

ความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์  
ด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันในน้ำแครอท

STABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA ENCAPSULATED  
BY EXTRUSION METHOD IN CARROT JUICE

สุภัสสร วันสุทธะ<sup>1,3</sup>, ลัดดาวลัย ยืนยาว<sup>1,3</sup>, เขมวิทย์ จันทะมา<sup>2</sup>

และ ศิริมา สุวรรณภูมิ จันทะมา<sup>3,\*</sup>

Supasson Wansutha<sup>1,3</sup>, Laddawan Yuenyaow<sup>1,3</sup>, Kaemwich Jantama<sup>2</sup>

and Sirima Suvarnakuta Jantama<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> สาขาการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

<sup>2</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

<sup>3</sup> กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

### บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญที่พบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ผสมโพรไบโอติก คือ แบคทีเรียโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ จึงมีการนำเทคนิคเ็นแคปซูลชันมาใช้ในการปรับปรุงอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกเมื่อนำไปเติมในน้ำแครอท โดยทำการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *Lactobacillus fermentum* LF026 และ *Bifidobacterium animalis* BF052 ด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชัน โดยใช้ส่วนผสมของพอลิเมอร์คือเพคตินและไฮดรอกซีแอลจีเนต และประเมินร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์และแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำแครอท เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระยะเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อเติมในน้ำแครอท พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่าแบคทีเรีย

\* ผู้ประสานงาน: ศิริมา สุวรรณภูมิ จันทะมา

อีเมล: sirima.s@ubu.ac.th

ที่ไม่ได้รับการห่อหุ้มเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอทได้

**คำสำคัญ:** การห่อหุ้มเซลล์, โพรไบโอติก, ความคงตัว, น้ำแครอท

## ABSTRACT

Major problem in probiotic-supplemented health product development is the low survival rate of probiotic strains. Therefore, encapsulation method has been used to improve the survival rate of the probiotic strains in food products. This study aimed to evaluate the effect of encapsulation to the survival rate of probiotic strains supplemented in carrot juice. *Lactobacillus fermentum* LF026 and *Bifidobacterium animalis* BF052 were encapsulated by extrusion method using pectin and sodium alginate as a polymer mixture. Survival rates of encapsulated and non-encapsulated bacteria in carrot juice during storage at 4 °C for six weeks were tested. The results of stability test of both probiotic strains in carrot juice indicated that encapsulated probiotic cells showed the greater survival rate than that of non-encapsulated cells. The obtained results demonstrated that encapsulation of probiotic cell could increase the survival rate of probiotic bacteria in carrot juice.

**KEYWORDS:** Encapsulation, Probiotic, Stability, Carrot juice

## บทนำ

โพรไบโอติก (probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอ จะช่วยส่งเสริมสุขภาพร่างกาย (FAO/WHO, 2002) ในสภาวะปกติสามารถพบโพรไบโอติกได้ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ มีบทบาทสำคัญต่อร่างกายในการควบคุมสมดุลของลำไส้ และมีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านต่าง ๆ เช่น ป้องกันภาวะท้องเสีย ลดภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยหรือไม่ทนต่อน้ำตาลแลคโตส ลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง ป้องกันหรือลดระดับ

การเกิดสารก่อมะเร็ง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Amara et al., 2015) ผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์จากนม เช่น โยเกิร์ต ซีสมันหมักในหลายรูปแบบ รวมถึงผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเสริมโพรไบโอติก (Sharma และ Devi, 2014; Altieri, 2016) สำหรับผลิตภัณฑ์น้ำผักและน้ำผลไม้ที่มีการเติมโพรไบโอติกอาจจะยังไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศไทย แต่ได้รับความนิยมสำหรับผู้บริโภคในหลายประเทศ (Kechagia et al., 2013) เช่น ประเทศสวีเดน อังกฤษ สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย เดนมาร์ก และฟินแลนด์ (Chaudhary, 2019)

แบคทีเรียโพรไบโอติกเมื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์โดยตรงอาจมีความคงตัวหรือมีร้อยละการรอดชีวิตต่ำ จึงมีแนวคิดในการเพิ่มความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกให้มีปริมาณการรอดชีวิตที่มากที่สุดด้วยการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย (encapsulation) ก่อนนำไปเติมในผลิตภัณฑ์ การนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้ประโยชน์โดยการเติมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงคือความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ การรอดชีวิตในระหว่างกระบวนการผลิต ความคงตัวที่สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหาร เอนไซม์และน้ำย่อยในทางเดินอาหาร และกลื่อน้ำดีในลำไส้ เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการปกป้องเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกให้รอดชีวิตจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ จึงมีแนวคิดในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียก่อนนำไปเติมในผลิตภัณฑ์ (Burgain et al., 2011) การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกโดยวิธีการเอ็นแคปซูลชันด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก ต้นทุนต่ำ โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก และสามารถเพิ่มความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ (Krasaekoopt et al., 2003) การห่อหุ้มเซลล์ทำได้ด้วยการนำสารพอลิเมอร์มาใช้ในการกักเก็บเซลล์และช่วยปกป้องแบคทีเรียโพรไบโอติกจากการถูกทำลายในสภาวะความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งจะสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกให้มีปริมาณโพรไบโอติกอยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการส่งเสริมสุขภาพ นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ยังสามารถช่วยกลบรสชาติ สี และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้อีกด้วย (Zuidam and Shimoni, 2009; Champagne and Kailasapathy, 2008) การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนต (alginate) และไคโตซาน (chitosan) ช่วยปกป้องเซลล์โพรไบโอติกทำให้โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารได้ เป็นวิธีที่ดีในการนำส่งเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกไปยังลำไส้ใหญ่เพื่อการส่งเสริมสุขภาพของ

