



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปกป้อง *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 จากความร้อนโดยการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อเสริมในอาหารไก่เม็ดและการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

Heat Protection of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Encapsulating with Calcium

Alginate used as Pelleted Feed Additives and Their Fluidized-Bed Drying

นางผู้วิจัย นางสาวณัฏชา วรรณพฤกษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภคมน จิตประเสริฐ, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ธีรพงศ์ ยุกสัน, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วราภรณ์ มาลาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนันท์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปกป้อง *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 จากความร้อนโดยการเ็นแคปซูลด้วย
แคลเซียมอัลจิเนตเพื่อเสริมในอาหารไก่เนื้อและการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

Heat Protection of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Encapsulating with Calcium Alginate used
as Pelleted Feed Additives and Their Fluidized-Bed Drying

โดย

นางสาวณัฏฐา วรรณพฤษย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

ณัฏฐา วรรณพฤกษ์ 2551: การปกป้อง *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 จากความร้อนโดยการ
เอ็นแคปซูลด้วยแคลเซียมอัลจินตเพื่อเสริมในอาหารไก่เนื้อและการทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ ปรินญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กมลน จิตประเสริฐ, Ph.D. 91 หน้า

การเอ็นแคปซูล *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วยแคลเซียมอัลจินตมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการ
รอดชีวิตจากสภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูล ซึ่งมีปัจจัยที่
ศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์) และความเร็วรอบในการกวน (200,
250 และ 300 รอบต่อนาที) และมีดัชนีชี้วัด คือ ผลได้ของเม็ดเชื้อในช่วงขนาด 400-1200 ไมโครเมตร พบว่า
สภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์ และความเร็วรอบในการ
กวน 200 รอบต่อนาที ซึ่งให้ผลได้เป็น 60.83, 60.47 และ 60.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มี
นัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการทดสอบความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนในน้ำที่อุณหภูมิ 75
องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลรอดชีวิตมากกว่าเชื้ออิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) โดย
เชื้ออิสระรอดชีวิต 1.16×10^6 CFU/g ที่เวลา 100 วินาที สำหรับเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูล พบว่าการใช้ความเข้มข้น
0.05 โมลาร์ มีการรอดชีวิตแตกต่างจากที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) โดยที่
100 วินาที มีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 5.61×10^6 , 1.32×10^7 และ 7.95×10^7 CFU/g ตามลำดับ เมื่อผ่านการอัดเม็ดอาหารไก่ที่
อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-30 วินาที เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตมากกว่าเชื้อ
อิสระ ซึ่งมีเชื้อรอดชีวิตเฉลี่ยเหลือเป็น 2.93×10^5 และ 3.23×10^6 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้นก่อนการอัดเม็ด 2.30×10^9
และ 1.85×10^9 CFU/g สำหรับเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูล ตามลำดับ การการทำแห้งแบบ
ฟลูอิดซ์ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ คือ เม็ดเชื้อ 50 กรัม อุณหภูมิ 30 ± 2 องศา
เซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที เวลา 45 และ 60 นาที เมื่อเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ
4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 2.36×10^{10} และ 7.16×10^9 CFU/g และความชื้น
เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 20.16 และ 15.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่เม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้งสามารถเก็บรักษาได้
14 วัน โดยปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 1.16×10^{11} CFU/g และมีความชื้นเฉลี่ย 92 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นพบการ
ปนเปื้อน ฉะนั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลเพื่อป้องกันเชื้อจากความร้อนในการเสริมในอาหารไก่
เนื้อ คือ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.10 โมลาร์ ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที และเม็ดเชื้อที่
ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดซ์มีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 3 เดือน

Natcha Vannapruk 2008: Heat Protection of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Encapsulating with Calcium Alginate used as Pelleted Feed Additives and Their Fluidized-Bed Drying. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pakamon Chitphasert, Ph.D. 91 pages.

The encapsulation of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 with calcium alginate was conducted to increase the survival of the probiotics from pelleting process. In this study, the encapsulating factors including of the concentration of CaCl_2 (0.05, 0.10 and 0.20 M) and mixing speed (200, 250 and 300 rpm) were investigated. The results showed that the optimal conditions giving the desirable bead size range of 400-1200 μm were 0.05, 0.10 and 0.20 M CaCl_2 and 200 rpm, providing 60.83, 60.47 and 60.74% yield, respectively, which were not statistically different ($p>0.05$). The heat protection ability of the gel beads tested by incubating the samples in the water bath at 75°C revealed that the survival of the encapsulated cells was significantly higher than that of the free cells ($p\leq 0.05$). At the longest incubating time (100 s), the remaining free cells were 1.16×10^6 CFU/g, while those of encapsulated cell with 0.05, 0.10 and 0.20 M CaCl_2 were 5.61×10^6 , 1.32×10^7 and 7.95×10^7 CFU/g, respectively. When the free cells and encapsulated cell were subjected to the pelleting process at 75°C for 25-35 s, the remaining cells were 2.93×10^5 CFU/g. and 3.23×10^6 CFU/g from the initial cells of 2.30×10^9 CFU/g and 1.85×10^9 CFU/g, respectively. To increase the shelf life of the probiotic beads, the fluidized-bed drying experiment was carried on. The optimal drying condition was the air temperature of $30\pm 2^\circ\text{C}$, air velocity of 2.25 m/s and drying time of 45 and 60 min for the bead weights of 50 g. For 3 month storage at 4°C , the survived cells of 45 and 60 min drying time were 2.36×10^{10} CFU/g and 7.16×10^9 CFU/g with the moisture contents of 20.16 and 15.59%, respectively. On the other hand, the encapsulated cells without drying were contaminated after 14 days of storage with the survived cells of 1.16×10^{11} CFU/g and the moisture content of 92%. Therefore, the optimal condition of protecting the probiotics from the pelleting process was 0.10 M CaCl_2 and 200 rpm, and the shelf life of the fluidized-bed dried beads was at least 3 month period.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภคมน จิตประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนคอยให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณ ดร. รังรอง ยกसान กรรมการวิชาเอก ดร. วรรณ มาลา พันธุ์ กรรมการวิชารอง รองศาสตราจารย์ ดร. สุริยา ตันติวิวัฒน์ ผู้แทนบัณฑิต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนก อมรเทวภัทร ที่สละเวลาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไม่ได้หากไม่มีกำลังใจที่สำคัญของพ่อแม่และพี่สาวทั้งสี่คน ตลอดจนการดูแลเลี้ยงดูและให้ความเข้าใจข้าพเจ้าในทุก ๆ ด้านจนกระทั่งมาถึง ณ จุดนี้ได้ รวมทั้งกำลังใจจากญาติ ๆ ทุกคน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้า และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ขอบคุณกำลังใจ ความช่วยเหลือและมิตรภาพที่ดีจาก จ๊อบ จีบ กระป๋อง วิ ดิงลี่ จอย กวาง อร และเพื่อน ๆ รุ่นปี 2547 ทุกคน พี่ ๆ ปรินญาโทและเอก และน้อง ๆ ปรินญาตรี ในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ขอขอบคุณพ่อแม่พี่สาวที่แสนดีที่คอยช่วยเหลือ ดูแลและให้กำลังใจข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ณัชชา วรรณพฤกษ์

ตุลาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
สรุป	48
ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	51
ภาคผนวก	60
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	61
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	64
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบในด้านต่าง ๆ ของการเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค อิเล็กโตรพอร์ชันและอิมัลชัน	16
2	ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อผลได้ของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินเตและขนาดเฉลี่ยของเมดเชื้อ	30
3	ปริมาณความชื้นของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์	31
4	ผลของความเร็วยรอบในการกวนต่อผลได้ของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการ เอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินเตและขนาดเฉลี่ยของเมดเชื้อ	33
5	ปริมาณความชื้นของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเร็วยรอบในการ กวน	34
6	ปริมาณเชื้อรอดชีวิตของ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วย แคลเซียมอัลจินเตจากสภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่	41
ตารางผนวกที่		
ค1	การกระจายขนาดของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชัน ด้วยแคลเซียมอัลจินเตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์	68
ค2	การกระจายขนาดของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชัน ด้วยแคลเซียมอัลจินเตเมื่อแปรผันความเร็วยรอบในการกวน	70
ค3	ผลได้ของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วย แคลเซียมอัลจินเตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์	72
ค4	ผลได้ของเมด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วย แคลเซียมอัลจินเตเมื่อแปรผันความความเร็วยรอบในการกวน	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค5 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และ ความเร็วรอบในการกวน (ซ้ำที่ 1)	76
ค6 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และ ความเร็วรอบในการกวน (ซ้ำที่ 2)	78
ค7 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และ ความเร็วรอบในการกวน (ซ้ำที่ 3)	80
ค8 ปริมาณความชื้นของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ แคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวน	82
ค9 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่รอดชีวิตจากการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ของเชื้ออิสระและเชื้อที่ ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ความ เข้มข้นต่าง ๆ ในหน่วยโมลาร์	83
ค10 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการอัดเม็ดอาหารไก่ด้วยอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 25-30 วินาที	85
ค11 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แล้วอัดเม็ดอาหารไก่ด้วยอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 25-30 วินาที	85
ค12 สภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่	86
ค13 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ	87
ค14 ปริมาณความชื้นของ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันและทำ แห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ	87
ค15 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันและเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน	88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค16 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันและผ่านการทำแห้ง 45 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน	88
ค17 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันและผ่านการทำแห้ง 60 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน	89
ค18 ความชื้นของเม็ด <i>L.reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์และ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน	90

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แผนภาพกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ชนิดเม็ดจคม	11
2 เทคนิคการเอ็นแคปซูลเลชันจุลินทรีย์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแบบเอ็กซ์ทรูชันและ อิมัลชัน	15
3 โครงสร้างทางเคมีของอัลจิเนตที่มีองค์ประกอบเป็น D-mannuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G)	18
4 โครงสร้าง egg box ของเจลแคลเซียมอัลจิเนต	18
5 ลักษณะการกระจายขนาดของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้น ของแคลเซียมคลอไรด์	32
6 ลักษณะการกระจายขนาดของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเร็วรอบ ในการกวน	36
7 ปริมาณ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่รอดชีวิตจากการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ	38
8 ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตและทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ	43
9 ปริมาณความชื้นของ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตและทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ	44
10 ปริมาณเชื้อรอดชีวิตของ <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตแล้วทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	46
11 ปริมาณความชื้นของเม็ด <i>L. reuteri</i> KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วย แคลเซียมอัลจิเนตแล้วทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	47

การปกป้อง *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 จากความร้อนโดยการเอ็นแคปซูลชัน
ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อเสริมในอาหารไก่เม็ดและ
การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

Heat Protection of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by Encapsulating with
Calcium Alginate used as Pelleted Feed Additives and
Their Fluidized-Bed Drying

คำนำ

ปัจจุบันธุรกิจการเลี้ยงไก่เนื้อได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งในด้านการส่งออกและการบริโภคภายในประเทศ โดยในด้านการส่งออกมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยส่งออกไก่เนื้อได้มากกว่า 300,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 29,438 ล้านบาท (สำนักงานการค้าต่างประเทศ, 2550) ซึ่งตลาดส่งออกที่สำคัญของไทย ได้แก่ ญี่ปุ่น และสหภาพยุโรป

จากสภาวะการแข่งขันที่สูงขึ้นในตลาดโลกจึงมีการใช้สารปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ต่าง ๆ ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตให้มีคุณภาพและปริมาณมากขึ้นเพื่อให้ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค และสำหรับการส่งออกนั้นการใช้สารปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่เป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากอาจทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคมีการพัฒนาจนดื้อยาได้ และหากตกค้างในเนื้อไก่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Gustafson and Bowen, 1997; Ahmad, 2006) และจากมาตรการป้องกันความปลอดภัยผู้บริโภคของสหภาพยุโรปที่เป็นตลาดคู่ค้าที่สำคัญซึ่งได้มีนโยบายปฏิเสชนำเข้าไก่ที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องและเกิดการตกค้างในไก่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อตรงต่อการส่งออกไก่ของไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อหาสิ่งทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะดังกล่าว

การเสริมโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารไก่เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหการใช้สารปฏิชีวนะได้ โดยโปรไบโอติกต้องสามารถเจริญเติบโตและรอดชีวิตจากสภาวะต่าง ๆ ในการผลิตอาหารและมีจำนวนในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 10^6 - 10^7 CFU/g (FAO/WHO, 2001) ทั้งนี้โปรไบโอติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ใน

ระบบทางเดินอาหารโดยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Chandramouli *et al.*, 2004) จึงช่วยให้ระบบการย่อยอาหารของไก่ดีขึ้น สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้ไก่มีสุขภาพดีและมีอัตราการแลกเนื้อสูง (Guarner and Schaafsma, 1998; Pascual *et al.*, 1999; Arslan, 2004; Ahmad, 2006) อาหารไก่เม็ดเป็นอาหารรูปแบบที่นิยมนำมาใช้เพื่อเลี้ยงไก่เนื้อ เนื่องจากข้อดีในด้านการขนส่งและต่อสุขภาพของไก่ แต่การใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารไก่อัดเม็ดยังมีข้อจำกัดจากการที่ขั้นตอนการคลุกไอน้ำและการอัดเม็ดมีอุณหภูมิสูงประมาณ 65-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 นาที (Kirkpinar and Basmacioglu, 2006) ทำให้การรอดชีวิตของเชื้อดำ โดยเมื่อเสริม *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ในรูปแบบเชื้ออิสระในอาหารไก่เม็ดที่ผลิต ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-30 วินาที พบว่าเชื้อรอดชีวิตในปริมาณ 10^1 - 10^2 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/g (Pungsungworn, 2551) ซึ่งปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในไก่

