

การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและกระบวนการอบแห้งเพื่อผลิตหัวเชื้อ
โพรไบโอติกด้วยกากถั่วเหลือง

A STUDY OF CULTURE CONDITIONS AND DRYING PROCESS FOR
PROBIOTIC INOCULUM PRODUCTION WITH SOYBEAN MEAL

อาทิตยาพัฒน์ กัณนิกา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและกระบวนการอบแห้งเพื่อผลิตหัวเชื้อ
โพรไบโอติกด้วยกากถั่วเหลือง

อาทิตยาพัฒน์ กัณนิกา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและกระบวนการอบแห้งเพื่อผลิตหัวเชื้อ
โพรไบโอติกด้วยกากถั่วเหลือง
Study of Culture Conditions and Drying Process for Probiotic
Inoculum Production with Soybean Meal

ชื่อ - นามสกุล นางสาวอาทิตย์ยาพัฒน์ กันนิกา
สาขา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อัมภฎาฐ อารีสิริสุข, Ph.D.
ปีการศึกษา 2562

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์, ปร.ด.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อัมภฎาฐ อารีสิริสุข, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์จันทิมา ทีฆะ, Ph.D.)

..... กรรมการ
(อาจารย์อารณี โชติโก, Ph.D.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาโท

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)

วันที่ 24 เดือน กันยายน พ.ศ. 2562

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงและกระบวนการอบแห้งเพื่อผลิตหัวเชื้อโพรไบโอติกด้วยกากถั่วเหลือง
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอาทิตยาพัฒน์ กันนิกา
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อัมภกร อารีสิริสุข, Ph.D.
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงโพรไบโอติก *Enterococcus faecium* A028 ด้วยการหมักแบบแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF) ในกากถั่วเหลือง (Soy Bean Meal, SBM) (2) ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกด้วยการหมักแบบกะชื้น (3) ศึกษาสารปกป้องเซลล์โพรไบโอติกและอุณหภูมิในกระบวนการอบแห้ง และการเก็บรักษา โดยคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD) และ (4) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) ผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนน้ำต่อ SBM ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นกากน้ำตาล เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total Viable Cell Counts, TVC) สามอันดับแรก โดยมีค่า Effect contribution เท่ากับ 56.27 14.33 และ 10.46 % ตามลำดับ ปัจจัยดังกล่าวถูกคัดเลือกไปศึกษาระดับที่เหมาะสมต่อการเพิ่มค่า TVC ของแบคทีเรียใน SBM ปริมาณ 300 g พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนน้ำต่อ SBM เท่ากับ 1.5:1 (v/w) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 15.45 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลไม่มีผลต่อการเพิ่มค่า TVC อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 Log CFU/g (24.30 % ของ TVC เริ่มต้น) และมีค่า TVC สูงสุดเท่ากับ 9.77 Log CFU/g นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 แบบ SSF ใน SBM ปริมาณ 3,000 g ไม่แตกต่างจากระดับเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ (p -value > 0.05) เมื่อศึกษาการหมักแบบกะชื้น พบว่าการหมักแบบ SSF ที่อัตราส่วน 90 มีความเหมาะสมในการผลิต TVC สูงสุดเท่ากับ 9.19 Log CFU/g ผลการเลียนแบบการเจริญพบว่าแบบจำลอง Logistic และแบบจำลอง Gompertz สามารถเลียนแบบการเจริญของ *E. faecium* A028 ในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF และกระบวนการหมักแบบกะชื้นได้เป็นอย่างดี (ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.956-0.995) การวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า SBM เป็นวัสดุราคาถูกที่มีประสิทธิภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติก *E. faecium* A028 แบบ SSF ได้

นอกจากนี้การศึกษาระดับสูงของโพรไบโอติกเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในระหว่างการอบแห้ง ผลการวิจัยพบว่ากระบวนการทำให้แห้งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 การใช้สารปกป้องเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมอลโตเดกซ์ทรินเป็นสารปกป้องที่ดีที่สุดสามารถรักษาความอยู่รอดของโพรไบโอติกจากความร้อนของกระบวนการอบแห้ง มีการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 83.32 % และพบว่าการรอดชีวิตของโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการอบแห้ง โดยจำนวน

เซลล์ที่รอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ลดลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 55°C และลดลงมากที่อุณหภูมิ 75°C นอกจากนี้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติก พบว่าการเก็บรักษาโปรไบโอติกที่อุณหภูมิสูงแบบที่เรียจะมีอัตราการตายจำเพาะสูงขึ้น โดยมีอัตราการตายจำเพาะเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 50 60 และ 70°C เท่ากับ 0.0170 0.0249 0.0759 และ 0.4465 h⁻¹ ตามลำดับ

จากการศึกษาทั้งหมดพบว่า SBM เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรไบโอติกโดยไม่ต้องเสริมสารอาหาร กระบวนการ SSF ที่มีการหมักแบบกะขี้ สามารถเพาะเลี้ยงโปรไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ง่าย และต้นทุนต่ำ และสารมอลโตเด็กซ์ทรินสามารถใช้ในการรักษาความอยู่รอดของ *E. faecium* A028 ในระหว่างกระบวนการอบแห้งได้

คำสำคัญ : *Enterococcus faecium* A028 สภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบแห้ง กากถั่วเหลือง การรอดชีวิต การหมักแบบกะขี้



Thesis Title	Study of Culture Conditions and Drying Process for Probiotic Inoculum Production with Soybean Meal
Name-Surname	Miss Artitayapan Kannika
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Mr. Atsawut Areesirisuk, Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

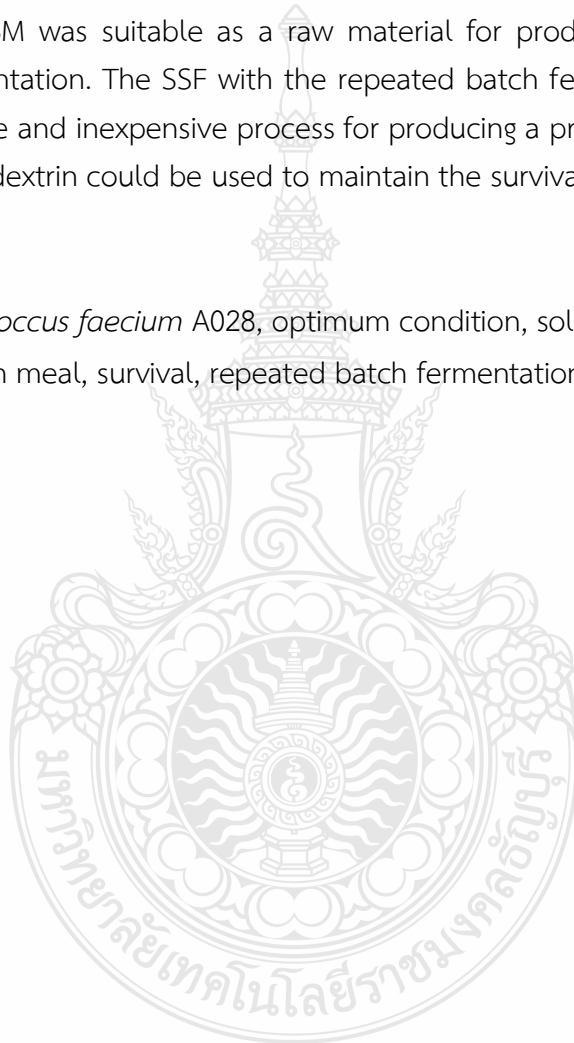
The aims of this study were to : (1) optimize the growth condition of a probiotic strain *Enterococcus faecium* A028 with solid-state fermentation (SSF) in soybean meal (SBM), (2) study the probiotic cultivation by repeated batch fermentation, (3) study the protective agent and temperature in drying process and storage. The important cultivation variables were selected according to the Plackett–Burman Design (PBD), and (4) study the optimum state via the Response Surface Methodology by employing the Box-Benken Design (BBD) statistical model.

The results revealed that the water to SBM ratio, incubation time, and molasses concentration were the first-three main variables affecting the increase of Total Viable Cell Counts (TVC) with the effect contribution of 56.27, 14.33, and 10.46 %, respectively. These three variables were selected to determine the optimum level of increasing bacteria TVC in 300 g of SBM. It was found that the optimal level was 1.5:1 (v/w) of water to SBM ratio and 15.45 hour of incubation time, whereas the effect of molasses concentration did not significantly affected the increase of TVC at the confidence level of 95 %. The TVC was increased to 1.91 Log CFU/g (24.30 % of initial TVC); and the maximum of TVC was 9.77 Log CFU/g. Moreover, it was revealed that cultivation of *E. faecium* A028 in 3,000 g of SBM by SSF was not significantly different from the initial level (p -value > 0.05). In the experiment of repeated batch fermentation, applying SFF with 90 % replacement of new materials was a suitable process to continuously produce the highest TVC of 9.19 Log CFU/g. Finally, the results of growth simulation were denoted that the Logistic model and modified Gompertz model could well imitate the growth of *E. faecium* A028 by SSF and the repeated batch fermentation process (R^2 was in the range of 0.956-0.995). This research suggested that the SBM was an effective low-cost material that could be used for cultivating *E. faecium* A028 probiotic by the SSF process. In addition, the study of protectants, which enhanced the survival rate of probiotic during the drying process indicated that the drying process affected the survival rate of *E. faecium* A028 probiotic. Utilization of protective agents, especially maltodextrin could

highly prevent the probiotic from the heat in the drying process with the maximum survival rate at 83.32 %. In the probiotic drying process, the findings indicated that the strain viability of probiotic depended on the drying temperatures. The viable cell number of *E. faecium* A028 slightly decreased at 55°C and severely decreased at 75°C. Furthermore, Probiotic powder which was stored at the high temperatures resulted in the increase of specific death rate of bacteria. The specific death rates of storage at 40, 50, 60, and 70°C were 0.0170, 0.0249, 0.0759, and 0.4465 h⁻¹, respectively.

Overall, SBM was suitable as a raw material for producing probiotic without nutrient supplementation. The SSF with the repeated batch fermentation process was the efficient, simple and inexpensive process for producing a probiotic product of good quality. The maltodextrin could be used to maintain the survival of probiotic during the drying process.

Keywords: *Enterococcus faecium* A028, optimum condition, solid-state fermentation, soybean meal, survival, repeated batch fermentation



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ดีด้วยความกรุณาจาก ดร. อัษฎาวุธ อารีศิริสุข อาจารย์ที่ปรึกษาหลักในการทำวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ชี้แนะแนวทางแก้ปัญหาตลอดระยะเวลาการศึกษาไม่ว่าจะเป็นการสอนในเรื่องของทฤษฎีและการทำปฏิบัติการรวมถึงสนับสนุนอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีในการทำทดลองเป็นอย่างดีและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการปฏิบัติงาน รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.จันทิมา พิษะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์และกรรมการสอบในครั้งนี้ที่ให้คำปรึกษาในระหว่างการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาให้คำแนะนำในการทำปฏิบัติการและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบในครั้งนี้และคอยให้คำชี้แนะเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ ดร. อารณี โชติโก ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ผู้ดำเนินการวิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีต่างๆ ในการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อธนาภาค กัณนิกา และคุณแม่ประเทือง น้อยนคร ผู้ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้เป็นอย่างดี อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีอย่างยิ่ง ตลอดเวลาจนทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

อาทิตยาพัฒน์ กัณนิกา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(11)
สารบัญตาราง (ต่อ).....	(12)
สารบัญรูป	(13)
อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	(14)
บทที่ 1 บทนำ	16
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	16
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	17
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	17
1.4 กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	18
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	19
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB).....	20
2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	22
2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)	22
2.4 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก	23
2.5 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับมนุษย์	24
2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	24
2.7 ผลของโพรไบโอติกในการยับยั้งจุลินทรีย์	25
2.8 การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์.....	26
2.9 การใช้โพรไบโอติกควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร	29
2.10 ข้อควรพิจารณาการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก	29
2.11 การใช้โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	30
2.12 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ <i>E. faecium</i>	30

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.13 กระบวนการหมักแบบแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF).....	32
2.14 การอบแห้ง (Drying)	34
2.15 องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง.....	35
2.16 อายุการเก็บรักษา (Shelf life)	36
2.17 การทดสอบอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร.....	40
2.18 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเมื่อผ่านกระบวนการผลิต	40
2.19 สารปกป้องเซลล์ (Protective agent).....	42
2.20 ประเภทของแบบจำลอง (Model).....	44
2.21 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	45
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	48
3.1 อุปกรณ์.....	48
3.2 สารเคมี.....	49
3.3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	49
3.4 สถานที่ทำการทดลอง และเก็บข้อมูล.....	58
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	59
4.1 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ใน SBM ด้วยกระบวนการ SSF.....	59
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง <i>E. faecium</i> A028 ใน SBM ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology).....	62
4.3. ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง <i>E. faecium</i> A028 ใน SBM ด้วย กระบวนการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด.....	66
4.4 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง <i>E. faecium</i> A028 ในSBM ด้วย กระบวนการ SSF โดยการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation).....	68
4.5 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกระหว่างการอบแห้ง	76
4.6 การผลิตผงโพรไบโอติกและการเก็บรักษา	83
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	89
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	89

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
5.2 ข้อเสนอแนะ	89
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	102
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา.....	105
ประวัติผู้ดำเนินการทดลอง	107



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล	21
ตารางที่ 2.2	สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางชนิด	25
ตารางที่ 2.3	สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรียโอซิน).....	29
ตารางที่ 2.4	ข้อดีและข้อเสียของ SSF และ SMF.....	33
ตารางที่ 2.5	ประเภทของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	45
ตารางที่ 3.1	ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยกระบวนการ SSF ใน SBM โดยวางแผนการทดลองแบบ PBD.....	50
ตารางที่ 3.2	แผนการทดลองแบบ PBD	51
ตารางที่ 3.3	ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยการหมักแบบ SSF	52
ตารางที่ 3.4	การวางแผนทดลองแบบ BBD.....	52
ตารางที่ 4.1	ผลการทดลอง PBD แต่ละปัจจัย.....	60
ตารางที่ 4.2	อิทธิพลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF ต่อการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028	61
ตารางที่ 4.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของผลการทดลอง	64
ตารางที่ 4.4	ค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	67
ตารางที่ 4.5	การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกแบบ SSF.....	68
ตารางที่ 4.6	การเจริญสูงสุดของแต่ละสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบกะช้า.....	71
ตารางที่ 4.7	ประสิทธิภาพการเจริญของโพรไบโอติกและค่าผลผลิตในกระบวนการหมักแบบกะช้า ...	72
ตารางที่ 4.8	ค่า μ_{max} และ r_{max} จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic และ Gompertz.....	76
ตารางที่ 4.9	อัตราการแห้งจำเพาะและอัตราการตายจำเพาะของกระบวนการอบแห้ง ด้วยสารป้องกัน	79
ตารางที่ 4.10	อัตราการแห้งจำเพาะและอัตราการตายจำเพาะของกระบวนการอบแห้ง ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	82
ตารางที่ 4.11	ค่าจลนพลศาสตร์การตายของ <i>E. faecium</i> A028 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.12	ค่า $\ln k_{\text{death}}$ ของผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกที่อุณหภูมิต่าง ๆ	86
ตารางที่ 4.13	ค่าคงที่และสมการของอาร์เรเนียส	86
ตารางที่ 4.14	การเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่อุณหภูมิ 65°C ที่ได้จากการทดลองและจากการทำนาย	88



สารบัญรูป

หน้า

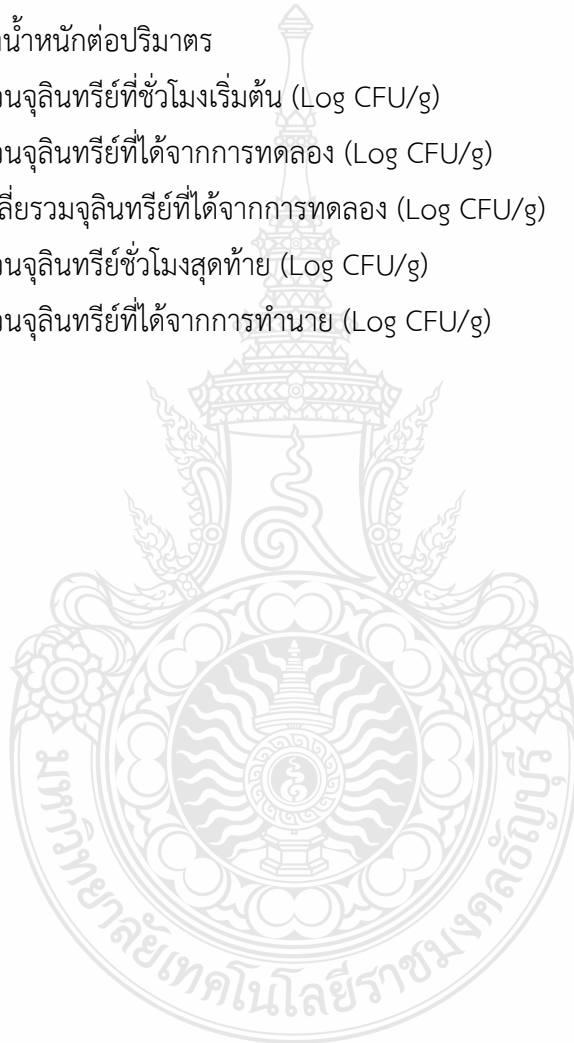
รูปที่ 4.1	อิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง	65
รูปที่ 4.2	(A) การเลียนแบบการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยแบบจำลอง Logistic และ (B) แบบหุ่นประยุกต์ของ Gompertz ในการเพาะเลี้ยงระดับเริ่มต้น และระดับขยายขนาด.....	67
รูปที่ 4.3	การเพาะเลี้ยง <i>E. faecium</i> A028 ด้วยการหมักแบบกะช้ำที่อัตราส่วน (A) 50 % (B) 70 % (C) 90 % โดยน้ำหนัก.....	70
รูปที่ 4.4	การเพาะเลี้ยง <i>E. faecium</i> A028 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะช้ำใน ระดับขยายขนาดที่อัตราส่วน 90 % โดยน้ำหนัก	71
รูปที่ 4.5	การเลียนแบบการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยสมการ Logistic ในกระบวนการหมักแบบกะช้ำ.....	73
รูปที่ 4.6	การเลียนแบบการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยสมการ Gompertz ในกระบวนการหมักแบบกะช้ำ.....	74
รูปที่ 4.7	การเลียนแบบการเจริญของ <i>E. faecium</i> A028 ด้วยสมการ (A) Logistic (B) Gompertz	75
รูปที่ 4.8	การรอดชีวิตของ <i>E. faecium</i> A028 โดยใช้สารปกป้องเซลล์ต่างชนิดใน กระบวนการอบแห้ง	78
รูปที่ 4.9	ปริมาณความชื้น <i>E. faecium</i> A028 โดยใช้สารปกป้องเซลล์ต่างชนิดใน กระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C.....	78
รูปที่ 4.10	การเลียนแบบการอบแห้ง FSBM ที่อุณหภูมิ 55°C เมื่อเติมสารปกป้องเซลล์ชนิดต่าง ๆ.....	80
รูปที่ 4.11	การรอดชีวิตของ <i>E. faecium</i> A028 ในกระบวนการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75°C	82
รูปที่ 4.12	<i>E. faecium</i> A028 ระหว่างกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ.....	84
รูปที่ 4.13	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(N_t/N_0)$ และ ระยะเวลาในการเก็บรักษา (A) 40°C (B) 50°C (C) 60°C (D) 70°C	85
รูปที่ 4.14	ความสัมพันธ์ระหว่าง \ln_{kd} กับ $1/T$ ของ <i>E. faecium</i> A028 ที่อุณหภูมิต่างๆ	87

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	ค่าคงที่ของ Arrhenius
BBD	Box-Benken Design เป็นโปรแกรมการออกแบบการทดลอง
CFU	Colony Forming Unit เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์
E_a	พลังงานกระตุ้น J/mol
FOS	Fructo Oligosaccharide ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์
FSBM	Fermented SBM กากถั่วเหลืองหมัก
g	เป็นหน่วยพื้นฐานของมวลในระบบเมตริก
k_{death}	อัตราการตายจำเพาะ (h^{-1})
k_{drying}	อัตราการแห้ง (h^{-1})
Kg	เป็นหน่วยพื้นฐานของมวลในระบบเมตริก
LAB	แบคทีเรียกรดแลคติก
MR	ค่าสัดส่วนความชื้น
MRS	De Men Rogosa and Sharpe อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์
MSG	Monosodium glutamate โมโนโซเดียมกลูตาเมต (ผงชูรส)
n	ลำดับของปฏิกิริยา
N_0	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (Log CFU/g)
N_t	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอด (Log CFU/g)
PBD	Plackett Burman Design เป็นโปรแกรมการออกแบบการทดลอง
RB	Repeated Batch การเลี้ยงแบบกะซ้ำ
r_{max}	อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด (Log CFU/g h)
R	ค่าคงที่ของแก๊ส (8.314 J/K.mol)
SBM	Soybean meal กากถั่วเหลือง
SSF	Solid-state Fermentation กระบวนการหมักแบบแห้ง
SMF	Submerged Fermentation กระบวนการหมักแบบเหลว
t	เวลาในการเพาะเลี้ยง (h)
t_L	ระยะเวลาช่วง Lag phase (h^{-1})
T	อุณหภูมิ ($^{\circ}K$)
TVC	Total viable cell count จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

μ_{\max}	อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (h^{-1})
v/v	อัตราปริมาตรต่อปริมาตร
W_{ds}	น้ำหนักแห้ง
W_{ws}	น้ำหนักเปียก
w/v	อัตราน้ำหนักต่อปริมาตร
X_0	จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (Log CFU/g)
X_{\exp}	จำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (Log CFU/g)
$X_{\exp mean}$	ค่าเฉลี่ยรวมจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (Log CFU/g)
X_{\max}	จำนวนจุลินทรีย์ชั่วโมงสุดท้าย (Log CFU/g)
X_{pre}	จำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทำนาย (Log CFU/g)



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

โพรบิโอติก ตามความหมายขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO/WHO) หมายถึง จุลชีพที่มีชีวิต ซึ่งบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพร่างกาย [1] จุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรบิโอติกได้แก่แบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เพิ่มความปลอดภัยด้านอาหารและสุขภาพของผู้บริโภคโดยการป้องกันและลดเชื้อก่อโรค [2]

ปัจจุบันมีการนำเชื้อโพรบิโอติกมาใช้ในการผสมลงไปในการผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ เพื่อส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหาร รวมทั้งลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสัตว์ การเพาะเลี้ยงโพรบิโอติกมีการพัฒนากันอย่างรวดเร็ว ซึ่งใช้วิธีการหมักแบบแห้ง (SSF) ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย การถ่ายถอดออกซิเจนในระบบได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเหลว (SMF) นอกจากนี้ยังมีบางรายงานว่าจุลินทรีย์โพรบิโอติกที่หมักแบบแห้ง (SSF) มีค่าการเจริญและการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ในไก่เนื้อและลูกสุกร ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเหลว (SMF) [1] จุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตสูงและที่สำคัญยังสามารถนำวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากทางเกษตร และอุตสาหกรรมทางการเกษตร ทั้งนี้ยังมีการหมักแบบแห้งแบบกะขี้ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่สามารถทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ในแต่ละรอบของเพาะเลี้ยง และสามารถทำการหมักได้อย่างต่อเนื่องหรือจนกว่าเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนลดลง [3]

จากการศึกษามีการใช้โพรบิโอติกแบบผง เพราะใช้งานง่าย สะดวก มีความเสถียร และมีความยืดหยุ่นต่อการใช้งานสูง [4] เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพที่ดี จำเป็นต้องมีเชื้อโพรบิโอติกเริ่มต้นในปริมาณสูง เพราะเมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารสัตว์เชื้อจะลดลง อาจทำให้เชื้อโพรบิโอติกที่ได้ไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ และระยะเวลาในการเก็บรักษา รวมทั้งปัจจัยต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต เช่น กระบวนการอบแห้ง เพราะมีการใช้ลมร้อนซึ่งอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ซึ่งการอบแห้งมีหลายรูปแบบ ได้แก่ การอบแห้งแบบแช่แข็ง การอบแห้งแบบพ่นฝอย การอบแห้งด้วยสุญญากาศ การอบแห้งด้วยการเป่าลม และอื่น ๆ [5]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรบิโอติกในกากถั่วเหลือง (Soybean meal, SBM) ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้ง โดยวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติ โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบพหุคูณเพื่อใช้ในการ

กำหนดค่าควบคุมสำหรับการปฏิบัติการครั้งนี้ โดยการออกแบบการทดลองทางสถิตินี้ นับเป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่ทำให้ประหยัดทรัพยากรและสามารถใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์เพื่อประเมินหาสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งและกระบวนการหมักแบบกะซ้าได้ และคัดเลือกสารปกป้องเซลล์ที่เหมาะสมในการปกป้องเซลล์โพรไบโอติกระหว่างการอบแห้งด้วยลมร้อนและศึกษาอัตราการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาเพื่อสร้างแบบจำลองการทำนายอายุการเก็บรักษา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโพรไบโอติกด้วยการหมักแบบแห้งใน SBM
- 1.2.2 เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติก
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้า (Repeated Batch Fermentation)
- 1.2.4 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกใน SBM ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด
- 1.2.5 เพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการอบแห้ง SBM ที่หมักด้วยโพรไบโอติก
- 1.2.6 เพื่อศึกษาการผลิตผงโพรไบโอติกและการเก็บรักษา

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 ขอบเขตของสถานที่ทำการวิจัย
 - 1.3.1.1 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
 - 1.3.1.2 หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพและนาโน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
 - 1.3.1.3 FS107, Department of Food Science, National Pingtung University of Science and Technology (NPUST), Taiwan
- 1.3.2 ขอบเขตของงานวิจัย
 - 1.3.2.1 คัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติกด้วยการหมักแบบแห้งใน SBM

- 1.3.2.2 ศึกษาาระดับปัจจัยที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติกด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)
- 1.3.2.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)
- 1.3.2.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกใน SBM ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด
- 1.3.2.5 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการอบแห้ง SBM ที่หมักด้วยโพรไบโอติก
- 1.3.2.6 ศึกษาการผลิตผงโพรไบโอติกและการเก็บรักษา

1.4 กรอบแนวความคิดการวิจัย

โพรไบโอติก (Probiotic) คือ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ [6] ซึ่งพบได้ในบริเวณลำไส้ โพรไบโอติกในสิ่งมีชีวิตสามารถช่วยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค และสร้างสมดุลภายในลำไส้ สร้างแบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins) สร้างเอนไซม์ที่กระตุ้นการดูดซึมสารอาหารของสิ่งมีชีวิต มีอิทธิพลต่อการควบคุมภูมิคุ้มกัน และยับยั้งเอนไซม์ที่กระตุ้นในการเกิดโรคมะเร็งและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพาโทเจน (Pathogen) [7] รวมถึงจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารในรูปที่มีชีวิต อาหารที่มีโพรไบโอติกโดยทั่วไปอาจมีส่วนผสมของโพรไบโอติกหนึ่งชนิดหรือมากกว่าก็ได้ โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้ต้องได้รับการศึกษาและตรวจสอบอย่างแน่ชัดแล้วว่าไม่มีผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค และเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วจะเป็นตัวช่วยควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ร่างกายไม่ต้องการให้อยู่ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ให้แก่ร่างกายได้ เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้รับการบริโภคจากอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่าง ๆ แหนมสด และผักดอง เป็นต้น

คุณสมบัติของโพรไบโอติก ขึ้นอยู่กับชนิด สปีชีส์ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพของโพรไบโอติกยังขึ้นอยู่กับปริมาณ ระยะเวลา และช่วงเวลาในการให้โพรไบโอติก ซึ่งจะช่วยการรักษาจุลินทรีย์ต่าง ๆ และความสามารถในการปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และสามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสารอาหารบางประเภทที่ระบบการย่อยในร่างกายสัตว์ที่ไม่สามารถย่อยได้ให้เป็นสารที่มีประโยชน์และร่างกายดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นโพรไบโอติกจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์อย่างมาก งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบหัวเชื้อแบบแห้งให้สามารถนำไปผสมกับอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ได้ง่ายสะดวกในการจัดเก็บ และการขนส่ง ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มผลผลิตการเพาะเลี้ยงได้สูง ลดการพึ่งพาสารเคมีและยาปฏิชีวนะได้ให้วัตถุประสงค์