ร่างกาย (Chávarri et al., 2010) อัลจินตเป็นสารที่นิยมนำไปใช้ในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก เพราะมีโครงสร้างที่เรียบง่าย ไม่เป็นพิษ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และต้นทุนต่ำ แต่มีข้อเสียคือมีความไวต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด (Korbekandi et al., 2011) ดังนั้นจึงมีการนำพอลิเมอร์ชนิดอื่นมาผสมร่วมด้วย เช่น เพคติน (pectin) เมื่อรวมตัวกับน้ำตาลและกรดในปริมาณที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดเป็นเจลที่อ่อนนุ่ม นอกจากนี้ เพคตินยังจัดเป็นพรีไบโอติก (prebiotics) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้อีกด้วย (Burgain et al., 2011)

ผักและผลไม้หลายชนิดประกอบสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณสมบัติในการป้องกัน หรืออาการที่เกิดเนื่องจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้นำผักเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถหาบริโภคได้ง่าย สะดวก และมีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ (Zheng et al., 2017) น้ำแครอทมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่สามารถลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ โรคหลอดเลือด และลดกระบวนการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่อาจส่งผลให้เกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ ได้ (Potter et al., 2011) นอกจากนี้ น้ำแครอทยังมีคุณสมบัติ ในการขับปัสสาวะและลดความดันโลหิต ในแครอทประกอบด้วยวิตามิน (vitamins) แร่ธาตุ (minerals) สารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ไฟโตเคมีคอล (phytochemicals) ลูทีน (lutein) ไลโคปีน (lycopene) แคโรทีน (carotene) ซีแซนทีน (zeaxanthin) และแซนโทฟิล (xanthophyll) (Sarfaraz et al., 2016) การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำแครอทเสริมแบคทีเรีย โพรไบโอติกจึงมีความน่าสนใจ นอกจากร่างกายจะได้รับโพรไบโอติกที่มีประโยชน์แล้วยังได้รับ สารต้านออกซิเดชันและสารอาหารจากน้ำแครอทที่ประกอบด้วยวิตามิน แร่ธาตุ และใยอาหาร ที่มีประโยชน์แก่ร่างกายอีกด้วย Charnchai et al. (2016) ได้ทำการแยกตัวอย่างแบคทีเรีย และศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี ได้แก่การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถในการทนต่อสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารและสภาวะจำลองในลำไส้ ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ได้ และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือ *Lactobacillus fermentum* LF026 และ *Bifidobacterium animalis* BF052 แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ที่ดี มีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ในระบบทางเดินอาหาร และมีความสามารถในการเกาะติดลำไส้ของมนุษย์ได้ดี ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยพอลิเมอร์

ที่มีส่วนประกอบของโซเดียมอัลจิเนตและเพคตินด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *L. fermentum* LF026 และ *B. animalis* BF052 เมื่อนำไปเติมในน้ำแครอท

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. แบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. fermentum* LF026 และ *B. animalis* BF052 (Charnchai et al., 2016) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

#### 2. การเตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติก

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) broth ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 6.50 (HiMedia, India) โดยบ่ม *L. fermentum* LF026 ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ส่วนแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 บ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) โดยใช้ถุงบ่มไร้ออกซิเจน (anaerobic bag) ที่บรรจุ gas pack และบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้ง ล้างแบคทีเรียส่วนที่เป็นตะกอน (pellet) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำวิธีเดิม จำนวน 2 รอบ

#### 3. การเตรียมพอลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก

เตรียมสารละลายพอลิเมอร์โดยละลายสารโซเดียมอัลจิเนตให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกับน้ำกลั่น และละลายสารเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกับน้ำกลั่น โดยใช้แท่งแก้วคนสารให้ละลาย เป็นเวลา 30 นาที และสังเกตการละลายของพอลิเมอร์ที่สมบูรณ์ได้จากสารโซเดียมอัลจิเนตและสารเพคตินละลายไม่เป็นเม็ดในน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายโซเดียมอัลจิเนตผสมกับสารละลายเพคติน

ในอัตราส่วนสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ต่อ สารละลายเพคตินเท่ากับ อัตราส่วน 2:1 (Jantama et al., 2016)

