Bioeng 33(1) (1989): 79-89.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. and Hassan, H.M. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology 56(7) (1990): 2120-4.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. and Khosrokhavar, R. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. Annals of Microbiology 61 (2011): 411-424.
- Moraes, K., Fagundes, C., Melo, M., Andreani, P. and Monteiro, A. Conservation of Williams pear using edible coating with alginate and carrageenan. Food Science and Technology (Campinas) 32 (2012): 679-684.
- Morais, S.G.G., da Silva Campelo Borges, G., dos Santos Lima, M., Martín-Belloso, O. and Magnani, M. Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. Food Research International 126 (2019): 108681.
- Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z. and Kiani, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27(1) (2011): 123-128.
- Nag, A. and Das, S. Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. Journal of Functional Foods 5(1) (2013): 170-177.
- Nagpal, R., Kumar, A. and Kumar, M. Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. Annals of Microbiology 62(4) (2012): 1573-1578.
- Nualkaekul, S. and Charalampopoulos, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology 146(2) (2011): 111-117.
- Nualkaekul, S., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V. and Charalampopoulos, D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. Food Research International 53(1)

(2013): 304-311.

- Nualkaekul, S., Salmeron, I. and Charalampopoulos, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. Food Chemistry 129(3) (2011): 1037-1044.
- Okada, S., Daengsubha, W., Uchimura, T.A.I., Ohara, N. and Kozaki, M. Flora of lactic acid bacteria in Miang produced in northern Thailand. The Journal of General and Applied Microbiology 32(1) (1986): 57-65.
- Özer, B., Kirmaci, H.A., Şenel, E., Atamer, M. and Hayaloğlu, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. International Dairy Journal 19(1) (2009): 22-29.
- Papadimitriou, K.I., Zeimpekis, I., Moschou, D., Sun, K., Hu, C., Ashburn, P. and Morgan, H. Towards a high-precision, embedded system for versatile sensitive biosensing measurements. in 2015 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), pp. 1-4, 2015.
- Patil, J. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. Digest Journal of nano-materials and biostucture 5 (2010): 241-48.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A. and Sirichakwal, P.P. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. Journal of Food Composition and Analysis 21(3) (2008): 241-248.
- Perrechil, F.A., Maximo, G.J., Sato, A.C.K. and Cunha, R.L. Microbeads of Sodium Caseinate and **K**-Carrageenan as a **β**-Carotene Carrier in Aqueous Systems. Food and Bioprocess Technology 13(4) (2020): 661-669.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M. and Corbo, M. Challenges for the production of probiotic fruit juices. Beverages 1 (2015): 95-103.
- Perricone, M., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Speranza, B. and Bevilacqua, A. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. Journal of Functional Foods 10 (2014): 421-426.
- Pimentel, T.C., Klososki, S.J., Rosset, M., Barão, C.E. and Marcolino, V.A. 14 - Fruit juices

- as probiotic foods. in Grumezescu, A.M. and Holban, A.M. (eds.), Sports and Energy Drinks. 483-513: Woodhead Publishing, 2019.
- Podolak, R.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L. and Fung, D.Y.C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids (+). Journal of Food Protection 59(4) (1996): 370-373.
- Poontawee, W., Natakankitkul, S. and Wongmekiat, O. Protective Effect of *Cleistocalyx nervosum* var. paniala fruit extract against oxidative renal damage caused by cadmium. Molecules 21(2) (2016): 133.
- Popa, E.G., Gomes, M.E. and Reis, R.L. Cell delivery systems using Alginate–carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. Biomacromolecules 12(11) (2011): 3952-3961.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Research International 41(2) (2008): 111-123.
- Puguan, J.M.C., Yu, X. and Kim, H. Diffusion characteristics of different molecular weight solutes in Ca–alginate gel beads. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 469 (2015): 158-165.
- Rakin, M., Vukasinovic, M., Siler-Marinkovic, S. and Maksimovic, M. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. Food Chemistry 100(2) (2007): 599-602.
- Ramdhan, T., Ching, S.H., Prakash, S. and Bhandari, B. Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. Trends in Food Science & Technology 106 (2020): 150-159.
- Ranadheera, S., Prasanna, P.H.P. and Vidanarachchi, J. Fruit juices as probiotic carriers. in. 253-267, 2014.
- Rasel, M. and Hasan, M. Formulation and evaluation of floating alginate beads of diclofenac sodium. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences 11 (2012).
- Reynolds, A.G., Wardle, D. A., Hall, J. W., and Dever, M. Fruit maturation of four *Vitis vinifera* cultivars in response to vineyard location and basal leaf removal. American Journal of Enology and Viticulture 46 (1995): 542-558.
- Ritter, P., Kohler, C. and von Ah, U. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri*