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการปกป้อง *L. reuteri* KUB-AC5 จากสถานะการคลุกไอน้ำในกระบวนการผลิตอาหารไก่เม็ด โดยการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตตามวิธีอิมัลชัน ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเอนแคปซูเลชันในด้านการกระจายขนาดและการปกป้องเชื้อเพื่อให้เชื้อทนความร้อนได้สูง และศึกษาการยืดอายุการเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันโดยการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ ผลที่ได้จากการทดลองสามารถใช้บ่งบอกความเป็นไปได้ในการผลิตอาหารไก่เม็ดเสริมโปรไบโอติก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการเอนแคปซูเลชัน *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
2. เพื่อศึกษาเวลาที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบฟลูอิดไดซ์ (fluidized-bed drying) *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนต
3. เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษา *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและการทำแห้งแบบฟลูอิดไดซ์

การตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก

1.1 ความหมายของโพรไบโอติก

โพรไบโอติก (probiotic) เป็นคำในภาษากรีก แปลว่า เพื่อชีวิต (Gibson and Fuller, 2000) ซึ่งนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยของ Lilly and Stillwell (1965) โดยกล่าวว่า โพรไบโอติกเป็นสารชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาและสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่ทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดในระบบทางเดินอาหารรวมทั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่มีประโยชน์ด้วย ในปี ค.ศ. 1974 Paker ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ต่อมา Fuller (1989) ได้ปรับปรุงคำจำกัดความของโพรไบโอติกใหม่เพื่อแก้ไขความสับสนเกี่ยวกับคำว่า สารเคมี โดยให้คำจำกัดความใหม่ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตใช้เป็นอาหารเสริม (feed supplement) มีผลช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ โดยคำจำกัดความที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่นี้เน้นความสำคัญของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ จากนั้นมามีการให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกที่หลากหลายซึ่งสามารถสรุปได้ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วสามารถทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภคในด้านที่อาหารทั่ว ๆ ไปให้ไม่ได้ นั่นคือ สามารถสนับสนุนและส่งเสริมสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันและก่อให้เกิดความสมดุลทางโภชนาการและจุลินทรีย์ในลำไส้ (Males and Johnson, 1990; Guarner and Schaafsma, 1998; Playne, 2002; Isolauri *et al.*, 2004)

1.2 *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

L. reuteri KUB-AC5 คัดแยกโดย Nitisinprasert *et al.* (2000) จากลำไส้ไก่ เป็นโพรไบโอติกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแท่งสั้นแบบคู่ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่มีการสร้างสปอร์ สามารถเจริญเติบโตได้ที่ช่วง pH กว้าง นั่นคือ pH 2-9 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่การเจริญเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ของการเจริญที่สภาวะปกติ แต่อุณหภูมิที่

เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่เรียกว่า แบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ *Salmonella* sp.

Sukyai (2003) ตรวจสอบและระบุลักษณะเฉพาะของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *L. reuteri* KUB-AC5 โดยดัชนีชี้วัดสำหรับผลของสารต้านจุลชีพ คือ การยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* 11 สายพันธุ์ และ *Salmonella* sp. 3 สายพันธุ์ ใช้ส่วนใสจากการเพาะเลี้ยง (cell-free culture supernatant; CS) *L. reuteri* KUB-AC5 แล้วปรับให้ค่า pH ของ CS ต่ำกว่า 5 พบว่า กิจกรรมการยับยั้งเกิดจากอิทธิพลของสารต้านจุลชีพ 2 ลักษณะ คือ การยับยั้งทั้งกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียวและการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และสารอื่น ๆ ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วยอัลตราฟิวดเรชัน พบว่า กรดอินทรีย์อยู่ในส่วน retentate (B) และ filtrate (S) นอกจากนี้การคัดแยกและวิเคราะห์ลักษณะของกรดอินทรีย์ด้วย HPLC ทำให้สันนิษฐานได้ว่า B และ S เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและต่ำตามลำดับ โดย B และ S ผลิตจาก KUB-AC5 ซึ่งไวต่อการย่อยของเอนไซม์ protease type XIII และ pepsin A ตามลำดับ ผลความไวต่อเอนไซม์ดังกล่าวของ B และ S มีลักษณะเหมือนกับสารต้านจุลชีพชนิดแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like inhibitory substance; BLIS) จากข้อจำกัดของ BLIS ทำให้เห็นว่า สารต้านจุลชีพ B และ S มีกิจกรรม 100-200 AU/ml โดย KUB-AC5 สามารถผลิตสารต้านจุลชีพชนิด S ซึ่งแสดงกิจกรรมในช่วงเวลาที่ 12-24 BLIS และสารต้านจุลชีพ B จาก KUB-AC5 แสดงกิจกรรมในช่วงเวลาที่ 24-48

Hamsupo (2005) ศึกษาผลของการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อความคงตัวของ *L. reuteri* KUB-AC5 โดยผสม skim milk 20 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทำแห้ง คือ อุณหภูมิเข้า 170 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิออก 85 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์การผลิตสารต้านจุลชีพและศึกษาอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 118 วัน พบว่า *L. reuteri* KUB-AC5 สามารถเก็บรักษาได้ 118 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยรอดชีวิต 11.3 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือเชื้อมีจำนวนเหลือ 10^8 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้น 10^9 CFU/g ซึ่งวิธีการทำแห้งนี้ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง *Salmonella* sp.

Nitisinprasert *et al.* (2006) ศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกกับผนังลำไส้ โดยการใช้วิธีทางจุลชีววิทยา เพาะเลี้ยง *L. reuteri* KUB-AC5 ในหลอดทดลอง ในรูปสารละลายที่มีเยื่อผนังลำไส้ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ 21.6 เปอร์เซ็นต์

1.3 การใช้โปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับไก่

การใช้โปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 โดยมีการนำโปรไบโอติกมาผสมกับอาหารสัตว์เพื่อปรับปรุงสุขภาพของสัตว์และเพิ่มความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรค ในขณะนั้นมีการสันนิษฐานว่า โปรไบโอติกมีผลต่อการรักษาอาการท้องร่วงและลดจุลินทรีย์ก่อโรคที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่สนใจประโยชน์ของโปรไบโอติกต่อสุขภาพของสัตว์ เนื่องจากในอดีตมีการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของไก่ ยับยั้งการเกิดโรคที่มีผลทำให้การเจริญเติบโตของไก่ลดลง ซึ่งอาหารไก่กระทรวงทั่ว ๆ ไปมียาปฏิชีวนะ 4-10 กรัมต่อดัน และมีการใช้สารปฏิชีวนะมากกว่า 1 อย่างขึ้นไป เพื่อเป็นการเร่งการเจริญเติบโต โดยมีการทดลองเลี้ยงไก่กระทรวงแบบไม่ให้สารปฏิชีวนะในอาหาร พบว่าลูกไก่มีอาการโตช้าและมีประสิทธิภาพในการใช้อาหารน้อยลง (Ahmad, 2006) อย่างไรก็ตามการใช้สารปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรค อีกทั้งเกิดการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง และมีผลทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อเจ้าถิ่นที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารได้ (Capurso, 2001) จึงมีการนำโปรไบโอติกมาใช้เพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะดังกล่าว โดยหน้าที่ของโปรไบโอติก คือ เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารไก่แล้วต้องสามารถสร้างสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่เป็นโทษต่อไก่ได้ ระลอกการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการแย่งพื้นที่การเจริญเติบโตหรือแย่งอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยย่อยอาหารหรือสารอื่นๆ ที่เป็นโภชนาที่จำเป็นต่อสัตว์ และกระตุ้นให้ภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น (Garriga *et al.* 1998; Ahmad, 2006; Vicente *et al.*, 2007) สำหรับฟาร์มเลี้ยงไก่นั้นมีการใช้โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ซึ่งทำให้ไก่มีการนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายสารอาหารที่ย่อยยาก เช่น การเสริม *Enterococcus faecium* ในอาหารที่ใช้เลี้ยงไก่ พบว่า สามารถช่วยให้เกิดการย่อยเซลลูโลสและดูดซึมนำไปใช้ได้ สามารถปรับปรุงการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเพิ่มอัตราการแลกเนื้อได้ ซึ่งประสิทธิภาพและกิจกรรมของโปรไบโอติกมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Pascual *et al.*, 1999) ลักษณะการเสริมโปรไบโอติกนั้นใช้วิธีให้ไก่ได้รับจุลินทรีย์โดยตรง ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องได้รับการคัดเลือกมาอย่างดีแล้วว่าไม่มีการปนเปื้อน มีลักษณะการทำงานที่เหมาะสมต่อการเป็นโปรไบโอติก มีความคงตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่และไม่เป็นพิษต่อไก่ สำหรับการศึกษาการเสริมโปรไบโอติกมีหลายรูปแบบด้วยกัน ตัวอย่างงานวิจัย ได้แก่