ดังกล่าวมีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น เช่น ปริมาณโปรตีนทั้งหมด กรดอะมิโนอิสระ และยังสามารถลดความเป็นพิษของสารเคมีบางชนิดในวัตถุดิบได้ ทำให้อาหารสัตว์มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ทราบถึงคุณสมบัติหลังกระบวนการหมักแบบแห้งใน SBM
- 1.5.2 ทราบถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติกด้วยการหมักแบบแห้งใน SBM
- 1.5.3 ทราบถึงระดับปัจจัยที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติก
- 1.5.4 ทราบถึงเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกใน SBM ด้วยการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด
- 1.5.5 ทราบถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติกในกระบวนการหมักแบบกะช้ำ
- 1.5.6 ทราบถึงการอยู่รอดของโพรไบโอติกระหว่างกระบวนการอบแห้ง
- 1.5.7 ได้หัวเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมได้ และสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมา โดยสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มตามผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น คือ กลุ่ม ฮอมอเฟอริเมนเททีฟ (Homofermentative) และกลุ่มเฮเทอโรเฟอริเมนเททีฟ (Heterofermentative) โดยกลุ่มแรกนั้นแบคทีเรียจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้มากกว่า 95 % ผลิตกรดอะซิติก (Acetic acid) 5 % และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียกลุ่มที่สองจะผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 % และผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก (Formic acid) เอทานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์รวมกันประมาณ 50 % แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ [8] ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ บางชนิดสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (Porphyrin Group) [9] มีรูปร่างแบบแท่ง กลม รวมถึงกึ่งแท่งกึ่งกลม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญและบางชนิดเจริญได้ในสภาพที่ไร้อากาศ [9] เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอาหารค่อนข้างซับซ้อนและมีความอุดมสมบูรณ์ (Complex and Enrichment Media) โดยจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจน แบคทีเรียจะเจริญได้ในอาหารที่มี Growth factor และมีวิตามิน เช่น ไบโอติน (Biotin) หรือริโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง [10] เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อภายในท่อนของทางเดินอาหาร ช่องฟันและช่องคลอดของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม และยังพบทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในอาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่มต่าง ๆ และเครื่องในสัตว์ เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกจัดเป็นกลุ่มที่สำคัญ 4 สกุล (Genus) ได้แก่ *Lactobacillus* *Leuconostoc* *Pediococcus* และ *Streptococcus* คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล แสดงในตารางที่ 2.1 ปัจจุบันมีการตรวจสอบระดับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecule) ต่าง ๆ ภายในเซลล์และวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์และลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม

โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิก ซึ่งใช้จัดจำแนกจุลินทรีย์ได้ถึงระดับ Species และ Subspecies โดยใช้เทคนิคขั้นสูงทางพันธุศาสตร์ การเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวมีความแม่นยำในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็นสกุลต่าง ๆ ดังนี้ *Aerococcus Alloiococcus Bifidobacterium Carnobacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Vagococcus* และ *Weissella* [10]

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สกุล

คุณสมบัติทางสรีรวิทยา และชีวเคมี	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Growth at pH 8.0	ND	ND	+	ND
Growth at pH 9.6	-	-	+	+/-
Growth at NaCl 4 %	ND	ND	+	ND
Growth at NaCl 8 %	+/-	ND	+/-	ND
Growth at 45°C	+	+	+	+/-
Growth at 50°C	+/-	-	+/-	ND
Acid formation	+	+	ND	+/-
Arabinose	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Maltose	+	ND	-	-
Raffinose	+	-	-	+/-
Ribose	+	-	ND	+/-
Sucrose	-	+/-	+/-	+/-
Trehalose	ND	+/-	-	+/-
Xylose	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	+	-	-	+/-
Catalase activity	ND	ND	-	-

หมายเหตุ - คือไม่เกิดปฏิกิริยา + คือ เกิดปฏิกิริยา
+/- คือ ความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ND คือไม่มีข้อมูล

ที่มา : Pospiskova *et al.* (2013) [11]

2.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* *Micrococcus pyogenes* *Escherichia coli* *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น และยังสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่ส่งผลเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นด้วย ได้แก่

2.2.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นให้กลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ [10]

2.2.2 ไดอะซีทิล (Diacetyl) เป็นสารให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักและยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์อีกด้วย [10]

2.2.3 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถทำลายแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว โดยผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้อีกด้วย แบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่ได้รับความสนใจนำไปใช้เป็นสารธรรมชาติ [10]

2.2.4 รูทีริน (Reuterin) เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน ละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ผลิตโดยแบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus reuteri* รูทีรินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ [11]

2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)

2.3.1 โพรไบโอติก (Probiotic) หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และ สัตว์ ซึ่งพบได้ในบริเวณลำไส้ และรวมถึงจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารในรูปที่มีชีวิต อาหารประเภทโพรไบโอติกโดยทั่วไปมีส่วนผสมของจุลินทรีย์หนึ่งชนิดหรือมากกว่าก็ได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ต้องได้รับการศึกษาและตรวจสอบอย่างแน่ชัดแล้วว่าไม่มีผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค และเมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไปแล้วจะเป็นตัวช่วยควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ร่างกายไม่ต้องการให้อยู่ [12] ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ให้แก่ร่างกายได้ เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้รับจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ แหนมสด เป็นต้น คุณสมบัติของโพรไบโอติก คือ มีความสามารถในการปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และสามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายอาหารบางประเภทที่ระบบการย่อยในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ให้เป็นสารที่มีประโยชน์และร่างกายดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ [13]

2.4 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.4.1 ด้านลักษณะทั่วไป

2.4.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้กับมนุษย์ สายพันธุ์นั้นควรมีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์

2.4.1.2 สายพันธุ์ที่ใช้ควรมีความปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์ โดยมีการทดสอบเพื่อใช้กับมนุษย์ และมีการรับรองผลที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพทางด้านการบำบัดที่สามารถพิสูจน์ได้

2.4.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกใช้เป็นโพรไบโอติกจะต้องมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ผลิตวิตามินและเป็นสารยับยั้ง เป็นต้น

2.4.1.4 ต้องมีความคงตัวทางพันธุกรรมไม่ก่อเกิดการกลายพันธุ์ ไม่ส่งผ่านยีนที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ

2.4.1.5 ไม่เป็นเชื้อก่อโรคเป็นพิษหรือมีปฏิริยาที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในอวัยวะต่างๆ รวมทั้งมีประวัติเกี่ยวข้องกับโรค เช่น โรคติดเชื้อเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ หรือโรกระบบทางเดินอาหารผิดปกติ เป็นต้น

2.4.2 ด้านความคงทนในสภาวะต่างๆ

2.4.2.1 ต้องรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดของระบบทางเดินอาหารและลำไส้ตอนบน ทนต่อกรดและน้ำดี ยึดเกาะในส่วนของเยื่อผิวของลำไส้ได้ และแพร่ขยายพันธุ์ในลำไส้อย่างน้อยที่สุด ระยะเวลาหนึ่ง

2.4.2.2 โพรไบโอติกจะต้องมีชีวิตและความคงทนในระหว่างกระบวนการแปรรูปและภายใต้สภาวะการเก็บรักษา

2.4.2.3 มีความคงตัวหลังจากการทำแห้งแบบแช่แข็ง หรือโดยวิธีการอื่นๆ

2.4.3 ด้านบทบาทหน้าที่

2.4.3.1 ผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์

2.4.3.2 มีกิจกรรมป้องกันในอาหาร เช่น ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียหรืออาหารเป็นพิษ และมีกิจกรรมต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Salmonella sp.* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น

2.4.3.3 มีคุณสมบัติต่อต้านการกลายพันธุ์ และต่อต้านสารก่อมะเร็ง รวมทั้งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่จะไม่มีผลเมื่อเกิดการอักเสบอยู่ก่อนแล้ว

2.4.3.4 ให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ดีในผลิตภัณฑ์

2.4.3.5 ให้ประโยชน์แก่ผู้ที่ให้ที่อยู่อาศัย ต่อโพรไบโอติก และสามารถขยายการผลิตเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ [14]

2.5 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับมนุษย์

- 2.5.1 จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกได้ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์
- 2.5.2 ต้องแสดงให้เห็นผลที่ได้ชัดเจนกว่าการไม่เติมโพรไบโอติก
- 2.5.3 ต้องทนต่อสภาวะแวดล้อมในลำไส้เล็ก ทางเดินอาหาร ตลอดจนถึงทางเดินหายใจ
- 2.5.4 ผลิตคอเลสเตอรอลได้
- 2.5.5 ยับยั้งสารก่อมะเร็งทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน
- 2.5.6 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ ทำให้การดูดซับแคลเซียมและวิตามินได้ดี [15]

2.6 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกมีหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา และแต่ละชนิดมีหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่

2.6.1 แบคทีเรีย ส่วนมากเป็นแบคทีเรียแลคติก เช่น

2.6.1.1 จีโนส *Lactobacillus* เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefir* และ *Carnobacterium*

2.6.1.2 จีโนส *Leuconostoc* ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc plantarum*

2.6.1.3 จีโนส *Pediococcus* ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus halophilus*

2.6.1.4 จีโนส *Streptococcus* ปัจจุบันแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม *Enterococci* เช่น *Enterococcus faecium* M74 และ SF68 กลุ่ม *Lactococci* เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* และ กลุ่ม *Streptococci* เช่น *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

2.6.1.5 จีโนส *Bifidobacterium* เช่น *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium thermophilum*

2.6.1.6 จีโนส *Propionibacterium* ได้แก่ *Propionibacterium freudenreichii*

2.6.1.7 จีโนส *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis*

2.6.2 ยีสต์ ยีสต์ที่นำมาใช้ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pintolopesii*

2.6.3 รา เชื้อราที่นำมาใช้ ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* [15]

2.7 ผลของโพรไบโอติกในการยับยั้งจุลินทรีย์

ในปัจจุบันความต้องการลดปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อการถนอมอาหาร เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก และไนเตรต มีมากขึ้นจึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารที่ผลิตขึ้นจากธรรมชาติ ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร โดยคุณสมบัติของสารดังกล่าวต้องสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเสื่อมเสียและก่อโรค การศึกษาจุลินทรีย์โพรไบโอติกกำลังได้รับความสนใจและเป็นแนวทางในการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหาร โดยโพรไบโอติกแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ ชนิดอื่นๆ ได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางชนิด

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง	จุลินทรีย์โพรไบโอติก
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Lactococcus, Pediococcus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Lactobacillaceae, Bacillus, Brevibacterium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus, Micrococcus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillaceae, Lactococcus, Pediococcus</i>
Salmonella	<i>Lactobacillus sp., Lactococcus sp. Leuconostoc</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pediococcus, Lactococcus lactis</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Lactobacillaceae, Lactococcus, Bacillus</i>
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<i>Lactococcus, Pediococcus</i>
Moulds	<i>Lactobacillaceae</i>
Yeasts	Lactic acid bacteria
	Bacillus
	<i>Aeromonas</i>

ที่มา : Mossel *et al.*, (1996) [16]

จากตารางที่ 2.2 จะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มโพรไบโอติก ในระบบอาหารมีโพรไบโอติกหลายชนิดที่แสดงสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ถั่วหมัก แหนม และผักดอง เป็นต้น

2.8 การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

โพรไบโอติกหลายชนิดสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์บางชนิดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งสารที่ผลิตขึ้นบางครั้งก็มีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะเซทิล และริบทีรีน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั่วไปได้แบบไม่เจาะจง [16] และบางครั้งก็ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้น และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่จำเพาะมากขึ้นได้แก่ แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) ซึ่งสารที่จุลินทรีย์ โพรไบโอติกผลิตขึ้นจะมีผลต่อจุลินทรีย์ในลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.8.1 กรดอินทรีย์

โพรไบโอติกสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด แบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และบางครั้งก็สามารถผลิตกรดชนิดอื่นได้ด้วย [17] ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ในสภาวะที่เหมาะสม กรดอินทรีย์จะถูกสังเคราะห์จากกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนต์เตททิฟแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น *Lactococci*, *Pediococci*, *Streptococci* และ *Lactobacilli* บางชนิด [13] จะผลิตกรดแลคติกได้เป็นส่วนใหญ่ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตททิฟแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus casei* ซึ่ง จะ หมัก ได้สารชนิดอื่นด้วยนอกจากกรดแลคติก เช่น กรดอะซิติก หรือ แอลกอฮอล์ เป็นต้น กรดอินทรีย์จะยับยั้งจุลินทรีย์ได้โดยที่กรดจะแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์และเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ได้ไฮโดรเจนไอออน ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ และกรดอินทรีย์ยังไปทำให้โปรตีนภายในเซลล์เกิดการเสียสภาพ ทำให้เซลล์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้

ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์จะแตกต่างกัน มีการศึกษาพบว่ากรดอินทรีย์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดอินทรีย์และมีข้อสันนิษฐานว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์น่าจะเกี่ยวข้องกับสัดส่วนโมเลกุลของกรดที่แตกตัวและไม่แตกตัว โดยประสิทธิภาพจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำลง ซึ่งจะมีสัดส่วนโมเลกุลกรดที่ยังไม่แตกตัวสูง [17]

2.8.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) มีคุณสมบัติเป็นพิษทางชีววิทยา โพรไบโอติกบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ได้แก่ *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Pediococci* และ

Leuconostoc [18] แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น และจุลินทรีย์ที่ผลิตจะทนได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้และมีผลในการทำลายโครงสร้างกรดนิวคลีอิกรวมทั้งโปรตีนภายในเซลล์ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารชนิดอื่นเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้ [17]

2.8.3 ไดอะซีทิล

ไดอะซีทิล (2,3-Butanedione) ได้จากกระบวนการสลายซิเทรตในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งขับออกมาโดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactococci*, *Pediococci* และ *Leuconostoc* ไดอะซีทิลจะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ รา ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก [18] เนื่องจากจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับโปรตีนที่จับอยู่กับอาร์จินีน (arginin – binding protein)

2.8.4 อะซีทัลดีไฮด์

อะซีทัลดีไฮด์ เกิดจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนส จึงผลิตอะซีทัลดีไฮด์ออกมามาก ซึ่งเป็นการหมักแบบเฮเทอโรเพอร์เมนเตชัน มีการรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์เข้มข้น 10- 100 ppm สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้

2.8.5 ริวทีรีน

ริวทีรีนเกิดจากกระบวนการสลายกลีเซอรอลและกลีเซอรอลดีไฮด์ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus reuteri* ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน [18] ริวทีรีนไม่ใช่แบคเทอริโอซิน แต่เป็นสารผสมของ โมโนเมอริกไฮเดรทโมโนเมอริก และไซคลิกไดเมทริก ในรูปของเบต้าไฮดรอกซีโพรพิโอนัลดีไฮด์ ริวทีรีนเป็นสารต้านจุลินทรีย์มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา เนื่องจากไปยับยั้งเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส ทำให้ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมภายในเซลล์ได้ มีรายงานว่าริวทีรีนเติมในเนื้อวัวสามารถยับยั้ง *E. coli* และจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ [17]

2.8.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) เป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็ก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไวต่อสารดังกล่าวได้ รวมทั้งแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติก แต่ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ผู้ผลิต แบคเทอริโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นตามกลไกทางธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมี โพรไบโอติกหลายชนิดสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lactobacillus acidophilus* สามารถผลิต Acidocin ได้ ส่วน *Lactococcus lactis* สามารถผลิต Nisin ได้ *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิต plantaricin

และ *Bacillus subtilis* สามารถผลิต Subtilin ได้ เป็นต้น มีการรายงานว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยในอาหาร เช่น *Bacillus cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียแลคติกบางชนิด [19]

แบคทีเรียโอซินมีผลต่อแบคทีเรียโดยการยับยั้งการเจริญหรือทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดขึ้นอยู่กับชนิด ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซิน รวมทั้งสภาวะแวดล้อม ชนิดจำนวนเซลล์เป้าหมาย และการรวมตัวกับสารอาหาร แบคทีเรียโอซินทำลายเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลร่วมกันทำให้เกิดรูหรือช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายแตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น ไนซิน ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis* เป็นแบคทีเรียโอซินกลุ่มแลนทิไบโอติก ที่เป็นกลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ทนความร้อนและมีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ในโมเลกุลเรียกว่า แลนธิโอนิน ลักษณะการทำลายแบคทีเรียของไนซินเป็นแบบทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอกของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด โดยไนซินเป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย เป็นผลให้เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกรบกวน เซลล์เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มพลาสมาทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกมา เซลล์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ส่วนสปอร์ของแบคทีเรียจะไวต่อไนซิน โดยกรณีสปอร์พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วระหว่างที่สปอร์เกิดการงอก ถ้าไนซินมีความเข้มข้นสูงจะสามารถยับยั้งการสร้างเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของ *E. coli* และ *Bacillus stearothermophilus* ได้ [20]

ส่วนแบคทีเรียโอซินกลุ่มนอนแลนทิไบโอติกส์ จะมีขนาดโมเลกุลที่เล็กและทนความร้อนการยับยั้งทำได้โดยในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับกับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ จากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุลแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกจะทำปฏิกิริยากับเอซิลกรุปของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เซลล์สูญเสียสมดุลไอออนรวมทั้งสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์

จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์และสัตว์ได้ ซึ่งเรียกว่าแบคทีเรียโอซิน ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรียโอซิน)

จุลินทรีย์แบคทีเรียโอซิน	สารยับยั้ง
<i>Lactobacillus</i> sp.	caseicin, curvacin , brevicin, plantaricin fermenticin, lactacin , lactocin helveticin
<i>Lactococcus</i> sp.	nisin, lactococcins, lacticin , lactostrepcins
<i>Leuconostoc</i> sp.	Carnocin, mesenterocin, leucocin, louconocin
<i>Pediococcus</i> sp.	Pediocin
<i>Bacillus</i> sp.	Subtilisin

ที่มา : Mossel *et al.* (1996) [16]

2.9 การใช้โพรไบโอติกควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย จึงทำให้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลากหลายชนิด โดยในช่วงแรกพบว่ามีการใช้ในการผลิตภัณฑ์อาหารประเภทไวน์ โยเกิร์ต แหนม เป็นต้น ต่อมาได้มีการศึกษาและพัฒนาพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดหากได้รับประทานเข้าไป จะเกิดผลดีต่อร่างกาย ช่วยให้มีสุขภาพดีและมีอายุยืนยาว ซึ่งพบว่าโพรไบโอติกหลายชนิดสามารถควบคุมจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารได้ทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยวิธีนี้เป็น การควบคุมจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจมาก เนื่องจากการเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคทั้งจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และจากสารเคมี จึงทำให้มีการศึกษาการนำโพรไบโอติกมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ปลา ผักและผลไม้ เป็นต้น [21]

2.10 ข้อควรพิจารณาการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ในการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะดีทางกายภาพและทางประสาทสัมผัส และมีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่มีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้นในการผลิตจึงมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ความปลอดภัยของสายพันธุ์ที่เลือกใช้ ผลของการเป็นโพรไบโอติกปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไป สภาพที่ใช้ในการบ่ม ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างชนิดของเชื้อในกรณีการใช้เชื้อผสม รวมถึงการเลือกรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ในช่วงระหว่างการเก็บรักษาและผลที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพในแง่ของการเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก [21]

2.11 การใช้โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

อาหารที่มีเชื้อโพรไบโอติกเป็นองค์ประกอบที่ใช้สำหรับการบริโภคของมนุษย์มีออกจำหน่ายในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. casei* โดยเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์นมหมัก ปัจจุบันมีการเพิ่มจำนวนของสปีชีส์ต่างๆ ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเป็นอย่างมาก เช่น *Bacillus* sp. และ fungi คือ *Saccharomyces* sp. และ *Aspergillus* sp. แต่ในผลิตภัณฑ์นมหมัก ยังคงเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้เป็นตัวกลางในการส่งผ่านเชื้อโพรไบโอติก และถือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลาย แต่อย่างไรก็ตามยังมีการใช้เชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้แก่ fruit juices, fruit soups, infant formulas และยังใช้ในทางเภสัชกรรมจากผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งจะทำให้เกิดการบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการตลาดของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในอนาคตต่อไป [21]

2.12 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ *E. faecium*

ในปัจจุบันการใช้โพรไบโอติกร่วมกับอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์มีแนวโน้มที่แพร่หลายมากขึ้นทั้งในระดับอุตสาหกรรมและเกษตรกรรายย่อย เนื่องจากโพรไบโอติกมีประโยชน์หลายด้านอย่างที่ทราบกันเป็นอย่างดีว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยย่อยสลายอาหารเพื่อให้สัตว์มีการเจริญได้ดีขึ้น ขนาดตัวใหญ่ขึ้น น้ำหนักมากขึ้น และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์ได้อีกด้วย [11] จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นและขายได้ราคาสูง [22] มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อการผลิตสัตว์ออกมาเพื่อยืนยันถึงศักยภาพของโพรไบโอติกที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ดังนี้

Pospiskova *et al.* (2013) [23] ทำการทดลองเกี่ยวกับโพรไบโอติกที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ของสุกร ในงานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของสุกร แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ให้อาหารที่เสริมโพรไบโอติก *E. faecium* SF68 และกลุ่มที่ 2 ให้อาหารโดยไม่เสริมโพรไบโอติก (กลุ่มทดลอง) เก็บตัวอย่างอุจจาระไปทดสอบ พบว่า ในกลุ่มที่เสริมด้วยโพรไบโอติกมีจำนวน *E. coli* และ *Clostridium* spp. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงข้อดีอย่างชัดเจนของการบริโภคอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกส่งผลให้ลดการเกิดโรคอุจจาระร่วงที่พบบ่อยในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

Bybee *et al.* (2011) [24] ศึกษาผลของ *E. faecium* SF68 ต่อโรคท้องร่วงในแมวและสุนัข ในการทดลองมีแมวทั้งหมด 217 ตัว และสุนัข 182 ตัว ทำการทดลอง 4 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมด้วยโพรไบโอติกและกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก (กลุ่มควบคุม) ผลการทดลอง

พบว่าอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส่งผลให้โรคท้องร่วงในแมวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในสุนัขไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Hafsa *et al.* (2015) [25] ศึกษาศักยภาพโพรไบโอติกสายพันธุ์ *E. faecium* และความต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกจากลำไส้และอุจจาระไก่ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและระบุคุณสมบัติของ *Enterococcus* sp. ที่แยกจากลำไส้และอุจจาระไก่เพื่อคัดเลือกโพรไบโอติกที่มีศักยภาพ โดยแยกแบคทีเรียจากลำไส้และอุจจาระไก่ 30 ตัว ที่เลี้ยงจากฟาร์มเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า *Enterococcus* sp. มีการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.2 % เป็นเวลา 24 h และสภาวะจำลองของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แบคทีเรียดังกล่าวมีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *S. enteritidis* มีการระบุสายพันธุ์ว่าเป็น *E. faecium* จากการทดลองพบว่า *E. faecium* เป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้ร่วมกับอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมด้านสุขภาพของสัตว์ได้เป็นอย่างดี

Simonova *et al.* (2009) [26] ทำการวิจัยเกี่ยวกับ *E. faecium* CCM7420 และผลต่อกรย่อยอาหารของกระต่าย ผลการทดลองพบว่า กระต่ายมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากได้รับอาหารเสริมด้วย *E. faecium* CCM7420

Divyashri *et al.* (2015) [27] ศึกษาถึงคุณสมบัติโพรไบโอติก พบว่า *E. faecium* CFR 3003 มีการรอดชีวิตภายใต้สภาวะจำลองในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากสามารถทนต่อสภาวะกรดพีเอช 1.5 2.0 และ 3.0 สามารถรอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.45 % และรอดชีวิตภายใต้สภาวะที่มีเอนไซม์เพปซินและทริปซิน

Ghomrassi *et al.* (2016) [28] ศึกษาศักยภาพของ Enterococci ที่แยกจากปลาทะเลที่มีความต้านทานต่อแบคทีเรียแกรมลบ มีการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่ามี *E. faecium* จำนวน 13 ไอโซเลต และ *L. lactis* จำนวน 3 ไอโซเลต ผลการทดลองพบว่า *E. faecium* จำนวน 6 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus parauberis* *Vagococcus* spp. และ *Carnobacterium maltaromaticum* และโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Flavobacterium frigidarium* *Vibrio pectenica* *V. penaeicida* และ *Photobacterium damsela* โดยแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบแยกจากปลาที่เป็นโรค และมีการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี จากการทดลองแสดงถึงศักยภาพของ *E. faecium* ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติก

Sarra *et al.* (2013) [29] แยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรีย Enterococci จากปลา โดยทำการศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอวัยวะภายในของปลาที่มีคุณสมบัติที่ดีและมีความปลอดภัย ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ คือ GM1 GM2 และ GM3 ระบุว่าเป็น *E. faecium* โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

มีการผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและยับยั้ง *Carnobacterium maltaromaticum* ที่เป็นเชื้อก่อโรคในปลา และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ Ampicillin Penicillin Tetracycline และ Gentamicin แต่มีความสามารถในการต้านทานต่อยา Rifampicin การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับส่งเสริมการเจริญหรืออาจใช้เพื่อปรับปรุงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร

2.13 กระบวนการหมักแบบแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF)

กระบวนการหมักแบบ หมายถึง การหมักที่เกี่ยวข้องกับของแข็งที่ไม่มีน้ำหรือมีน้ำปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่พื้นผิวจะต้องมีความชื้นพอที่จะช่วยการเจริญและการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ การหมักแบบ Solid-State Fermentation (SSF) ยังช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ในธรรมชาติในของแข็งที่ชื้นและได้เป็นต้นแบบของเทคนิคการหมักในสมัยโบราณอีกด้วย จึงไม่น่าแปลกใจที่เกือบทุกกระบวนการหมักที่ใช้ในสมัยโบราณอยู่บนพื้นฐานของหลักการของ SSF การหมักแบบ SSF นิยมนำวัสดุเหลือทิ้งจากทางเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตร เพราะใช้พลังงานที่ต่ำกว่าและมีน้ำเสียน้อยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและยังเป็นการแก้ไขปัญหาการจัดการของเสียที่เป็นของแข็งอีกด้วย

ประวัติศาสตร์ของเทคโนโลยีการหมักที่บ่งชี้ว่ากระบวนการ SSF เป็นที่นิยมในประเทศตะวันตกในช่วงหลังปี ค.ศ. 1940 ได้มีการพัฒนาของเทคโนโลยีการหมักแบบ Submerged fermentation (SMF) ในพัฒนาวิทยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีความต้องการอย่างมากของยาปฏิชีวนะในช่วงสงครามโลก SMF กลายเป็นเทคโนโลยีแบบอย่างที่ดีสำหรับการผลิตสารประกอบต่าง ๆ [30] และในช่วง 1960-1970 มีรายงานปรากฏในการผลิตสารพิษจากเชื้อราโดย SSF ในการผลิตอาหารสัตว์ที่อุดมไปด้วยโปรตีน มีการรายงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร จึงเป็นที่สนใจการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบเหลือทิ้งที่ต้นทุนต่ำอย่างอื่น ตั้งแต่นั้นมาได้มีการเพิ่มการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่นอาหาร, สาร Primary และ Secondary ต่าง ๆ และกระบวนการทางชีวภาพ เช่น Biobleaching Bio pulping Bioremediation Bio beneficiation ฯลฯ [30]

SSF มีข้อดีมากกว่า SMF เป็นการหมักที่ง่ายและลดค่าใช้จ่ายได้ และยังมีหลักการในการควบคุมของพารามิเตอร์ที่แตกต่างกันเช่นค่า pH อุณหภูมิอากาศการถ่ายโอนออกซิเจนและความชื้น SSF ไม่มีความซับซ้อนซึ่งต่างจากการหมักแบบ SMF ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อเสียของ SSF และ SMF