#### 4. การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวิธีเอนแคปซูเลชัน แบบเอ็กซ์ทรูชัน

ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. fermentum* LF026 หรือ *B. animalis* BF052 ใน สารละลายพอลิเมอร์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมอัลจิเนตและเพคติน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (แบ่งสารละลายที่ได้ไปนับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น ตามวิธีที่ระบุในวิธีการดำเนินการวิจัยข้อที่

5) บรรจุสารละลายผสมของพอลิเมอร์และแบคทีเรียในกระบอกฉีดยาและต่อเข้ากับเข็มฉีดยาขนาด 27G นำไปหยดเหนือสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยความสูงของปลายเข็มห่างจากผิวหน้าของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ประมาณ 30 เซนติเมตร จะสังเกตเห็นเม็ดบีดส์ตกตะกอนที่ก้นบีกเกอร์สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แช่เม็ดบีดส์ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์นาน 30 นาที เพื่อให้เกิดการสร้างผนังเม็ดบีดส์ ที่สมบูรณ์ ล้างเม็ดบีดส์ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) จำนวน 2 ครั้ง โดยกรอง ผ่านกรวยกรองที่รองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร

#### 5. การนับจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกเริ่มต้น ด้วยวิธี spread plate

ทำการเจือจางแบคทีเรียโพรไบโอติกที่กระจายตัวในสารละลายพอลิเมอร์แบบอนุกรม 10 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และกระจายแบคทีเรีย (spread) ลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (ค่า Y สำหรับใช้ในการคำนวณค่าร้อยละแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกกักเก็บภายในเม็ดบีดส์ (% entrapment) ส่วนแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 ทำการกระจายแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่เติมสารซิสเตอีน (cysteine) ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มเพาะแบคทีเรียในสภาวะไร้ออกซิเจนอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 6. การประเมินลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดส์

สุ่มตัวอย่างเม็ดบีดส์ที่เตรียมได้มาจำนวน 10 เม็ด ทั้งหมด 3 ครั้ง มาทำการประเมิน ลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่า ได้แก่ ลักษณะภายนอกของเม็ดบีดส์ และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดส์ด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) แสดงค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดส์เฉลี่ยเป็นหน่วยไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ )

7. การทดสอบหาค่าร้อยละแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกกักเก็บภายในเม็ดบีดส์  
พักเม็ดบีดส์ที่กรองผ่านกระดาษกรอง เป็นเวลา 10 นาที แล้วสุมเม็ดบีดส์น้ำหนัก  
100 มิลลิกรัม นำไปละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร  
ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดบีดส์ละลายหมด ทำการเจือจาง  
แบบอนุกรม 10 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อ  
ปริมาตร นำสารละลายที่เจือจางแล้วไปกระจาย (spread) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS  
agar เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate (ตามรายละเอียดที่ระบุในวิธีการ  
ดำเนินการวิจัยข้อที่ 5) ซึ่งจะได้เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเม็ดบีดส์  
(ค่า X สำหรับใช้ในการคำนวณหาร้อยละแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกกักเก็บภายในเม็ดบีดส์  
(% entrapment) โดยคิดเป็นค่าร้อยละเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่นำมาทำการ  
ห่อหุ้มเซลล์ ดังนี้

$$\text{ร้อยละของแบคทีเรียที่ถูกกักเก็บภายในเม็ดบีดส์ (\% entrapment)} = (X/Y) \times 100$$

เมื่อ X คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเม็ดบีดส์

Y คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นในสารละลายผสมของโซเดียมอัลจินตและ  
เพคติน

8. การทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำไปเติมในน้ำแครอทเมื่อ  
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทำการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำไปเติมในน้ำแครอท โดยทำ  
การทดลอง 2 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 เติมเม็ดบีดส์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ลงในน้ำแครอท  
แบบสเตอริไรซ์ (sterilized vegetable juices) ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

ชุดที่ 2 เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ (non-encapsulated bacteria)  
ลงในน้ำแครอทแบบสเตอริไรซ์ โดยมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ  $10^8$  CFU/ml

นำน้ำแครอทจากทั้งสองชุดการทดลองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส  
และทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยการสุมตัวอย่างน้ำแครอทมาบ่ม  
ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เพื่อให้มีดปิดส์แตก และทำการเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่าด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยวิธี spread plate บนอาหาร MRS agar ทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตทุกสัปดาห์ต่อเนื่องกัน เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และคำนวณค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น ซึ่งจะทำให้การทดสอบเปรียบเทียบความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอท จากค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์กับแบคทีเรียที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ และทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยคำนวณค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในแต่ละสัปดาห์ดังนี้

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต (\% survival)} = (\log A / \log B) \times 100$$

เมื่อค่า A และค่า B ได้จากการนับจำนวนหาจำนวนแบคทีเรีย ดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \frac{(\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง})}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่เติมลงในจานอาหาร}}$$

เมื่อ A คือ จำนวนแบคทีเรียในสัปดาห์เริ่มต้นหรือสัปดาห์ที่ 0

B คือ จำนวนแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

ระดับความเจือจาง คือ ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำแครอทที่ถูกทำการเจือจางแบบอนุกรม 10 เท่า