- K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. BMC microbiology 9 (2009): 87.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E. and Jaramillo-Flores, M.E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. Food Research International 44(1) (2011): 250-258.
- Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Graü, M.A., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. In vitro bioaccessibility of health related compounds as affected by the formulation of fruit juice and milk based beverages. Food Research International 62 (2014): 771-778.
- Ruvinov, E. and Cohen, S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: progress, translational strategies, and clinical outlook: From ocean algae to patient bedside. Advanced Drug Delivery Reviews 96 (2016): 54-76.
- Saarela, M., Alakomi, H.L., Mättö, J., Ahonen, A.M. and Tynkkynen, S. Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with improved stability in fruit juice. LWT - Food Science and Technology 44(4) (2011): 1012-1018.
- Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S. and El-Nezami, H. Interaction of probiotics and pathogens benefits to human health Current Opinion in Biotechnology 21(2) (2010): 157-167.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H.S., Alvarez-Ramírez, J. and Vernon-Carter, E.J. Textural properties of alginate pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Food Research International 43(1) (2010): 111-117.
- Sarıyer, S., Duranoğlu, D., Doğan, Ö. and Küçük, İ. pH-responsive double network alginate/kappa-carrageenan hydrogel beads for controlled protein release: Effect of pH and crosslinking agent. Journal of Drug Delivery Science and Technology 56 (2020): 101551.
- Šárka, H., Kristýna, R., Kristina, B., Iveta, K. and Marcela, S. Fruit juices with probiotics new type of functional foods. Czech Journal of Food Sciences 36(No. 4) (2018): 284-288.

- Sarker, M., Ko, S.-Y., Kim, G.-M. and Yang, C.-J. Effects of *Camellia sinensis* and mixed probiotics on the growth performance and body composition in broiler. Journal of medicinal plant research 4 (2010): 546-550.
- Sathisaran, I. and Balasubramanian, M. Physical characterization of chitosan/gelatin-alginate composite beads for controlled release of urea. Heliyon 6(11) (2020): e05495.
- Shah, N.P., Ding, W.K., Fallourd, M.J. and Leyer, G. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. Journal of Food Science 75(5) (2010): M278-M282.
- Shori, A.B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. Food Bioscience 13 (2016): 1-8.
- Siegmundfeldt, H., Björn Rechinger, K. and Jakobsen, M. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. Applied and environmental microbiology 66(6) (2000): 2330-2335.
- Somashekaraiah, R., Shruthi, B., Deepthi, B.V. and Sreenivasa, M.Y. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. Frontiers in Microbiology 10(1382) (2019).
- Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K. Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus* (1). Journal of Food Protection 52(12) (1989): 856-862.
- Sukontasing, S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J.-S. and Suzuki, K.-i. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(9) (2007): 2151-2154.
- Sukprasansap, M., Chanvorachote, P. and Tencomnao, T. *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* berry fruit protects neurotoxicity against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. Food and Chemical Toxicology 103 (2017): 279-288.
- Talwalkar, A., Miller, C., Kailasapathy, K. and Nguyen, M. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yogurt. International Journal of Food Science & Technology 39 (2004): 605-611.

- Tamime, A.Y., Saarela, M., Søndergaard, A.K., Mistry, V.V. and Shah, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. in Probiotic Dairy Products. 39-72, 2006.
- Tantratian, S. and Balmuang, N. Enriched makiang (*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*) seed extract and citric acid to control pathogenic bacteria and color of fresh cut cantaloupe. LWT 138 (2021): 110626.
- Tantratian, S., Balmuang, N. and Krusong, W. Phenolic enrichment of Ma-Kieng seed extract using absorbent and this enriched extract application for safety control of fresh cut cantaloupe. LWT 106 (2019): 105-112.
- Thongma, S. Botanical description of Makiang. Lampang Agricultural Research and Training Center. Bangkok, 2002.
- Tolstoguzov, V.B. Some physico chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. Food Hydrocolloids 9(4) (1995): 317-332.
- Trček, J., Mira, N.P. and Jarboe, L.R. Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. Applied Microbiology and Biotechnology 99(15) (2015): 6215-6229.
- Tripathi, M.K. and Giri, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of Functional Foods 9 (2014): 225-241.
- Tsai, F.-H., Chiang, P.-Y., Kitamura, Y., Kokawa, M. and Islam, M.Z. Producing liquid-core hydrogel beads by reverse spherification: Effect of secondary gelation on physical properties and release characteristics. Food Hydrocolloids 62 (2017): 140-148.
- Tsen, J.-H., Lin, Y.-P. and An-Erl King, V. Fermentation of banana media by using K-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. International Journal of Food Microbiology 91(2) (2004): 215-220.
- Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z. and Yi, L. Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 26(12) (2015): 735-749.
- Vasudha, S. and Mishra, H. Non dairy probiotic beverages. International Food Research Journal 20 (2013): 7-15.
- Volstatova, T., Marsik, P., Rada, V., Geigerova, M. and Havlik, J. Effect of apple extracts