ข้อดี	ข้อเสีย
ผลผลิตที่สูงขึ้น	มีการเคลื่อนย้ายค่อนข้างยาก
การไหลเวียนของออกซิเจนที่ดีขึ้น	มีประสิทธิภาพในการผสมต่ำ
วัตถุดิบที่ใช้ต้นทุนต่ำ	มีการควบคุมที่ค่อนข้างยากของพารามิเตอร์ในกระบวนการ (pH, ความร้อน, ความชื้น สารอาหาร, ฯลฯ)
ไม่ต้องกำจัดน้ำที่เสียจากกระบวนการผลิต	
ใช้พลังงานน้อยและลดค่าใช้จ่าย	
เป็นกระบวนการหมักที่ง่าย	อาจมีปัญหาเกี่ยวกับความร้อนสะสม
เป็นการหมักที่คล้ายกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ	ถ้าหากผลิตภัณฑ์มีปนเปื้อนต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัด

ที่มา : Couto and Sanroman, (2006) [30]

2.13.1 การประยุกต์ใช้กระบวนการหมักแบบ SSF กับ จุลินทรีย์โพรไบโอติก

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ SSF กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ส่งเสริมการเจริญของสัตว์ต่างๆ ได้ เช่น ช่วยรักษาสมดุลและควบคุมปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรครภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารทำให้สัตว์สามารถดูดซึมอาหารได้มากขึ้น ส่งเสริมและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง มีอัตราการรอดชีวิตสูง ซึ่งในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยประยุกต์ใช้กระบวนการหมักแบบแห้งในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย การถ่ายเทออกซิเจนในระบบดีกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเหลว จุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตสูง และยังสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากถั่วเหลือง และกากถั่วเขียว มาใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงได้ [31], [32] เนื่องจากมีโปรตีน โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) วิตามินบี และแร่ธาตุต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ทำให้วัตถุดิบดังกล่าวมีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น เช่น ปริมาณโปรตีนทั้งหมด กรดอะมิโนอิสระ และยังสามารถลดความเป็นพิษของสารเคมีบางชนิดในวัตถุดิบได้ ทำให้อาหารสัตว์มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

ทั้งนี้ในปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้อาหารสัตว์ที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แบบสดในการเพาะเลี้ยงสัตว์ต่างๆ ซึ่งอาหารดังกล่าวมีอายุในการเก็บรักษาสั้นๆ ทำให้ต้องมีการผลิตใหม่อยู่เสมอ จุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน เกิดการปนเปื้อนของ

จุลินทรีย์ที่ไม่พึ่งประสงค์ได้ง่าย ใช้พื้นที่ในการจัดเก็บมาก และมีน้ำหนักในการขนส่งสูง ซึ่งส่วนใหญ่มีการผลิตจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB)

2.14 การอบแห้ง (Drying)

หลักการอบแห้งคือ นำความชื้นออกจากวัตถุดิบเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา เมื่อทำการอบแห้งวัตถุดิบเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์แล้วจะสามารถเก็บได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น โดยผลิตภัณฑ์นั้นจะไม่เกิดความเสียหายจากการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาอบแห้งแล้วจะไม่มี ความชื้นเหลืออยู่หรืออาจจะเหลืออยู่น้อยมากจนจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญขึ้นได้ การอบแห้งเป็นการประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษาอีกด้วย เนื่องจากการอบแห้งเป็นการดึงน้ำออกจากวัตถุดิบจึงทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงและน้ำหนักน้อยลง คุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังการอบแห้งได้รับผลกระทบมาจากกระบวนการอบแห้ง ทำให้รสชาติ สี และกลิ่นที่เปลี่ยนแปลงไป มีการถ่ายเทความร้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกไปยังผิวหน้าของวัตถุดิบในระหว่างกระบวนการอบแห้งและการถ่ายเทมวลจากข้างในต้อออกไปยังผิวของวัตถุดิบเนื่องจากการถ่ายเทความร้อนสู่สิ่งแวดล้อม [33]

2.14.1 จลนพลศาสตร์การอบแห้ง (Drying kinetics)

การอบแห้งเป็นการถ่ายเทความร้อนไปยังวัตถุดิบที่มีความชื้นเพื่อไล่ความชื้นออกมาในรูปแบบของการระเหย ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการอบแห้ง คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง ความชื้นสัมพัทธ์ อัตราการไหลของอากาศในระหว่างกระบวนการอบแห้ง และประสิทธิภาพของเครื่องอบแห้ง พฤติกรรมของการอบแห้งด้วยลมร้อนเป็นตัวกลางในการพาความชื้นออกจากตัววัตถุดิบ [33]

2.14.2 การอบแห้งวัตถุดิบชนิดต่างๆ

Tirawanichakul *et al.* (2012) [34] ศึกษาการอบแห้งของขนุนด้วยพลังงานความร้อนผสมผสานระหว่างรังสีอินฟราเรด ไมโครเวฟ และลมร้อน โดยได้ทำการทดลองอบแห้งขนุนในช่วงอุณหภูมิ 40 - 60°C ในทุกการทดลอง โดยขนุนมีค่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง 300 - 400 % มาตรฐานแห้ง หลังจากการอบแห้งค่าความชื้นของขนุนลดลงเหลือ 12 - 19 % มาตรฐานแห้ง จากการทดลองพบว่าอัตราการอบแห้งของขนุนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างกระบวนการอบแห้งเมื่อเทียบกับความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างขนุน มีการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการอบแห้งชั้นบางของขนุนพบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Modified Page Logarithmic และ Approximation of Diffusion เหมาะสมกับการอบแห้งแบบ 2 ชั้นตอนด้วยคลื่นไมโครเวฟกับลมร้อน การอบแห้งด้วยรังสีอินฟราเรดและการอบแห้งด้วยพลังงานความร้อนระหว่างรังสีอินฟราเรดร่วมกับลมร้อน ตามลำดับ

Nadee *et al.* (2012) [35] ศึกษาการอบแห้งของใบเตยด้วยรังสีอินฟราเรดร่วมกับลมร้อนและการอบแห้งด้วยลมร้อนเพียงอย่างเดียว ทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 - 65°C ใช้กำลังของ

รังสีอินฟราเรดที่ 500 และ 1,000 W ความชื้นเริ่มต้นในการอบแห้งใบเตยและความชื้นสุดท้ายอยู่ที่ 400 - 600 % มาตรฐานแห้ง และ 8 - 12 % มาตรฐานแห้ง ตามลำดับ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งใบเตยด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 1,000 W ร่วมกับลมร้อนและการอบแห้งด้วยลมร้อนเพียงอย่างเดียวคือ แบบจำลองของ Logarithmic และแบบจำลองที่ใช้สำหรับการอบแห้งด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 500 W ร่วมกับลมร้อนคือ แบบจำลองของ Page

Tirawanichakul *et al.* (2013) [36] ได้ทำการอบแห้งใบข้าวบักที่อุณหภูมิ 50-70°C ด้วยรังสีอินฟราเรดที่กำลัง 500 - 1,500 W โดยใบข้าวบักสดที่นำมาทำการทดลองมีความชื้นเริ่มต้นที่ 600 % มาตรฐานแห้ง และความชื้นสุดท้ายที่ 20 % มาตรฐานแห้ง แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งใบข้าวบักคือ สมการของ Midilli

Phosee *et al.* (2013) [37] ได้ทำการอบแห้งใบสะระแหน่ด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75°C ใบสะระแหน่มีความชื้นเริ่มต้น 6.98 กรัม/น้ำต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และความชื้นสุดท้ายหลังการอบแห้งที่ 0.064 กรัม/น้ำต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งคือ สมการของ Midilli โดยมีค่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) สูงสุด ในขณะที่ค่ารากที่สองของความคลาดเคลื่อนกำลังสองเฉลี่ย (RMSE) และค่าโคสแควร์ (X^2) ต่ำสุด

2.15 องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลือง (Soybean Meal, SBM) มีโปรตีน (Protein) กรดอะมิโน (Amino Acid) และไนโตรเจน (Nitrogen) เป็นองค์ประกอบหลัก [38] และมีปริมาณไลซีนสูง ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ และรสชาติอร่อย ทำให้เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ [39] ใน SBM ยังมีสารประกอบที่สำคัญอย่างไอโซฟลาโวนส์ โดยไอโซฟลาโวนส์นั้นเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีการค้นพบว่าสามารถป้องกันความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งเต้านม ไอโซฟลาโวนส์ในถั่วเหลืองยังสามารถส่งเสริมความแข็งแรงในเพศหญิงได้ เนื่องจากในถั่วเหลืองมีสารสำคัญที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนในเพศหญิง [40] มีงานวิจัยพบว่าในสัตว์ปีกสามารถย่อย SBM ได้ดี โดยจะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมาทำการย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีน ส่งผลให้สัตว์มีการย่อยโปรตีนได้เร็ว ทำให้มีการเจริญเร็วขึ้น SBM จึงเป็นวัตถุดิบชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [38] ในช่วงปี พ.ศ. 2550 ถึงปี พ.ศ. 2558 ได้มีการสุ่มตัวอย่าง SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากแหล่งที่มาของถั่วเหลือง โดยศึกษาถึงปริมาณโปรตีนรวม (Crude Protein) คุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการของ SBM การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหรือวัตถุแห้ง (Dry Matter, DM) พบว่า SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกาและบราซิลมีค่าโปรตีนรวมมากกว่า SBM จากประเทศอาร์เจนตินา มีค่าเท่ากับ 532 532 และ 517 g / kg ตามลำดับ

SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอาร์เจนตินามีปริมาณไลซีนมากกว่า SBM จากประเทศบราซิล มีค่าเท่ากับ 6.17 6.11 และ 6.07 % ตามลำดับ SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกามีซูโครสมากกว่า SBM จากประเทศอาร์เจนตินาและบราซิล เท่ากับ 84 78 และ 64 g / kg และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตชนิดสแตคีโอส (Stachyose) เท่ากับ 64 57 และ 53 g / kg ตามลำดับ ปริมาณไฟเบอร์เท่ากับ 118 102 และ 90 g / kg และแรฟฟิโนส (Raffinose) เท่ากับ 16 14 และ 11 g / kg จากประเทศบราซิล อาร์เจนตินา และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ ในส่วนของปริมาณแร่ธาตุขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของSBM โดย SBM จากประเทศบราซิลมีธาตุเหล็ก (Fe) มากแต่มีแคลเซียม (Ca) น้อย มีธาตุฟอสฟอรัส (P) ธาตุโพแทสเซียม (K) มากกว่า SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอาร์เจนตินา ตัวชี้วัดคุณภาพโปรตีนแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของ SBM ค่ากิจกรรมยูริเอส (Urease Activity) ของ SBM จากประเทศอาร์เจนตินามีค่าต่ำสุด ความเสียหายที่เกิดจากความร้อน เช่น การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard Reaction) หรือปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลมีค่าต่ำสุดใน SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกา องค์ประกอบทางเคมี คุณภาพโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการของ SBM ในแต่ละแหล่งที่มาที่มีความแตกต่างกัน ที่ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากัน SBM จากประเทศสหรัฐอเมริกามีไฟเบอร์น้อย ซูโครสและไลซีนมาก [41] มีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของ SBM ด้วยการหมักแบบแห้งร่วมกับการใช้เชื้อผสม ดังนี้ *Streptococcus thermophiles* *Bacillus subtilis* MA139 และ *Saccharomyces cerevisiae* ผลการทดลองพบว่า SBM หมักผสมโพรไบโอติก สามารถทำให้ลูกสุกรหย่านมมีประสิทธิภาพในการเจริญได้ดีขึ้น [39] SBM เป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่นิยมใช้มากที่สุดในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีโปรตีนสูงและต้นทุนต่ำ [42]

2.16 อายุการเก็บรักษา (Shelf Life)

อายุการเก็บรักษา หมายถึง สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหาร อาจมีผลต่อคุณภาพของอาหารภายหลังการเก็บรักษาในช่วงเวลาหนึ่ง ลักษณะทางคุณภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่ต้องการ อาจมีเพียงหนึ่งลักษณะหรือมากกว่านั้น ที่ระบุว่าอาหารไม่เหมาะสมที่จะบริโภคหรืออาจกล่าวได้ว่าอาหารนั้นหมดอายุการเก็บรักษา นอกจากนี้ อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ยังหมายถึงระยะเวลาที่คุณสมบัติของอาหารยังคงเป็นที่ยอมรับได้ของลูกค้า ผู้ผลิตอาหารต้องรับผิดชอบว่าอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ของตนนั้นต้องไม่สั้นกว่าวันหมดอายุ (Expiring Date) ที่ประทับไว้บนผลิตภัณฑ์ [43] การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เพื่อคงคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในช่วงเวลาที่ต้องการภายใต้สภาวะการเก็บรักษาและการขนส่ง โดยอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันและขึ้นอยู่กับสภาวะการแปรรูปต่าง ๆ ในโรงงาน และอุณหภูมิที่ใช้การเก็บรักษา

อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารเป็นการบ่งบอกถึงระยะเวลาที่ผลิตภัณฑ์นั้นยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค รวมถึงยังมีประสาทสัมผัสทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ เป็นที่พึงพอใจ และคงไว้ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการ ทั้งนี้ต้องอยู่ภายใต้เงื่อนไขของการเก็บรักษาตามสภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้หากพิจารณาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารแล้วสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยภายใน (Intrinsic Factors) ซึ่งเป็นปัจจัยที่แสดงถึงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (Water Activity: aw) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความเป็นกรดทั้งหมด (Total Acidity) ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ แร่ธาตุต่าง ๆ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น การใส่สารป้องกันการเสีย (Food Preservative) องค์ประกอบของสารกลุ่มชีวเคมีต่าง ๆ เป็นต้น และปัจจัยภายนอก (Extrinsic Factors) เช่น การควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษาและการจัดจำหน่าย การสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ในระหว่างกระบวนการผลิตและกระบวนการขนส่ง รวมไปถึงการจัดการของผู้บริโภค เป็นต้น ทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกต่างก็มีปฏิริยาซึ่งกันและกันในแง่การยับยั้งหรือการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ [44] สามารถแบ่งได้ดังนี้

2.16.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

เป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีสาเหตุมาจากความผิดพลาดในการจัดการในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิต และการขนส่ง เช่น การชำรุดของผัก ผลไม้ การแตกหักของผลิตภัณฑ์ขนมอบกรอบ การสูญเสียความกรอบของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

2.16.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

สามารถเกิดได้ทั้งขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษาโดยปฏิริยาเคมีส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบภายในของอาหารที่มีปัจจัยแวดล้อมภายนอกเข้ามาเป็นตัวช่วยในการเกิดปฏิริยา โดยปฏิริยาเคมีที่สำคัญ ๆ ได้แก่ ปฏิริยาจากเอนไซม์ (Enzymatic Reaction) เช่น การเกิดกลิ่นหืน การเกิดสีน้ำตาล เป็นต้น

2.16.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

การเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้ต้องอาศัยปัจจัยที่เพียงพอประกอบด้วย จึงจะสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ เช่น ค่าวอเตอร์แอกติวิตีในผลิตภัณฑ์อาหาร ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลหรือเกลือ (Osmotic Concentration) ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นต้น เช่น การเน่าเสียของอาหารสด เป็นต้น

แม้ว่าปัจจุบันจะมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ก็ได้มีการประยุกต์ใช้ในการประมาณอายุการเก็บรักษาของอาหารและการตรวจการเน่าเสียเช่นใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสรุปความเป็นไปได้ของสิ่งมีชีวิตที่ทำให้อาหารเน่าเสียและพัฒนาความก้าวหน้าของ

กระบวนการผลิตและกระบวนการเก็บรักษา โดยใช้ความรู้เชิงปริมาณของจุลินทรีย์ใช้ในการทำนายและ เป็นพื้นฐานในการพัฒนาอุปกรณ์และเครื่องมือเพื่อใช้ในการตรวจสอบตั้งแต่กระบวนการผลิต การเก็บรักษา การจัดจำหน่าย และการคาดการณ์อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่เหลือ ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญๆ ได้แก่ การบรรจุภัณฑ์ อุณหภูมิ ค่ากิจกรรมของน้ำ ค่าความเป็นกรด-ด่าง คุณสมบัติของอุปกรณ์ที่ใช้ และอื่น [43]

ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารเป็นแหล่งที่อยู่ที่ดีเยี่ยมสำหรับการเจริญจุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะมีการปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการแปรรูปและการจัดการดำเนินการต่าง ๆ ก่อให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ โดยตัวเลขเริ่มต้นของสิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อนมีผลกระทบมาจากหลายปัจจัยซึ่งประกอบไปด้วย ปัจจัยภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ปัจจัยที่มาจากกระบวนการผลิต ได้แก่ การถูกทำลายด้วยความร้อน ปัจจัยอื่น ๆ เช่น อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ การเสื่อมสภาพของอาหารเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องระหว่างกระบวนการเก็บรักษาอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ ด้านเคมีในตัวอย่างอาหาร และกิจกรรมต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ในตัวผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ซึ่งผู้บริโภคสามารถปฏิเสธสินค้าได้ เช่น การสูญเสียสีแดงสดบนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อสัตว์ [43]

2.16.4 วิธีการแบบดั้งเดิม

วิธีการทางจุลชีววิทยาแบบดั้งเดิมเป็นการตรวจสอบเพื่อกำหนดขอบเขตการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์ถูกจำกัดด้วยเวลา และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สำหรับปฏิบัติการย่อยสลายที่ทำให้เกิดการเน่าเสียอาจจะพบจำนวนจุลินทรีย์ได้ตั้งแต่ 7 Log /g หรือ mg ของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ขึ้นอยู่กับสถานะ มีการใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อน มีราคาแพง เพื่อให้ได้ผลที่แม่นยำและรวดเร็ว สามารถทำซ้ำได้ และนำไปใช้ในการประมาณอายุการเก็บรักษาโดยส่วนใหญ่จะใช้การตรวจสอบด้วยวิธีการทางกายภาพและทางเคมี [42] ได้รับการยอมรับเพื่อใช้สำหรับทำนายอายุการเก็บรักษาน้อยมาก และได้มีการคิดและพัฒนาเพื่อนำไปสู่ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางทางด้านอุตสาหกรรมด้านอาหาร

2.16.5 จุลชีววิทยาทำนาย

การทำนายอายุการเก็บรักษา และการประยุกต์ใช้ต่าง ๆ คือ [44] ได้แก่ การวัดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นของผลิตภัณฑ์ ชนิดของจุลินทรีย์ ความซับซ้อนของอาหารแต่ละประเภท ไม่เท่ากัน จึงมีการพัฒนารูปแบบทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมเพื่อหาความแปรปรวนทางชีวภาพ ความจำเป็นภายใต้เงื่อนไขต่าง ๆ และการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้ตรวจสอบปัจจัยภายนอก

มีข้อกำหนดหลายข้อที่ช่วยในการกำหนดระดับความเชื่อมั่นเพื่อความปลอดภัยและคุณภาพของอาหารในทุกขั้นตอนหลังการผลิต ข้อดีเฉพาะที่เป็นไปได้จากการสร้างแบบจำลอง คือ

2.16.5.1 เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์และอายุการเก็บรักษาเพื่อใช้ในการพัฒนาตลาดที่ส่งออกไกล ๆ ได้

2.16.5.2 สามารถระบุพารามิเตอร์สำหรับพัฒนาความเสถียรของจุลินทรีย์ทางจุลภาคหรือผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป

2.16.5.3 สามารถให้ความหมายการระบุและปริมาณผลกระทบของข้อบกพร่องของการประมวลผลและระบบการกระจายสินค้าซึ่งอาจทำให้เกิดการปฏิเสธสินค้าโดยเฉพาะสินค้าส่งออก

2.16.5.4 เป็นพื้นฐานในการพัฒนาระบบคุณภาพ HACCP อย่างสมเหตุสมผล โดยมีการสะสมข้อมูลเชิงปริมาณเกี่ยวกับจุลินทรีย์ และทำให้ข้อกำหนดของพารามิเตอร์ การประมวลผล ผลิตภัณฑ์การกำหนดการเก็บรักษา และจัดจำหน่ายเพื่อป้องกันหรือจำกัดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเสื่อมสภาพ เพื่อพัฒนาไปสู่ระบบที่ยอมรับได้

ในช่วงปี 1980 และ 1990 [45] มีการศึกษาส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการสร้างแบบจำลองเลียนแบบพฤติกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดจากอาหารและก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ซึ่งได้รับความสนใจมากขึ้น และในปี 1960 และ 1970 มีรายงานเกี่ยวกับการเน่าเสียหลายแนวคิดมีการพัฒนาวิธีการและพัฒนาแบบจำลองเพื่อใช้ในการตรวจสอบและการประยุกต์ใช้มากขึ้นและทดสอบความสัมพันธ์กับการทำนายอายุการเก็บรักษาอาหารเย็นที่เก็บไว้และนำไปสู่การพัฒนากลยุทธ์และเทคโนโลยี เช่น การกำหนดระดับความเน่าเสีย ความสัมพันธ์และความอดทนต่ออุณหภูมิต่าง ๆ การสัมผัสกับอุณหภูมิที่ผันผวน โดยได้ทำการนํานมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์มาทำการหาค่าเฉลี่ยของสิ่งมีชีวิตที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย 5 CFU/mL ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.4 เป็นจุดเริ่มต้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และมีเวลาที่เชื้อ *Pseudomonas* spp. เจริญ คือ 5.5 h ดังนั้นอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นมสามารถเก็บไว้ได้นาน 7.5 วัน คิดได้จาก

$$\begin{aligned} \text{จำนวนของการเจริญของจุลินทรีย์ก่อนการเน่าเสีย} &= 7.5 - (-2.3) \\ &= 9.8 \times \text{Log } 10 / \text{Log } 2 \\ &= 32.5 \\ \text{ดังนั้น เวลาที่สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้} &= 32.5 \times 5.5 \\ &= 7.5 \text{ วัน [45]} \end{aligned}$$

2.17 การทดสอบอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารมี 2 วิธี ดังนี้

2.17.1 การทดสอบในสภาวะปกติ โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทดสอบไว้ที่สภาวะควบคุมปกติสัปดาห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์มาตรวจสอบคุณภาพเป็นระยะ ๆ จนกระทั่งผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพจนไม่เป็นที่ยอมรับ โดยมีการกำหนดอายุการเก็บรักษาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพจนไม่เป็นที่ยอมรับให้เป็นอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้น

2.17.2 การทดสอบในสภาวะเร่ง โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่สภาวะควบคุมที่สามารถเร่งการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ได้ เช่น อุณหภูมิสูงกว่าปกติ ความเข้มข้นของออกซิเจนสูงกว่าปกติ เป็นต้น สภาวะการเก็บรักษาเหล่านี้จะทำให้เกิดการเสื่อมเสียอย่างรวดเร็วขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบจึงสั้นลงจากนั้นนำค่าไปแปลผลเป็นอายุการเก็บที่สภาวะปกติ เช่น อาหารชนิดหนึ่งมีอายุการเก็บ 60 วันที่สภาวะปกติและ 15 วันที่สภาวะเร่ง ดังนั้นอายุการเก็บ 1 วันที่สภาวะเร่งจะเท่ากับ 4 วันที่สภาวะปกติ [45]

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาเป็นสิ่งที่ไม่พึงประสงค์ การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เช่น ความคงตัว กลิ่นรส กลิ่นและเนื้อสัมผัส มีความสำคัญมากในการวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหารทุกชนิดจะเปลี่ยนไปเมื่อเก็บรักษา อาจเกิดขึ้นได้เร็วมาก เช่น ในผลิตภัณฑ์สด เป็นต้น หรืออาจเกิดขึ้นได้ช้ามาก เช่น อาหารกระป๋อง เป็นต้น อายุการเก็บผลิตภัณฑ์เป็นค่าที่ประมาณได้ยาก เนื่องจากถ้าใช้วิธีทดสอบอายุการเก็บตามหลักการคือ บรรจุอาหารตามเงื่อนไขการผลิตตั้งไว้ในสภาวะที่ต้องการหาค่าอายุการเก็บรักษาจริง กำหนดค่าช่วงเวลาของการทดสอบแล้วนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์มาตรวจวัดค่าตัวแปรที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพ ติดตามดูเวลาเก็บ ว่าเวลาที่เท่าใดที่ทำให้อาหารที่บรรจุเสื่อมสภาพ แต่การทดลองดังกล่าวใช้เวลายาวนานและหากต้องการตรวจผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก เวลาที่ใช้ในการทดลองในแต่ละสภาวะจะเพิ่มมากขึ้นและในทางอุตสาหกรรมไม่สามารถรอผลการทดลองยาวนานได้ ดังนั้นจึงมีการทดลองในสภาวะเร่ง โดยทดสอบการเก็บตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์อุณหภูมิสูง ซึ่งเรียกว่า การทดสอบในสภาวะเร่ง (Accelerated Shelf Life Test, ASLT) [45]

2.18 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเมื่อผ่านกระบวนการผลิต

การรอดชีวิตและกิจกรรมของโพรไบโอติกมีความสำคัญมาก เนื่องจากโพรไบโอติกต้องรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุด 10^7 CFU/mL จนกระทั่งวันที่บริโภคโพรไบโอติกนั้น [46] นอกจากนี้ยังต้องมีการรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายต่อเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก ในช่วงหลายปีที่

ผ่านลูกค้ามีความต้องการอาหารเสริมที่มีโพรไบโอติกสูงขึ้น จึงได้มีการพัฒนาการทำแห้งของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเพื่อป้องกันเซลล์และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยการทำแห้งของผลิตภัณฑ์สามารถเพิ่มสารอาหารเข้าไปโดยตรง โพรไบโอติกจะสามารถมีชีวิตอยู่ประมาณ 6-7 Log CFU/g ได้ถ้ามีการเก็บรักษาไว้เป็นอย่างดี (FAO and WHO, 2006) จุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. rhamnosus* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการยึดเกาะและสามารถผ่านไปในระบบทางเดินอาหารได้ดี ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่แตกต่างกันออกไป [47] แต่อย่างไรก็ตามการลดลงของจำนวนเซลล์อาจเกิดขึ้นได้จากการระเหยของน้ำออกนอกเซลล์และอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไปในกระบวนการระเหยน้ำออกหรือกระบวนการอบแห้งผลิตภัณฑ์ [48] เพื่อเป็นการแก้ไขผลกระทบที่เกิดขึ้นจึงได้มีการนำวิธีการ Microencapsulation หรือการทำให้จุลินทรีย์ถูกห่อหุ้มด้วยสารห่อหุ้ม [49] ซึ่งมีปัจจัยหลายด้านที่มีบทบาทต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก ประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้

2.18.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่าง ๆ มีจำนวนมาก ทำให้ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ

2.18.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เป็นปัจจัยแรกที่ต้องคำนึงถึง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์นั้นสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว

2.18.3 พีเอช

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันก็ส่งผลให้เชื้อนั้นมีการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน

2.18.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง

2.18.5 ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อ

การเจริญของแบคทีเรียมี 4 ระยะ คือ Lag phase Log phase Stationary phase และ Death phase ซึ่งระยะ Stationary phase จะเกิดความหลากหลายทางกายภาพของเซลล์ โดยระยะที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตระหว่างการทำให้แห้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

2.18.6 สารปกป้องเซลล์ (Protective Agent)

สารปกป้องเซลล์ หรือ Protective Agent คือ วัสดุหรือตัวกลางที่ใช้ในการห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้เพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก สารปกป้องเซลล์มี

หลายชนิดแต่ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ นมพร่องมันเนยคืนรูป (Reconstituted Skim Milk) ซูโครส เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้สารปกป้องเซลล์ที่จะห่อหุ้มจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

2.18.7 อุณหภูมิและภาวะบรรจุภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ได้นานขึ้น และภาวะที่ใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์โดยต้องไม่มีการแพร่ผ่านของออกซิเจนและความชื้น [49]

2.19 สารปกป้องเซลล์ (Protective Agent)