ปริมาตรตัวอย่างที่เติมลงในจานอาหาร คือ ปริมาตรที่ใช้ในการกระจายแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS agar ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ คือ 0.1 มิลลิลิตร

#### 9. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยกำกับด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ผลการทดสอบได้รับการประเมินโดยการทดสอบสถิติ one-way ANOVA โดยใช้แบบทดสอบ

Tukey's test และทดสอบสถิติ independent t-test ใช้โปรแกรมซอฟต์แวร์ SPSS รุ่น 16 กำหนดระดับนัยสำคัญไว้ที่ระดับ 0.05 ( $p < 0.05$ )

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการศึกษาเพื่อประเมินผลของการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียด้วยพอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของโซเดียมอัลจิเนตและเพคตินด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชันต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *L. fermentum* LF026 และ *B. animalis* BF052 เมื่อนำไปเติมในน้ำแครอท และทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมในน้ำแครอท เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยผลการประเมินลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดส์ การคำนวณค่าร้อยละแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ และการทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกจากการคำนวณค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในน้ำแครอท มีดังนี้

การประเมินลักษณะของเม็ดบีดส์ด้วยตาเปล่าพบว่าเม็ดบีดส์ที่เตรียมได้มีลักษณะรูปร่างทรงกลม ผิวเรียบ และนุ่มลื่น ขนาดของเม็ดบีดส์ที่ห่อหุ้มแบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ  $1.77 \times 10^3 \pm 0.04$  ไมโครเมตร และเม็ดบีดส์ที่ห่อหุ้มแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ  $1.73 \times 10^3 \pm 0.02$  ไมโครเมตร (ตารางที่ 1) โดยค่าร้อยละของแบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 ที่ถูกกักเก็บไว้ในเม็ดบีดส์ (% entrapment) เท่ากับร้อยละ 78.20 และค่าร้อยละของแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 ที่ถูกกักเก็บไว้ในเม็ดบีดส์เท่ากับร้อยละ 22.72 (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดส์ ขนาดเม็ดบีดส์ และค่าร้อยละของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกกักเก็บภายในเม็ดบีดส์

| แบคทีเรียโพรไบโอติก       | ลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดส์           | ขนาดเม็ดบีดส์เฉลี่ย ( $\mu\text{m}$ ) | ร้อยละการถูกกักเก็บ (% entrapment) |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| <i>L. fermentum</i> LF026 | ลักษณะรูปร่างกลม ผิวเรียบ และนุ่มลื่น | $1.77 \times 10^3 \pm 0.04$           | 78.20                              |
| <i>B. animalis</i> BF052  | ลักษณะรูปร่างกลม ผิวเรียบ และนุ่มลื่น | $1.73 \times 10^3 \pm 0.02$           | 22.72                              |

โดยส่วนใหญ่เม็ดบีดส์ที่ได้จากกระบวนการห่อหุ้มเซลล์จะมีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงระหว่างไมโครเมตรถึงมิลลิเมตร (Poshadri and Kuna, 2010) ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดส์ที่ได้จากเทคนิคอิเล็กซ์ทรูชันควรมีขนาดประมาณ 100-10,000 ไมโครเมตร (Solanki et al., 2013) ในการศึกษาเม็ดบีดส์ที่เตรียมได้มีขนาดที่วัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดส์ได้ประมาณ 1.73 - 1.77 มิลลิเมตร ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lee และคณะ ที่ได้ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *B. longum* KCTC 3128 และ *B. longum* HLC 3742 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 - 4 ด้วยเทคนิคอิเล็กซ์ทรูชันพบว่าเม็ดบีดส์ที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.03–2.62 มิลลิเมตร (Lee et al., 2000) โดยทั่วไปเม็ดบีดส์ที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะมีพื้นผิวที่เรียบ (Chávarri et al., 2010) เทคนิคอิเล็กซ์ทรูชันเป็นวิธีการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียสูง ซึ่งขนาดของเม็ดบีดส์ที่ได้อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดของหัวฉีด (Martín et al., 2015) นอกจากนี้ลักษณะของเม็ดบีดส์ที่เตรียมได้ในการศึกษาค้างนี้ มีความสอดคล้องกับการวิจัยของ Coghettoa และคณะ ที่ทำการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก *L. plantarum* ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและเพคติน ได้เม็ดบีดส์ที่มีลักษณะกลมและผิวเรียบเช่นกัน (Coghettoa et al., 2016)