- and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of *Lactobacillus gasser* R and *Lactobacillus casei* FMP. Journal of Functional Foods 35 (2017): 391-397.
- Wang, Z. and Yang, S.-T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Bioresource Technology 137 (2013): 116-123.
- Yáñez, R., Marques, S., Gírio, F.M. and Roseiro, J.C. The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. Process Biochemistry 43(4) (2008): 356-361.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. Journal of Clinical Microbiology 42(4) (2004): 315-8.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. LWT - Food Science and Technology 38(1) (2005): 73-75.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Technology 97(12) (2006): 1427-1430.
- Žuntar, I., Petric, Z., Bursać Kovačević, D. and Putnik, P. Safety of Probiotics: Functional Fruit Beverages and Nutraceuticals. Foods 9(7) (2020): 947.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ

ก.1 ค่าสีของเม็ดบีด ประยุกต์จากวิธีของ Abdallah et al. (2018)

วิธีวิเคราะห์

วัดสีของเม็ดบีดด้วยเครื่อง Chroma meter (Konica-Minolta CR-10, Osaka, Japan) ทำการปรับค่ามาตรฐานทุกครั้งด้วย white plate ($L^* = +97.83$, $a^* = 0.43$, $b^* = +1.98$) จากนั้นทำการวัดสีบริเวณพื้นผิวของเม็ดบีดทำการอ่านค่าแต่ละตัวอย่างทั้งหมด 6 ครั้ง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ต่อตัวอย่าง 1 ชุด

โดยที่ L^* ใช้กำหนดค่าความสว่าง (Lightness)

$L^* = 0$ วัตถุไม่มีสีดำ

$L^* = 100$ สีที่ได้จะสว่าง หรือ เป็นสีขาว

a^* ใช้กำหนดค่าสีแดง หรือ สีเขียว (Redness/Greenness)

$+a^* =$ วัตถุมีสีออกแดง

$-a^* =$ วัตถุมีสีออกเขียว

b^* ใช้กำหนดค่าสีเหลือง หรือ สีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

$+b^* =$ วัตถุมีสีออกเหลือง

$-b^* =$ วัตถุมีสีออกน้ำเงิน

ก.2 การวัดขนาด และ ค่าความแข็งของเม็ดบีด ตามวิธีของ Nualkaekul et al. (2013)

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างเม็ดบีด ทั้ง 5 ชนิด วัดขนาดโดยใช้ไมโครมิเตอร์ (Fowler IP54, USA) และหลังจากนั้นนำมาหาค่า ความแข็ง (hardness) ของเม็ดบีด ด้วยเครื่อง texture analyzer (TA-XT2i; Stable Micro Systems, England) โดยใช้ หัววัด รหัส P/2 เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 mm cylinder probe และ ใช้ความเร็ว 0.1 mm s^{-1} การวิเคราะห์จะอยู่ใน

รูปแบบของการกด โดยระยะกด คือ ระยะ 50% ของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดปิด แรงบีบอัดสูงสุด (peak force) จะถูกวัดเป็นหน่วยกรัม (g) โดย ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ต่อ ชุดตัวอย่าง

ก.3 วิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา ประยุกต์จากวิธีของ Liu et al. (2002) และ Rasel and Hasan (2012)

วิธีเตรียมสารเคมี

เจือจาง Ethyl Alcohol 95% ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 30 % 50% 70%

โดยใช้ สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรเริ่มต้น

C_2 = ความเข้มข้นสุดท้าย

V_2 = ปริมาตรสุดท้าย

วิธีเตรียมตัวอย่าง

ทำการ dehydrate ใน Ethyl Alcohol(EtOH) ทั้งหมด 5 ขั้นตอน โดยแต่ละขั้นตอนให้กรองเฉพาะเม็ดปิดไปแช่ EtOH ปริมาตร 5 mL ในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิห้อง ดังนี้ แช่เม็ดปิดลงใน EtOH 30% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่เม็ดปิดแช่ลงใน EtOH 50% เป็นเวลา 30 นาที แช่เม็ดปิดต่อลงใน EtOH 70% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเม็ดปิดแช่ใน EtOH 95% เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งขั้นตอนสุดท้าย จะแช่เม็ดปิดใน Ethyl Alcohol Absolute เป็นเวลา 30 นาที (ขั้นตอนนี้ให้ทำซ้ำ 3 ครั้ง) กรองเม็ดปิดออก และเก็บตัวอย่างใน หลอดทดลอง โดยเติม Ethyl Alcohol Absolute ปริมาตร 5 mL ปิดฝาหลอดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ ส่งตัวอย่างไปที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อ ทำการนำตัวอย่างเข้าเครื่องทำแห้งแบบวิกฤต Critical point dryer (CPD) ซึ่งเป็นการทำให้ตัวอย่างแห้งโดยไม่เสียรูปร่าง ซึ่งอาศัยหลักการนำคาร์บอนไดออกไซด์เหลวแลกเปลี่ยนกับแอลกอฮอล์ ณ จุดที่มีอุณหภูมิ และ ความ