สารปกป้องเซลล์ หมายถึง ตัวกลางที่ใช้ในการห่อหุ้มจุลินทรีย์เพื่อป้องกันการถูกทำร้ายจากสภาวะแวดล้อม สารปกป้องเซลล์ของจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ เช่น หางนมผง (Skim Milk Powder) [50] เวย์โปรตีน (Whey Protein Isolate) [51] มอลโตเดกซ์ทริน (Maltodextrin) [52] Arabic Gum น้ำตาลซูโครส (Sucrose) น้ำตาลแลคโตส (Lactose) [53] ผงชูรส (Monosodium Glutamate, MSG) [54] เป็นต้น แต่ก็ยังมีสารปกป้องเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ได้เช่นกัน ดังต่อไปนี้

2.19.1 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-Oligosaccharides, FOS) และอินนูลิน (Inulin)

อินนูลินเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) เป็นสารประกอบขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฟรุคโตส (Fructose) 3-60 โมเลกุล โดยอินนูลินจะพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถละลายในน้ำร้อน อุณหภูมิประมาณ 80°C ได้ดีและละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็นและแอลกอฮอล์ [55] และมีความคงตัวสูงและไม่มีผลข้างเคียงต่อประสาทสัมผัส มีรสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสด ช่วยให้เครื่องดื่มละลายเข้ากันได้ดี ซึ่งมีงานวิจัยรายงานว่า การเติมอินนูลินลงในไอศกรีมจะช่วยให้การเจริญและเพิ่มการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* และ *B. lactis* ให้มากขึ้น [56]

2.19.2 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-Oligosaccharide, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบพบในน้ำนมของคน น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากกาแลคโตสโดยเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตไซด์ (β-galactosidase) เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ได้โดยไม่ผ่านการย่อยและถูกดูดซึมไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ โดยผลผลิตหลักๆ ที่ได้จะเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวไทเรท เป็นต้น [57]

2.19.3 ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean Oligosaccharide, SOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบได้ทั่วไปในพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Raffinose และ Family Oligosaccharides ซึ่งเป็นสารประกอบของ Raffinose และ Stachyose [58] สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนที่ไปในลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่

2.19.4 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครสผลิตมาจากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นของน้ำตาลแลคโตสและซูโครส โดยใช้เอนไซม์ β -fructosyltransferase และมีผลส่งเสริมจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bifidobacteria* [59]

2.19.5 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและฟรุคโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic linkage มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อย แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ ซึ่งโดยปกติแล้วแลคทูโลสไม่มีหรือมีน้อยมากในอาหารทั่วไปส่วนมากมีการนำแลคทูโลสไปใช้ในการเติมแต่งในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค [60]

2.19.6 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-Oligosaccharide, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α ,1-6 glycosidic linkage โดยถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ α -amylase และ Pullulanase [61]

2.19.7 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco - Oligosaccharide, GOS)

กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β ,1-6 glycosidic linkage เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจจะสกัดมาจาก β -glucan จากต้นไธม์ และได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารสุขภาพ (Functional Food) [61]

2.19.8 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo - Oligosaccharide, XOS)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 xylo-oligosaccharide [61]

2.20 ประเภทของแบบจำลอง (Model)

แบบจำลองในทางวิทยาศาสตร์ คือ รูปแบบการนำเสนอต่างๆ ที่เป็นตัวเลขจริงของระบบที่สนใจ ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของข้อความบรรยาย (Verbal Model) แบบจำลองแผนภาพ (Diagrammatic Model) แบบจำลองทางกายภาพ (Physical Model) หรือ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (Mathematic Model) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้มีการประยุกต์อย่างกว้างขวาง รวมถึงงานทางด้านกระบวนการชีวภาพด้วย แสดงเนื่องจากสามารถนำเสนอข้อมูลในเชิงปริมาณและตัวเลข แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการทางชีวภาพนั้น อาจอยู่ในรูปแบบง่าย ๆ เพียงสมการเดียวหรืออาจมีความซับซ้อนหลายสมการ ซึ่งความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ เช่น เซลล์ องค์ประกอบทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ อาทิ เช่น อุณหภูมิ พีเอช เป็นต้น [62]

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการทางชีวภาพโดยทั่วไปจะมีความซับซ้อน และมีแบบจำลองหลายประเภท คือ แบบจำลองปฏิกิริยาเคมี แบบจำลองหัตถกรรม และ แบบจำลองหัตถกรรม ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ดังนั้นการจำลองจึงต้องอาศัยการแก้สมการเชิงคณิตศาสตร์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และแสดงผลได้ทั้งข้อมูลเชิงตัวเลขและกราฟ ถึงแม้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นจะไม่สามารถอธิบายหรือเป็นตัวแทนของระบบจริงได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อนำแบบจำลองมาเลียนแบบกระบวนการแล้ว ทำให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน คือ

2.20.1 ช่วยให้ความเข้าใจในกระบวนการมากขึ้น เนื่องจากแบบจำลองมักถูกออกแบบมาเพื่อแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างเหตุปัจจัยและผลลัพธ์ การเปรียบเทียบข้อมูลที่ทำนายได้จากแบบจำลองกับข้อมูลจากการทดลองจริงจะช่วยให้มีความเข้าใจในระบบมากยิ่งขึ้น

2.20.2 ช่วยในการออกแบบการทดลอง การวิเคราะห์ความไว (Sensitive) ของแบบจำลอง จะช่วยให้ทราบว่า ตัวแปรไหนที่มีหรือไม่มีความสำคัญ หากตัวแปรใดไม่มีความสำคัญ ก็จะไม่นำมาพิจารณาในแบบจำลองและการทดลอง ทำให้ลดจำนวนการทดลองได้

2.20.3 ใช้ในการทำนายและควบคุมกระบวนการออกแบบควบคุมกระบวนการ และเมื่อแบบจำลองไม่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้ว ก็สามารถที่จะใช้ทำนายการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการภายใต้สภาวะต่าง ๆ ได้ ซึ่งสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการออกแบบระบบควบคุมกระบวนการ [63]

2.20.4 ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ ซึ่งการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้น โดยทั่วไปจะพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกำไรหรือต้นทุนของกระบวนการ ดังนั้น การแปรค่าปัจจัยต่าง ๆ โดยการเลียนแบบกระบวนการช่วยให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมได้

ตารางที่ 2.5 ประเภทของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

แบบจำลองปฐมภูมิ	แบบจำลองทุติยภูมิ	แบบจำลองตติยภูมิ
Gompertz Function	Belehradek Model (Square-root Model)	USDA Pathogen Modelling Program
Modified Gompertz	Ratkowsky Model (Square-root Model)	Food Micro Model
Modified Monod Model		
D Values of Thermal Inactivation	Z value	-
Growth Decline Model of Whiting and Cygnarowicz	Polynomial or Response	-
Three-phase Linear Model	-	-

ที่มา : McDonald and Sun (1999) [63]

2.21 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wirunpan *et al.* (2016) [54] ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อ *L. lactis* 1464 ผสมกับอาหารกึ่งก่อนการอัดเม็ด แล้วอบแห้งด้วยอุณหภูมิ 50 60 70 และ 80°C ให้ได้ค่าความชื้นต่ำกว่า 11 % โดยในการทดลองใช้ระดับอุณหภูมิต่างๆ ในการอบแห้งเป็นตัวชี้วัดอัตราการรอดชีวิต มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในระดับ 10^6 - 10^8 CFU/g และอัตราการรอดชีวิตหลังการอบแห้งมีตั้งแต่ 75.94 - 92.28 % ที่ pH 3.8 และอัตราการรอดชีวิตตั้งแต่ 89.54 - 96.87 % ที่ pH 7 และนอกจากนี้ยังมีการเพิ่มสารป้องกันเซลล์ที่ให้ประสิทธิภาพดีคือ ผงชูรสและนมผง

Khem *et al.* (2015) [64] ได้ทำการทดลองใช้สารปกป้องเซลล์ *L. plantarum* A17 ได้แก่ Whey protein, Trehalose, Lactose และ Skim milk ระหว่างการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 60 และ 90°C โดย Whey protein ให้การปกป้องสูงสุด และทดสอบการรอดชีวิตโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 60 และ 90°C โดยใช้ตัวป้องกันเซลล์ คือ Whey Protein และ Lactose ที่อุณหภูมิ 50 และ 60°C เซลล์ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 180 sec. มีอัตราการรอดชีวิตลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 60°C อัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ log 5 และ 90 °C อยู่ที่ log 3 การทดสอบอัตราการรอดชีวิต

โดยการเติมสารที่ป้องกันเซลล์ที่แตกต่างกัน อบแห้งที่อุณหภูมิ 90°C และ 110°C ในช่วง 90 sec. แรกของอุณหภูมิ 90°C มีเชื้ออยู่ประมาณ $\log 9$ ในขณะที่อุณหภูมิ 110°C อัตราการรอดชีวิตลดต่ำลง แต่สำหรับ Whey Protein ที่พลาสเจอร์ไรซ์ และไม่พลาสเจอร์ไรซ์ ไม่ได้ส่งผลต่อการลดลงของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ

Desmons *et al.* (1998) [65] ได้ทำการผลิตเชื้อ *L. brevis* มีความเข้มข้นของเซลล์ถึง 8.2×10^{10} CFU/mL ภายใน 21 h โดยการหมักแบบกึ่งกะในอาหาร MRS โดยการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และมีการปรับปรุงโดยการเติมสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ กลีเซอรอล แคลเซียมคาร์บอเนต และนมผงไขมันต่ำ 70 % และใช้แบบจำลองโดยอ้างอิงสมการของ Arrhenius ใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บได้แก่ 30 46 และ 60°C โดยที่อุณหภูมิ 30°C มีค่าคงที่ (k) สูงสุด คือมีค่าเท่ากับ 1.66 h^{-1} กราฟที่ใช้แสดงการทำนายโดยอ้างอิงสมการของ Arrhenius และเปรียบเทียบของการทำนายและการทดลองจริงออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 4°C โดย 50 วัน เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยการทำนายเท่ากับ 58 % และจากการทดลองจริงเท่ากับ 59 % และ 137 วัน เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยการทำนายเท่ากับ 23 % และจากการทดลองจริงเท่ากับ 16 %

Krokida *et al.* (2003) [66] ได้ทำการศึกษากระบวนการอบแห้งของผักต่าง ๆ โดยใช้การอบแห้งด้วยอากาศ โดยมีค่าความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 0.10 - 0.90 และมีการศึกษาค่ากิจกรรมของน้ำเปรียบเทียบกับของสองอุณหภูมิ คือ 30 และ 70°C ทำให้ทราบว่าขนาดของตัวอย่างระหว่างการอบแห้ง โดยเฉพาะอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นค่าคงที่ของการอบแห้งก็เพิ่มขึ้นด้วย

Syarifah Nor Faizah Syed Abdul Rahman *et al.* (2015) [67] ได้ทำการทดลองการอบแห้งเงาะที่อุณหภูมิ 40 50 60 70 และ 80 °C เป็นเวลา 24 h โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 4 แบบ คือ แบบจำลองของ Lewis, Page, Handerson และ Pabis โดยมีค่าประสิทธิภาพการแพร่ (D_{eff}) ตั้งแต่ 1.34×10^{-10} ถึง $4.36 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ ค่าพลังงานกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 24.99 KJ

Costa *et al.* (2017)[68] ได้ทำการยืดอายุการเก็บรักษาของชีสโดยการจับกันของกรดได้นำเสนอประสิทธิภาพของสารประกอบคาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ผลของการทดลองทำให้ทราบว่าค่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อรสชาติของชีส และการบรรจุภัณฑ์ภายใต้ไนโตรเจน 100 % สามารถควบคุมการเจริญของยีสต์ได้ ซึ่งวิธีการแก้ปัญหาที่ดีที่สุด คือการใช้ Lysozyme และ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ และ MAP ที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 100 % สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 26 วัน

Tsironi *et al.* (2017) [69] ศึกษาการพัฒนาและการทำนายอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมพร้อมทานในสภาวะหึ่งโซอูปทานภายใต้บรรยากาศที่ปรับเปลี่ยน 3 % ของออกซิเจน 10 % ของคาร์บอนไดออกไซด์ และ 82 % ของไนโตรเจน โดยทำการวัดประชากรของจุลินทรีย์ วิตามินซี และ

เนื้อสัมผัสเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาตรวจพบ *Pseudomonas* spp. มีค่าอยู่ในระดับ 8 มีการสูญเสียวิตามินซีเริ่มต้น 20 % ค่าสมการของ Arrhenius มีค่าพลังงานกระตุ้นเท่ากับ 69.1

Basholli-Salih *et al.* (2014) [70] ทำการศึกษาเพื่อเลือกสารป้องกันเซลล์ *B. infantis* UV16PR ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำและประเภทของอาหารที่แตกต่างกัน สารปกป้องเซลล์ที่ใช้ ได้แก่ Cellobiose, Lactose Sucrose และ Trehalose พบว่า Cellobiose ความเข้มข้น 5 % สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุด หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ และความเข้มข้น 10 % ของสารปกป้องเซลล์ทั้งหมดส่งผลให้ *B. infantis* มีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และยังพบว่า Cellobiose และ Trehalose ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของ β -galactosidase อีกด้วย

Dattatreya *et al.* (2007) [71] ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเวย์โปรตีนชนิดหวาน (Sweet Whey Protein; SWP) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่างกัน โดยมีการใช้เครื่องดูดความชื้นในการดูดความชื้นของตัวผลิตภัณฑ์ออกและเร่งการเกิดสีน้ำตาลโดยการใช้อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 40 60 และ 80°C ส่งผลให้เกิดสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปและใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นและทำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง ใช้สมการของจลนพลศาสตร์ในการศึกษาอายุการเก็บรักษาเพื่อทำนายผลกระทบของอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิพบว่า การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน 2 ปี ที่อุณหภูมิ 53°C



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 กระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminium Foil)
- 3.1.2 กระจกบอทวง (Cylinder) Favorit
- 3.1.3 กากแก้วเหลือง
- 3.1.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) SCHOTT
- 3.1.5 ขวดสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Glass Bottle)
- 3.1.6 จุกสำลี (Cotton) รถพยาบาล
- 3.1.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Lamp)
- 3.1.8 ถุงตีบั้น (Stomacher Bag)
- 3.1.9 ถุงฟอยด์ที่บีบซีปล็อคชนิดตั้งได้
- 3.1.10 ทิป (Tip)
- 3.1.11 น้ำกลั่น (Distilled water)
- 3.1.12 ปีกเกอร์ (Beaker) SCHOTT
- 3.1.13 ไมโครปิเปต (Micropipette) Gilson
- 3.1.14 หลอดทดลอง (Test Tube) PYREX
- 3.1.15 เครื่องชั่งแบบละเอียด 2 ตำแหน่ง (Precision Balance) Mettler Toledo รุ่น PL -3002
- 3.1.16 เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 3.1.17 เครื่องตีบั้น (Stomacher) SEWARD รุ่น Stomacher 400 circulator
- 3.1.18 เครื่องบดละเอียด
- 3.1.19 เครื่องบ่มชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator) JSR
- 3.1.20 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)
- 3.1.21 เครื่องอบลมร้อน (Hot Air Oven) WiseVen รุ่น WOF-305
- 3.1.22 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ESCO รุ่น AC2
- 3.1.23 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) N-Biotex รุ่น NB-1080
- 3.1.24 ซองดูดความชื้น

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารวุ้น (Agar) BioAgars
- 3.2.2 แคลเซียมคาร์บอเนต Calcium carbonate (CaCO_3) UNIVAR
- 3.2.3 De Man Rogosa and Sharpe (MRS) HIMEDIA
- 3.2.4 โซเดียมคลอไรด์ Sodium chloride (NaCl) UNIVAR
- 3.2.5 คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) UNIVAR
- 3.2.6 โซเดียมซิเตรท ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) UNIVAR
- 3.2.7 โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3) UNIVAR
- 3.2.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) UNIVAR
- 3.2.9 ฟูลินซีโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) JSR
- 3.2.10 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin ;BSA) UNIVAR

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

Enterococcus faecium A028 [72]

3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *E. faecium* A028 ปริมาตร 1 mL ลงในอาหารเหลว de Man Rogosa and Sharpe (MRS) 100 mL นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 24 h จากนั้นนำเชื้อ 200 μL ใส่หลอดไมโครทิวบ์เทปด้วยกลีเซอรอล 75 % ผสมให้เข้ากันจากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่ -80 °C

3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *E. faecium* A028 ปริมาตร 1 mL ที่เก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่ -80 °C ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 mL ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 24 h เพื่อกระตุ้นการเจริญ จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 30 mL ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 270 mL อีกครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 18 h ในสภาวะนิ่ง นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองต่อไป

3.3.4 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของโพรไบโอติกใน SBM ด้วยการหมักแบบแห้ง

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงใน SBM ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการทดลองด้วยการแปรผันปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อ SBM (X_1) อุณหภูมิ (X_2) ความเข้มข้นกากน้ำตาล (X_3) ปริมาณกล้าเชื้อ (X_4) ความเป็นกรดต่าง (X_5) แคลเซียมคาร์บอเนต (X_6) และเวลาในการเพาะเลี้ยง

(X_7) (ตารางที่ 3.1) เพื่อศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการเจริญของ *E. faecium* ใน SBM โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett Burman Design (PBD) [75] ดังตารางที่ 3.2 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total Viable Cell Count, TVC) ที่เพิ่มขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Design Expert Version 7.0 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 และนำไปศึกษาระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยกระบวนการSSF ใน SBM โดยวางแผนการทดลองแบบ PBD

ปัจจัย	หน่วย	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย	
			ต่ำ (-1)	สูง (+1)
Water to SBM ratio	v/w	X_1	0.1:1	1:1
Incubation Temperature	°C	X_2	30	40
Molasses	%w/v	X_3	0	5
Starter	%v/w	X_4	5	10
pH	-	X_5	5	6
CaCO ₃	%w/v	X_6	0	0.05
Incubation Time	h	X_7	4	12
Dummy	-	X_8, X_9, X_{10}, X_{11}	-1	1

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ PBD

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	1:1	40	0	10	6	0.05	4	-	-	1.00	-
2	0.1:1	40	5	5	6	0.05	12	-	-	-	1.00
3	1:1	30	5	10	5	0.05	12	1.00	-	-	-
4	0.1:1	40	0	10	6	0	12	1.00	1.00	-	-
5	0.1:1	30	5	5	6	0.05	4	1.00	1.00	1.00	-
6	0.1:1	30	0	10	5	0.05	12	-	1.00	1.00	1.00
7	1:1	30	0	5	6	0	12	1.00	-	1.00	1.00
8	1:1	40	0	5	5	0.05	12	1.00	1.00	-	1.00
9	1:1	40	5	5	5	0	4	-	1.00	1.00	-
10	0.1:1	40	5	10	5	0	4	1.00	-	1.00	1.00
11	1:1	30	5	10	6	0	4	-	1.00	-	1.00
12	0.1:1	30	0	5	5	0	4	-	-	-	-

3.3.5 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

ถ่ายกล้าเชื้อ *E. faecium* A028 ลงใน SBM ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยแปรผันปัจจัยที่มีสัดส่วนอิทธิพล (Effect Contribution) ต่อการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุดจำนวน 3 ปัจจัย (จากผลการทดลองที่ 3.3.4) ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อSBM (X_1) ความเข้มข้นกากน้ำตาล (X_3) และเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (X_7) (ตารางที่ 3.3) โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) [74] ดังตารางที่ 3.4 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่า TVC ที่เพิ่มขึ้น มาคำนวณค่าทางสถิติโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษากับการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยสมการ Second-Order Polynomial Quadratic Equation นำสมการที่ได้มาหาสภาวะที่เหมาะสมและทำการทดลองเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในสภาวะดังกล่าวเพื่อทดสอบ (Validation) ผลการทดลอง

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* ด้วยการหมักแบบ SSF ใน SBM โดยแผนการทดลองแบบ BBD

ปัจจัย	หน่วย	สัญลักษณ์	ระดับของปัจจัย		
			ต่ำ (-1)	กลาง (0)	สูง (+1)
Water to SBM ratio	v/w	X_1	0.5	1.25	2
Molasses	%w/v	X_3	0	2.5	5
Incubation Time	h	X_7	4	14	24

ตารางที่ 3.4 การวางแผนทดลองแบบ BBD

การทดลอง	X_1	X_3	X_7
1	0.50 (-1)	0.00 (-1)	14.00 (0)
2	2.00 (+1)	0.00 (-1)	14.00 (0)
3	0.50 (-1)	5.00 (0)	14.00 (0)
4	2.00 (+1)	5.00 (0)	14.00 (0)
5	0.50 (-1)	2.50 (+1)	4.00 (-1)
6	2.00 (+1)	2.50 (+1)	4.00 (-1)
7	0.50 (-1)	2.50 (+1)	24.00 (+1)
8	2.00 (+1)	2.50 (+1)	24.00 (+1)
9	1.25 (0)	0.00 (-1)	4.00 (-1)
10	1.25 (0)	5.00 (0)	4.00 (-1)
11	1.25 (0)	0.00 (-1)	24.00 (+1)
12	1.25 (0)	5.00 (0)	24.00 (+1)

3.3.6 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในSBM ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาด

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.3.5 มาเตรียม SBM ปริมาณ 3,000 g นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 psi เวลา 15 min ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆ ตลอดการเพาะเลี้ยง

3.3.7 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในSBM ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งในการหมักแบบกะซ้ำ (repeated batch)

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.3.5 มาเตรียม SBM 300 g โดยจะแบ่งออกเป็น 3 ชุด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ถ่ายกล้าเชื้อ LAB ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ได้ 3.3.5 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการจะถ่าย FSBM 50 70 หรือ 90 % ตามลำดับ จากนั้นเติม SBM ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาณเท่าเดิมเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมด และทำการทดลองแบบเดิมจนกว่าการเจริญของแบคทีเรียจะคงที่หรือเริ่มลดลง

3.3.8 การศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในSBM ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งแบบกะซ้ำ (repeated batch) ในระดับขยายขนาด

นำสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.3.7 มาเตรียม SBM ปริมาณ 3,000 g นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 psi เวลา 15 min ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ ลงไปในปริมาณที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงๆ ตลอดการเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทั้งหมด

3.3.9 การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของ *E. faecium* ด้วยSBM ในกระบวนการหมักแบบแห้ง

นำข้อมูลส่วนการหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและข้อมูลการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในSBM กระบวนการหมักแบบแห้งในระดับขยายขนาดทั้งการหมักแบบกะและกะซ้ำโดย

3.3.9.1. อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด (Maximum Growth Rate) ของ *E. faecium* A028

- 1) การหาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด (r_m) ด้วยสมการของ Gompertz [75]

ทำโดยวิธีการหาผลต่างยกกำลังสองที่น้อยที่สุด (Least Square Method) ระหว่างข้อมูลที่วัดได้จากการทดลองจริงและแบบจำลองของ Gompertz ที่เวลาต่างๆ โดยใช้ฟังก์ชัน (Function) Solver ในโปรแกรม Microsoft Excel เวอร์ชัน 2010 โดยสมการของ Gompertz Model แสดงดังสมการที่ (3.1)

$$X = X_0 \left[X_{\max} \cdot \exp \left[-\exp \left[\frac{r_{\max} \cdot \exp(1)}{X_{\max}} \right] (t_L - t) + 1 \right] \right] \quad (3.1)$$

- โดยที่ X_0 คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (Log CFU/g)
 X_{\max} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงสุดท้าย (Log CFU/g)
 r_{\max} คือ อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด (CFU/g.h⁻¹)
 t_L คือ ระยะเวลาช่วง lag phase (h⁻¹)
 t คือ เวลาในการเพาะเลี้ยง (h⁻¹)

- 2) การหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดด้วยสมการของ Logistic การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของจุลินทรีย์ (Maximum specific Growth Rate, μ_{\max}) [76] โดยสมการของ Logistic Model แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Logistic ที่ใช้ในการศึกษาค่า μ_{\max} ของ *E. faecium* ที่เพาะเลี้ยงแบบ SSF ใน SBM แสดงดังสมการที่ (3.2) และ (3.3)

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \quad (3.2)$$

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_{\max}} \right) (1 - \exp(\mu_{\max} \cdot t)) \right]} \quad (3.3)$$

- โดยที่ X_0 คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (Log CFU/g)
 X_{\max} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงสุดท้าย (Log CFU/g)
 μ_{\max} คือ อัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์สูงสุด (h⁻¹)
 t คือ เวลาในการเพาะเลี้ยง (h)

3.3.10 การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกระหว่างกระบวนการอบแห้ง

3.3.10.1 การศึกษาการคัดเลือกสารปกป้องเซลล์ในระหว่างการอบแห้ง

นำ SBM ที่หมักครบเวลาแล้ว 8 h มาแผ่กระจายบนผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วจึงทำการพ่นสารป้องกันเซลล์ความเข้มข้น 5 % ปริมาณ 300 mL ลงไปบน SBM แล้วทำการผสมเข้ากันให้จนทั่ว โดยชนิดของสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ ได้แก่ น้ำกลั่น (ชุดควบคุม) ทางนมผง (Skim Milk) มอลโตเดกซ์ทรีน (Maltodextrin) ผงชูรส (Monosodium- Glutamate, MSG) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructo-Oligosaccharides, FOS) และ ยีสต์สกัด (Yeast Extract) แล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C สุ่มเก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆ ตลอดการอบแห้งเพื่อนำมาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดและค่าความชื้นใน SBM

3.3.10.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในระหว่างการอบแห้งต่อการลดของจุลินทรีย์

นำ SBM ที่หมักครบเวลาแล้ว 8 h มาแผ่กระจายบนผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้วจึงทำการพ่นสารป้องกันเซลล์ความเข้มข้น 5 % ปริมาณ 300 mL ลงไปบน SBM แล้วทำการผสมเข้ากันให้จนทั่ว โดยชนิดของสารปกป้องเซลล์ที่ใช้คือ มอลโตเดกซ์ทรีนแล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75 °C สุ่มเก็บตัวอย่างเป็นช่วง ๆ ตลอดการอบแห้งเพื่อนำมาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดและค่าความชื้นใน SBM

นำข้อมูลการลดลงของความชื้นที่เวลาต่าง ๆ มาคำนวณหาอัตราการแห้ง (Drying Rate) ของ SBM หมักที่มีการเติมสารปกป้องเซลล์ โดยประยุกต์ใช้สมการทางคณิตศาสตร์ (Mathematical modeling) ของการอบแห้ง ในการหาค่าดังกล่าว

- 1) การคำนวณหาสัดส่วนความชื้นโดยใช้แบบจำลองของ Page [77]

$$M_R = \exp(-k_{\text{drying}})t^n \quad (3.4)$$

โดยที่ M_R คือ ค่าสัดส่วนความชื้น
 k_{drying} คือ อัตราการแห้ง (h^{-1})
 t คือ เวลา (h)
 n คือ ลำดับของปฏิกิริยา

2) การคำนวณหาค่าอัตราการตาย (Death rate) [80]

$$\ln N_t - \ln N_0 = -k_{\text{death}} t^n \quad (3.5)$$

โดยที่ N_t คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (Log CFU/g)
 N_0 คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (Log CFU/g)
 k_{death} คือ อัตราการตายจำเพาะ (h^{-1})
 t คือ เวลา (h)
 n คือ ลำดับของปฏิกิริยา

3) การคำนวณหาค่า R^2 [81]

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{\text{exp}} - X_{\text{exp,mean}})^2 - (X_{\text{pre}} - X_{\text{exp,i}})^2}{\sum_{i=1}^N (X_{\text{exp,i}} - X_{\text{exp,mean,i}})^2} \quad (3.6)$$

โดยที่ X_{exp} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (Log CFU/g)
 $X_{\text{exp,mean}}$ คือ ค่าเฉลี่ยรวมของจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลอง (Log CFU/g)
 X_{pre} คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ได้จากการทำนาย (Log CFU/g)