Pascual *et al.* (1999) ศึกษาผลของการเสริม *L. salivarius* CTC2197 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella* Enteritidis C-114 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในไก่ โดยการให้เชื้อโดยตรงทาง

ปากไก่อายุ 1 วัน ซึ่งแปรผันปริมาณเชื้อที่ให้ คือ 10^5 , 10^6 และ 10^8 CFU/g เปรียบเทียบกับการให้ *S. Enteritidis* ปริมาณ 10^8 CFU/g โดยตรงยังกระเพาะข้าวกั้น เมื่อเปรียบเทียบการให้ *L. salivarius* ผ่านทางอาหารไก่ผงและน้ำ พบว่า ปริมาณ *L. salivarius* 10^5 CFU/g ที่ลูกไก่แรกเกิดได้รับเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในไก่ได้ โดยเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์ เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารไก่ และหลังจาก 21 วัน ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ขณะเดียวกันตรวจพบ *L. salivarius* CTC2197 ปริมาณ 10^8 CFU/g

Jin *et al.* (2000) ศึกษาผลของการใช้ *Lactobacillus* sp. ที่มีความสามารถในการยิดเกาะที่ผนังลำไส้เสริมในอาหารผงที่ใช้เลี้ยงต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลไลติก (amylolytic) ไลโปไลติก (lipolytic) โปรติโอไลติก (proteolytic) เบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) และเบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ในลำไส้เล็กของไก่กระตังตั้งแต่ปลายลำไส้เล็กตอนต้นถึงลำไส้เล็กตอนปลาย ปริมาณเชื้อที่ใช้ คือ 2×10^9 CFU/g โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มอาหารที่ไม่เสริม *Lactobacillus* sp. กลุ่มที่เสริม *L. acidophilus* I26 และกลุ่มที่เสริม *Lactobacillus* sp. 12 สายพันธุ์ (*L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ *L. fermentum* 3 สายพันธุ์ *L. crispatus* 1 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 6 สายพันธุ์) หลังจากเลี้ยงไก่เป็นเวลา 40 วัน พบว่า กลุ่มที่มี *L. acidophilus* และกลุ่มที่มี *Lactobacillus* sp. 12 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตอะไมโลไลติกในลำไส้เล็กได้แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปไลติกและโปรติโอไลติก เบต้ากลูคูโรนิเดส และเบต้ากลูโคซิเดส

Priyankarage *et al.* (2003) ศึกษาผลของโปรไบโอติกชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของไก่กระตัง การทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 อาหารที่ไม่มีการผสมสารใด ๆ (NC) กลุ่มที่ 2 อาหารที่เสริมยาปฏิชีวนะ Zinc bacitracine 0.25 กรัม ต่อ กิโลกรัม (PC) กลุ่มที่ 3 อาหารที่เสริม Protemix 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. (T_1) กลุ่มที่ 4 อาหารที่เสริม G-Probiotic 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย *Saccharomyces cerevisiae*, *L. acidophilus* และ *Streptococcus faecium* (T_2) และ กลุ่มที่ 5 อาหารที่เสริม Hi-yield 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย *Saccharomyces cerevisiae* (T_3) พบว่า ปริมาณและชนิดของโปรไบโอติกมีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่ โดยในช่วง 7-21 วัน ไก่ที่เลี้ยงด้วย PC, T_2 และ T_3 มีน้ำหนักตัวเป็น 560.74, 565.44 และ 551.75 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 21 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการใช้ NC และ T_1 ซึ่งมีน้ำหนักตัวเป็น 524.12 และ 547.76 ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง

Khaksefidi and Ghoorchi (2006) ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus subtilis* ในการเลี้ยงไก่กระทงอายุ 0-21 วัน เพื่อการพัฒนาการเจริญเติบโตและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของไก่ โดยการผสมเชื้อในอาหารไก่ผง และแปรรูปปริมาณเชื้อที่เสริมเป็น 0, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า น้ำหนักตัวของไก่เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณการเสริม *B. subtilis* มากขึ้น ซึ่งเมื่อไก่อายุ 21 วัน มีน้ำหนักเป็น 670, 683 และ 700 กรัม สำหรับการเสริมเชื้อ 0, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันของไก่ซึ่งพิจารณาจากการผลิตแอนติบอดีเมื่อนิดแอนติเจนเข้าเส้นเลือดบริเวณปีกของไก่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบว่า การผลิตแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณการเสริม *B. subtilis* มากขึ้นเช่นกัน

Safalaoh (2006) ศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่กระทง โดยวิเคราะห์น้ำหนัก การใช้อาหารและไขมันที่ช่องท้องของไก่ ซึ่งโปรไบโอติกที่เสริม ได้แก่ *L. plantarum* ATCC8014 และ *L. casei* ATCC7469 โดยผสมกับน้ำที่ให้ไก่กินในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1 : 1000 (โปรไบโอติกต่อน้ำ) ตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งอายุ 49 วัน พบว่า การเสริมโปรไบโอติกทำให้น้ำหนักตัวของไก่เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือ มีน้ำหนักตัว 2094 ± 11 กรัม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่เสริมโปรไบโอติก ($p < 0.05$) ที่มีน้ำหนักตัว 2057 ± 15 กรัม ไขมันที่ช่องท้องลดลงจาก 0.95 เป็น 0.89 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้อาหารสำหรับอาหารที่เสริมและไม่เสริมโปรไบโอติกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Vicente *et al.* (2007) ศึกษาผลของการเสริม *Lactobacillus* spp. ที่เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่กระทง เพื่อลดการตายของไก่ในฟาร์มและทดแทนการให้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยง โดยการผสมเชื้อในน้ำที่ให้ไก่กิน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 CFU/ml พบว่า เมื่อเลี้ยงไก่เป็นเวลา 21-24 วัน การตายของไก่ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยไก่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 2.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ใช้เชื้อดังกล่าวในการเลี้ยง ส่วนในด้านของน้ำหนักตัวของไก่และอัตราการใช้อาหาร พบว่า เพิ่มขึ้นน้อยมากจากการเลี้ยงโดยไม่เสริมโปรไบโอติก