ต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้น ทำการวิเคราะห์สภาพพื้นผิวของเม็ดปิดแต่ละชนิด โดยนำชิ้นงานยึดติดกับแผ่นวางด้วย carbon tape และ ทำการฉาบผิวด้วยทอง นำตัวอย่างไปศึกษาลักษณะพื้นผิวของเม็ดปิด โดยใช้กล้อง Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) 10 kV ที่กำลังขยาย 30 เท่า และ 50,000 เท่า

ก.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดปิด โดยใช้เครื่อง FTIR ประยุกต์จากวิธีของ Rasel and Hasan (2012)

วิธีเตรียมตัวอย่าง

นำเม็ดปิดที่ได้จากการสุมเก็บตัวอย่าง ทำการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ เครื่อง Freeze dryer ที่อุณหภูมิ -90°C ที่ความดัน 1 hPa เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเม็ดปิดที่แห้ง นำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเม็ดปิดแต่ละชนิด โดยใช้เครื่องมือ Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ทำให้เกิดช่วงกลาง มีช่วงคลื่น $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวัด pH ในเม็ดบีด ประยุกต์จากวิธีของ Sariye et al. (2020)

บดเม็ดบีดแต่ละชนิด ให้แตกละเอียด และ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที และ นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำแข็งละลาย จากนั้น นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า pH โดยใช้ เครื่องมือ pH meter (LAQUAtwin-pH-22, Horiba, Japan)

ข.2 การวัดปริมาณกรดทั้งหมด (Total % acidity) ด้วยวิธี Titratable acidity

ตามวิธีของ Rodriguez-Campos et al. (2011)

1. วิธีเตรียมสารเคมี

วิธีเตรียม 0.1N NaOH

วิธีคำนวณ

1N จะมี NaOH อยู่ 40 g

0.1 N จะมี NaOH อยู่ $40 \times 0.1 = 4\text{ g/L}$

หากต้องการ เตรียม NaOH ปริมาตร 100 mL จะต้องใช้ซึ่งสารมา $\frac{4 \times 100}{1000} = 0.4\text{ g}$

เพราะฉะนั้น ต้องซึ่งสาร NaOH มา 0.4 g และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 mL

ทำการไทเทรตน้ำมะกึ่ง เพื่อหา ปริมาณรวมของกรด (Total % Citric acid) โดยการนำตัวอย่างของสารละลายกรอเม็ดบีดออก และ บีเปตมา 10 mL จากนั้น เจือจางด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 40 mL ทำการหยด phenolphthalein 1-2 หยด เพื่อเป็น indicator จากนั้นนำไปไทเทรตกับ 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติที่ปริมาณต่างเข้าทำปฏิกิริยาพอดีกับกรด จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์กรดซิตริกที่มีอยู่ในตัวอย่าง

จากสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{กรดซิตริก \%} = \frac{N \text{ ของ } NaOH \times \text{มิลลิตรของ } NaOH \text{ ที่ใช้ } \times \text{meq.wt citric acid} \times 100}{\text{ตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต}} \quad (1)$$

โดย *meq.wt citric acid* = 0.06404

ข.3 วิธีการวัดปริมาณทั้งหมดของแอนโรไซยานิน โดยใช้วิธี pH-differential method

ตามวิธีของ Jiapong and Sudarat (2012)

1. วิธีเตรียม ไฮโดรคลอริก

วิธีคำนวณ

36 % w/v = สารละลาย 100 ml มี HCl 36 g

HCl 36 g = x mol >> mol = weight/molecular weight

$$= 36/36.46$$

$$= 0.987 \text{ mol}$$

ความเข้มข้น 1 Molarity (M) = 1 mol/L

ดังนั้น สารละลาย 100 mL มี HCl 0.987 mol

1000 mL มี HCl 9.87 mol

ปิเปต HCl 38% มา 1 mL นำมาปรับในขวดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1L

2. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์

2.1 วิธีเตรียม 1 KCl buffer

เตรียม สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) pH 1.0 ความเข้มข้น 0.025 M เตรียม 250 mL โดย ชั่ง KCl 0.466 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 240 mL ปรับค่า pH ด้วย HCl หรือ NaOH จนได้ pH 1.0

