วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



ผลของสารสื่อจากข้าวสารป่นร่วมกับสารป้องกันเซลล์ต่อการป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์โปรไบโอติก สายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 เพื่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์

Effect of rice meal media in combination with the protective agent on cell protection of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 for animal feed industry

ณัฐพร จันทร์ฉาย[1]*, กรณิการ์ ดิษฐสุวรรณกุล[2] และ หทัยรัตน์ ทัศนวงค์วรา[2]

Nuttaporn Chanchay[1]*, Kornnikar Dittasuwannakul[2] and Hathairat Tatsanawongwara[2]

[1] *สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ 54140*
[1] *Agro-Industrial Biotechnology Maejo University Phrae Campus, Phrae 54140*
[2] *บริษัทโปร ไบโอเทค ฟีด จำกัด, จังหวัดสมุทรสาคร 7400*
[2] *Pro Biotech Feed Co.Ltd., Samutsakhorn 74000*

บทคัดย่อ: อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้คำนึงถึงความสำคัญในการผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามจากปัญหาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื่องจากไม่สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์โปรไบโอติกให้มีชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารได้นาน ณ อุณหภูมิห้อง จึงได้มีแนวคิดเกี่ยวกับการเติมสารป้องกันเซลล์ที่ช่วยในการปกป้องจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์โดยการใช้ข้าวสารเป็นสื่อผสมร่วมกับสารป้องกันเซลล์ ซึ่งการทดสอบในครั้งนี้มีการใช้สารสื่อจากข้าวสารป่นร่วมกับการปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 สารห่อหุ้มเซลล์กลีเซอรอลความเข้มข้นที่ต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 % และมีการใช้สารป้องกันเซลล์มอลโตเดกซ์ตรินความเข้มข้นที่ต่างกัน 20, 30, 40 และ 50 % พบว่า การเติมมอลโตเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 40 % และการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 สามารถช่วยรักษาเซลล์โปรไบโอติกในข้าวสารป่นเป็นระยะเวลานานสูงสุด 19 วัน ณ อุณหภูมิห้อง โดยมีจุลินทรีย์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 เหลือรอดอยู่ที่ 3.47 log CFU/g ขณะที่การเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15 % ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 สามารถป้องกันเซลล์โปรไบโอติกสูงสุด ได้เพียง 10 วัน โดยมีจำนวนเซลล์ที่เหลือรอด เท่ากับ 3.73×10^4 CFU/g
คำสำคัญ: โปรไบโอติก; สารป้องกันเซลล์; สารสื่อผสม; ปลายข้าว; *Lactobacillus acidophilus*

ABSTRACT: The feed industry has recognized the importance of producing probiotics for animal feed. However, due to product preservation problems due to the inability to keep probiotic microorganisms alive in food for a long time at room temperature, the idea was to add cell protection agents to help protect probiotic microorganisms. in animal feed products by using rice as a medium in combination with cell protection agents. In this test, media from rice meal were used together with pH adjustments at 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0, different concentrations of glycerol cell envelopes 5, 10, 15 and 20 % and different concentrations of maltodextrin cell protection were used at 20, 30, 40 and 50 %. The pH of 7.0 was able to sustain probiotic cells in milled rice for up to 19 days at room temperature, with the probiotic strain Lactobacillus acidophilus TISTR 1338 remaining at 3.47 log CFU/g at 3.47 log CFU/g. The addition of glycerol at a 15 % concentration in combination with a pH adjustment of 7.0 was able to protect probiotic cells for only 10 days with the remaining cell survival of 3.73×10^4 CFU/g.
Keywords: probiotic; protective agent; mixed media; rice broken; *Lactobacillus acidophilus*

* Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

Received: date; March 3, 2021 Accepted: date; July 7, 2021 Published: date; December 29, 2021