การนำโปรไบโอติกมาผสมในอาหารสัตว์เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีความสนใจอาหารไก่เม็ดเป็นอาหารรูปแบบหนึ่งที่นิยมนำมาเลี้ยงไก่ แต่ในการผลิตอาหารไก่อัดเม็ดมีการเสริมวิตามินหรือเอนไซม์เพื่อการเจริญเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการเสริมจุลินทรีย์ยังมีน้อยมากเนื่องจากปัญหาของการรอดชีวิตของเชื้อ หากสามารถนำโปรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อไก่เสริมในอาหารไก่เม็ดที่มีข้อดีหลายด้านได้ ประโยชน์ที่ไก่ได้รับก็เพิ่มขึ้น จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการเลี้ยงไก่ ถึงแม้ว่าการใช้โปรไบโอติกจะให้ผลดี แต่ต้องระมัดระวังและรู้จักวิธีใช้ เนื่องจากกระบวนการผลิต

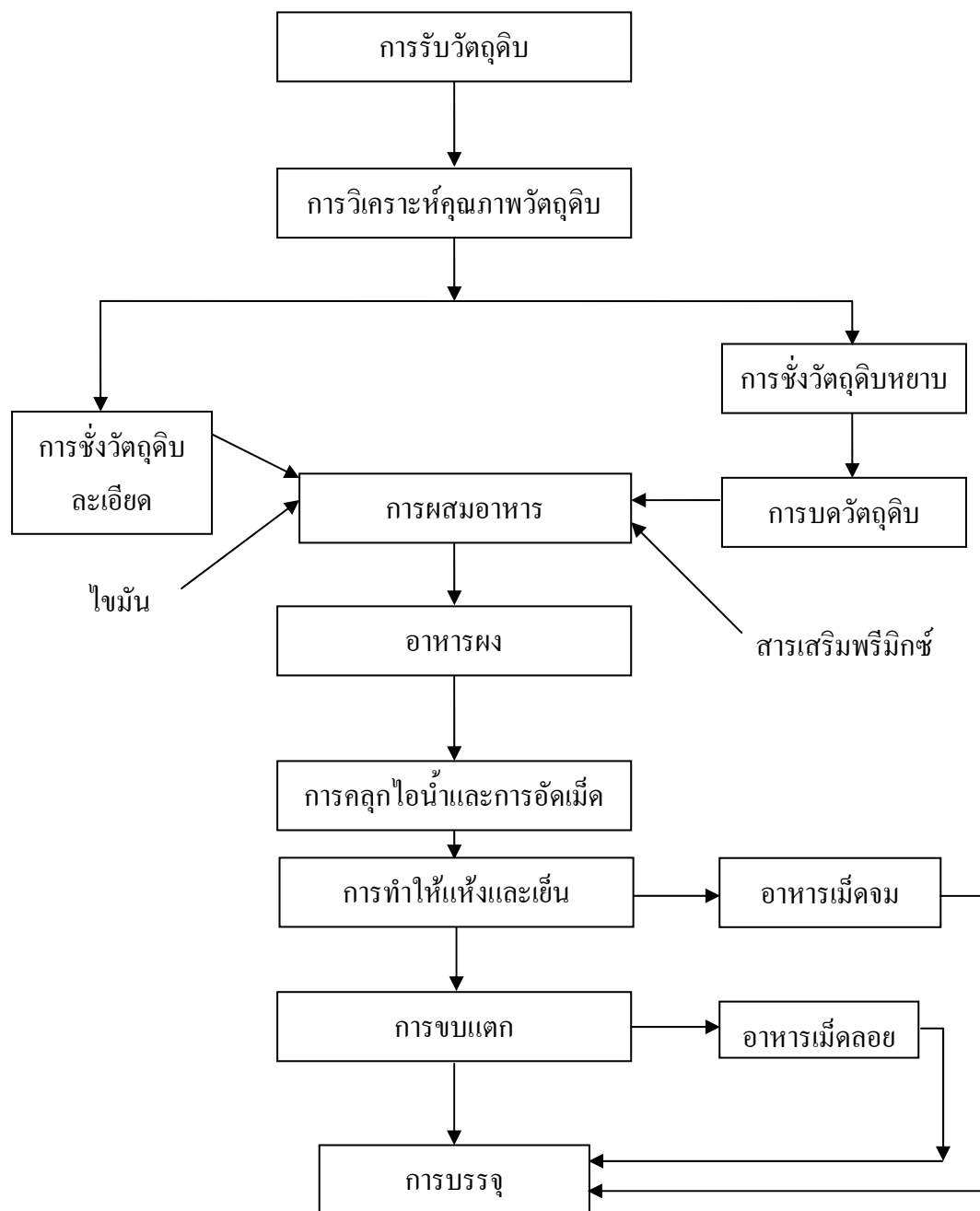
อาหารอาจทำลายจุลินทรีย์เหล่านั้นได้ เช่น กระบวนการอัดเม็ดอาหารไก่ซึ่งใช้ความร้อนสูงในขั้นตอนการคลุกไอน้ำทำให้จุลินทรีย์ตายได้ ซึ่งยังไม่มีรายงานที่ศึกษาการเสริมโปรไบโอติกในอาหารไก่เม็ด หากสามารถเสริมโปรไบโอติกในอาหารไก่ได้จะมีผลดีทั้งด้านประโยชน์และด้านการค้า จึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก แต่ทั้งนี้สิ่งสำคัญ คือ จะต้องรอดชีวิตจากกระบวนการอัดเม็ดอาหารไก่และมีปริมาณที่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในระบบทางเดินอาหารไก่ด้วย

2. อาหารไก่เม็ด

อาหารไก่เม็ดเป็นอาหารเม็ดจมน (hard pellet) ซึ่งเป็นรูปแบบอาหารที่นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงไก่ เนื่องจากเป็นอาหารสำเร็จรูปที่นำวัตถุดิบทั้งหมดมารวมกันด้วยสัดส่วนที่เหมาะสมแล้วอัดเป็นเม็ด (Thomas and van der Poel, 1996) มีลักษณะเป็นแท่งกลมยาวที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ด 4.0-4.2 มิลลิเมตร และความยาว 8.0-10.0 มิลลิเมตร การผลิตอาหารเม็ดจมนเป็นการผลิตอาหารที่ใช้ความร้อน ความชื้น และความดัน ในการขึ้นรูปเม็ดอาหาร ขั้นตอนการผลิตอาหารเม็ดจมนแสดงดังภาพที่ 1