2.2 วิธีเตรียมสารละลาย Sodium acetate buffer (CH₃COONa) pH 4.5

2.2.1 วิธีเตรียม 0.1 M Acetic acid

มวลโมเลกุลของกรดอะซิติกเท่ากับ 60.05 g/mol

$$0.1 \text{ (Mole)} \times 60.05 \text{ (g)} \times 99.8/100 = 5.99 \text{ g}$$

นำค่าที่คำนวณได้มาหารด้วยความหนาแน่นของกรดอะซิติก ซึ่งเท่ากับ 1.049 g/mL

$$5.99\text{g}/1.049\text{g} = 5.710$$

เพราะฉะนั้น ปิเปต Acetic acid 5.710 mL ใน Volumetric Flask แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 1000 mL

ตัวอย่าง วิธีคำนวณบัฟเฟอร์

กรดอะซิติก – โซเดียมอะซิเตต ปริมาตร 50 mL pH 4.5 จากสารละลายกรดอะซิติก 0.1 M (น้ำหนักโมเลกุล CH₃COONa = 82 g/mol และ pKa ของกรดอะซิติก = 1.75 × 10⁻⁵)

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร pH บัฟเฟอร์} &= \text{pK}_a + \log \frac{[\text{salt(aq)}]}{[\text{HA(aq)}]} \\ \text{จะได้} \quad 4.5 &= -\log(1.75 \times 10^{-5}) + \log \frac{[\text{salt(aq)}]}{[0.1]} \\ 4.5 &= 4.76 + \log \frac{[\text{salt(aq)}]}{[0.1]} \\ \frac{[\text{salt(aq)}]}{[0.1]} &= 10^{-0.26} \end{aligned}$$

$$[\text{salt(aq)}] = 0.55 \times 0.1 = 0.055 \text{ M}$$

ในสารละลาย 1000 mL ต้องใช้ $\text{CH}_3\text{COONa} = 0.055 \text{ M}$

ในสารละลาย 50 mL. ต้องใช้ $\text{CH}_3\text{COONa} = 0.00275 \text{ M}$

$$\text{CH}_3\text{CHOO}^- = 0.00275 \text{ M}$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้นต้องใช้ } \text{CH}_3\text{COONa} &= 0.00275 \times 82.03 \\ &= 0.2255 \text{ g} \end{aligned}$$

ชั่ง CH_3COONa จำนวน 0.2255 g มาละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 50 mL

เตรียม สารเคมี 2 ชนิด ใน volume matrix flask 10 mL โดยแยกกัน ได้แก่ KCl buffer pH 1.0 และ CH_3COONa buffer pH 4.5 จากนั้นนำ sample เฉพาะส่วนน้ำมะเข็ญที่ผ่านการแช่อัลจิเนตปิด ใส่ลงไปเพื่อเป็นการเจือจาง ในแต่ละ flask ปริมาตร 1 mL ปรับปริมาตร ให้ครบ 10 mL จากนั้น รอสารเคมีทำปฏิกิริยา 15 นาทีนำไปวัดค่า ดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrometer ที่ A_{510} และ A_{700} nm. (ต้องทำการวัดระหว่าง 15 นาที - 1 ชั่วโมง)

นำค่าที่วัดได้ คำนวณตามสมการดังนี้

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}} \quad (2)$$

คำนวณความเข้มข้นของ monomeric anthocyanin pigment ที่อยู่ในตัวอย่าง

$$\text{Monomeric anthocyanin} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l) \text{ pigment (mg/L)} \quad (3)$$

และ แปลงเป็น mg ของปริมาณ anthocyanin ต่อ 100g ของตัวอย่าง

เมื่อ MW คือ molecular weight , DF คือ อัตราส่วนเจือจางของตัวอย่าง , ϵ คือ ความสามารถในการดูดซับแสง (molar absorptivity) รังควัตถุ ของ cyanidin-3-glucoside , l คือ ความกว้างของคิวเวท โดยที่ MW = 449.2 และ $\epsilon = 26,900$

4. วิธีคำนวณปริมาณแอนโธไซยานินในเม็ดบีด ประยุกต์จากวิธีของ Puguan et al. (2015) และ Jiapong et al. (2012)

สามารถคำนวณได้ตามสมการดังนี้

Anthocyanin content in beads (mg/g)

$$= \text{ATC } t_0 - \text{ATC } t_{sd} \quad (4)$$

โดยกำหนดให้

$\text{ATC } t_0$ = ปริมาณแอนโธไซยานินในน้ำมะเกี๋ยง (mg/L) ณ ที่เวลา 0 นาที

$\text{ATC } t_{sd}$ = ปริมาณแอนโธไซยานิน (mg/L) มีปริมาณที่คงที่โดยไม่มีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ณ ที่เวลา X (นาที)