การทดสอบหาค่าร้อยละของปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกกักเก็บไว้ในเม็ดบีดส์ (% entrapment) แสดงถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บแบคทีเรียภายในเม็ดบีดส์เมื่อทำการห่อหุ้มเซลล์ด้วยพอลิเมอร์คือโซเดียมอัลจิเนตและเพคตินด้วยเทคนิคอิเล็กซ์ทรูชันของแบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 มีค่าเท่ากับ 78.2 ซึ่งมีความมากกว่าแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 ที่มีค่าร้อยละของแบคทีเรียที่ถูกกักเก็บไว้ในเม็ดบีดส์เท่ากับ 22.72 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก *B. animalis* BF052 จัดเป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอย่างยืงวด (obligate anaerobic bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญได้ในภาวะที่ไม่มีอากาศ หรือไม่มีออกซิเจนเท่านั้น โดยออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Bunesova et al., 2014) ซึ่งในระหว่างขั้นตอนการเตรียมเม็ดบีดส์ และขั้นตอนการทดสอบต่างๆ แบคทีเรีย *B. animalis* BF052 อาจจะมีการสัมผัสกับออกซิเจนได้บ้าง จึงอาจส่งผลให้ค่าร้อยละการกักเก็บแบคทีเรียในเม็ดบีดส์มีค่าน้อยกว่าเม็ดบีดส์ของแบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 โดยทั่วไปแบคทีเรีย *L. fermentum* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้

ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic bacteria) แต่ก็สามารถทนต่อออกซิเจนได้บ้างเล็กน้อย เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เพื่อลดความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เมื่อเซลล์สัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ (Claesson et al., 2007) ซึ่งในกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธีเอ็นแคปซูลชัน แบบเอ็กซ์ทรูชัน ซึ่งมีการสัมผัสอากาศเป็นเวลาค่อนข้างนานจึงอาจทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. animalis* BF052 มีโอกาสสัมผัสอากาศได้มากจึงทำให้มีค่าร้อยละของปริมาณแบคทีเรียในเม็ดบีดส์ที่น้อยกว่า *L. fermentum* LF026 ที่ทนอากาศได้ดีกว่า ทั้งนี้ค่าร้อยละการกักเก็บที่คำนวณได้อาจมีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากในขั้นตอนการทำให้เม็ดบีดส์แตกอาจมีแบคทีเรียบางส่วนที่ยังหลงเหลืออยู่ในชิ้นส่วนของเม็ดบีดส์ทำให้แบคทีเรียถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าความเป็นจริง (Nuakkaekul et al., 2013)

การทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอท เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีการรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจำนวนแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 1-3 มีจำนวนลดลงเล็กน้อยจากสัปดาห์เริ่มต้น และปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4-6 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการศึกษาลำดับกับงานวิจัยของ Krasaekoopt and Watcharapoka (2014) ที่ทำการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่ผสมด้วยกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์และเคลือบด้วยโคโตซานและศึกษาความคงตัวของแบคทีเรีย *L. acidophilus* 5 และ *L. casei* 01 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ในโยเกิร์ตพบว่าจำนวนแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 1-2 ( $1.61-1.81 \log \text{ CFU/mL}$ ) มีจำนวนลดลงเล็กน้อย และเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3-4 ( $1.97-2.20 \log \text{ CFU/mL}$ ) ซึ่งแบคทีเรียอาจมีการนำน้ำตาลกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ซึ่งจะเห็นว่าผลการวิจัยครั้งนี้ที่พบว่าปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4-6 นั้นอาจเป็นไปได้ว่าในระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์นั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงของสารชีวภาพในน้ำแครอทที่มีผลต่อทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งในน้ำแครอทเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ฟอสฟอรัส เหล็ก โพแทสเซียม แมกนีเซียม ทองแดง แมงกานีส กำมะถัน (Aly et al., 2004) วิตามิน และโปรตีน (Rafiq et al., 2016) นอกจากนี้ น้ำแครอทยังประกอบด้วยสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้อีกด้วย (Goderska et al., 2007)

**ตารางที่ 2** จำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตในน้ำแครอท ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

| สัปดาห์              | จำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตในน้ำแครอท (log CFU/ml) |                        |                          |                        |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
|                      | <i>L. fermentum</i> LF026                                 |                        | <i>B. animalis</i> BF052 |                        |
|                      | ไม่ห่อหุ้มเซลล์                                           | ห่อหุ้มเซลล์           | ไม่ห่อหุ้มเซลล์          | ห่อหุ้มเซลล์           |
| 0                    | 8.36±0.05 <sup>a</sup>                                    | 8.17±0.07 <sup>a</sup> | 9.52±0.03 <sup>a</sup>   | 9.34±0.05 <sup>a</sup> |
| 1                    | 6.45±0.01 <sup>a</sup>                                    | 6.45±0.01 <sup>a</sup> | 8.82±0.15 <sup>a</sup>   | 8.29±0.17 <sup>a</sup> |
| 2                    | 7.21±0.02 <sup>a</sup>                                    | 6.80±0.01 <sup>b</sup> | 8.96±0.84 <sup>a</sup>   | 8.50±0.27 <sup>a</sup> |
| 3                    | 6.44±0.05 <sup>a</sup>                                    | 6.82±0.01 <sup>b</sup> | 8.75±0.16 <sup>a</sup>   | 8.81±0.12 <sup>a</sup> |
| 4                    | 7.39±0.11 <sup>a</sup>                                    | 8.13±0.05 <sup>b</sup> | 9.50±0.06 <sup>a</sup>   | 9.28±0.08 <sup>a</sup> |
| 5                    | 8.15±0.01 <sup>a</sup>                                    | 8.15±0.21 <sup>a</sup> | 9.51±0.29 <sup>a</sup>   | 9.32±0.32 <sup>a</sup> |
| 6                    | 8.13±0.01 <sup>a</sup>                                    | 8.11±0.15 <sup>a</sup> | 9.50±0.03 <sup>a</sup>   | 9.33±0.47 <sup>a</sup> |
| การลดลงของโพรไบโอติก | 0.23±0.05 <sup>a</sup>                                    | 0.06±0.23 <sup>b</sup> | 0.02±0.07 <sup>a</sup>   | 0.01±0.41 <sup>a</sup> |