บทนำ

ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมามีการจำกัดการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ (Dibner and Richards, 2005) เนื่องจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ และทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น จึงมีการส่งเสริมการใช้โปรไบโอติกแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์มปศุสัตว์ ทั้งนี้เพื่อส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ และลดการดื้อยา (Simon et al., 2005) โดยโปรไบโอติกที่เป็นที่นิยม ได้แก่ สายพันธุ์ *Lactobacillus johnsonii, L. acidophilus, L. casei* และ *Bifidobacterium longum* (Bajagai et al., 2016) อย่างไรก็ตามโปรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ได้น้อย การทำให้โปรไบโอติกมีชีวิตรอดในอาหารสัตว์ และระบบทางเดินอาหารได้นั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณสารอาหาร จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ความไวของหัวเชื้อต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น และสภาวะการเก็บรักษา (Shah et al., 2000) อย่างไรก็ตามโครงสร้างของแบคทีเรียมีผลต่อการอยู่รอดและกระบวนการผลิตโปรไบโอติก โดยเฉพาะกระบวนการเพื่อการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไม่สามารถรักษาโครงสร้างที่จำเป็น เช่น โปรตีนพื้นผิวของแบคทีเรีย ซึ่งอาจส่งผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ได้ (Santivarangkna, 2015)

ปัจจุบันมีงานวิจัยการผลิตโปรไบโอติกแบบแห้งเพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์ และมีความสะดวกต่อกระจายสินค้า และค่าขนส่งถูกกว่า ดังนั้น แนวโน้มการผลิตโปรไบโอติกแบบแห้งจึงเป็นที่นิยมมาก แต่วิธีการเหล่านี้มักส่งผลให้เซลล์ตายเนื่องจากผลของอุณหภูมิ และการคายน้ำ (Anal and Singh, 2007) นอกจากนั้นมีรายงานหลายฉบับระบุว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกอยู่รอดไม่ดีในแบบเซลล์อิสระ (De Vos et al., 2010) จึงจำเป็นต้องมีตัวช่วยยึดเกาะหรือห้อหุ้มเซลล์ เพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ดีขึ้น เป็นการปกป้องเซลล์แบคทีเรียที่ไวต่อสภาวะที่ไม่พึงประสงค์ได้ โดยใช้เทคโนโลยีการห่อหุ้มด้วยวัสดุพาหะโดยสร้างแคปซูลขนาดเล็ก ซึ่งช่วยในการปกป้องเซลล์ (Champagne et al., 1996) แต่เทคนิคนี้ใช้ต้นทุนสูงไม่เหมาะกับในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ปัจจุบันมีแนวคิดพัฒนาตัวห่อหุ้มโปรไบโอติกที่เป็นโพลิเมอร์ชีวภาพปลอดสารพิษ และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Jayani et al., 2020) เช่น โปรตีนจากวัสดุทางการเกษตร Savedboworn et al. (2019) กล่าวว่า โปรตีนจากข้าวที่เสริมด้วยพรีไบโอติกจะมีความสามารถในการปกป้องเซลล์โปรไบโอติก ในระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และยังไม่พบผลกระทบของโปรตีนจากข้าวในฐานะที่เป็นตัวปกป้องโปรไบโอติก นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจของคนไทย และเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ ในข้าวมีสารอาหารครบถ้วน มีแป้ง และน้ำตาล มีกรดอะมิโนหลายชนิด มีเส้นใยอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) รวมทั้งโอลิโกแซ็คคาร์ไรด์ (Oligosaccharides) มีงานวิจัยที่ใช้ข้าวเป็นสับสเตรท (Substrate) ส่งเสริมการเจริญเติบโตสำหรับ *L. rhamnosus, L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. (Helland, 2004; Saman, 2011; Nguyen, 2007; Song, 2012) เนื่องจากเชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถใช้โอลิโกแซคคาไรด์ในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (Horecker et al., 1956)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนากระบวนการผลิต และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ โดยการใช้ปลายข้าวสารป่นเป็นสื่อผสมเพื่อใช้ในการดูดซับความชื้น ร่วมกับการศึกษาชนิดของสารป้องกันเซลล์เพื่อใช้เป็นสารยึดเกาะให้แก่แบคทีเรีย

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338

ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) บนอาหารแข็ง MRS โดยวิธีการ Streak แยกให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง หลังจากได้โคโลนีเดี่ยวให้เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยให้มีค่า McFarland No. 0.5