ซึ่ง $\text{ATC } t_{sd}$ จะต้องเข้ากระบวนการวิเคราะห์ทางสถิติ จึงจะทราบเวลาที่ X นาที และ นำมาคำนวณค่า แอนโธไซยานินในเม็ดบีดได้ตามสมการ

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ

ค.1 วิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบระดับห้องปฏิบัติการ ประยุกต์จากวิธีของ De Marco et al. (2018)

1. เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก และ LAB- MF ที่คัดแยกได้จากใบเมี่ยงหมัก

เชื้อเชื้อโคโลนีที่ต้องการทดสอบได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 2074, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365, *Lactobacillus salivarius* TISTR 1112, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272, *Lactobacillus casei* TISTR 1340 และ *Lactobacillus paracasei* ATCC 393 และ LAB-MF ที่คัดแยกได้จากเมี่ยงหมัก ประมาณ 3-4 โคโลนีใส่ใน MRS broth ปริมาตร 9 mL (ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง Auto clave 121 °C เป็นเวลา 15 นาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปิเปตปริมาตร 1 mL ลงใน MRS broth ปริมาตร 9 mL หลอดใหม่ (ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง Auto clave 121 °C เป็นเวลา 15 นาที) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

นำเชื้อที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้น เทอาหารเหลว ออก แบบ Aseptic technique ไปล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 9 mL นำไปวัดค่าความขุ่น เท่ากับ 1.0 McFarland standard ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/mL

2. เชื้อแบคทีเรียก่อโรค

เชื้อเชื้อโคโลนีที่ต้องการทดสอบได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 1311, *Salmonella enteritidis* DMST 15676, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 6633 ประมาณ 3-4 โคโลนีใส่ใน NA broth ปริมาตร 9 mL (ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง Auto clave 121°C เป็นเวลา 15 นาที) หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปวัดค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^6 CFU/mL สามารถนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียม นำไปใช้ในการทดลองต่างๆได้

ค.2 วิธีการย้อมผนังเซลล์แบคทีเรีย ตามวิธีของ Lee et al. (2016) และ Somashekaraiah et al. (2019)

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และ เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบ ทำการ สเมียร์ (smear) ให้เชื้อกระจายในน้ำกลั่น ทำให้แห้งโดยการนำแผ่นสไลด์ผ่านความร้อน (heat fixed) 2-3 ครั้ง และ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง และ ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง และ ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดด้วย 95% แอลกอฮอล์ และ ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นย้อมสี Safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที และ ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีผนังเซลล์ และ ลักษณะรูปร่างของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแลคติกจะติดสีของ Crystal violet หรือ สีม่วงน้ำเงิน คือ เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก

ค.3 วิธีทดสอบคะตะเลส ตามวิธีของ Lee et al. (2016) และ Somashekaraiah et al. (2019)

หยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วใช้ลูบเชื้อเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ ทำการสเมียร์ ลงบนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแลคติกจะสร้างเอนไซม์คะตะเลส คือ ไม่เกิดฟองก๊าซ ให้ผลเป็น (-) คือ เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียแลคติก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ค.4 วิธีนับจำนวนเชื้อที่เหลืรอดชีวิต Survival (%) ตามวิธีของ Haghshenas et al. (2015)

สามารถคำนวณจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลืรอดได้จากสมการ

$$\text{Survival (\%)} = (N/N_0) \times 100 \quad (5)$$

N = จำนวนเชื้อที่สามารถมีชีวิตเหลืรอด (\log_{10} CFU/mL or g)

N_0 = จำนวนเชื้อปริมาณเริ่มต้น (\log_{10} CFU/mL or g)

ค.5 วิธีวัดรอบวงใส (clear zone) ของแบคทีเรีย ประยุกต์จากวิธีของ Karimi et al. (2018)

ขนาดของรอบวงใส (clear zone) (6)

= ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของเชื้อ - ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disk (6 mm)

วิเคราะห์ผล ขนาดของ Clear Zone : 8–10 mm ให้ผลเป็น (+), 11–15 mm ให้ผลเป็น (++) และ ถ้าหากไม่พบ clear zone ให้ผลเป็น (-)

ค.6 การจำแนกเชื้อโดยวิธี 16S rRNA sequencing ประยุกต์จากวิธีของ Lee et al. (2016) และ Somashekaraiyah et al. (2019)

1 . วิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบคทีเรีย โดยใช้ PCR

ทำได้โดย วิธีการ ทำ DNA extraction ด้วยการต้ม โดยนำ Colony ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar มา 2-3 loops ใส่ลงในหลอด 0.3 mL sterile water และ ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำหลอดไป centrifuge ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะเก็บส่วนใส (Crude DNA)ไปใช้ใน โดยดูดไปไว้ Eppendorf หลอดใหม่ เพื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในขั้นตอนถัดไป ซึ่งสามารถเตรียมตัวอย่าง Master mix ได้จาก ตาราง ค.6