กระบวนการผลิตอาหารสัตว์เม็ดเริ่มจากการรับวัตถุดิบและนำมาตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีตามมาตรฐานที่โรงงานกำหนด โดยสมบัติด้านกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น และขนาดเป็นต้น และสมบัติด้านเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า ดัชนีการย่อยได้ของโปรตีนและสารพิษจากเชื้อรา เป็นต้น จากนั้นวัตถุดิบต่าง ๆ ผ่านการบดเพื่อลดขนาดให้ได้รูปร่างที่สม่ำเสมอและขนาดใกล้เคียงกัน โดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 400-1200 ไมโครเมตร (Nir *et al.*, 1994) ซึ่งการบดมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ เพิ่มความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ เพิ่มประสิทธิภาพการผสมและเพิ่มคุณภาพของเม็ดอาหารให้มีความคงทนหลังการผลิต เมื่อบดวัตถุดิบให้เป็นไปตามช่วงขนาดที่ต้องการแล้วผสมวัตถุดิบโดยใช้ถังผสม ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเนื่องจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการอัดเม็ดและความคงทนของอาหารที่ผลิต รวมทั้งทำให้วัตถุดิบกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงสารอาหารที่สัตว์ได้รับเมื่อกินอาหารเข้าไป การผสมให้วัตถุดิบเป็นเนื้อเดียวกันนั้นมีปัจจัยสำคัญ ได้แก่ ประสิทธิภาพของเครื่องผสมและขั้นตอนการผสมวัตถุดิบ ซึ่งควรผสมวัตถุดิบที่มีปริมาณมากที่สุดหรือวัตถุดิบที่ผสมกันยาก เช่น น้ำมันหรือส่วนผสมที่มีน้ำมันอยู่ก่อน และต้องวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผสมจากการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของการผสม (Coefficient of variation, CV) (Pfof, 1976) โดยถ้าค่า CV น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าประสิทธิภาพของการผสมดีมาก ถ้าอยู่ในช่วง 10-15 เปอร์เซ็นต์ แสดง

ว่าประสิทธิภาพของการผสมดี หรือหากมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าประสิทธิภาพของการผสม
 แยมมาก (Clark, 2006) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการอัดเม็ดซึ่งมีการเพิ่มประสิทธิภาพการอัดเม็ดโดยการ
 คลุกไอน้ำให้สามารถขึ้นรูปเม็ดอาหารได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มความชื้นของวัตถุดิบให้สามารถเกาะตัว
 กันเป็นเม็ดได้ดีขึ้น นอกจากนี้เป็นการกระตุ้นสารเชื่อมธรรมชาติที่มีอยู่ในอาหารผง เช่น โปรตีน
 และแป้ง ให้ทำหน้าที่เป็นสารยึดระหว่างอนุภาคของอาหารผง อุณหภูมิและเวลาในการคลุกไอน้ำ
 ของอาหารไก่มี 2 ประเภท คือ การคลุกไอน้ำชนิดเร็ว ใช้อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-
 30 วินาที และการคลุกไอน้ำชนิดช้า ใช้อุณหภูมิ 65-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 นาที (ณัฐชนก,
 2548; Kirkpinar and Basmacioglu, 2006) เมื่อผ่านการคลุกไอน้ำความชื้นของอาหารเพิ่มขึ้น
 ประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความชื้นสุดท้ายควรอยู่ในช่วง 13-15 เปอร์เซ็นต์ (Thomas *et al.*, 1997)
 เมื่อผ่านการอัดเม็ดแล้วลำเลียงเม็ดอาหารไต่ไปทำให้แห้งและเย็น ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อลดอุณหภูมิ
 ของอาหารเม็ดและระเหยความชื้นที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการคลุกไอน้ำออก ซึ่งมีผลต่ออายุการเก็บ
 รักษาและการปนเปื้อนเชื้อราในระหว่างการเก็บรักษาหรือก่อนการนำไปให้สัตว์กิน โดยอุณหภูมิ
 ของอาหารเม็ดหลังการทำให้แห้งและเย็นไม่ควรเกิน ± 5 องศาเซลเซียส ของอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม
 โดยมีระยะเวลาในการทำให้แห้งและเย็นประมาณ 10-15 นาที ต่อมาเป็นขั้นตอนการขบแตก
 อาหารเม็ดเพื่อใช้สำหรับอาหารไก่เนื้อและอาหารกึ่งกลาดำวัยอ่อน เป็นการทำให้อาหารเม็ดมีขนาด
 เล็กลง ในขั้นตอนนี้ถ้าอาหารเม็ดมีความแข็งดำเกินไป อาจมีปริมาณฝุ่นสูง ดังนั้น เมื่อนำไปผ่าน
 เครื่องขบแตกจะได้อาหารที่เป็นชิ้นต่าง ๆ ไม่เท่ากันและมีฝุ่นมาก ถ้าอาหารไก่เนื้ออัดเม็ดมีค่าความ
 คงทนของอาหารเม็ดต่ำ ซึ่งธรรมชาติการจิกอาหารของไก่เนื้อจะเลือกจิกอาหารที่มีขนาดใหญ่ทำให้
 สมรรถภาพการผลิตลดลง จากนั้นบรรจุในถุง ๆ ละ 25-30 กิโลกรัม



ภาพที่ 1 แผนภาพกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ชนิดเม็ดจมน

ที่มา: ญัฐชนก (2548)

ข้อดีของอาหารไก่เม็ด คือ การทำให้สัตว์ได้รับโภชนาอย่างครบถ้วน ความสะดวกต่อการขนส่งและการขนย้ายซึ่งมีความสำคัญมากในระดับอุตสาหกรรม องค์ประกอบของอาหารเม็ดสมบูรณ์และเป็นสัดส่วน อีกทั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคลดลงจากระบวนการอัดเม็ดที่ต้องผ่าน

การคลุกไอน้ำ โดยเฉพาะ *Salmonella* sp. ทำให้ระยะเวลาในการเก็บรักษานานกว่าอาหารผง (พันทิพา, 2539; Thomas and van der Poel, 1996) ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่มากขึ้น โดยพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของไก่เพิ่มขึ้น 6-9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่กินอาหารผง เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิความร้อนสูงขึ้นสูงขึ้นทำให้แบ่งเกิดการฟองตัวและสุก โปรตีนเกิดการสลายตัว และช่วยให้เซลล์ไขมันแตก เกิดการปลดปล่อยไขมันออกมานอกเซลล์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ในร่างกายของสัตว์สามารถย่อยสลายและนำไปใช้ประโยชน์ได้เร็ว การสูญเสียอาหารน้อยลงจากการเลือกจิกกินอาหาร ลดปัญหาเรื่องฝุ่น (Thomas *et al.*, 1997; Augirre-Guzman *et al.*, 2002) เนื่องจากเมื่อฝุ่นเข้าไปในจมูกของสัตว์ทำให้เกิดการระคายเคือง สัตว์จะกินอาหารได้น้อยลงและพยายามกินน้ำมากขึ้น หรือบางครั้งวัตถุดิบอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์มีลักษณะฟูมาก ทำให้สัตว์กินอาหารได้น้อยลงเป็นผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลงด้วย ในส่วนของผลต่อคุณภาพอาหารสัตว์ด้านกายภาพ คือ ความแข็งและความคงทนของเม็ดอาหาร พบว่า การคลุกไอน้ำมีอิทธิพลโดยตรงต่อความแข็งของอาหารไก่ เม็ดหรือคุณภาพของเม็ดอาหารไก่ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการอัดเม็ดเป็นดัชนีบ่งชี้ปริมาณไอน้ำที่อาหารได้รับก่อนการอัดเม็ด (Thomas *et al.*, 1997)