การเตรียมสารสื่อปลายข้าวสารหัก

เติมปลายข้าวสารหัก (ข้าวสารสายพันธุ์หอมมะลิ จากตลาดแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร) ลงในเครื่องบดละเอียดประมาณ 200 กรัม และบดเป็นเวลาประมาณ 3 นาที ร่อนคัดขนาด 2 มิลลิเมตร ใส่ขวดดูแรนแล้วจึงไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

วิธีการศึกษา และวิเคราะห์

การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกของชุดควบคุม (*L. acidophilus* TISTR 1338 ผสมกับข้าวสารป่นสื่อผสม)

นำเชื้อ *L. acidophilus TISTR* 1338 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ให้อากาศ แล้วจึงวัดปริมาณเชื้อเริ่มต้น และ pH จากนั้นผสมกับสารสื่อข้าวสารบดละเอียดในอัตราส่วน เชื้อ 50 มิลลิลิตรต่อสื่อผสม 1 กิโลกรัม (5% v/w) ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วทำการแบ่งเก็บในถุงกันแสงปิดผนึก ถุงละ 100 กรัม ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 40 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 2, 4, 7, 10, 14, 19, 21, 30 และ 40 มาวิเคราะห์จำนวนเซลล์โปรไบโอติก เพื่อทราบข้อจำกัดในการเก็บรักษาโปรไบโอติก

การศึกษาความเข้มข้นของ pH ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก

ทำการปรับ pH ให้แก่เชื้อเริ่มต้น *L. acidophilus* TISTR 1338 ด้วย NaOH และ HCl ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 จากนั้นนำมาผสมกับสารสื่อข้าวสารบดละเอียดในอัตราส่วนเชื้อ 50 มิลลิลิตรต่อสื่อผสม 1 กิโลกรัม (5% v/w) ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วทำการแบ่งเก็บในถุงกันแสงปิดผนึก ถุงละ 100 กรัม ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 40 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 2, 4, 7, 10, 14, 19, 21, 30 และ 40 มาวิเคราะห์จำนวนเซลล์โปรไบโอติก เพื่อทราบความเข้มข้นของ pH ที่มีความเหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกที่มีระยะเวลาการเก็บรักษานานที่สุด

การศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก

หลังจากทราบความเข้มข้นของ pH ที่มีความเหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกในระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานที่สุดแล้ว จึงทำการปรับ pH ของเชื้อเริ่มต้น *L. acidophilus* TISTR 1338 ตามค่า pH ความเข้มข้นดังกล่าว จากนั้นแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 2 กลุ่ม เพื่อทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกต่อสารป้องกันเซลล์ที่ชนิด และความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 ทำการเติมกลีเซอรอลเป็นสารช่วยห่อหุ้มเซลล์ด้วยเพื่อช่วยปกป้องจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ความเข้มข้นต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 % ทำการปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

กลุ่มทดลองที่ 2 เติมมอลโตเด็กซ์ตริน (Maltodextrin) เป็นสารป้องกันเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างกัน 20, 30 และ 40 % ทำการปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

เมื่อทำการปรับ pH และเติมสารป้องกันเซลล์แล้วนำกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มมาผสมกับสารสื่อข้าวสารบดละเอียดในอัตราส่วนเชื้อ 50 มิลลิลิตรต่อสื่อผสม 1 กิโลกรัม (5% v/w) ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร แล้วทำการแบ่งเก็บในถุงกันแสงปิดผนึก ถุงละ 100 กรัม ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 40 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 2, 4, 7, 10, 14, 19, 21, 30 และ 40 มาวิเคราะห์จำนวนเซลล์โปรไบโอติก เพื่อทราบระยะเวลาการเก็บรักษาที่ส่งผลดีต่อจำนวนเซลล์

การวิเคราะห์จำนวนเซลล์

ทำการตรวจสอบการรอดชีวิต หรือจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียโปรไบโอติกด้วยวิธีการ Dilution plate count โดยทำการชั่งตัวอย่างทดลอง 25 กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ที่มี Sodium chloride 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ออกจากสารป้องกันเซลล์ แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทดลองที่ทำการล้างด้วย Sodium chloride เรียบร้อยแล้ว มา Spread plate ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มี Bromocresol purple 0.04 % บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (3 ซ้ำ) วิเคราะห์ผลในหน่วย CFU/g และเปรียบเทียบค่าทางสถิติของระยะเวลาการเก็บผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17 ที่ความเชื่อมั่น 95 %