ตาราง ค.6 การเตรียม Master mix ในการทำ PCR product

Reagent	Concentration		Volume (μL)
	Stock	Working	Working (50 $\mu\text{L}/\text{rxn}$)
Vi buffer	10X	1X	5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.5
dNTPs mix	10 μM	0.1 μM	0.5
Primer (Forward)	10 μM	0.1 μM	0.5
Primer (Reverse)	10 μM	0.1 μM	0.5
Tag DNA	5 U/ μL	2 U/ μL	0.4
H ₂ O	-	-	36.6
Template (Sample)	-	10-50 ng/ μL	5

นำ Template ผสม กับ master mix ทำการตั้งค่าเครื่องแต่ละ Step ดังนี้ (1) อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที (2) อุณหภูมิ 92 °C เป็นเวลา 1 นาที (3) อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 นาที (4) อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที (5) GOTO step 2, 30X (6) อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที (7) อุณหภูมิ 4 °C ซึ่ง Primer ที่ใช้ (ในที่นี้ใช้ 338F, 518R อุณหภูมิที่เหมาะสมในการ annealing คือ 55 °C) ซึ่งกระบวนการทำ PCR จะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อจบกระบวนการ นำ Eppendorf PCR product ไปทำการรันเจลในขั้นตอนถัดไป หรือ ถ้าหากยังไม่ทำการรันเจลทันที ให้เก็บหลอด PCR product ที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อต้องการทำการรันเจล ให้นำ PCR product ที่แช่แข็งตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนได้สารละลาย จึงสามารถนำไปรันเจลต่อได้

2. วิธีการ Run gel

2.1 วิธีการเตรียมเจล

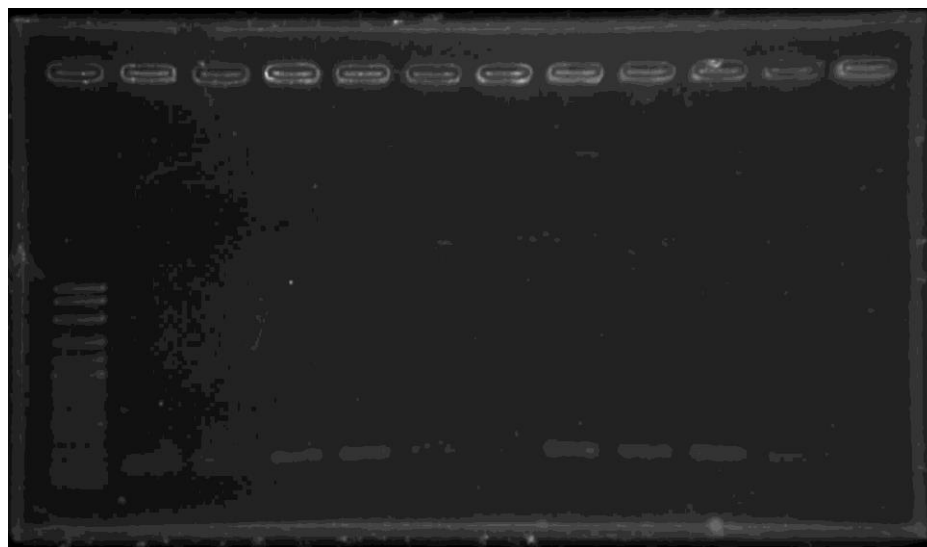
ชั่ง Agarose gel 1 g ลงใน flask TE buffer ปริมาตร 100 mL หลังจากนั้นนำ flask เข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที หรือ พอให้ ผง Agarose gel ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ TE buffer ข้อสังเกตคือ หากผง Agarose gel ละลายก็จะได้เป็นสารละลายใสไม่มีสี และ ไม่มีความขุ่น นำ

Eppendorf ที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ออกจาก -20°C มาใส่ลังโฟมโดยมี ice pack ควบคุมอุณหภูมิ ความเย็นขณะดำเนินการทดลอง

หลังจากนั้นเตรียม parafilm เป็นแถบเล็กๆ แล้วหยด dye 2 μL ตามจำนวน DNA ที่ต้องการทดสอบ และ หยด DNA 10 μL ผสมให้เข้ากันกับ dye เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วให้ดูด ใส่ในช่อง gel ที่เตรียมไว้ นำเจลเข้าเครื่อง run gel โดยตั้งค่าเครื่องใช้ 100V เป็นเวลา 30 นาที เมื่อ run เสร็จใส่ถุงมือแล้วนำเจลออกจากเครื่องไปแช่ใน Ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างน้ำ Distilled water เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ทำการเปิดโปรแกรม Gene snap และ ใส่เจลในตู้มืด ทำการเปิดไฟแสงสีขาวเพื่อจัดตำแหน่ง จากนั้นปิดตู้ และ ปิดไฟแสงสีขาว ทำการเปิดแสง UV จะได้ภาพจากการ run gel ขึ้นแถบ DNA ของแบคทีเรีย(ถ้าต้องการภาพพื้นหลังขาวให้ไปที่ image แล้วกด invert)