**หมายเหตุ:** <sup>a, b</sup> ค่าตามด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) และวิเคราะห์ทางสถิติของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยแสดงค่าจำนวนเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอท เปรียบเทียบเป็นคู่ระหว่างตัวอย่างน้ำแครอทที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์กับเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำแครอทที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ ประเมินโดยการทดสอบสถิติแบบ one-way ANOVA แบบทดสอบ Tukey's test และการลดลงของจำนวนโพรไบโอติก โดยการทดสอบสถิติแบบ independent t-test

เมื่อเก็บรักษาน้ำแครอทเป็นเวลาครบ 6 สัปดาห์ พบว่าจำนวนแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีจำนวนลดลงน้อยกว่าจำนวนแบคทีเรียในชุดตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดย *L. fermentum* LF026 ที่ไม่ห่อหุ้มเซลล์มีการลดลงของจำนวนเซลล์เท่ากับ  $0.23 \pm 0.05$  log CFU/ml ซึ่งแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์มีการลดลงของจำนวนเซลล์เท่ากับ  $0.06 \pm 0.23$  log CFU/ml และแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 ที่ไม่ห่อหุ้มเซลล์มีการลดลงของจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $0.02 \pm 0.07$  log CFU/ml ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์ที่มีการลดลงของจำนวน

แบคทีเรียเท่ากับ  $0.01 \pm 0.41 \log \text{CFU/ml}$  (ตารางที่ 2) ตามผลการศึกษาของ Chaikham (2015) ที่ได้ศึกษาความคงตัวของแบคทีเรีย *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA5 และ *B. lactis* Bb-12 พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารสกัดจากดอกมะม่วงหิมพานต์ มีอัตราการมีชีวิตรอดมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์จากการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย (cell loss) เมื่อเก็บในระบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน ซึ่ง ผลการวิจัยมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกเมื่อห่อหุ้มเซลล์แล้วจะมีการลดลงของโพรไบโอติกน้อยกว่าเมื่อไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ จากงานวิจัยของ Mokhtari et al. (2018) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์เมื่อเติมในน้ำอู่นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 วัน ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีความสามารถในการรอดชีวิตที่สูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Mokhtari et al. (2018) นี้พบว่าการผลการทดสอบความยอมรับของผู้บริโภคยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากคุณสมบัติของสายพันธุ์โพรไบโอติกที่เลือกใช้ในการศึกษา อาจทำปฏิกิริยาบางอย่างกับตัวอย่างน้ำผลไม้และทำให้ได้รสชาติที่ยังไม่เป็นที่พอใจของผู้บริโภค ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาร้อยละการรอดชีวิต (% survival) ของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ โดยกำหนดให้จำนวนแบคทีเรียในสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับร้อยละ 100 ผลการศึกษาโดยรวมพบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์จะมีการรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ (ตารางที่ 3) ซึ่งจากค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับในสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 6 แสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอทได้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ไม่ได้ทำการห่อหุ้มเซลล์ โดยสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. fermentum* LF026 ได้ดีกว่าแบคทีเรีย *B. animalis* BF052

โดยทั่วไปปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม คือ อย่างน้อยประมาณ  $10^6$ - $10^7 \text{CFU/ml}$  จึงจะเกิดประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ (Nualkaekul et al., 2013) ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมื่อเก็บน้ำแครอทไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ครบระยะเวลา 6 สัปดาห์ แบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 และ *B. animalis* BF052 ยังคงมีความคงตัวที่ดี โดยมีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ในช่วง  $10^8$ - $10^9 \text{CFU/ml}$  แสดงให้

เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีความคงตัวที่ดีในน้ำแครอท ซึ่งแบคทีเรียที่ได้รับการห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ได้รับการห่อหุ้มเซลล์ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชันสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแครอทได้