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกของชุดควบคุม (*L. acidophilus* TISTR 1338 ผสมกับข้าวสารป่นสื่อผสม)

เชื้อ *L. acidophilus TISTR* 1338 ในชุดควบคุมเป็นเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่ให้อากาศ มีการเจริญเติบโตของเชื้อในช่วงระยะ Stationary phase มีปริมาณเชื้อสูงสุดที่ 10 log CFU/g และมีค่า pH อยู่ที่ 4.58 มีลักษณะเป็นกรด จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อในชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 40 วัน เมื่อเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4, 7, 10, 14, 19, 21, 30 และ 40 มาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ พบว่า วันที่ 0 ชุดควบคุมมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 7.56 log CFU/g และเมื่อเวลาผ่านไป พบว่า จำนวนเซลล์มีแนวโน้ม

ลดลง และสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เพียง 10 วัน โดยมีปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดเท่ากับ 3.61 log CFU/g ($P<0.05$) เนื่องจากหลังวันที่ 10 เป็นต้นไป ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus TISTR* 1338 (**Figure 1**) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Helland (2004); Saman (2011); Nguyen (2007); Song (2012) พบว่า การใช้ข้าวเป็นสับสเตรท (Substrate) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตสำหรับ *L. rhamnosus, L. plantarum, L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ได้ Horecker et al. (1956) กล่าวว่า ข้าวมีส่วนประกอบของโอลิโกแซคคาไรด์ และเชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตเอนไซม์ไซโลส (Xylose) ทำให้สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-Phosphate) จากนั้นน้ำตาลชนิดนี้จะเข้าสู่วิถี Pentose Phosphate และ Phosphoketolase ทำให้ได้น้ำตาล Fructose-6-Phosphate 2 ตัว และ Glyceraldehyde-3-Phosphate 3 ตัว น้ำตาลเหล่านี้จะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส และวัฏจักรเครปส์ เพื่อผลิตเป็นพลังงานให้แก่เซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 10 เป็นต้นไป ไม่พบการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus TISTR* 1338 ซึ่งไม่ใช่ผลที่ดีในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกอาหารสัตว์ได้

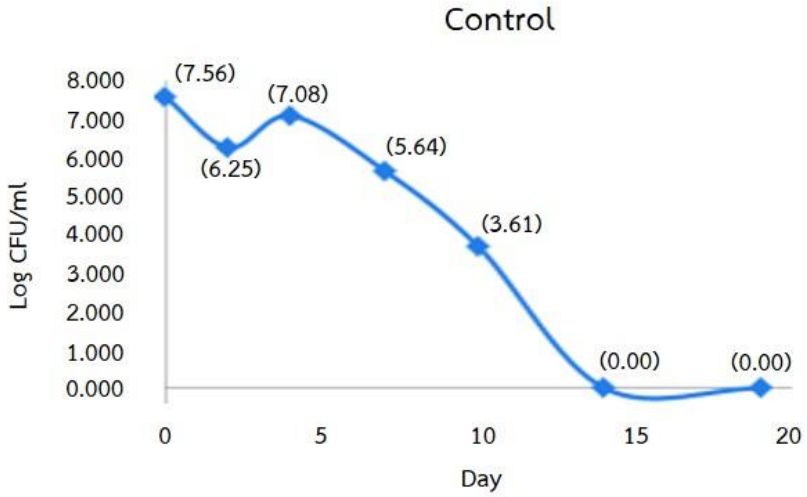


Figure 1 Decreased growth of the infection *L. acidophilus* TISTR 1338 from a controlled formula