ซึ่ง PCR product ที่ได้ จะต้องมีความเข้มข้น 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ มีขนาด (size) 160 bp ตามรูปที่ รูปที่ ค.6 นำ PCR product ปริมาตร 15 μL ส่งวิเคราะห์ DNA sequencing กับ บริษัท แปซิฟิก ไชเอ็นซ์ จำกัด เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย และ นำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละ ไอโซเลท เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI ในโหมด GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง หรือความเหมือน (% identity) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเมียงหมัก กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแลคติกใน ฐานข้อมูล สายพันธุ์แบคทีเรีย ใน GenBank จะสามารถทราบถึง ความคล้ายคลึงของสายพันธุ์ ระหว่างแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก และ แบคทีเรียที่มีอยู่ใน ฐานข้อมูล ตามรูปที่ ค.6.1



รูปที่ ค.6 ภาพตัวอย่าง DNA ของ เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติก คัดแยกได้จาก
เมี่ยงหมัก บน Agarose gel

ค.7 การวัดจำนวนแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครแคปซูลแต่ละชนิด ประยุกต์จากวิธีของ

Nualkaekul et al., 2013

1. วิธีเตรียมสารเคมี

1.1 การเตรียม Citrate buffer

ทำเตรียมสารละลาย 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7H_2O$) 10.51 g ในน้ำกลั่น 1 L และ เตรียมสารละลาย 0.05 M sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 H_2O$) 14.7 g ในน้ำกลั่น 1 L จากนั้น ปิเปตสารละลาย 0.05 M citric acid ปริมาตร 9.5 mL ผสมกับ สารละลาย 0.05 M sodium citrate ปริมาตร 40.5 mL ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย จะได้ citrate buffer โดยใช้ 1N HCl หรือ 1N NaOH ในการปรับ ให้ได้ 1% Citrate buffer pH 6.0

วัดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิตในเม็ดปิดโดยใช้ 1% Citrate buffer pH 6.0 ปริมาตร 9 mL และ ใส่เม็ดปิดที่ผ่านการกักเก็บในน้ำมะเขีง 1 g ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้สารละลายเข้าไปในโครงสร้างของเม็ดปิดทำให้โครงสร้างเม็ดเจลเสีสภาพ จากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) จนกว่าเม็ดปิดจะละลาย เป็นเนื้อเดียวกันกับ citrate buffer นำสารละลายดู มา 1 mL ทำการเจือจางเชื้อด้วย 0.85% NaCl โดยทำการ serial dilution จากนั้น เลือกสารละลายที่เหมาะสม ใช้เทคนิค spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่เข้าไปใน anaerobic jar และ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิตในเม็ดปิด โดยรายงานผลเป็น \log_{10} CFU/g

ค.8 การวัดอัตราการลดลงของแบคทีเรีย ประยุกต์จากวิธีของ Chammanee et al. (2009)

วิธีคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อแบคทีเรีย หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ (%)

$$R = \frac{A - B \times 100}{A} \quad (7)$$

R คือ เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อแบคทีเรีย หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)

A คือ จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเวลาที 0 (ชั่วโมง หรือ วัน) หน่วยเป็น CFU/mL หรือ g

B คือ จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ลดลงเวลาที X (ชั่วโมง หรือ วัน) หน่วยเป็น CFU/mL หรือ g

เวลาที X คือ เวลาที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีจำนวนที่ลดลง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวภัสริน หัตยาภิชาติ
วัน เดือน ปี เกิด	18 ตุลาคม 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและผลิตภัณฑ์การเกษตร คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อปีการศึกษา 2559 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2560
ที่อยู่ปัจจุบัน	140 ถนนมหารณพ แขวงเสาชิงช้า เขตพระนคร กรุงเทพมหานคร 10200
ผลงานตีพิมพ์	ได้นำเสนอผลงานวิจัยภาคโปสเตอร์ ในหัวข้อ Changes of Alginate beads mixed different polymers during storage in acidic fruit juice ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 23rd Food Innovation Asia Conference 2021 (FIAC 2021) Food Innovation and Sustainability through Bio-Circular-Green Economy ในวันที่ 18 มิถุนายน 2564