ตารางที่ 3 ค่าร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์ในน้ำแครอท

| ลำดับ | ร้อยละการรอดชีวิต (% survival) |                         |                          |                         |
|-------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|       | <i>L. fermentum</i> LF026      |                         | <i>B. animalis</i> BF052 |                         |
|       | ไม่ห่อหุ้มเซลล์                | ห่อหุ้มเซลล์            | ไม่ห่อหุ้มเซลล์          | ห่อหุ้มเซลล์            |
| 0     | 100 <sup>a</sup>               | 100 <sup>a</sup>        | 100 <sup>a</sup>         | 100 <sup>a</sup>        |
| 1     | 77.23±0.40 <sup>a</sup>        | 78.98±0.84 <sup>a</sup> | 92.69±2.02 <sup>a</sup>  | 88.80±1.28 <sup>a</sup> |
| 2     | 86.25±0.94 <sup>a</sup>        | 83.18±0.69 <sup>b</sup> | 94.14±0.51 <sup>a</sup>  | 91.03±2.32 <sup>a</sup> |
| 3     | 77.02±1.14 <sup>a</sup>        | 83.47±0.97 <sup>b</sup> | 91.89±2.08 <sup>a</sup>  | 94.37±1.94 <sup>a</sup> |
| 4     | 88.49±1.95 <sup>a</sup>        | 99.46±0.20 <sup>b</sup> | 99.82±0.26 <sup>a</sup>  | 99.42±1.52 <sup>a</sup> |
| 5     | 97.46±0.57 <sup>a</sup>        | 99.65±1.69 <sup>a</sup> | 99.88±2.65 <sup>a</sup>  | 99.85±4.06 <sup>a</sup> |
| 6     | 97.28±0.61 <sup>a</sup>        | 99.19±2.82 <sup>a</sup> | 99.74±0.73 <sup>a</sup>  | 99.88±4.42 <sup>a</sup> |

หมายเหตุ: <sup>a, b</sup> ค่าตามด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) และวิเคราะห์ทางสถิติของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ประเมินโดยการทดสอบสถิติแบบ one-way ANOVA แบบทดสอบ Tukey's test

ผลการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ว่าวิธีการเอ็นแคปซูลชันที่ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *L. plantarum* และ *B. longum* ด้วยอัลจิเนตและเพคตินสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียในน้ำทับทิมและน้ำแครนเบอร์รี่ การเคลือบเมล็ดบดด้วยเพคตินสามารถป้องกันเซลล์จากสารประกอบฟีนอลิกในน้ำผลไม้ที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพได้ (Nualkaekul et al., 2013) ในน้ำแครอทมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้ (Potter et al., 2011) ดังนั้นการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกจึงเป็นแนวทางที่ทำให้สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในน้ำแครอทได้ นอกจากนี้แนวคิดการห่อหุ้มเซลล์

แบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยโซเดียมอัลจิเนตและเคลือบเม็ดบีดส์อีกหนึ่งชั้นด้วยไคโตซาน (chitosan) น่าจะสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งไคโตซาน จัดเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ (biodegradable) สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อมนุษย์ได้ดี (biocompatible) และมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น เป็นสารจากธรรมชาติ ที่ไม่มีอันตราย และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ เป็นต้น ไคโตซานจึงได้รับความสนใจในการนำไปใช้เป็น สารห่อหุ้มเซลล์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ อย่างมากมาย (Călinoiu et al., 2019) ตามการ ศึกษาของ Phoem et al., (2015) ที่ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *B. longum* เมื่อผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตกับสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotics) เช่น โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) หอมแดง (*Eleutheria americana*) และฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย ที่มีประโยชน์ได้ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ เมื่อนำไปเติมในนม ถั่วเหลืองและน้ำสับปะรด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียที่ผ่านการ ห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่ได้ห่อหุ้มเซลล์ ตลอดระยะเวลา ที่ศึกษานมถั่วเหลือง 6 วัน และน้ำสับปะรด 45 วัน (Phoem et al., 2015) อีกทั้งมี การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายที่มี ส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพรไทย ได้แก่ ดอกมะม่วงหิมพานต์ ใบบัวบก และใบย่านาง ซึ่งมี คุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก โดยได้นำแบคทีเรีย *L. casei* 01, *L. acidophilus* LA5 และ *B. lactis* Bb-12 ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์เติมลงในน้ำผลไม้ ได้แก่ น้ำหม่อน น้ำมะเมา น้ำลำไย และน้ำแมลงอน ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของสารสกัดมะม่วงหิมพานต์ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ดีที่สุด (Chaikham, 2015) ดังนั้น การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีการผสมสารพรีไบโอติกจึงเป็นอีกแนวทางที่น่าสนใจ เพื่อให้สามารถรักษาสภาพการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ได้อย่างมี ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

### สรุปผลการวิจัย

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย *L. fermentum* LF026 และแบคทีเรีย *B. animalis* BF052 ด้วยวิธีการเอ็นแคปซูลชัน เทคนิคเอ็กซ์ทูชัน ซึ่งใช้พอลิเมอร์ผสมระหว่างเพคติน และโซเดียมอัลจิเนตพบว่าสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียในน้ำแครอทได้ อย่างไรก็ตาม

ควรศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการจัดสภาวะในการเตรียมเมล็ดปัสในสภาวะไร้ออกซิเจน และควรลดระยะเวลาในขั้นตอนการเย็นแช่ขุเลชันให้น้อยที่สุดเพื่อลดโอกาสที่แบคทีเรียจะสัมผัสกับออกซิเจน เนื่องจากมีผลต่อร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก ทั้งนี้ผลการวิจัยจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำแครอทที่เติมแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวมีปริมาณโพรไบโอติกที่มีชีวิตเพียงพอในระดับที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อส่งเสริมสุขภาพได้ รวมทั้งสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผักหรือน้ำผลไม้ชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในน้ำแครอทให้มีรสชาติ เนื้อสัมผัสที่เหมาะสม และมีการทดสอบความยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช. งบประมาณแผ่นดิน) ผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีร่วมกับมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 (SUT3-304-60-24-1) และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีสำหรับความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- Altieri, C. (2016). Dairy propionibacteria as probiotics: recent evidences. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 172.
- Aly, S. A., Galal, E. A., & Elewa, N. A. (2004). Carrot Yoghurt: Sensory, Chemical, Microbiological Properties and Consumer Acceptance. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(6), 322-330.
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 107-114.

- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Killer, J., & Musilova, S. (2014). Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*, 5(4), 377-388.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467-483.
- Călinoiu, L., Ștefănescu, B. E., Pop I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. (2019). Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation. *Coatings*, 9(194); doi:10.3390/coatings9030194.
- Chaikham, P. (2015). Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 12, 61-66.
- Champagne, C. P., & Kailasapathy, K. (2008). Encapsulation of probiotics. In N. Garti (Ed.), *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals* (pp. 344-369). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Charnchai, P., Jantama, S.S., Prasitpuriprecha, C., Kanchanatawee, S., & Jantama, K. (2016). Effects of the Food Manufacturing Chain on the Viability and Functionality of *Bifidobacterium animalis* through Simulated Gastrointestinal Conditions. *Plos One*, 11(6), e0157958.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán Mdel, C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate–chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185–189.
- Chaudhary, A. (2019). Probiotic Fruit and Vegetable Juices: Approach Towards a Healthy Gut. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(6), 1265-1279.

- Claesson, M. J., van Sinderen, D. & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 22-28.
- Coghettoa, C. C., Brinques, G. B., Siqueira, N. M., Pletsch, J., Duarte Soares, R. M. & Záchia Ayub, M. A. (2016). Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Functional Foods*, 24, 316-326.
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Cited 20 May 2018, From: <http://www.who.int/foodsafety/fsmanagement/en/probioticguidelines.htm>.
- Goderska, K., Czarnecka, M. & Czarnecki, Z. (2007). Effect of Prebiotic Additives to Carrot Juice on The Survivability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Bacteria. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4), 427-432.
- Jantama, S. S., Phimsuwan, S., Ungchock-Amnuai, S., Charnchai, P., Rungseevijitprapa, W. & Jantama, K. (2016). Evaluation of Survival Rate of Encapsulated *Lactobacillus fermentum*. LF026 in Yoghurt. Proceeding of The 4<sup>th</sup> Current Drug Development International Conference 2016 (CDD2016). 1-3 June 2016. Phuket. Thailand.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN nutrition*, 2013, doi:10.5402/2013/481651.
- Korbekandi, H., Mortazavian, A.M., & Iravani, S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In N. Shah (Ed.), *probiotic and prebiotic foods: Technology, Stability and Benefits to the human health* (pp. 131-163). New York: Nova Science Ltd.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.

- Krasaekoopt, W. & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *Food Science and Technology*, 57, 761-766.
- Lee, K. Y., Heo, T. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salts solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869-873.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15-25.
- Mokhtari, S., Jafari, S. M. & Khomeiri, M. (2018). Survival of encapsulated probiotics in pasteurized grape juice and evaluation of their properties during storage. *Food Science and Technology International*, 52, 1042-1048.
- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304-311.
- Phoem, A. N., Chanthachum, S. & Voravuthikunchai, S. P. (2015). Applications of microencapsulated *Bifidobacterium longum* with *Eleutherine americana* in fresh milk tofu and pineapple juice. *Nutrients*, 7(4), 2469-2484.
- Poshadri, A., & Kuna, A. (2010). Microencapsulation technology: A review. *The Journal of Research ANGRAU*, 38(1), 86-102.
- Potter, A. S., Foroudi, S., Stamatikos, A., Patil, B. S. & Deyhim, F. (2011). Drinking carrot juice increases total antioxidant status and decreases lipid peroxidation in adults. *Nutrition Journal*, 10(96), 1-6.

- Rafiq, S., Sharma, V., Nazir, A., Rashid, R., Sofi, S.A., Nazir, F., & Nayik, G. (2016). Development of Probiotic Carrot Juice. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(4), 1000534.
- Sarfaraz, S., Farooq, N., Ashraf, N., Aslam, A., & Sarwar, G. (2016). Non-Pharmacological Use of *Daucus Carota* Juice (Carrot Juice) as Dietary Intervention in Reducing Hypertension. *Enzyme Engineering*, 5(2), 1-5.
- Sharma, M., & Devi, M. (2014). Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(4), 537-552.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International*, 620719, 1-21.
- Zheng, J., Zhou, Y., Li, S., Zhang, P., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2017). Effects and Mechanisms of Fruit and Vegetable Juices on Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), doi:10.3390/ijms18030555.
- Zuidam, N.J., & Shimoni, E. (2009). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In N.J. Zuidam & V. Nedovic (Ed.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 3-29). New York: Springer-Verlag Inc.