ผลศึกษาความเข้มข้นของ pH ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก

จากการศึกษาความเข้มข้นของ pH ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก ที่ pH 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป pH ทุกความเข้มข้นมีผลให้จำนวนเซลล์ลดลง และมีการลดลงของเชื้อในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ในระหว่างวันที่ 0-14 และในวันที่ 19 พบว่า ที่ pH 5.5, 6.0 และ 6.5 ไม่พบการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก ในขณะที่ pH 7.0 สามารถเก็บเชื้อได้ระยะเวลามากที่สุดทั้งหมด 19 วัน และมีการรอดชีวิต 3.73 log CFU/g (**Figure 2**) มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ *L. acidophilus* นั้นได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (Wood and Holzapfel, 1995) จึงทำค่า pH ในอาหารเปลี่ยนแปลงเป็นกรดเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น การปรับ pH ของตัวอย่างทดลองเริ่มต้นเป็น 7 เมื่อเวลาผ่านไปจาก pH ที่เป็นกลางจึงจะมีความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โปรไบโอติก สอดคล้องกับงานวิจัยของศิริโฉม และจิตติยา (2561) กล่าวว่า *L. acidophilus* ที่ผสมในน้ำข้าวกล้องงอก ที่มีค่า pH 6.89 เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ค่า pH เริ่มต้นลดลงจาก 6.89 เป็น 4.21 โดยเซลล์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 3.51 log CFU/ml ดังนั้น ค่า pH เริ่มต้นในอาหารควรอยู่ระหว่าง 6.5-7 เพื่อให้สภาวะความเป็นกรดที่เกิดกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มแลคติกมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เมื่อระยะเวลาผ่านไป โดย pH เริ่มต้นที่ 7 ส่งผลต่อระยะเวลาการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติกเป็น 19 วัน

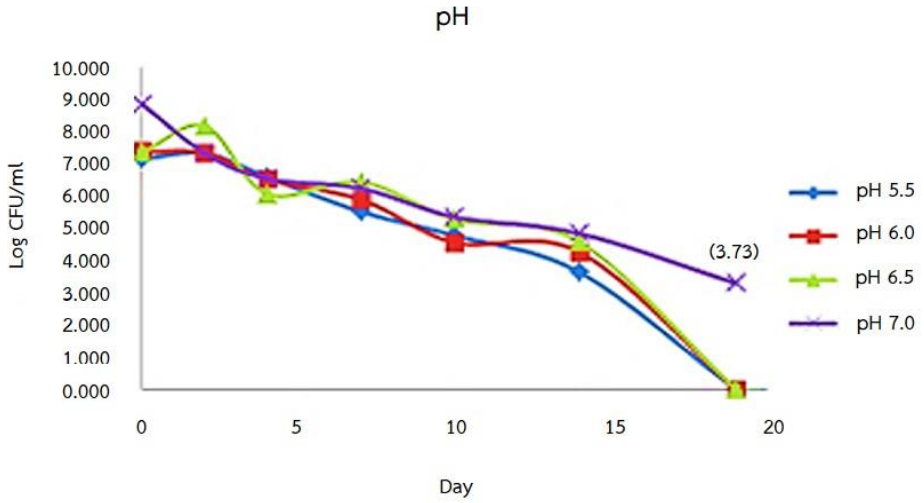


Figure 2 Decreased growth of the infection pH-adjusted *L. acidophilus* TISTR 1338

ผลศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก

หลังจากทำการศึกษาความเข้มข้นของ pH ที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก พบว่า ที่ pH 7.0 สามารถเก็บเชื้อได้ระยะเวลามากที่สุด จึงได้ทำการปรับ pH ของเชื้อเริ่มต้น *L. acidophilus TISTR* 1338 เป็น 7.0 จากนั้นได้ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มเติมสารป้องกันเซลล์คลละชนิดกัน ได้แก่ กลีเซอรอล และมอลโตเด็กซ์ตริน