3.3.11 การผลิตผงโปรไบโอติกและการเก็บรักษา

นำ SBM ที่มีจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาบดให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้ตะแกรงบดขนาดรูพรุน 80 ช่องต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำมาผสมกับแป้งมันสำปะหลังและมอลโตเดกซ์ทริน (Maltodextrin) แล้วนำไปบรรจุใส่ถุงพอยด์ทึบซีลลอค จำนวนถุงละ 1000 g จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันได้แก่ 40 50 60 และ 70°C เก็บตัวอย่างเป็นระยะเพื่อนำมาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด

3.3.11.1 การคำนวณหาค่าคงที่อัตราการตายของจุลินทรีย์ [78]

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k_{\text{death}} t \quad (3.7)$$

โดยที่ N_0 คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น (Log CFU/g)

N_t คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (Log CFU/g)

t คือ เวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ (day)

k_{death} คือ ค่าคงที่อัตราการตายจำเพาะ (day⁻¹)

เมื่อแทนค่าในสมการที่ 3.7 จะได้ค่า k_{death} หรือค่าคงที่อัตราการตายจำเพาะและเมื่อนำค่า k_{death} ไปสร้างกราฟกับค่า $1/T$ ในสมการของ Arrhenius (สมการที่ 3.8) จะสามารถสร้างกราฟเพื่อใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของจุลินทรีย์ได้

3.3.11.2 กราฟของ Arrhenius [79]

$$\ln k_{\text{death}} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (3.8)$$

โดยที่ E_a คือ ค่าพลังงานกระตุ้น (J/mole)

R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (8.314 J/°K/mole)

T คือ อุณหภูมิสัมบูรณ์ (°K)

A คือ ค่าคงที่ของ Arrhenius

โดยการหาค่าคงที่ของ Arrhenius (A) และพลังงานกระตุ้น (E_a) โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k_{\text{death}}$ กับ $1/T$ จะได้กราฟเส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ $-\frac{E_a}{R}$

3.3.12 วิธีการวิเคราะห์

3.3.12.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดทั้งหมด

ซึ่งตัวอย่างจำนวน 10 g ต่อ 0.85 % NaCl ปริมาตร 90 mL นำไปตีปั่นด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 min จากนั้นนำไปเจือจางด้วย 0.85 % NaCl ใช้เทคนิคการ pour plate โดยใช้อาหาร MRS Agar ผสมกับ 0.8 % CaCO₃ แล้วจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 h แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

3.3.12.2 การหาค่าความชื้น

โดยใช้ SBM ที่หมักแล้วและอยู่ระหว่างขั้นตอนการอบแห้ง โดยเก็บตัวอย่างออกมาเป็นช่วงเวลาต่าง ๆ แล้วนำมาชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งจำนวน 5 g แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 h แล้วนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง โดยคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตรดังต่อไปนี้ [54]

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(W_{ws} - W_{ds})}{W_{ws}} \quad (3.9)$$

โดยที่ W_{ws} คือ น้ำหนักเปียก (g)

W_{ds} คือ น้ำหนักแห้ง (g)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง และเก็บข้อมูล

3.4.1 ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.4.2 หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพและนาโน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.4.3 FS107, Department of Food Science, National Pingtung University of Science and Technology (NPUST), Taiwan

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 ใน SBM ด้วยกระบวนการ SSF

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *E. faecium* A028 ที่เพาะเลี้ยงแบบ SSF ใน SBM ด้วยการวางแผนการทดลองแบบ PBD แสดงดังตารางที่ 4.1 โดยพบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญใน SBM ได้ทุกสภาวะที่ทำการทดลอง และมีการเจริญแตกต่างกันในแต่ละสภาวะ การศึกษานี้มีทั้งหมด 7 ตัวแปร ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางชีวภาพ และปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อSBM (water:SBM) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความชื้นของวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแห้งนั้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีความชื้นแตกต่างกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีการเจริญได้สูงสุดในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน และในการเพาะเลี้ยงแบบที่เรียกรดแลคติกนั้นควรมีการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกพร้อมกับการเจริญ หากมีการเพาะเลี้ยงนานจะทำให้มีการสร้างกรดแลคติกออกมาเป็นจำนวนมากซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Product Inhibition) ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลง ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้ในการทดลองปริมาณกล้าเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยหากมีการใช้กล้าเชื่อน้อยเกินไป อาจทำให้จุลินทรีย์ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงนานและมีระยะ lag phase ยาว ส่งผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ และหากใช้กล้าเชื้อมากเกินไปจะทำให้ต้นทุนในการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับขยายขนาดหรือในระดับอุตสาหกรรมสูงขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาระดับของกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้สูงสุดและมีต้นทุนในการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุด ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณกากน้ำตาล ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่ใช้ในการศึกษานี้ เพื่อให้แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้ระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นยังมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อความสามารถในการเจริญและการสร้างกรดแลคติก ระหว่างการเพาะเลี้ยงหากแบคทีเรียเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่างไม่เหมาะสม

จะทำให้เจริญได้น้อย และแคลเซียมคาร์บอเนตยังเป็นสารที่ช่วยลดผลกระทบของกรดแลคติกต่อการเจริญได้ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียยังสามารถเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของกรดแลคติกสูงสุดคล้อยกกับงานวิจัยของ Rodriguez de olmos ในปี 2015 ซึ่งศึกษาอิทธิพลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. paracasei* supsp. *paracasei* และ *B. longum* ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ในถั่วเหลืองที่มีความชื้น 60 % พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญ และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 9.5 และ 9.0 Log CFU/g ตามลำดับ [80] เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยต่อการเจริญของ *E. faecium* โดยการวิเคราะห์การถดถอย (Regression Analysis) (ตารางที่ 4.2) พบว่าปัจจัยแต่ละชนิดส่งผลต่อการเจริญของ *E. faecium* แตกต่างกัน โดยระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (X_7) มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรียสูงที่สุด ซึ่งมีค่า Effect Contribution เท่ากับ 56.27 % รองลงมาคือ ปริมาณน้ำต่อSBM (X_1) และความเข้มข้นกากน้ำตาล (X_3) โดยมีค่า Effect Contribution เท่ากับ 14.33 และ 10.46 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลอง PBD แต่ละปัจจัย

การทดลอง	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Increased TVC (Log CFU/g)
1	1:1	40	0	10	6	0.05	4	-	-	1.0	-	0.75
2	0.1	40	5	5	6	0.05	12	-	-	-	1.0	0.33
3	1:1	30	5	10	5	0.05	12	1.0	-	-	-	0.66
4	0.1	40	0	10	6	0	12	1.0	1.0	-	-	0.26
5	0.1	30	5	5	6	0.05	4	1.0	1.0	1.0	-	0.45
6	0.1	30	0	10	5	0.05	12	-	1.0	1.0	1.0	0.15
7	1:1	30	0	5	6	0	12	1.0	-	1.0	1.0	0.54
8	1:1	40	0	5	5	0.05	12	1.0	1.0	-	1.0	0.93
9	1:1	40	5	5	5	0	4	-	1.0	1.0	-	0.22
10	0.1	40	5	10	5	0	4	1.0	-	1.0	1.0	0.18
11	1:1	30	5	10	6	0	4	-	1.0	-	1.0	0.18
12	0.1	30	0	5	5	0	4	-	-	-	-	0.41

ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของปัจจัยในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF ต่อการเจริญของ *E. faecium* A028

Variable	Coefficients	Effect	Plot Effect	p-value	Effect Contribution (%)
Water:SBM	0.092	0.18		0.088	14.33
Incubation Temperature	0.062	0.12		0.205	6.48
Molasses	-0.078	0.16		0.127	10.46
Starter	-0.017	-0.03		0.704	0.47
pH	-0.018	-0.04		0.677	0.57
CaCO ₃	0.00003	0.01		0.908	0.043
Incubation Time	-0.18	-0.36		0.011	56.27

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า SBM สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ด้วยกระบวนการ SSF ได้ เนื่องจาก SBM ประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน SBM และยังมีปริมาณกรดอะมิโนไลซีนสูง ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้ [81] ซึ่งแบคทีเรีย *E. faecium* A028 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (Protease) [74] จึงสามารถย่อยโปรตีนใน SBM เพื่อนำมาสร้างขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในกระบวนการ SSF จุลินทรีย์จึงมีการเจริญได้มากขึ้น [83] สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำต่อ SBM แสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการเจริญ *E. faecium* A028 เมื่อพิจารณาอิทธิพลของการเติมกากน้ำตาลใน SBM พบว่าการเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 5 % ทำให้แบคทีเรียเจริญได้สูงขึ้นเล็กน้อยแสดงให้เห็นว่ากากน้ำตาลมีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกใน SBM [78] แต่มีอิทธิพลน้อยกว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและปริมาณน้ำต่อ SBM และผลการทดลองยังพบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลในทางลบต่อการเจริญเนื่องจากในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจะมีการสร้างกรดแลคติกขึ้นมา เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ [84] ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นจึงทำให้การเจริญของ *E. faecium* A028 ลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ปริมาณกลูต้าเชื้อ ความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ในระดับที่ทำการศึกษา พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อการเจริญของโพรไบโอติกน้อย โดยมีค่า Effect Contribution เท่ากับ 6.48 0.47 0.57 และ 0.04 % ตามลำดับ

ดังนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำตาลต่อ SBM ปริมาณกากน้ำตาล และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมาศึกษาระดับที่เหมาะสมในการทดลองถัดไปโปรตีนภายในเซลล์และการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของแบคทีเรีย [82] ดังนั้น SBM ที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองในโรงงานอุตสาหกรรมจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยกระบวนการ SSF เนื่องจากสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดีและมีราคาถูก

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปริมาณน้ำตาลต่อ SBM อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของกากน้ำตาล และปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าปัจจัยดังกล่าวแสดงอิทธิพลในทางบวกต่อการเพิ่มค่า TVC ของแบคทีเรีย (Positive Effect) ซึ่งเมื่อปัจจัยดังกล่าวเพิ่มขึ้นจะส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญมากขึ้นด้วย ในขณะที่ปริมาณกลูโคส ความเป็นกรดต่าง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แสดงอิทธิพลในทางลบ (Negative Effect) ต่อการเจริญของ *E. faecium* (ตารางที่ 4.2)

ในปี 2003 Gervais and Molin [82] รายงานว่าความชื้นมีความสำคัญต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ SSF เนื่องจากน้ำทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารอาหารใน SBM ทำให้โพรไบโอติกสามารถดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุใน SBM มาใช้ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ได้ง่าย

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ใน SBM ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกใน SBM แสดงดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 และความสัมพันธ์ระหว่างค่า TVC ที่เพิ่มขึ้น (Increased TVC) กับปัจจัยที่ศึกษาแสดงดังสมการที่ (4.1) จากแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) ผลการทดลองพบว่ามีปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง *E. faecium* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแบบจำลอง (Model) มีค่า p -value และ R^2 เท่ากับ 0.0012 และ 0.9457 ตามลำดับ และมีค่าความเข้ากันได้ของแบบจำลอง (Lack of Fit) เท่ากับ 0.2287 แสดงว่า Model นี้มีความเหมาะสมในการอธิบายการเพิ่มขึ้นของค่า TVC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อย่างไรก็ตามพบว่า ปริมาณน้ำตาลต่อ SBM และ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ α เท่ากับ 0.05 (p -value เท่ากับ 0.0229 และ 0.0007 ตามลำดับ) ในขณะที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงที่ทำการทดลอง (p -value เท่ากับ 1.000) (ตารางที่ 4.3)

รูปที่ 4.1(A) แสดงพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface) ของอิทธิพลร่วม (Interaction Effect) ระหว่างปริมาณน้ำตาลต่อ SBM และความเข้มข้นของกากน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14 h ผลการทดลองแสดงว่าปริมาณน้ำตาลต่อ SBM ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล รูปที่ 4.1(B) แสดงอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณน้ำตาลต่อ SBM และระยะเวลาในการ

เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 2.5 % โดยปัจจัยทั้งสองชนิดส่งผลต่อการเจริญของโพรไบโอติก และรูปที่ 4.1(C) แสดงอิทธิพลร่วมของความเข้มข้นของกากน้ำตาลและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญมากกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล

สมการที่ (4.1) พบว่าสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มค่า TVC ของโพรไบโอติกคือ ปริมาณน้ำต่อ SBM เท่ากับ 1.5:1 v/w ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 15.45 h โดยจะมีค่า TCV เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 Log CFU/g (Predicted Result) จากจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น เมื่อนำสถานะดังกล่าวมาทดลองเพาะเลี้ยง *E. faecium* ด้วยการหมักแบบ SSF ใน SBM เพื่อทดสอบผลการทดลอง (Validation) พบว่า มีค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 9.77 Log CFU/g (Experimented Result) ซึ่งไม่แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากสมการที่ (4.1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แสดงให้เห็นว่าสมการที่ (4.1) มีประสิทธิภาพในการอธิบายอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาได้อย่างเหมาะสมที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

นำข้อมูลมาสร้างแบบหุ่น (Model) ด้วยสมการ Second Order Polynomial Quadratic Equation นำสมการที่ได้มาทำนายสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง LAB ด้วยการหมักแบบแห้งใน SBM นำสถานะที่ทำนายจากสมการดังกล่าวมาทำการทดลองจริง และเปรียบเทียบกับข้อมูลจากสมการ (Predicted Result) เพื่อยืนยันผลการทดลองโดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติ One-Sample *t*-test ซึ่งมีค่า Sig = 0.945 > 0.05 แสดงว่าข้อมูล มีปริมาณ TCV ไม่แตกต่างกัน ในการทดลองจริงกับค่าที่ได้จากการทำนายแสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทำนาย สามารถนำมาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้จริงที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสอดคล้องกับงานวิจัย Handa ในปี 2014 [84] ได้ทำการศึกษาการหาสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกในการหมักแบบแห้งด้วยแบบถั่วเหลืองด้วยพื้นผิวตอบสนอง พบว่าการออกแบบด้วยแผนการทดลองแบบ Box-Benken Design (BBD) ช่วยเพื่อประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและช่วยประหยัดเวลาในการเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย

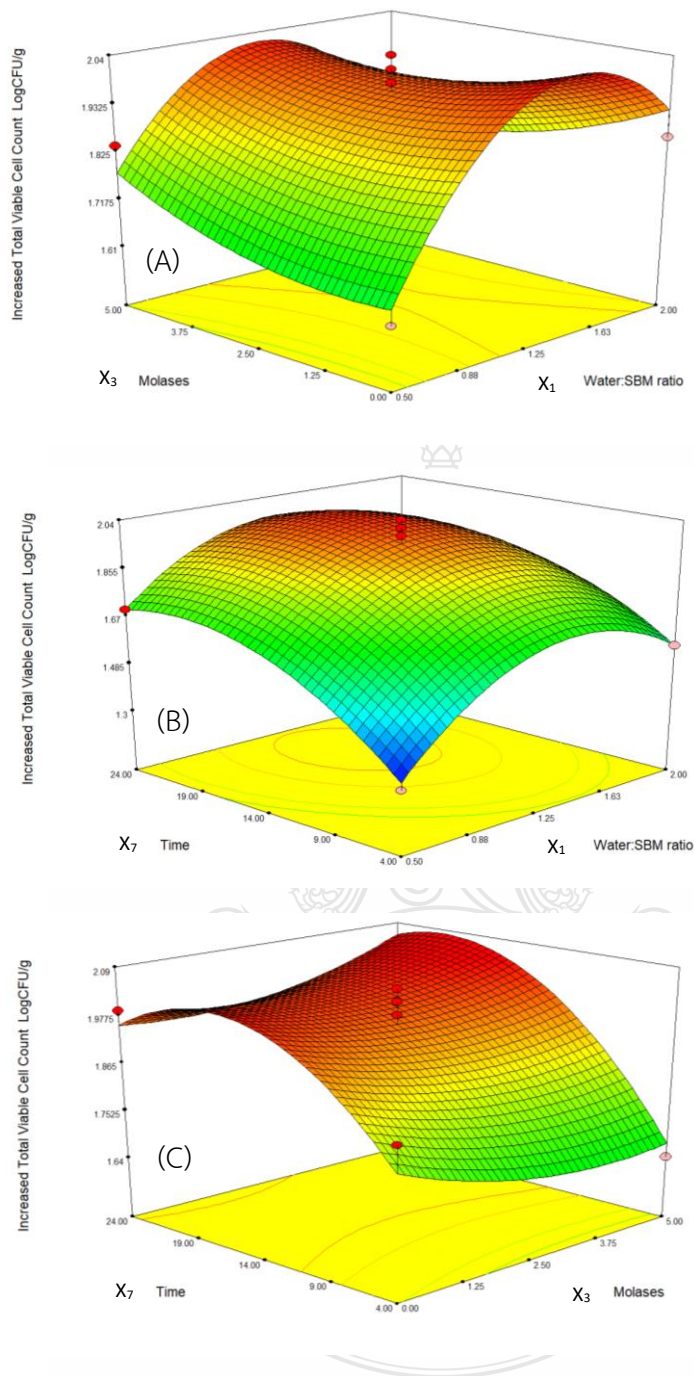
ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของผลการทดลอง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	f-value	p-value
Model	0.5875	9	0.0653	13.5369	0.0012
X_1	0.0406	1	0.0406	8.4221	0.0229
X_3	0.0000	1	0.0000	0.0000	1.0000
X_7	0.1596	1	0.1596	33.0999	0.0007
X_1X_3	0.0182	1	0.0182	3.7794	0.0930
X_1X_7	0.0081	1	0.0081	1.6798	0.2361
X_3X_7	0.0110	1	0.0110	2.2863	0.1743
X_1^2	0.2345	1	0.2345	48.6318	0.0002
X_3^2	0.0091	1	0.0091	1.8880	0.2118
X_7^2	0.0960	1	0.0960	19.9090	0.0029
Residual	0.0338	7	0.0048		
Lack of Fit	0.0211	3	0.0070	2.2161	0.2287
Pure Error	0.0127	4	0.0032		
Correlation	0.6200	16			

$R^2 = 0.9457$

$$\text{Increased TVC (Log CFU/g)} = 0.606 + 1.317X_1 - 0.021X_3 + 0.058X_7 - 0.036X_1X_3 - 6.000X_1X_7 + 2.100X_3X_7 - 0.419X_1^2 + 7.440X_3^2 - 1.510X_7^2 \quad (4.1)$$

- เมื่อ X_1 คือ ปริมาณน้ำต่อSBM (% v/w)
 X_3 คือ ความเข้มข้นกากน้ำตาล (%)
 X_7 คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (h)

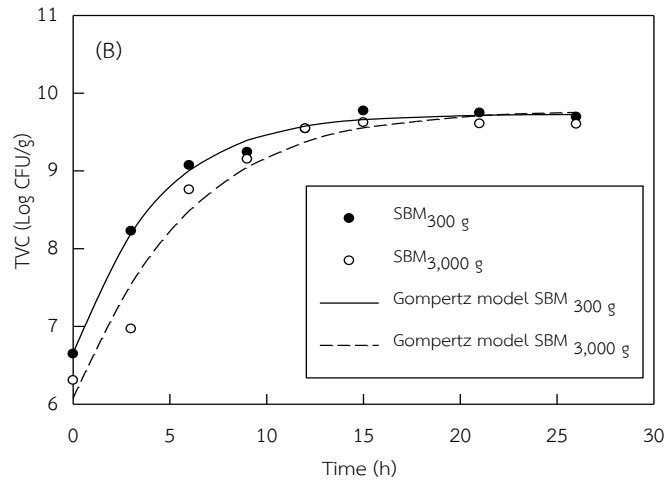
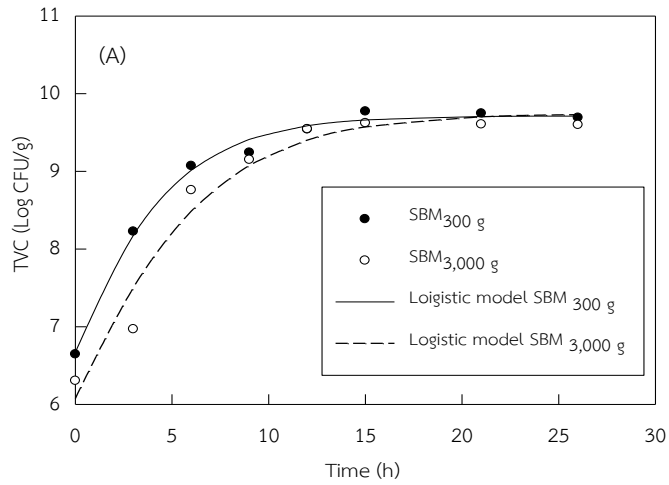


รูปที่ 4.1 อิทธิพลร่วมของปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง
 (A) อิทธิพลร่วมของปริมาณน้ำตาลต่อSBMและกากน้ำตาล
 (B) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและปริมาณน้ำตาลต่อSBM และ
 (C) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

4.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในSBMด้วยกระบวนการหมักแบ แท่งในระดับขยายขนาด

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในระดับขยายขนาด พบว่าของจุลินทรีย์มีการเจริญใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *E. faecium* A028 ในระดับเริ่มต้น (ปริมาณ SBM เท่ากับ 300 g) สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบขยายขนาดได้ (ปริมาณ SBM เท่า 3000 g) ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันกับการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้นที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า Sig= 0.930>0.05)

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *E. faecium* A028 ในระดับขยายขนาดซึ่งใช้ SBM จำนวน 3,000 g (SBM_{3,000g}) แสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้โดยมีค่า TVC เท่ากับ 9.66 Log CFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้น (SBM_{300g}) ซึ่งมีค่า TVC เท่ากับ 9.77 Log CFU/g และเมื่อทำการเลียนแบบ (Simulation) การเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Logistic และแบบ Gompertz พบว่าแบบจำลองทั้งสองแบบสามารถเลียนแบบการเจริญของโพรไบโอติกได้อย่างเหมาะสม (รูปที่ 4.2 (A) และ 4.2 (B)) โดยให้ค่า R^2 มากกว่า 0.95 (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของแบคทีเรียจากแบบจำลอง Logistic (ตารางที่ 4.4) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในระดับเริ่มต้น และระดับขยายขนาด จะมีค่า μ_{max} เท่ากับ 0.295 h⁻¹ และ 0.234 h⁻¹ ตามลำดับ ในขณะที่ค่า r_{max} ซึ่งได้จากแบบจำลอง Gompertz เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้นและระดับขยายขนาด มีค่าเท่ากับ 0.948 Log CFU/g h และ 0.726 Log CFU/g h ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับขนาดเริ่มต้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้นและระดับขยายขนาดให้ค่า TVC ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.4) พบว่า SBM สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ใกล้เคียงกับวัตถุดิบชนิดอื่น ๆ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบ SSF ด้วย SBM ในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถนำไปพัฒนาการผลิตโพรไบโอติกสำหรับจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้



รูปที่ 4.2 (A) การเลียนแบบการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยแบบจำลอง Logistic และ (B) แบบจำลองประยุกต์ของ Gompertz ในการเพาะเลี้ยงระดับเริ่มต้นและระดับขยาย

ตารางที่ 4.4 ค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของ *E. faecium* A028 ที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

	แบบจำลอง Logistic		แบบจำลอง Gompertz	
	SBM _{300g}	SBM _{3,000g}	SBM _{300g}	SBM _{3,000g}
X_0 (Log CFU/g)	6.671	6.075	6.661	6.078
X_{max} (Log CFU/g)	9.714	9.744	9.730	9.777
μ_{max} (h ⁻¹)	0.295	0.234	NC	NC
r_{max} (Log CFU/g h)	NC	NC	0.948	0.726
t_L (h)	NC	NC	0.000	0.000
R^2	0.994	0.962	0.995	0.956

NC =Not calculated

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า TVC ของการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกด้วย SSF โดยใช้กับงานวิจัยอื่นๆ (ตารางที่ 4.5) พบว่าการใช้ SBM เป็นวัตถุดิบในกระบวนการ SSF ให้ค่า TVC สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกด้วยวัตถุดิบอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า SBMเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักแบบ SSF ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานต่ำมีน้ำเสียน้อย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และยังเป็น การเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่ง

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกแบบ SSF

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์	TVC*	อ้างอิง
Oats	<i>L. plantarum</i>	9.45	(Zhang et al., 2015) [89]
	<i>B. animalis</i>	8.50	
Soy	<i>L. paracasei</i> supsp.	9.50	(Rodriguez de Olmos et al., 2015) [82]
	<i>paracasei</i>	9.00	
	<i>B. longum</i>		
Wheat	<i>L. reuteri</i>	9.00	(Ayyash et al., 2019)
	<i>L. plantarum</i>	8.50	[90]
Soybean meal	<i>E. faecium</i> (SBM _{300g})	9.82	(ศิริยาพร และคณะ, 2559)
	<i>E. faecium</i> (SBM _{3,000g})	9.77	[72]
Soybean meal	<i>E. faecium</i> (SBM _{300g})	9.77	This study
	<i>E. faecium</i> (SBM _{3,000g})	9.66	This study

*TVC is total viable cell count(Log CFU/g)

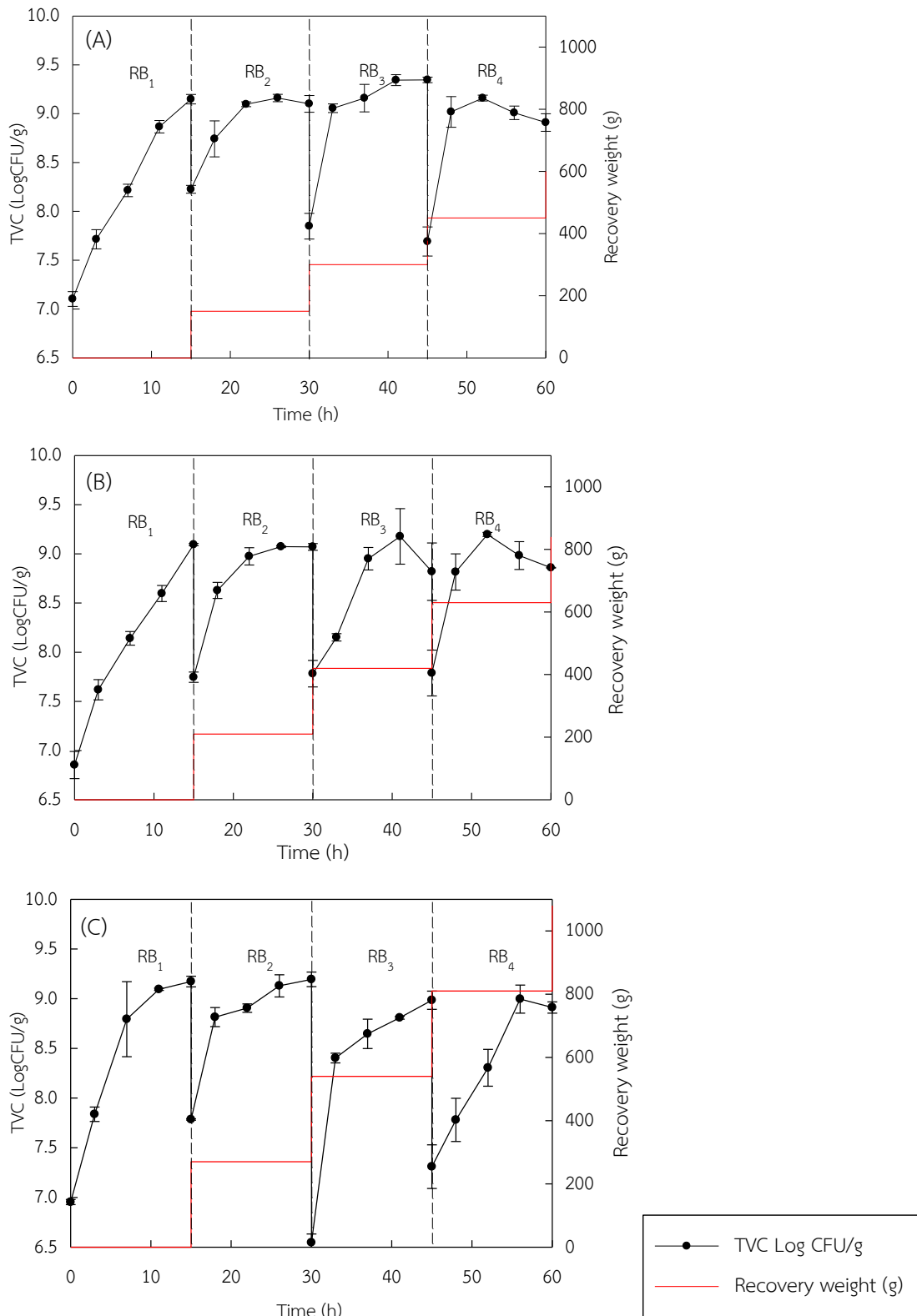
4.4 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ในSBM ด้วยกระบวนการ SSF โดยการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated Batch Fermentation)

การศึกษากการเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยแบ่งปริมาณการนำเข้าและออกแต่ละรอบของกระบวนการหมักแบบกะซ้ำ ออกเป็น 3 ชุดคือ 50 70 และ 90 % โดยน้ำหนักปริมาณเริ่มต้น โดยแต่ละชุดการทดลองมีการนำ FSBM (Fermented SBM, FSBM) ออกและเติม SBM ใหม่เข้าไปเพาะเลี้ยงโพรไบโอติก จำนวน 4 รอบ (RB₁-RB₄) ซึ่งผลการทดลองพบว่า *E. faecium* A028 มีการเจริญเพิ่มขึ้นและ มีการเจริญสูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงในแต่ละรอบแสดงดังรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6 โดยเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในแต่ละรอบพบว่า การทดลองที่ 90 % มีปริมาณFSBM สูงกว่าที่ 50 และ 70 % (ตารางที่ 4.6) และพบว่า การทดลองที่ 50 70 และ 90 % มีค่า TVC อยู่ในช่วง 9.1 - 9.3 Log CFU/g 9.0-9.2 Log CFU/g และ 8.9 - 9.1 Log CFU/g

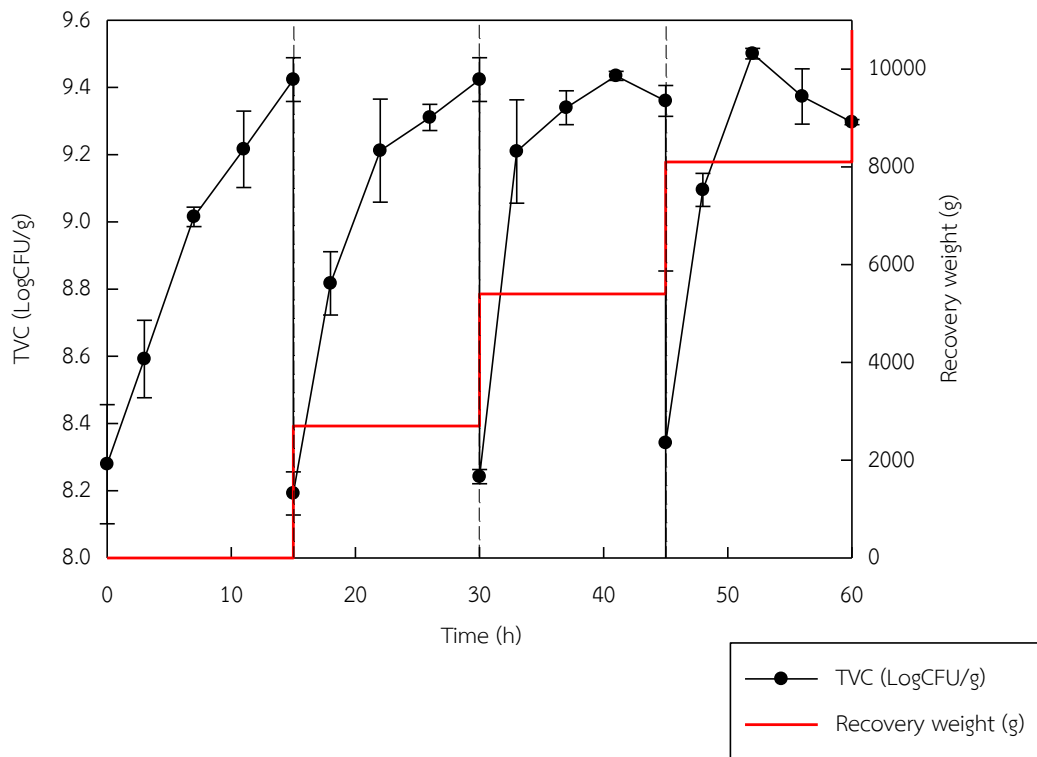
ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการทดลองที่ 90 % มีค่า TVC น้อยกว่าการทดลองระดับอื่น ๆ เล็กน้อยอาจเป็นเพราะปริมาณ FSBM ที่เหลือในระบบสำหรับที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการเพาะเลี้ยงรอบถัดไปมีน้อยกว่าการทดลองระดับอื่น ๆ และการเติม SBM ปริมาณที่สูงอาจจะทำให้ การผสมกับ FSBM เดิมที่เหลือในรอบที่ผ่านมาอย่างไม่ดีเท่าที่ควร [3] อาจส่งผลให้ปริมาณ TVC และอัตราการเจริญจำเพาะมีแนวโน้มที่ลดลงเล็กน้อยในช่วง RB_4 ของกระบวนการหมักแบบกะช้ำ อย่างไรก็ตามพบว่าในการทดลองที่ 90 % มีปริมาณของ FSBM ที่สูงกว่าชุดการทดลองที่ 50 และ 70 % ทำให้มีอัตราการผลิต TVC เพิ่มขึ้นในแต่ละชุดการทดลองเนื่องจากการเพิ่มอัตราส่วนการแทนที่ของ SBM ทำให้มีการสะสมของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้น [85] ซึ่งกระบวนการหมักแบบกะช้ำทำให้โพรไบโอติกมีการเจริญอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่มากขึ้นในระยะเวลาการหมักที่สั้นลง และสามารถลดค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย SFF จึงเป็นกระบวนการน่าสนใจสำหรับการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติก

เมื่อพิจารณาปริมาณ FSBM ที่ผลิตได้ในแต่ละรอบการเพาะเลี้ยง พบว่าการทดลองที่ขนาด 50 70 และ 90 % ได้ผลผลิตเท่ากับ 150 210 และ 270 g ในเวลา 15 h ตามลำดับ และทุกการทดลองมีค่า μ_{max} r_{max} และ TVC ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าประสิทธิภาพในกระบวนการหมักแบบแห้งในการหมักแบบกะช้ำ ซึ่งพบว่าการหมักในขนาด 300 g จำนวน 4 รอบจะได้ปริมาณ FSBM 1,200 g โดยการเพาะเลี้ยงที่ 50 70 และ 90 % มีปริมาณ FSBM ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อเท่ากับ 750 930 และ 1,110 g โดยมีการเตรียมกล้าเชื้อเพียงรอบที่ 1 เท่านั้น โดยมีค่า TVC อยู่ในช่วง 9.11- 9.20 Log CFU/g และอัตราการผลิต TVC เท่ากับ 92.00 127.91 และ 163.98 Log CFU/h ของการทดลองที่ 50 70 และ 90 % ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงโพรไบโอติกในระดับขยายขนาด (3000 g) ผลการทดลองพบว่ามีค่า TVC น้อยเท่ากับ 9.158 Log CFU/g เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 15 h โดยมีปริมาณ ปริมาณ FSBM ที่ผลิตได้ทั้งหมด เท่ากับ 10,800 g และมีค่า μ_{max} และ r_{max} อยู่ในช่วง 0.099-0.893 h^{-1} และ 0.968-3.003 Log CFU/g h ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)



รูปที่ 4.3 การเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ด้วยการหมักแบบกะชั้นที่อัตราส่วน (A) 50 % (B) 70 % (C) 90 % โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.4 การเพาะเลี้ยง *E. faecium* A028 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะช้ำในระดับขยายขนาดที่อัตราส่วน 90 % โดยน้ำหนัก

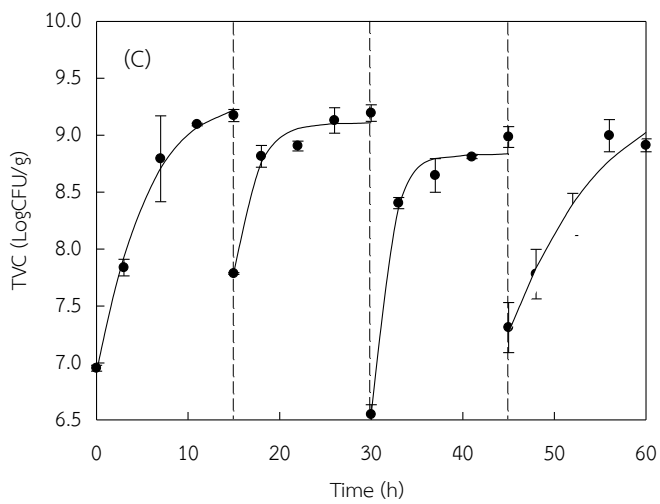
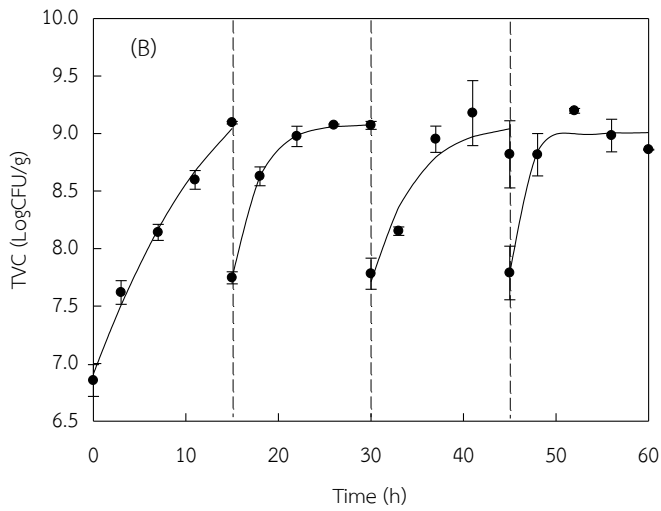
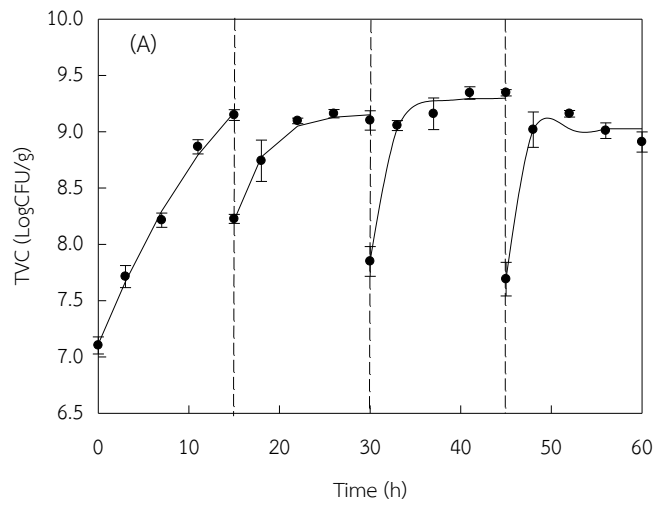
ตารางที่ 4.6 การเจริญสูงสุดของแต่ละสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบกะช้ำ

ชุดการทดลอง (%)	TVC สูงสุดเฉลี่ย (Log CFU/g)				ค่าเฉลี่ย
	RB ₁	RB ₂	RB ₃	RB ₄	
50 (300 g)	9.148	9.160	9.334	9.160	9.201
70 (300 g)	9.094	9.073	9.178	9.197	9.136
90 (300 g)	9.173	9.195	9.085	8.996	9.112
90 (3000 g)	9.216	9.111	9.134	9.173	9.158

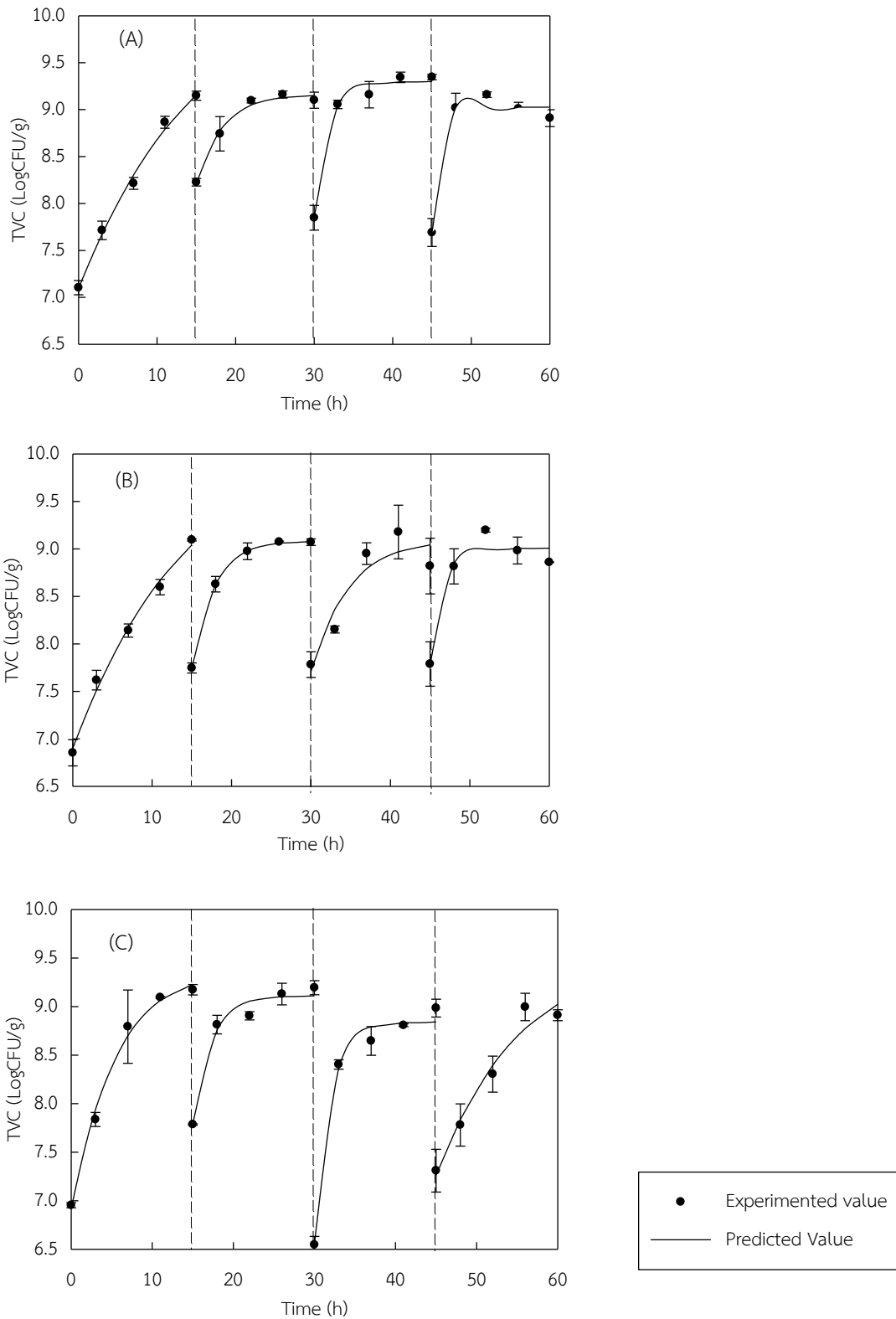
ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพการเจริญของโพรไบโอติกและค่าผลผลิตในกระบวนการหมักแบบกะขี้

ชุดการทดลอง (%)	FSBM (g)	อัตราการผลิต FSBM (g/h)	TVC สูงสุดเฉลี่ย	อัตราการผลิต TVC
			(Log CFU/g)	(Log CFU/h)
50 (300 g)	600	10	9.20	92.00
70 (300 g)	810	14	9.14	127.91
90 (300 g)	1,080	18	9.11	163.98
90 (3000 g)	10,800	180	9.16	1,648.80

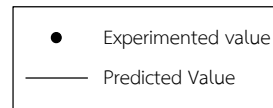
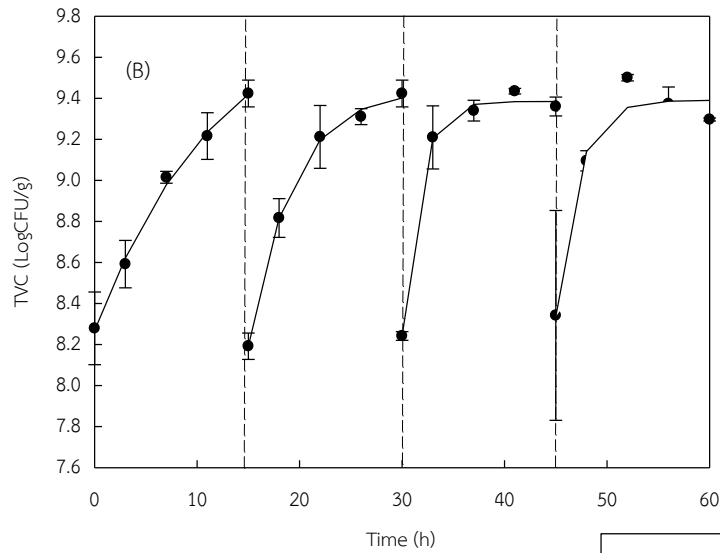
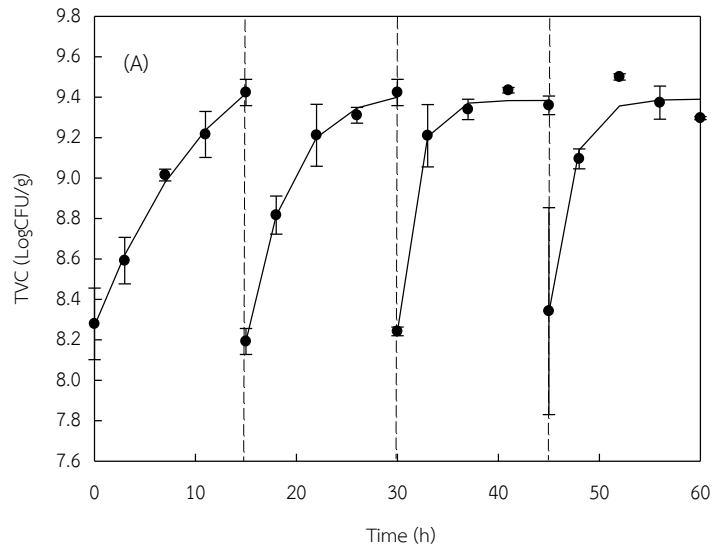
เมื่อนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ Logistic และแบบ Gompertz มาเลียนแบบการเจริญของโพรไบโอติกพบว่าแบบจำลองทั้งสองแบบสามารถเลียนแบบการเจริญของโพรไบโอติกในกระบวนการหมักแบบกะขี้ได้อย่างเหมาะสม (รูปที่ 4.5 และ 4.6) โดยมาค่า R^2 มากกว่า 0.96 เมื่อพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของโพรไบโอติกที่ได้จากแบบจำลอง Logistic และ Gompertz (ตารางที่ 4.8) พบว่า μ_{max} และค่า r_{max} ของแต่ละการทดลองมีแนวโน้มที่สูงขึ้นตามอัตราส่วนการนำเข้าและออกของ SBM อาจเป็นเพราะในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงมีการสะสมของจุลินทรีย์มากขึ้นจึงทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์สูงขึ้นและสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ ซึ่งเห็นได้ว่ากระบวนการหมักแบบกะขี้มีประสิทธิภาพสูงกว่ากระบวนการแบบกะประหยัดเวลาและต้นทุนในการเตรียมกล้าเชื้อ และให้ค่า TVC ของโพรไบโอติกสูง อีกทั้งยังสามารถผลิต FSBM ออกมาได้อย่างต่อเนื่อง [92]



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยสมการ Logistic ในกระบวนการหมักแบบกะซ่ำที่อัตราส่วน (A) 50 % (B) 70 % และ (C) 90 % โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.6 การเลียนแบบการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยสมการ Gompertz ในกระบวนการหมักแบบกะซ้าที่อัตราส่วน (A) 50 % (B) 70 % และ (C) 90 % โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.7 การเขียนแบบการเจริญของ *E. faecium* A028 ด้วยสมการ (A) Logistic (B) Gompertz ด้วยกระบวนการหมักแบบกะช้ำในระดับขยายขนาดที่อัตราส่วน 90% โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 4.8 ค่า μ_{max} และ r_{max} จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic และ Gompertz ตามลำดับในกระบวนการหมักแบบกะซ้า

ชุดการทดลอง (%)	μ_{max} (h^{-1})				r_{max} (Log CFU/g h)			
	RB ₁	RB ₂	RB ₃	RB ₄	RB ₁	RB ₂	RB ₃	RB ₄
50 (300 g)	0.092	0.323	0.611	1.768	0.285	1.051	2.042	4.647
70 (300 g)	0.103	0.243	0.240	0.710	0.318	1.257	1.756	2.294
90 (300 g)	0.227	0.482	0.610	0.126	0.697	1.538	1.830	3.251
90 (3000 g)	0.099	0.257	0.584	0.893	0.368	0.847	1.952	3.003

4.5 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกระหว่างการอบแห้ง

4.5.1 ผลของสารปกป้องเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกระหว่างการอบแห้ง

การศึกษาสารปกป้องเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม ทำการทดลองโดยพ่นสารปกป้องเซลล์ความเข้มข้น 50 g/L ปริมาตร 30 mL อบแห้งด้วยลมร้อน ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 24 h ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อหาจำนวนโพรไบโอติกที่รอดชีวิตและอัตราการแห้งที่เวลาต่าง ๆ โดยกำหนดปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาคุณสมบัติของสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ อัตราการรอดชีวิต ความชื้น ราคา และประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ ในกระบวนการอบแห้ง SBM หลังการหมัก (Drying Process) ปัจจัยที่ 1 คือ อัตราการรอดชีวิต จากรูปที่ 4.8 พบว่าจำนวนโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในชุดควบคุมลดลงจาก 9.20 Log CFU /g เหลือ 6.56 Log CFU/g คิดเป็นการรอดชีวิตเท่ากับ 71.27 % และการทดลองยังพบว่า เมื่อใช้มอลโตเดกซ์ทรินมีโพรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 83.33 % ทั้งนี้การใช้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ หางนมผง ผงชูรส และยีสต์สกัด มีจำนวนโพรไบโอติกที่รอดชีวิตใกล้เคียงกันเท่ากับ 76.46 78.53 76.07 และ 75.49 %

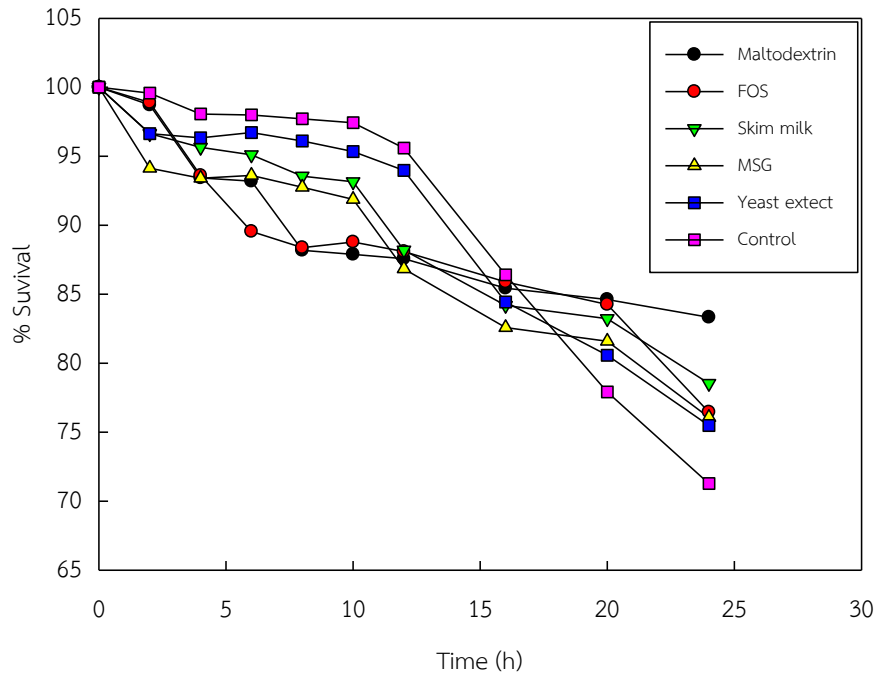
การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในระหว่างการอบแห้ง(ปัจจัยที่ 2) แสดงในรูปที่ 4.9 โดยการเลือกพิจารณาค่าความชื้น (Moisture Content; Mc) ของสารปกป้องเซลล์แต่ละประเภท ผลการทดลอง พบว่า ชุดควบคุมมีค่าความชื้นต่ำที่สุด เท่ากับ 3.59 % และมอลโตเดกซ์ทรินมีค่าความชื้น เท่ากับ 4.18 % ในขณะที่ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ หางนมผง ผงชูรส และ ยีสต์สกัด มีค่าความชื้น เท่ากับ 3.90 4.10 4.02 และ 3.96 % ตามลำดับจากการทดลองจะเห็นว่าการทดลองควบคุมมีอัตราการแห้งเร็วที่สุดรองลงมาคือ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งการลดลงที่รวดเร็วของความชื้นส่งผลทำให้แบคทีเรียมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว [42]

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอัตราการแห้งจำเพาะ (k_{drying}) โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ศึกษาค่า จลนพลศาสตร์ดังกล่าวตามแบบจำลองของ Page เพื่ออธิบายพฤติกรรมการลดลงของความชื้นผลการ ทดลองแสดง ดังรูปที่ 4.9 พบว่าฟรุกโตโอลิโกแซกคาไรด์ มีอัตราการแห้งจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.0018 h^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และเมื่อพิจารณาอัตราการตายจำเพาะพบว่าทำให้โพรไบโอติก มีอัตราการตายจำเพาะต่ำที่สุดเท่ากับ 0.0022 h^{-1} และการใช้ผงชูรสจะทำให้โพรไบโอติกมีอัตราการ ตายจำเพาะสูงสุด

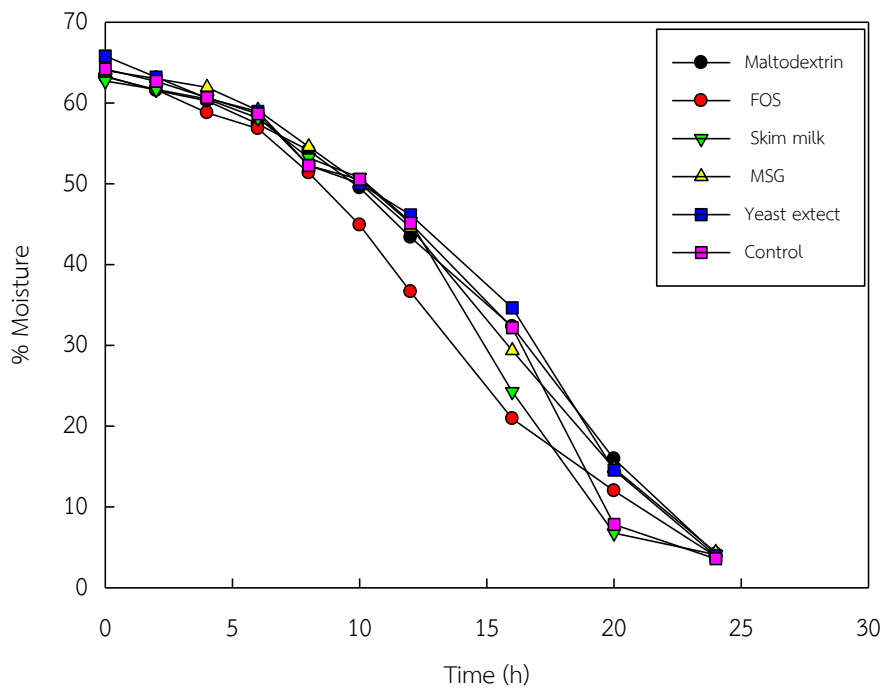
ปัจจัยที่ 3 ราคาของหางนมผง และ มอลโตเดกซ์ทริน ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียง กันจากการตรวจสอบราคาพบว่า มอลโตเดกซ์ทรินมีราคาสูงกว่าหางนมผงถึง 3 เท่า