เนื่องจากขั้นตอนการคลุกไอน้ำมีการใช้อุณหภูมิสูงซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เกิดจากอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การทำงานของเอนไซม์ โดยทำให้กิจกรรมของเอนไซม์และเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ถูกทำลายลงเพราะความร้อนทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จะมีผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2547) ฉะนั้น วัตถุประสงค์ประการหนึ่งของการคลุกไอน้ำ คือ การลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ แต่เมื่อมีการเสริมจุลินทรีย์หรือเอนไซม์เพื่อเป็นสารเสริมให้ไก่ทำให้พบปัญหาในด้านการรอดชีวิตของจุลินทรีย์และการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไป ดังนั้น จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการลดอุณหภูมิและเวลาในการคลุกไอน้ำ เป็นต้น (พันทิพา, 2539; Kirkpinar and Basmacioglu, 2006) นอกจากการปรับเปลี่ยนสถานะในการอัดเม็ดอาหารไก่แล้ว ในงานวิจัยครั้งนี้ซึ่งศึกษาการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารไก่เม็ด ได้มีการปรับปรุงให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตต่อสถานะการผลิตอาหารไก่เม็ด โดยการปกป้องไม่ให้จุลินทรีย์สัมผัสความร้อนหรือสัมผัสความร้อนน้อยลง วิธีการที่ใช้เพื่อการปกป้องจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงต้องเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องจุลินทรีย์และไม่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่เสริมและไก่ที่บริโภคอาหารไก่เข้าไป

3. การเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์

การเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์เป็นการห่อหุ้มจุลินทรีย์ไว้ในโครงสร้างตาข่ายของสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) เช่น คาราจีแนน (carageenan) ไคโตซาน (chitosan) อัลจิเนต (alginate) และโลคัสท์บีนกัม (locust bean gum) เป็นต้น การเอ็นแคปซูลชันสามารถช่วยลดการทำลายและการสูญเสียเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปและไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ (Se-Jin *et al.* 2008) ความเป็นกรดต่างในระบบทางเดินอาหาร (Iyer and Kailasapathy, 2005; Kailasapathy, 2005; Muthukumarsamy *et al.*, 2006) และสภาวะการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์ (Sheu and Marshall, 1993; Krasaekoopt *et al.*, 2006) เป็นต้น โดยประสิทธิภาพในการปกป้องเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ (Adhikari *et al.*, 2000; Sultana *et al.*, 2000; Truelstrup-Hansen, 2002) ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง เวลาที่ทำให้เกิดเป็นเม็ดเจลในสารเชื่อมขวาง (hardening time) (Chandramouli *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004) และอิทธิพลของการกวน (Capela *et al.*, 2007) เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิคการเอ็นแคปซูลชันเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ควรเลือกให้เหมาะสมกับงานที่น่าเชื่อถือไปประยุกต์ใช้

3.1 เทคนิคการเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์

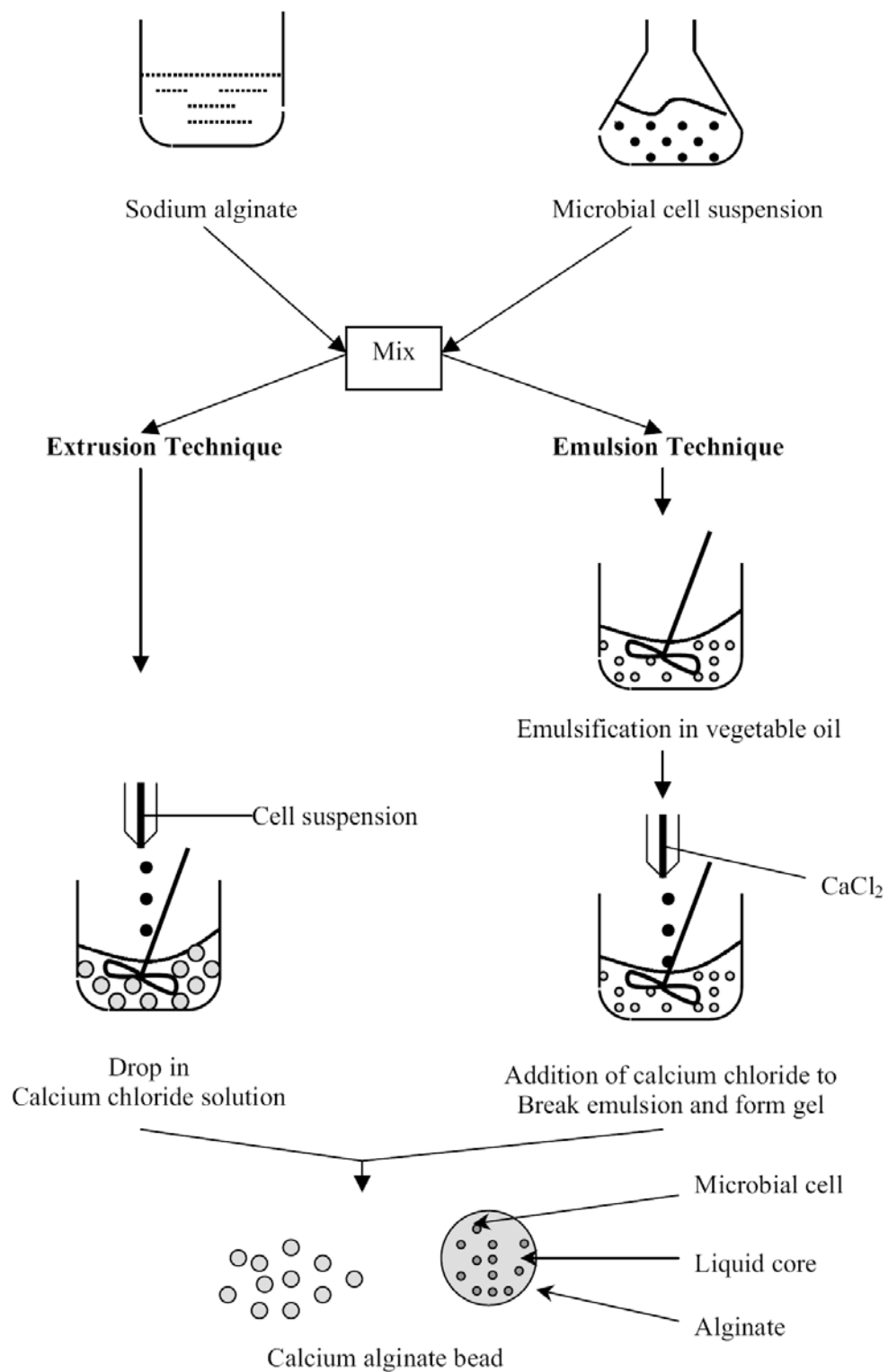
เทคนิคการเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามภาพที่ 2 ดังนี้ (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Grosso and Favaro-Trindade, 2004; Mortazavian *et al.*, 2007)