จากการศึกษาการปรับ pH ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างกัน และผสมกับสารสื่อข้าวสารป่น ซึ่งในการทดลองเติมสารป้องกันเซลล์ด้วยกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างกัน (5, 10, 15 และ 20 %) พบว่า จำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละวันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และระยะเวลา 10 วัน คือ ระยะเวลาที่กลีเซอรอลทุกความเข้มข้นสามารถรักษาเซลล์โปรไบโอติกได้ (**Figure 3**) อย่างไรก็ตามจากจำนวนเซลล์ที่วิเคราะห์ได้ พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 15 % เหมาะสมต่อการป้องกันเซลล์โปรไบโอติกสูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์ที่เหลือรอด เท่ากับ 3.73×10^4 log CFU/g และการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 20 % พบว่า มีเชื้อราเกิดขึ้นคาดว่ามาจากมีปริมาณความชื้นรวมเกิน 12% และมีค่า a_w (Water activity) สูงเกินไป (Beuchat et al., 2013) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sultana et al. (2000) พบว่า การป้องกันเซลล์ *L. acidophilus* ด้วยสารกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15 % เป็นสารป้องกันเซลล์ที่ดีเป็นอันดับ 3 รองลงมาจากการใช้แป้งข้าวโพดร่วมกับอัลจิเนต โดยมีการรอดชีวิตของเชื้อที่ร้อยละ 66.76 และสุจิตรา และคณะ (2561) กล่าวว่า การเก็บรักษาแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ในกลีเซอรอล 15% และแช่แข็งที่ -20 กับ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเชื้อได้มากกว่า 12 เดือน ดังนั้น ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อเพื่อให้เหมาะสมกับแบคทีเรียได้

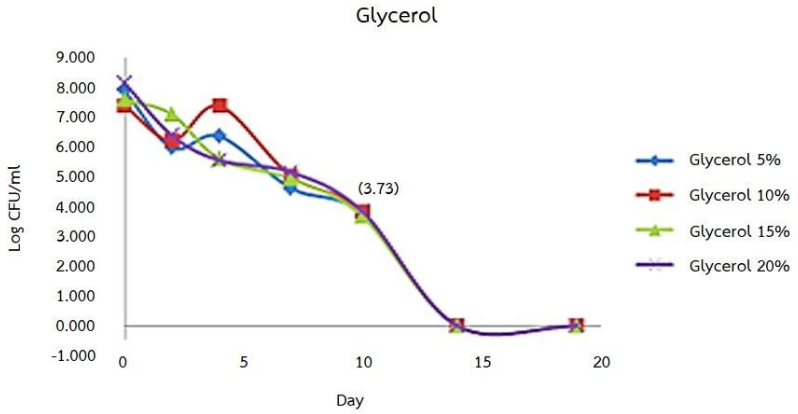


Figure 3 Decreased growth of the infection *L. acidophilus* TISTR 1338 was added to the cell protection agent with glycerol at various concentrations

จากการศึกษาการปรับ pH ร่วมกับการเติมมอลโตเด็กซ์ตรินที่ความเข้มข้นต่างกัน (20, 30 และ 40%) และสารสื่อข้าวสารบด พบว่า การเติมมอลโตเด็กซ์ตรินที่ความเข้มข้น 40 % ให้ผลที่ดีที่สุด จำนวนของเชื้อเหลือรอดถึง 19 วัน โดยมีการรอดชีวิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มีจำนวนเซลล์เหลือรอด 3.47 log CFU/g สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kurtmann et al. (2009) เกี่ยวกับการใช้น้ำตาลเป็นตัวกลางในการป้องกันเซลล์ ส่งผลต่อสภาวะทางกายภาพของการอยู่รอดแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษาได้ดีขึ้น และมอลโตเด็กซ์ตรินจัดเป็นพรีไบโอติกซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติมโตของ *L acidophilus* TISTR 1338 ทำให้ในตัวอย่างที่มีมอลโตเด็กซ์ตริน มีเชื้อเหลือรอดได้นานที่สุด เนื่องจากมอลโตเด็กซ์ตริ คือ คาร์โบไฮเดรต ประเภท Polysaccharide ที่ได้จากการย่อยโมเลกุลของสตาร์ช บางส่วนให้เป็นสายสั้นๆ ของน้ำตาลกลูโคส (Glucose) สอดคล้องกับ Horecker et al. (1956) กล่าวว่า เชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตเอนไซม์ไซโลส ทำให้สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ ซึ่งน้ำตาลชนิดนี้จะผลิตเป็นพลังงานให้แก่เซลล์ต่อไป ดังนั้น มอลโตเด็กซ์ตรินจึงเป็นทั้งสารป้องกันเซลล์ และสารอาหารที่ดีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L acidophilus* TISTR 1338