ปัจจัยที่ 4 พิจารณาประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์ โดยสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ประกอบไปด้วยมอลโตเดกซ์ทริน และ ฟรุกโต-โอลิโกแซกคาไรด์ และกลุ่มของโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วย ผงชูรส และ หางนมผง ทั้งสองกลุ่มมี กลไกในการปกป้องเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตจะทำหน้าที่ปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ ภายนอก และเข้าไปป้องกันความเสียหายภายในเซลล์ [42] รวมทั้งยังลดค่าการสูญเสียกิจกรรมของ เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดต (β -galactosidase) ภายในเซลล์ [80] และสารในกลุ่มโปรตีนมีกลไกในการ ทำงานคือ จะเคลือบผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งโครงสร้างของโปรตีนเป็นโครงสร้างง่าย ๆ และ หลังกระบวนการอบแห้งสามารถคืนน้ำให้กับเซลล์ได้ง่าย [42] ดังนั้น สารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตคือ มอลโตเดกซ์ทริน จึงมีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์ที่ดีกว่าสารในกลุ่มโปรตีนคือ หางนมผง เพราะสามารถปกป้องเซลล์ได้ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ รวมทั้งยังลดค่าการสูญเสียกิจกรรมของ เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดต (β -galactosidase) ภายในเซลล์ได้อีกด้วย

จากปัจจัยทั้ง 4 ข้อที่กล่าวมาข้างต้น ที่ได้ใช้ในการพิจารณาการคัดเลือกสารปกป้องเซลล์เพื่อ เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ระหว่างการอบแห้งด้วยลมร้อน พบว่า มอลโตเดกซ์ทริน เป็นสารปกป้องเซลล์ที่ดีที่สุด เพราะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุด ราคาถูก และมีคุณสมบัติในการ ปกป้องเซลล์ที่ดีกว่าสารกลุ่มโปรตีน



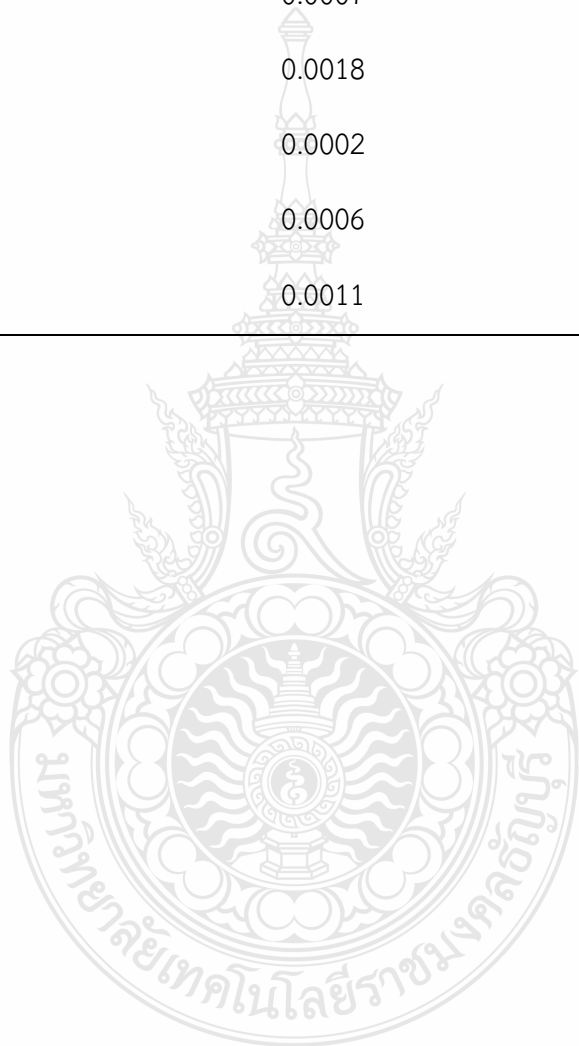
รูปที่ 4.8 การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 โดยใช้สารปกป้องเซลล์ต่างชนิดในกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C

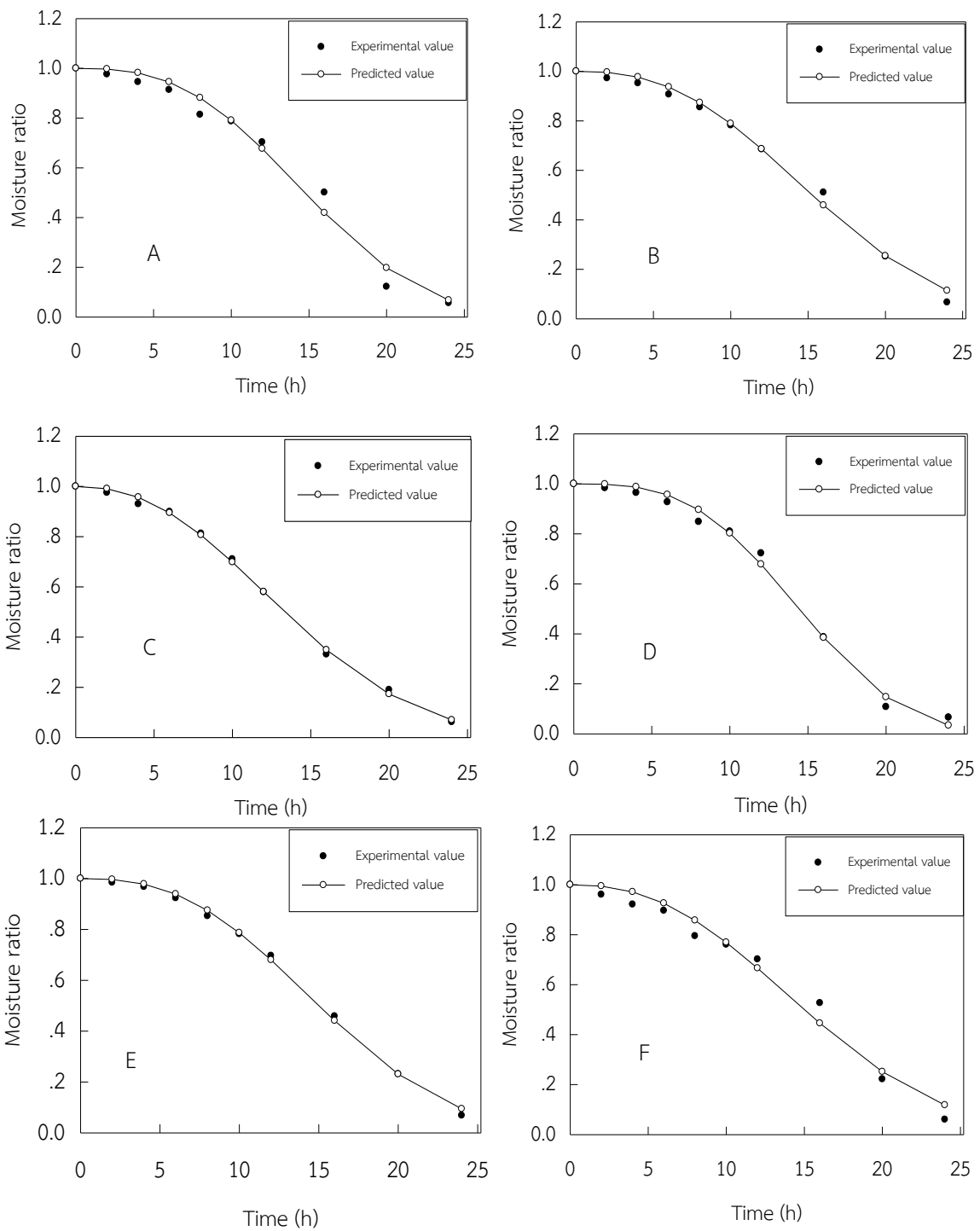


รูปที่ 4.9 ปริมาณความชื้นของ FSBM *E. faecium* A028 โดยใช้สารปกป้องเซลล์ต่างชนิดในกระบวนการอบแห้งที่ อุณหภูมิ 55°C

ตารางที่ 4.9 อัตราการแห้งจำเพาะและอัตราการตายจำเพาะของกระบวนการอบแห้งด้วยสารป้องกันต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 55 °C

สารปกป้องเซลล์	k_{drying} (h ⁻¹)	k_{death} (h ⁻¹)
Control	0.0004	0.0200
Maltodextrin	0.0007	0.0027
FOS	0.0018	0.0022
MSG	0.0002	0.0135
Skim milk	0.0006	0.0102
Yeast extract	0.0011	0.0092



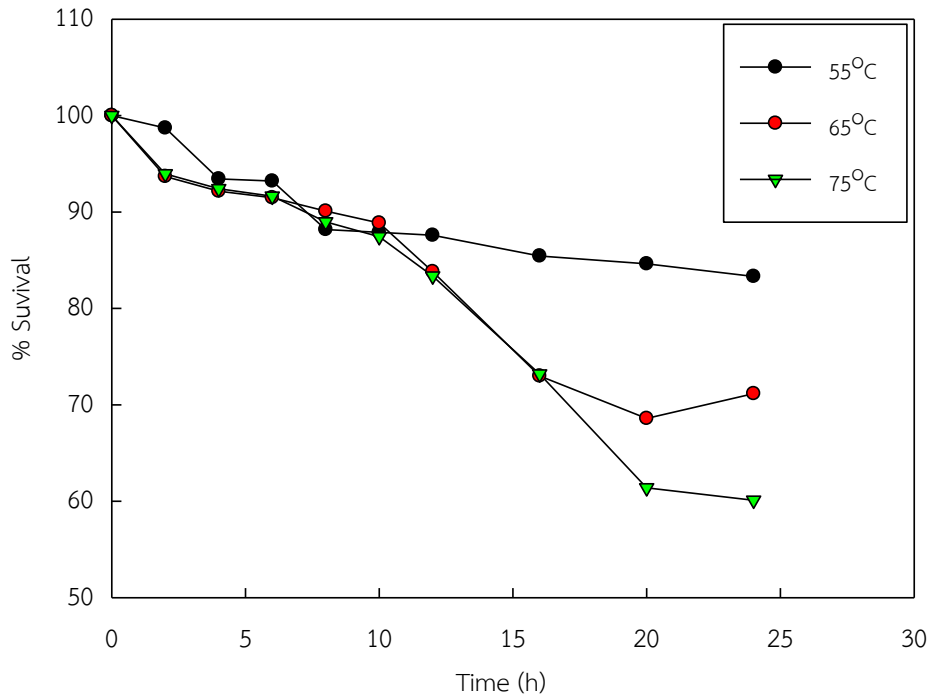


รูปที่ 4.10 การเลียนแบบการอบแห้ง FSBM ที่อุณหภูมิ 55°C เมื่อเติมสารปกป้องเซลล์ชนิดต่างๆ (A) Control (B) Maltodextrin (C) Fructo Oligosaccharide (D) Skim milk (E) Monosodium glutamate (F) Yeast Extract

4.5.2 ผลของของอุณหภูมิในระหว่างการอบแห้งต่อการรอดชีวิต

การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในระหว่างกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้มอลโตเดกซ์ทรีนเป็นสารปกป้องเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.10 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นของ *E. faecium* A028 มีค่า 10.25 Log CFU/g เมื่ออบ FSBM ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 24 h มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 83.33 % ในขณะที่การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ลดลงเป็น 71.15 และ 60.10 % เมื่ออบแห้งที่อุณหภูมิ 65 และ 75 °C ที่ 24 h ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการตายจำเพาะของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75 °C เท่ากับ 0.0027 0.0156 และ 0.074 h⁻¹ ตามลำดับ (รูปที่ 4.11) จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 จะลดลงเมื่ออุณหภูมิในการอบแห้งสูงขึ้น เนื่องจากกระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อนเป็นกระบวนการที่ทำให้ความชื้นของวัสดุลดลงซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก โดยผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิและระยะเวลาของกระบวนการอบแห้งมีผลต่ออัตราการแห้งของ FSBM เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งสูงขึ้น อัตราการแห้งจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของน้ำเกิดการระเหยสูง และโมเลกุลของน้ำภายในวัสดุจะเคลื่อนที่เร็วขึ้น ระยะห่างระหว่างโมเลกุลของน้ำเพิ่มขึ้น เป็นการลดแรงกระทำระหว่างโมเลกุลในทางอ้อม

ตารางที่ 4.10 แสดงอัตราการแห้งและอัตราการตายของโพรไบโอติก พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อัตราการอบแห้งและอัตราการตายของโพรไบโอติกจะสูงขึ้น เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ความชื้นของ FSBM ลดลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้เซลล์โพรไบโอติกสูญเสียน้ำภายในเซลล์รวดเร็วและตายเร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wirunpan ในปี 2016 [54] ที่ทำการศึกษการอบแห้งอาหารเลี้ยงกึ่งที่มีโพรไบโอติก *Lactobacillus lactis* 1464 พบว่า อัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการอบแห้งและชนิดของสารปกป้องเซลล์ การใช้สารปกป้องเซลล์ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้ในกระบวนการอบแห้ง โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 10⁶-10⁸ CFU/g และค่าความชื้นต่ำกว่า 11% จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการอบแห้ง FSBM คืออุณหภูมิ 55 °C และใช้มอลโตเดกซ์ทรีนเป็นสารปกป้องเซลล์



รูปที่ 4.11 การรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 65 และ 75°C โดยใช้มอลโตเดคซ์ทรีนเป็นสารปกป้องเซลล์

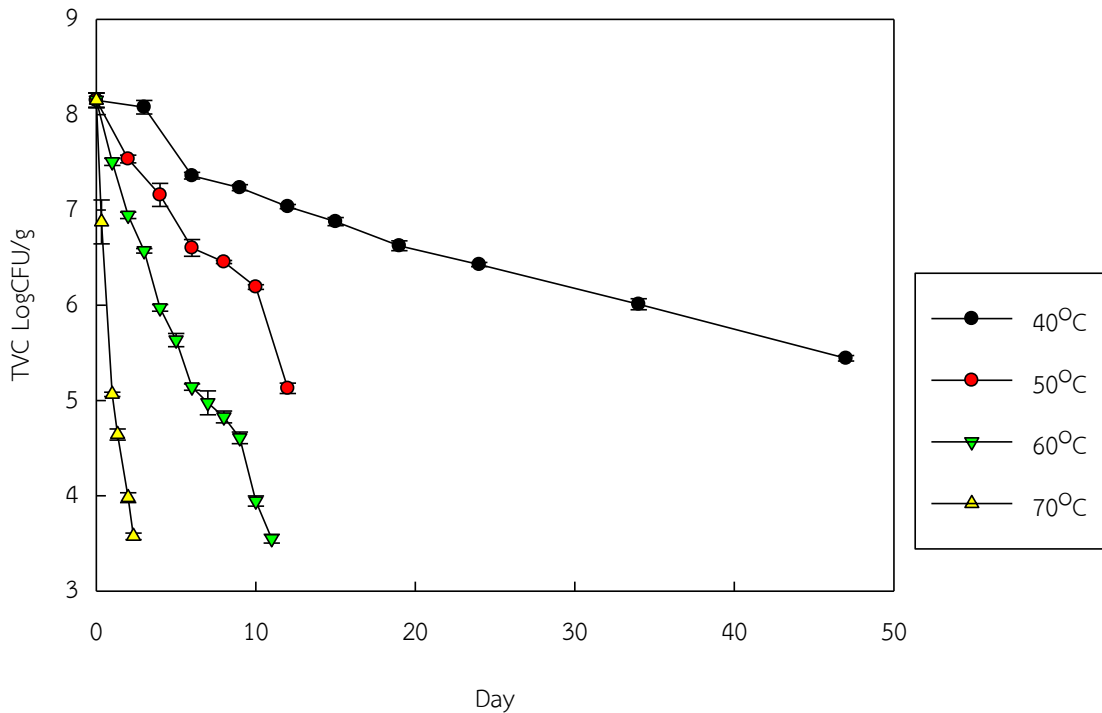
ตารางที่ 4.10 อัตราการแห้งจำเพาะและอัตราการตายจำเพาะของกระบวนการอบแห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ	$k_{\text{drying}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{death}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
55°C	0.0007	0.0027
65°C	0.0088	0.0156
75°C	0.0141	0.074

4.6 การผลิตผงโพรไบโอติกและการเก็บรักษา

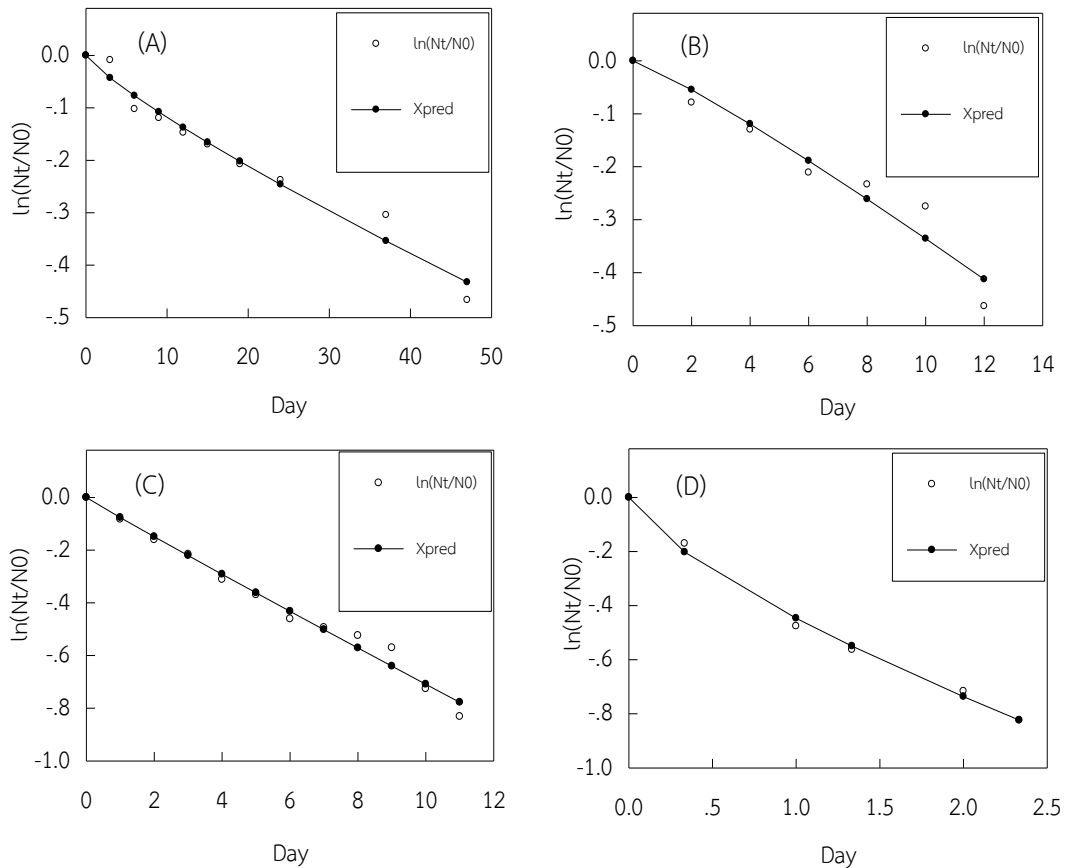
ผลของการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกที่ใช้มอลโตเดกซ์ทรินเป็นสารปกป้องเซลล์ระหว่างการอบแห้งด้วยลมร้อนและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.12 จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 40°C อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียจะลดลงเล็กน้อยโดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 5.443 Log CFU/g หรือ 66.78 % เมื่อเก็บรักษาไว้ 47 วัน ที่อุณหภูมิ 50°C อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลงเหลือเท่ากับ 5.128 Log CFU/g หรือ 62.91% ในเวลา 26 วัน ที่อุณหภูมิ 60°C อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลงเหลือเท่ากับ 3.550 Log CFU/g หรือ 43.55 % ในเวลา 11 วัน และที่อุณหภูมิ 70°C อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลงเป็นคงเหลือเท่ากับ 3.57 Log CFU/g หรือ 43.85 % ในเวลา 56 h เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียหรืออาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิส่งผลให้ *E. faecium* A028 มีอัตราการตายสูงขึ้นตามไปด้วย เพราะอุณหภูมิที่สูงส่งผลต่อการเร่งการสูญเสียน้ำออกสู่ภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *E. faecium* A028 นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกที่อุณหภูมิต่ำไม่ส่งผลต่อการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 40°C ระยะเวลาเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ 47 วัน พบว่าอัตราการตายของแบคทีเรียลดลง 2 Log CFU/g สาเหตุการตายลดลงช้า เนื่องจากแบคทีเรีย *E. faecium* A028 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C [73] และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้นแบคทีเรียจะมีอัตราการรอดชีวิตลดลงของอุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็นลำดับ

อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการอบแห้งและการเก็บรักษา มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา และการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรีย อันเนื่องมาจากความร้อนจากอุณหภูมิที่สูงไปสร้างความเสียหายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการสลายตัวสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น [50]



รูปที่ 4.12 *E. faecium* A028 ระหว่างกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์การตายของแบคทีเรียใช้อธิบายพฤติกรรมลดลงของจำนวนแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงในดังรูปที่ 4.13 โดยพิจารณาจากค่าอัตราการตายจำเพาะ (k_{death}) และ ลำดับของปฏิกิริยา (n) จากตารางที่ 4.11 ค่า k_{death} แสดงถึงอัตราเร็วในการตายของแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา ค่า k_{death} สูง แสดงว่าแบคทีเรียมีอัตราการตายเร็ว ค่า k_{death} ต่ำ แสดงว่าแบคทีเรียมีอัตราการตายช้า จากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีอัตราการตายเท่ากับ 0.0059 0.0170 0.0249 0.0759 0.4004 และ 0.4465 h^{-1} ตามลำดับ จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ n แสดงถึงลำดับของปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลำดับที่ 0 (Zero Order) ลักษณะของกราฟเป็นเส้นตรงและมีอัตราคงที่ แสดงว่าไม่มีปัจจัยใด ๆ ที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการตายของแบคทีเรีย ปฏิกิริยาลำดับที่ 1 (First Order) ลักษณะของกราฟเป็นเส้นโค้ง แสดงว่ามีปัจจัยที่ส่งผลต่อการตายของแบคทีเรีย นั่นคือ อุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้มีแนวโน้มเข้าใกล้ค่าการทดลอง [84] จากที่กล่าวมาข้างต้น จะพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่า k_{death} และค่า n จะสูงขึ้นตาม เพราะว่าอุณหภูมิสูงทำให้แบคทีเรียตายมากขึ้นส่งผลให้จำนวนเซลล์รอดชีวิตลดลง ทั้งยังทำให้แบคทีเรียมีชีวิตรอดที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลาสั้น ดังนั้นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้มีความสอดคล้องกับผลการทดลอง โดยพิจารณาจากค่าที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าทำนายหรือมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(N_t/N_0)$ และ ระยะเวลาในการเก็บรักษา (A) 40°C (B) 50°C (C) 60°C (D) 70°C

จากการพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์การตายของแบคทีเรียในข้อ 4.5 ทำให้ทราบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้แบคทีเรียมีอัตราการตายที่สูงขึ้นตามอุณหภูมิไปด้วย จากนั้นพิจารณาค่า k_{death} จากตารางที่ 4.12 โดยนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ $\ln k_{death}$ และเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาจาก องศาเซลเซียส (°C) เป็นองศาเคลวิน (°K) และคำนวณอุณหภูมิให้อยู่ในรูปของ $1/T$ เพื่อนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k_{death}$ และอุณหภูมิ (รูปที่ 4.14) เพื่อหาค่าคงที่โดยการใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Arrhenius แสดงในตารางที่ 4.13 จากความสัมพันธ์จะพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น $\ln k_{death}$ ก็จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ แล้วนำไปใช้ในการสร้างสมการทำนายอายุการเก็บรักษาและกราฟของ Arrhenius เพื่อใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามที่ต้องการ สมการที่ใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของ *E. faecium* A028 ได้แก่ $\ln k_{death} = -12.799(1/T) \times 1000 + 36.394$ แสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.11 ค่าจลนพลศาสตร์การตายของ *E. faecium* A028 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

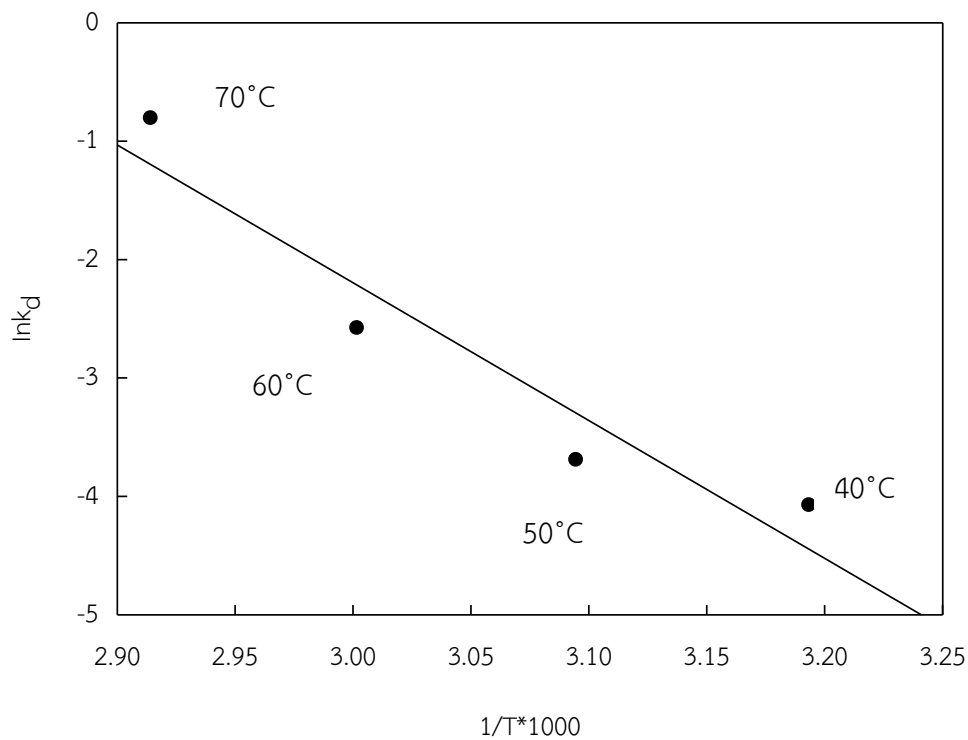
อุณหภูมิ (°C)	จุดเริ่มต้น Log CFU/g	จุดสิ้นสุด ซีวิต Log CFU/g	k_{death} (day ⁻¹)	n	R ²	RMSE
40	8.150	5.443	0.0170	0.8392	0.9671	0.0002
50	8.150	5.128	0.0249	1.1293	0.9406	0.0005
60	8.150	3.550	0.0759	0.9702	0.9835	0.0004
70	8.150	3.575	0.4465	0.7207	0.9953	0.0002

ตารางที่ 4.12 ค่า $\ln k_{death}$ ของผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	อุณหภูมิ สัมบูรณ์ (°K)	1/T	1/T*1000	k_{death} (day ⁻¹)	$\ln k_{death}$
40	313.15	0.00319	3.1934	0.0170	-4.0745
50	323.15	0.00309	3.0945	0.0249	-3.6929
60	333.15	0.00300	3.0017	0.0759	-2.5783
70	343.15	0.00291	2.9142	0.4465	-0.8063

ตารางที่ 4.13 ค่าคงที่และสมการของอาร์เรเนียส

สมการของ Arrhenius	A	E_a (J/mol)	R ²
$\ln k_{death} = -12.799(1/T) \times 1000 + 36.394$	6.393×10^{15}	-106.410	0.8920



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln k_{d}$ กับ $1 / T$ ของ *E. faecium* A028 ที่อุณหภูมิต่างๆ

การทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติก สามารถอธิบายได้โดยสมการใช้ค่า k_{death} ที่ได้จากสมการค่าคงที่ของ Arrhenius (อาร์เรเนียส) จากตารางที่ 4.13 จะได้เป็นสมการที่ใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกซึ่งมีค่าคงที่ของ Arrhenius เท่ากับ 6.393×10^{15} และค่าพลังงานกระตุ้นเท่ากับ -106.410 J/mol [65] โดยนำไปใช้ในการทำนายจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ ณ เวลาต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 4.14 โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในสมการทำนายอายุการเก็บรักษา โดยใช้ความสัมพันธ์ของลำดับปฏิกิริยาเป็นสมการเส้นตรง พบว่าสามารถทำนายการรอดชีวิตของโปรไบโอติกได้ใกล้เคียงกับการทดลองจริง ดังนั้นจึงสามารถนำสมการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงโปรไบโอติกที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้

ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์โพรบิโอติกที่อุณหภูมิ 65°C ที่ได้จากการทดลองและจากการทำนาย

อุณหภูมิ (°C)	สมการทำนาย อายุการเก็บรักษา	ระยะเวลา การเก็บรักษา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต TVC (Log CFU/g)	
			การทดลอง จริง	การทำนาย
65	$\ln \frac{N_t}{N_0} = -(0.4004)t^1$	2.333	3.870*	3.887*

* หมายถึง จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจากผลการทดลองจริงและผลการทำนายที่อุณหภูมิ 65°C ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $\alpha = 0.05$



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของโพรไบโอติก *E. faecium* A028 ด้วยแผนการทดลองแบบ BBD พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การใช้ปริมาณน้ำต่อ SBM เท่ากับ 1.5:1 v/w และเพาะเลี้ยงนาน 15.45 h โดยแบคทีเรียมีค่า TVC เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.91 Log CFU/g (24.30% ของ TVC เริ่มต้น) และสามารถเจริญได้สูงสุดเท่ากับ 9.77 Log CFU/g นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับขยายขนาดยังมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับเริ่มต้น และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Logistic และ Gompertz สามารถใช้ในการเลียนแบบการเจริญของโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี โดยมีค่า R^2 มากกว่า 0.95 และกระบวนการหมักแบบกะขำมีประสิทธิภาพสูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะ โดยสามารถระยะเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อและยังคงให้การเจริญของโพรไบโอติกใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบกะ อีกทั้งยังสามารถนำผลิตภัณฑ์ออกมาได้อย่างต่อเนื่อง

การศึกษาการคัดเลือกสารปกป้องเซลล์เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *E. faecium* A028 ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกหลังจากการอบแห้งด้วยลมร้อนและการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องมาจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิสูง อุณหภูมิจะส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิสูงจะส่งผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียลดลง จึงได้ทำการศึกษาการใช้สารปกป้องเซลล์เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย และจากการศึกษาพบว่า โมลโตเดกซ์ทรีนสารปกป้องเซลล์ที่ทำให้โพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดในระหว่างการอบแห้งด้วยลมร้อน จากการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์อัตราการตายของแบคทีเรียระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงทำให้ค่าอัตราการตายจำเพาะสูงขึ้นไปด้วย ซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก ดังนั้น จากการคำนวณและการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามารถนำไปใช้ในการทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกได้ใกล้เคียงกับการทดลองจริง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาองค์ประกอบและสารอาหารต่าง ๆ ของ SBM หลังจากกระบวนการอบแห้งด้วยลมร้อนมีคุณค่าทางสารอาหารเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่

5.2.2 ผสมจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด ในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ให้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

- [1] C. Ezema, "Probiotics in animal production: A review," *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, vol. 5, no. 11, pp. 308–316, 2013.
- [2] F. Bourdichon *et al.*, "Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 154, no. 3, pp. 87–97, Mar. 2012.
- [3] B. Cheirsilp and S. Kittha, "Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations," *Industrial Crops and Products*, vol. 66, pp. 73–80, Apr. 2015.
- [4] S. Huang *et al.*, "Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 63, pp. 1–17, May 2017.
- [5] X. C. Meng, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, C. Daly, and R. P. Ross, "Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 4, pp. 1406–1416, Feb. 2008.
- [6] M. Pineiro and C. Stanton, "Probiotic Bacteria: Legislative Framework Requirements to Evidence Basis," *Journal of Nutrition*, vol. 137, no. 3, pp. 850S–853S, Jan. 2007.
- [7] F. Gaggia, P. Mattarelli, and B. Biavati, "Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 141, no. Supplement, pp. S15–S28, Jul. 2010.
- [8] Axelsson, Lot., "Lactic acid Bacteria : Classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria (Salminen, S. and Von Wright, A., eds.)," *Marcel Dekker. New York*, vol. 1998, pp. 1–64.
- [9] E. C, *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health Review Probiotics in animal production: A review*. 2013.
- [10] Md. I. Hossain, M. Sadekuzzaman, and S.-D. Ha, "Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review," *Food Research International*, vol. 100, pp. 63–73, Oct. 2017.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [11] P. Pospiskova, G. Zornikova, M. Kolarova, Z. Sladek, T. Komprda, and J. Gersiova, "Effect of probiotics in the pig nutrition on the pathogenic bacteria counts in the gut," *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, the scientific journal.*, vol. 61, no. 6, pp. 1839–1843, Nov. 2013.
- [12] J. M. T. Hamilton-Miller, "Probiotics: a Critical Review," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, vol. 43, no. 6, pp. 849–849, Jan. 1999.
- [13] พ. วิไลพันธ์, "แบคทีเรียโอสติน. ตอนที่ 3 / พงษ์เทพ วิไลพันธ์,"แบคทีเรียโอสติน,. 2546. [Online]. Available:<http://202.29.80.68/ULIB6//dublin.php?ID=54797#.WDnIvmlS00>. [Accessed:27 November 2016].
- [14] H. Musikasang, A. Tani, A. H-kittikun, and S. Maneerat, "Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract," *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, vol. 25, no. 8, pp. 1337–1345, Aug. 2009.
- [15] M. E. Stiles and W. H. Holzapfel, "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy," *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–29, Apr. 1997.
- [16] D. A. A. Mossel, J. E. L. Corry, C. B. Struijk, and R. M. Baird, *Essentials of the Microbiology of Foods: A Textbook of Advanced Studies*, 1 edition. Chichester England ; New York: Wiley, 1996.
- [17] B. K. Ray and M. Daeschel, "Food biopreservatives of microbial origin.," *Microbiological Safety and Quality of Food*. Springer Science & Business Media 1992.
- [18] B. Lund and T. C. Baird-Parker, *Microbiological Safety and Quality of Food*. Springer Science & Business Media, 2000.
- [19] J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas, "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 1–20, Dec. 2001.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [20] M. A. Daeschel, J. Mcguire, and H. Al-Makhlafi, "Antimicrobial Activity of Nisin Adsorbed to Hydrophilic and Hydrophobic Silicon Surfaces," *Journal of Food Protection.*, vol. 55, no. 9, pp. 731–735, Sep. 1992.
- [21] H. K. Sreenath, A. B. Moldes, R. G. Koegel, and R. J. Straub, "Lactic acid production from agriculture residues," *Biotechnology Letters.*, vol. 23, no. 3, pp. 179–184, Feb. 2001.
- [22] G. A. Noskin, L. R. Peterson, and J. R. Warren, "*Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Bacteremia: Acquisition and Outcome," *Clinical Infectious Diseases.*, vol. 20, no. 2, pp. 296–301, Feb. 1995.
- [23] P. Pospiskova, G. Zornikova, M. Kolarova, Z. Sládek, T. Komprda, and J. Gersiova, "Effect of probiotics in the pig nutrition on the pathogenic bacteria counts in the gut," *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, the scientific journal.*, vol. 61, no. 6, pp. 1839–1843, 2013.
- [24] S. N. Bybee, A. V. Scorza, and M. R. Lappin, "Effect of the Probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on Presence of Diarrhea in Cats and Dogs Housed in an Animal Shelter: Probiotics and Diarrhea," *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, vol. 25, no. 4, pp. 856–860, Jul. 2011.
- [25] S. H. Abu Hafsa, A. F. Mendonca, B. F. Brehm-Stecher, A. A. Hassan, and S. A. Ibrahim, "Probiotic Potential and Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* Isolated from Chicken Caecal and Fecal Samples," *International Journal of Food Science and Biotechnology. Eng.*, vol. 9, no. 4, p. 350, 2015.
- [26] M. P. Simonova, "*Enterococcus faecium* CCM7420, bacteriocin PPB CCM7420 and their effect in the digestive tract of rabbits," *Czech Journal of Animal Science*, vol. 54, pp. 376–386, 2009.
- [27] Muralidhara, G. Divyashri, G. Krishna, and S. G. Prapulla, "Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: in vitro and in vivo evidence," *J. Med. Microbiol.*, vol. 64, no. 12, pp. 1527–1540, Dec. 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [28] H. Ghomrassi, "Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 118, no. 1, pp. 31–43, Feb. 2016.
- [29] M. Sarra, G. Taoufik, L. C. Patrick, B. Benjamin, F. Yannick, and H. Khaled, "Isolation and Characterization of Enterococci Bacteriocin Strains from Tunisian Fish Viscera," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 04, no. 06, pp. 701–708, 2013.
- [30] S. R. Couto and M. Á. Sanromán, "Application of solid-state fermentation to food industry A review," *Journal of Food Engineering*, vol. 76, no. 3, pp. 291–302, Oct. 2006.
- [31] Y.-R. Zhang, H.-R. Xiong, and X.-H. Guo, "Enhanced viability of *Lactobacillus reuteri* for probiotics production in mixed solid-state fermentation in the presence of *Bacillus subtilis*," *Folia Microbiologica. (Praha)*, vol. 59, no. 1, pp. 31–36, Jan. 2014.
- [32] C.H. Chi and S.J. Cho, "Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 68, pp. 619–625, May 2016.
- [33] วิเชียร ดวงสีเสน, "การศึกษาการอบแห้งกากมันสำปะหลังโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบตะแกรงหมุน," *วิทยานิพนธ์*, vol. 2555.
- [34] Supawan Tirawanichakul¹, Sakena Lamaepae², Yutthana Tirawanichakul^{3*}, "Combined Infrared/Microwave and Hot Air Drying for Jackfruit: Kinetics, Quality and Sensory Analysis," *Burapha Science Journal. J. 17*, vol. 2012.
- [35] Anusara Nadee¹, Yutthana Tirawanichakul^{2*} and Supawan Tirawanichakul³, "Drying Kinetics of Pandanus Leaf by Infrared Radiation Combine Hot Air and Hot Air," *Burapha Science Journal. J. 17*, vol. 2012.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [36] Supawan Tirawanichakul^{1*}, Salinla Chanchiew² and Yutthana Tirawanichakul^{3*}, “Pennywort Drying using Infrared Radiation: Drying Kinetics, Energy Consumption and Quality Aspect,” *KKU Research Journal*. 2013; 18(2): 311-324, vol. 2013.
- [37] Naowanit Phosee,¹ Pimonphan Khongbutr,¹ Krittikak Uttamating¹ and Rittichai Assawarachan^{1*}, “Effect of temperature on moisture ratio and color changes of mint leaves during hot air drying process,” *RMUTSB Academic Journal*., 1(2) : 103-114 (2013), vol. 2013.
- [38] C. Stefanello, S. L. Vieira, H. V. Rios, C. T. Simões, and J. O. B. Sorbara, “Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease,” *Animal Feed Science and Technology*., vol. 221, pp. 267–273, Nov. 2016.
- [39] Y. Wang, X. T. Liu, H. L. Wang, D. F. Li, X. S. Piao, and W. Q. Lu, “Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs,” *Livestock Science*., vol. 170, pp. 91–99, Dec. 2014.
- [40] T. Kumhom, A. Elkamel, P. L. Douglas, S. Douglas, S. Pongamphai, and W. Teppaitoon, “Prediction of isoflavone extraction from soybean meal using supercritical carbon dioxide with cosolvents,” *Chemical Engineering Journal*., vol. 172, no. 2–3, pp. 1023–1032, Aug. 2011.
- [41] F. de O. Silva, “Soybean meal and fermented soybean meal as functional ingredients for the production of low-carb, high-protein, high-fiber and high isoflavones biscuits,” *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*., vol. 90, pp. 224–231, Apr. 2018.
- [42] M. E. Cayre, O. Garro, and G. Vignolo, “Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions,” *Food Microbiology*., vol. 22, no. 6, pp. 505–512, Dec. 2005.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [43] D. Poddar, "Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method," *International Dairy Journal.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–7, Nov. 2014.
- [44] R. F. Stefanello, "Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents," *Food Research International.*, vol. 115, pp. 90–94, Jan. 2019.
- [45] T. A. McMeekin and T. Ross, "Shelf life prediction: status and future possibilities," *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 33, no. 1, pp. 65–83, Nov. 1996.
- [46] A. C. Ouwehand, S. Salminen, and E. Isolauri, "Probiotics: an overview of beneficial effects," in *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands*, R. J. Siezen, J. Kok, T. Abee, and G. Schasfsma, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002, pp. 279–289.
- [47] M. Arif, "Biochar improves phosphorus use efficiency of organic-inorganic fertilizers, maize-wheat productivity and soil quality in a low fertility alkaline soil," *Field Crops Research.*, vol. 214, pp. 25–37, Dec. 2017.
- [48] L. Lavari, "Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying," *LWT - Food Science and Technology.*, vol. 63, no. 1, pp. 322–330, Sep. 2015.
- [49] M. Chavarri, I. Maranon, and M. C. Villarán, "Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria," *Probiotics*, Oct. 2012.
- [50] E. Ananta, M. Volkert, and D. Knorr, "Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG," *International Dairy Journal*, vol. 15, no. 4, pp. 399–409, Apr. 2005.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [51] D. Ying, J. Sun, L. Sanguansri, R. Weerakkody, and M. A. Augustin, "Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose," *Journal of Food Engineering.*, vol. 109, no. 3, pp. 597–602, Apr. 2012.
- [52] K. Anekella and V. Orsat, "Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying," *LWT - Food Science and Technology.*, vol. 50, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2013.
- [53] B. E. Chavez and A. M. Ledebor, "Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival," *Drying Technology.*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1193–1201, Aug. 2007.
- [54] M. Wirunpan, W. Samedboworn, and P. Wanchaitanawong, "Survival and shelf life of *Lactobacillus lactis* 1464 in shrimp feed pellet after fluidized bed drying," *Agriculture and Natural Resources.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2016.
- [55] X. Wang and G. R. Gibson, "Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine," *Journal of Applied Microbiology.*, vol. 75, no. 4, pp. 373–380, Oct. 1993.
- [56] M. B. Akin, M. S. Akin, and Z. Kirmaci, "Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream," *Food Chemistry.*, vol. 104, no. 1, pp. 93–99, Jan. 2007.
- [57] M. J. Morowitz, E. Carlisle, and J. C. Alverdy, "Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill," *Surgical Clinics of North America.*, vol. 91, no. 4, pp. 771–785, Aug. 2011.
- [58] G. R. Gibson, "Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept)," *Clinical Nutrition Supplements.*, vol. 1, no. 2, pp. 25–31, Jan. 2004.
- [59] T. Ohkusa, Y. Ozaki, C. Sato, K. Mikuni, and H. Ikeda, "Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora," *Digestion.*, vol. 56, no. 5, pp. 415–420, 1995.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [60] J. Ballongue, C. Schumann, and P. Quignon, "Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity," *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement.*, vol. 222, pp. 41–44, 1997.
- [61] J. J. Ahire, K. P. Patil, B. L. Chaudhari, and S. B. Chincholkar, "Bacillus spp. of Human Origin: A Potential Siderophoregenic Probiotic Bacteria," *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 164, no. 3, pp. 386–400, Jun. 2011.
- [62] J. A. Rodríguez-León, J. C. de Carvalho, A. Pandey, C. R. Soccol, and D. E. Rodríguez-Fernandez, "Chapter 4 - Kinetics of the Solid-State Fermentation Process," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, A. Pandey, C. Larroche, and C. R. Soccol, Eds. Elsevier, 2018, pp. 57–82.
- [63] K. McDonald and D. W. Sun, "Predictive food microbiology for the meat industry: a review," *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 52, no. 1–2, pp. 1–27, Nov. 1999.
- [64] S. Khem, M. W. Woo, D. M. Small, X. D. Chen, and B. K. May, "Agent selection and protective effects during single droplet drying of bacteria," *Food Chemistry.*, vol. 166, pp. 206–214, Jan. 2015.
- [65] S. Desmons, H. Krhouz, P. Evrard, and P. Thonart, "Improvement of Lactic Cell Production," in *Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Nineteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-8. 1997, at Colorado Springs, Colorado*, M. Finkelstein and B. H. Davison, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 1998, pp. 513–526.
- [66] M. K. Krokida, V. T. Karathanos, Z. B. Maroulis, and D. Marinou-Kouris, "Drying kinetics of some vegetables," *Journal of Food Engineering.*, vol. 59, no. 4, pp. 391–403, Oct. 2003.
- [67] S. N. F. S. A. Rahman, R. Wahid, and N. A. Rahman, "Drying Kinetics of *Nephelium Lappaceum* (Rambutan) in a Drying Oven," *Procedia - Social and Behavioral Sciences.*, vol. 195, pp. 2734–2741, Jul. 2015.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [68] M. Costa , “The reduction of starch in finishing diets supplemented with oil does not prevent the accumulation of -10 18:1 in lamb meat,” *Journal of Animal Science.*, vol. 95, no. 8, p. 3745, 2017.
- [69] T. Tsironi, E. Dermesonlouoglou, M. Giannoglou, E. Gogou, G. Katsaros, and P. Taoukis, “Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain,” *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 240, pp. 131–140, Jan. 2017.
- [70] M. Basholli-Salihu, M. Mueller, S. Salar-Behzadi, F. M. Unger, and H. Viernstein, “Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices,” *LWT - Food Science and Technology.*, vol. 57, no. 1, pp. 276–282, Jun. 2014.
- [71] A. Dattatreya, M. R. Etzel, and S. A. Rankin, “Kinetics of browning during accelerated storage of sweet whey powder and prediction of its shelf life,” *International Dairy Journal.*, vol. 17, no. 2, pp. 177–182, Feb. 2007.
- [72] ศ. ฟักสกุล, “การผลิตอาหารสัตว์ด้วย *Enterococcus faecium* A028 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่,” *Thesis, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์*, 2560.
- [73] J. Zhou *et al.*, “Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology,” *Journal of Environmental Sciences.*, vol. 23, no. 1, pp. 22–30, Jan. 2011.
- [74] S. L. C. Ferreira *et al.*, “Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 597, no. 2, pp. 179–186, Aug. 2007.
- [75] Y. Mu, H.-Q. Yu, and G. Wang, “A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process,” *Water Research.*, vol. 41, no. 5, pp. 1152–1160, Mar. 2007.
- [76] K. Zajsek and A. Gorsek, “Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora,” *Food and Bioproducts Processing*, vol. 88, no. 1, pp. 55–60, Mar. 2010.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [77] J. Cai and S. Chen, "Determination of Drying Kinetics for Biomass by Thermogravimetric Analysis under Nonisothermal Condition," *Drying Technology.*, vol. 26, no. 12, pp. 1464–1468, Nov. 2008.
- [78] P. F. Stanbury, A. Whitaker, and S. J. Hall, *Principles of fermentation technology*, Reprint. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2003.
- [79] A. Borah, K. Hazarika, and S. M. Khayer, "Drying kinetics of whole and sliced turmeric rhizomes (*Curcuma longa* L.) in a solar conduction dryer," *Information Processing in Agriculture.*, vol. 2, no. 2, pp. 85–92, Sep. 2015.
- [80] R. Sciortino, R. Micale, M. Enea, and G. La Scalia, "A webGIS-based system for real time shelf life prediction," *Computers and Electronics in Agriculture.*, vol. 127, pp. 451–459, Sep. 2016.
- [81] S. Desmons, H. Krhouz, P. Evrard, and P. Thonart, "Improvement of lactic cell production," *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 70, no. 1, pp. 513–526, 1998.
- [82] A. Rodríguez de Olmos, E. Bru, and M. S. Garro, "Optimization of fermentation parameters to study the behavior of selected lactic cultures on soy solid state fermentation," *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 196, pp. 16–23, Mar. 2015.
- [83] C. Stefanello, S. L. Vieira, H. V. Rios, C. T. Simões, and J. O. B. Sorbara, "Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease," *Animal Feed Science and Technology.*, vol. 221, pp. 267–273, Nov. 2016.
- [84] Y. Wang, X. T. Liu, H. L. Wang, D. F. Li, X. S. Piao, and W. Q. Lu, "Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs," *Livestock Science.*, vol. 170, pp. 91–99, Dec. 2014.
- [85] P. Gervais and P. Molin, "The role of water in solid-state fermentation," *Biochemical Engineering Journal J.*, vol. 13, no. 2, pp. 85–101, Mar. 2003.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- [86] E. Rigo, "Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements," *LWT - Food Science and Technology.*, vol. 43, no. 7, pp. 1132–1137, Sep. 2010.
- [87] S. R. Heimer, D. Morrison, and M. S. Gilmore, "Chapter 39 - The Enterococci," in *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman, Eds. Boston: Academic Press, 2015, pp. 717–730.
- [88] C. L. Handa, U. R. Couto, A. H. Vicensoti, S. R. Georgetti, and E. I. Ida, "Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones," *Food Chemistry.*, vol. 152, pp. 56–65, Jun. 2014.
- [89] N. Zhang, D. Li, X. Zhang, Y. Shi, and H. Wang, "Solid-state fermentation of whole oats to yield a synbiotic food rich in lactic acid bacteria and prebiotics," *Food & Function.*, vol. 6, no. 8, pp. 2620–2625, Aug. 2015.
- [90] M. Ayyash, "In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp.," *Food Chemistry.*, vol. 275, pp. 50–58, Mar. 2019.
- [91] H. Oh, Y.-J. Wee, J.-S. Yun, and H.-W. Ryu, "Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor," *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, vol. 107, no. 1, pp. 603–613, Mar. 2003.
- [92] L. V. Reddy, Y.-M. Kim, J.-S. Yun, H.-W. Ryu, and Y.-J. Wee, "L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1," *Bioresource Technology Technol.*, vol. 209, pp. 187–194, Jun. 2016.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Dextrose	20	g
Meat peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Sodium acetate	5	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Ammonium citrate	2	g
Tween	1	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g

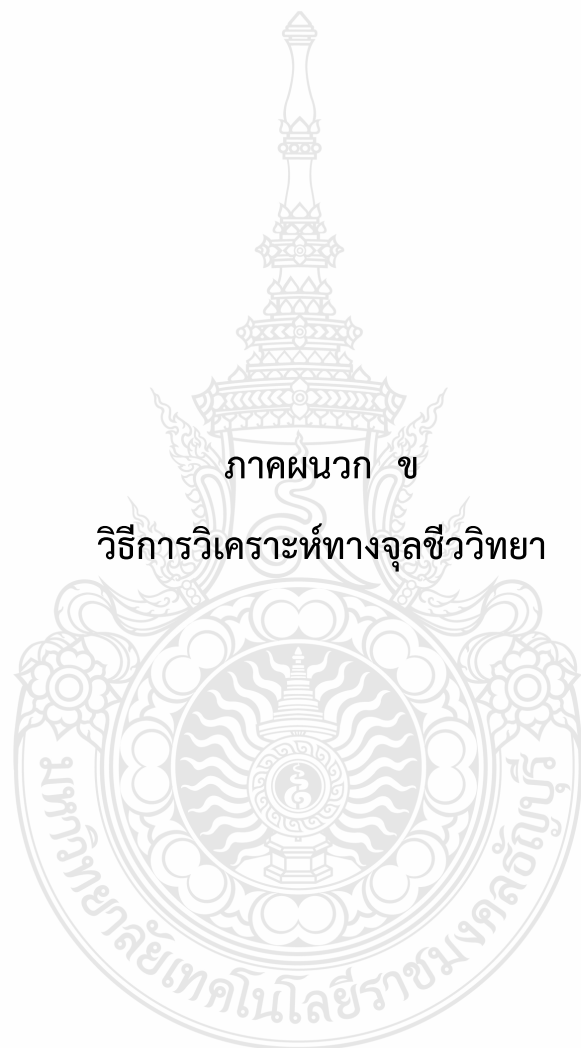
ชั่งเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 55.15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 min

2. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Agar

Dextrose	20	g
Meat peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Sodium acetate	5	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Ammonium citrate	2	g
Tween	1	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
Agar	15	g
CaCO ₃	2	g

ซั่งเลียงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 55.15 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ด้วยอุณหภูมิ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 min





ภาคผนวก ข

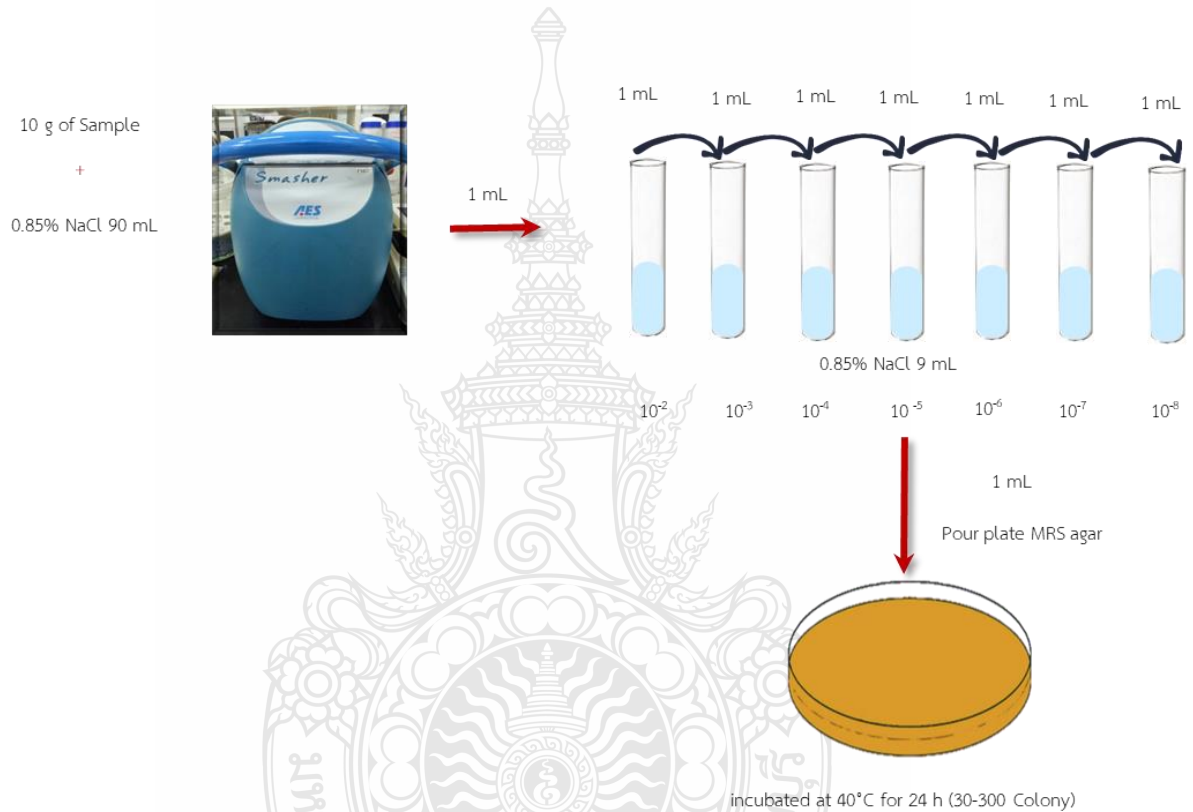
วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

1. วิธีการวิเคราะห์

1.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ต่อ NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยความเร็วรอบ 200 รอบ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปเจือจางด้วย 0.85 % NaCl ใช้เทคนิคการ Pour plate โดยใช้อาหาร MRS Agar ผสมกับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3 แล้วจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต



รูปที่ ข.1 เทคนิคการ Pour plate

ประวัติผู้ดำเนินการทดลอง

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอาทิตย์ยาพัฒนา กัณนิกา
วัน เดือน ปี เกิด 23 กุมภาพันธ์ 2536
ที่อยู่ 14/24 หมู่ 8 ซอยรามอินทรา 65 ถนนรามอินทรา แขวงท่าแร้ง
เขตบางเขน กรุงเทพฯ 10220
ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ประสบการณ์การทำงาน นักวิจัย STEM การผลิตตามโครงการ “การผลิตสารสกัดจากยีสต์ที่
อุดมด้วยนิวคลีโอไทด์โดยการย่อยเอนไซม์เชิงพาณิชย์สำหรับใช้เป็น
อาหารเสริมสำหรับสัตว์” ความร่วมมือกับ BIOWEALTH.CO.LTD
เบอร์โทรศัพท์ 0807756396
อีเมล artitayapanp@gmail.com