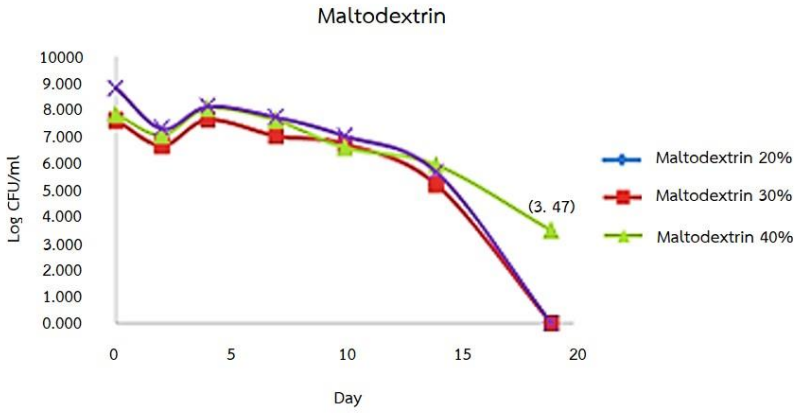


Figure 4 Decreased growth of the infection *L. acidophilus* TISTR 1338 was added to the cell protection agent with different concentrations of maltodextrin

เมื่อทำการเปรียบเทียบชุดทดลองที่ทำการปรับ pH และชุดทดลองที่ทำการปรับ pH ร่วมกับสารป้องกันเซลล์แต่ละชนิด พบว่า ชุดการทดลองที่ทำการปรับ pH ร่วมกับสารมอลโตเด็กซ์ตรินที่ความเข้มข้น 40% ให้ผลการรอดชีวิตของจำนวนเซลล์โปรไบโอติกดีที่สุด โดยมีการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอติก 3.47 log CFU/g ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าชุดการทดลองที่ทำการปรับ pH เพียงอย่างเดียว เนื่องจาก

มอลโตเด็กซ์ตรินมีความสามารถเป็นได้ทั้งสารป้องกันเซลล์และยังจัดเป็นพรีไบโอติกซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติมโตของ *L. acidophilus* TISTR 1338 และยังสอดคล้องกับประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, (2559) ประกาศว่าส่วนผสมโปรไบโอติกในการผลิตอาหารสัตว์สำเร็จรูปเพื่อขายต้องมีอัตราส่วนไม่น้อยกว่า 1.0 × 105 CFU/kg

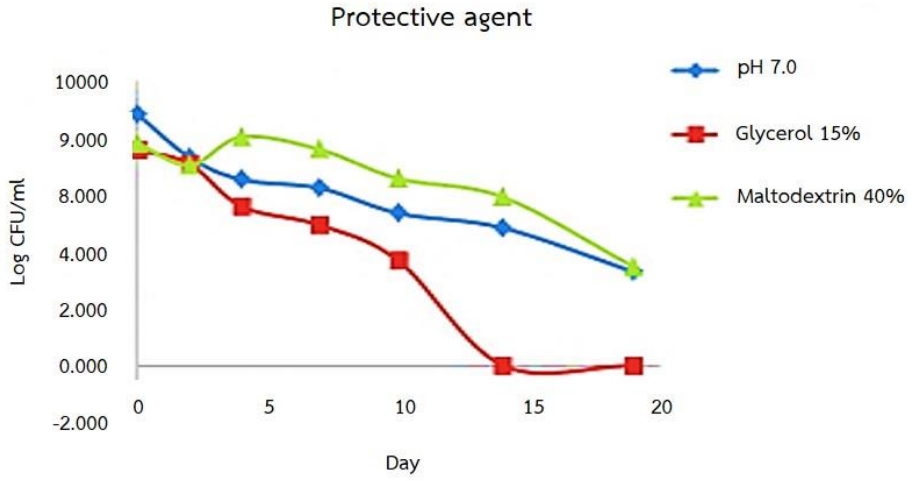


Figure 5 Reduction of *L. acidophilus* TISTR 1338 in samples with optimized cell protection agents

สรุป

การใช้สารป้องกันเซลล์มอลโตเดกซ์ตรินที่ความเข้มข้น 40% เป็นสารป้องกันร่วมกับสารสื่อปลายข้าวสารป่นสามารถทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 อยู่รอดได้เพิ่มขึ้นจนถึง 19 วัน และการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15% เป็นสารป้องกันร่วมกับสารสื่อปลายข้าวสารป่นสามารถทำให้เชื้อ *L. acidophilus* TISTR 1338 อยู่รอดได้เพิ่มขึ้นจนถึง 10 วัน และปริมาณเชื้อที่เหลือรอดยังอยู่ในระดับเพื่อการค้าได้ และการใช้ปลายข้าวสารหักที่เป็นของเหลือในอุตสาหกรรมจึงช่วยให้ลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ยังมีสารอาหารในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นผลที่ควรนำมาศึกษา และพัฒนาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์: เรื่อง กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559. แหล่งข้อมูล: http://eservice.afvc.dld.go.th/dld-streaming/access.do?p=document%2FdocLocation_20181216_104259_1544931779243.PDF&m=img. ค้นเมื่อ 12 มกราคม 2564.

สุจิตรา ยาหอม, จิตรสุดา กุลวัฒน์ และ สุทธิวรรณ ธรรมวัตร. 2562. การเก็บและรักษาสภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 38: 1-7.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า และจิตติยา รามวงศ์. 2557. การเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ในเครื่องดื่มน้ำข้าวกล้องงอก. แหล่งข้อมูล: https://www.researchgate.net/publication/262689492. ค้นเมื่อ 14 เมษายน 2564.

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

Bajagai, Y.S., A.V. Klieve, P.J. Dart, and W.L. Bryden. 2016. Probiotics in Animal Nutrition-production. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. FAO, Rome.

Beuchat, L.R., E. Komitopoulou, H. Beckers, R.P. Betts, F. Bourdichon, S. Fanning, H.M. Joosten, and B.H. T. Kuile. 2013. Low–water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. Journal of Food Protection. 76(1): 150-172.

Champagne, C.P., F. Mondou, Y. Raymond, and D. Roy. 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. Journal of Food Research International. 29: 555-562.

De Vos, P., M. Faas, M. Spasojevic, and J. Sikkema. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy Journal. 20: 292-302.

Dibner, J.J., and J.D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Journal of Poultry Science. 84(4): 634-643.

Helland, M.H., T. Wicklund, and J.A. Narvhus. 2004. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk-and water-based cereal puddings. International Dairy Journal. 14(11): 957-965.

Horecker, B.L., J. Hurwitz, and P.Z. Smyrniotis. 1956. Xylulose 5-phosphate and the formation of sedoheptulose 7-phosphate with liver transketolase. Journal of the American Chemical Society. 78(3): 692-694.

Jayani T., B. Sanjeev, S. Marimuthu, and S. Uthandi. 2020. Bacterial cellulose nano fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. Carbohydrate Polymers Journal. 250: 1-8.

Kurtmann, L., C.U. Carlsen, L.H. Skibsted, and J. Risbo. 2009. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): Influence of physical state on bacterial survival during storage. Biotechnology Progress. 25: 265-270.

Nguyen, T.T.T., J.P. Guyot, C. Icard-Vernière, I. Rochette, and G. Loiseau. 2007. Effect of high pressure homogenization on the capacity of *Lactobacillus plantarum* A6 to ferment rice/soybean slurries to prepare high energy ensity complementary food. Journal of Food Chemistry. 102(4): 1288-1295.

Santivarangkna C. 2015. Advances in Probiotic Technology. 1th Edition. CRC Press, US.

Saman, P., P. Fuciños, J.A. Vázquez, and S.S. Pandiella. 2011. Fermentability of brown rice and rice bran for growth of human *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. International Journal of Food Science and Biotechnology. 49: 128-132.

Savedboworn, W., K. Teawsomboonkit, S. Surichay, W. Riansa-ngawong, S. Rittisak, R. Charoen, and K. Phattayakorn. 2019. Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Science and Biotechnology. 28: 795–805.

Shah, N.P., J.F. Ali, and R.R. Ravula. 2000. Populations of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus casei* in commercial fermented milk products. Bioscience and Microflora. 19(1): 35-39.

Simon, O., W. Vahjen, and L. Scharek. 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics advances in pork production. PP. 161-167. In: Advances in Pork Production. Jan 18-21, 2005. University of Alberta, Canada.

Song, D., S. Ibrahim, and S. Hayek. 2012. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. 1st Edition. Intech Open London, England.

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

Wood, B.J.B., and W.H. Holzapfel. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. 1th Edition. Springer Press, Boston, USA.