3.1.1 เอ็กซ์ทรูชัน (extrusion)

การเอ็นแคปซูลชันแบบเอ็กซ์ทรูชันทำโดยผสมไฮโดรคอลลอยด์หรือพอลิเมอร์กับจุลินทรีย์ให้เกิดเป็นสารแขวนลอย จากนั้นหยดส่วนผสมลงในสารละลายเชื่อมขวาง เม็ดเชื้อที่ได้มีขนาดแปรผันตามเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มที่ใช้ ระยะห่างของการหยด เวลาที่แช่อยู่ในสารเชื่อมขวาง ความเร็วรอบในการกวน (Chandramouli *et al.*, 2004; Capela *et al.* 2007) ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และสารละลายเชื่อมขวาง (Khotimchenko *et al.*, 2001) เทคนิคนี้เป็นที่นิยมเนื่องจากขั้นตอนการผลิตง่าย ต้นทุนต่ำและสภาวะไม่รุนแรง

3.1.2 อิมัลชัน (emulsion) หรือระบบ 2 วัฏภาค (two phase system)

การเอ็นแคปซูล์แบบอิมัลชันประกอบด้วย 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคไม่ต่อเนื่อง (discontinuous phase) อันประกอบด้วย สารแขวนลอยของเซลล์กับพอลิเมอร์ (cell-polymer suspension) และวัฏภาคต่อเนื่อง (continuous phase) อันประกอบด้วย น้ำมันพืชและอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) วิธีการเตรียมทำโดยเทวัฏภาคไม่ต่อเนื่องลงในวัฏภาคต่อเนื่องพร้อมการกวนผสมเกิดเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) จากนั้นหยดสารเชื่อมขวางเพื่อเปลี่ยนสภาพสารละลายให้กลายเป็นเจล เทคนิคการเอ็นแคปซูล์แบบอิมัลชันเหมาะสมสำหรับงานที่ต้องการกำลังการผลิตมาก ๆ เนื่องจากง่ายต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต โดยในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคนี้ เนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่เนื้อ



ภาพที่ 2 เทคนิคการเอ็นแคปซูลเซลล์จุลินทรีย์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแบบเอ็กซ์ทรูชันและอิมัลชัน
ที่มา: Krasaekoopt *et al.* (2003)

การเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์แบบอิเล็กโทรซันและอิมัลชันมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบในด้านต่าง ๆ ของการเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรซันและอิมัลชัน

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคอิเล็กโทรซัน	เทคนิคอิมัลชัน
การเพิ่มปริมาณการผลิต	ยาก	ง่าย
ต้นทุน	ต่ำ	สูง
ความสะอาด	มาก	น้อย
การมีชีวิตอยู่ของจุลินทรีย์	80-95 เปอร์เซ็นต์	80-95 เปอร์เซ็นต์
ขนาดของเม็ดเชื้อ	2-5 มิลลิเมตร	25 ไมโครเมตร - 2 มิลลิเมตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก Krasaekoopt *et al.* (2003)

ลักษณะทางกายภาพและเคมีของเม็ดอัลจิเนตที่ผ่านการเอ็นแคปซูลด้วยวิธีอิเล็กโทรซันและอิมัลชันมีความแตกต่างกันที่สภาวะการเอ็นแคปซูลชันเดียวกัน เช่น เม็ดอัลจิเนตที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยวิธีอิมัลชันลักษณะเม็ดไม่เป็นทรงกลมขณะที่วิธีอิเล็กโทรซันมีลักษณะเป็นทรงกลมและแปรผันขนาดตามเข็มที่ใช้ในการหยด จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electrophoresis microscopy; SEM) โครงสร้างภายในเม็ดของวิธีอิมัลชันกระชับกว่าวิธีอิเล็กโทรซัน วิธีอิมัลชันมีปริมาณแคลเซียมภายในเม็ดสูงกว่าวิธีอิเล็กโทรซัน และวิธีอิมัลชันมีปริมาณน้ำที่เหลือในเม็ดย่อยกว่าวิธีอิเล็กโทรซัน (Fundueanu *et al.*, 1999)

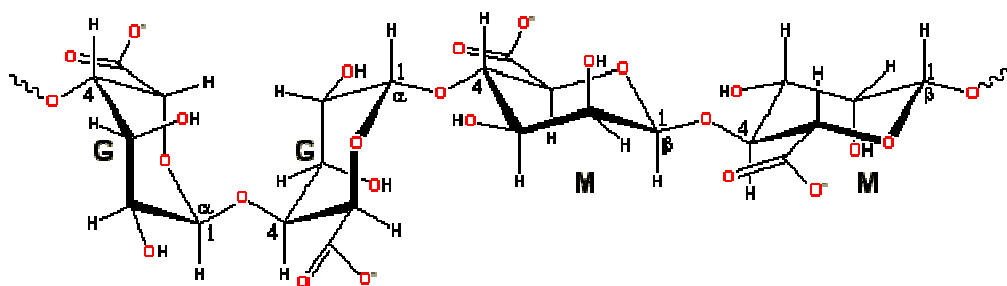
ประสิทธิภาพการเอ็นแคปซูลชันเพื่อปกป้องจุลินทรีย์สามารถยืนยันได้จากงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถในการปกป้องจุลินทรีย์จากสภาวะต่าง ๆ เช่น การแช่แข็ง การแช่เย็น ความเป็นกรด-ด่างในอาหารที่ผสมจุลินทรีย์ สภาวะการเก็บรักษาเม็ดเชื้อและผลิตภัณฑ์หรือสภาวะต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารผู้บริโภค เป็นต้น โดยมีพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเอ็นแคปซูลชันหลายชนิดและแต่ละชนิดต่างมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

3.2 การเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

อัลจิเนตเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล ส่วนใหญ่ได้จาก *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* และ *Ascophyllum nodosum* หรืออาจได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Azotobacter vinelandii* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับอัลจิเนตที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 32,000-200,000 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ร่วมของ D-mannuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) แบบเส้นตรง (ภาพที่ 3) อัตราส่วนของ M และ G แตกต่างกันไปตามแหล่งผลิตซึ่งเป็นผลให้คุณสมบัติแตกต่างกันด้วย โดยอัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะที่เป็นพอลิวาเลนต์ เช่น Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} และ Al^{3+} ซึ่งสามารถจับกับ G ได้ดี โดยเข้าไปแทนที่ H_3O^+ ของอัลจิเนตที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ COO^- เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า egg box (ภาพที่ 4) ทำให้มีโครงสร้างที่แข็งแรงยิ่งขึ้น สามารถเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำ (Nussinovitch, 1997) การเติมกรดที่ละลายในน้ำมันได้ เช่น กรดอะซิติก ทำให้ pH ของสารละลายอัลจิเนตลดลงจาก 7.5 เป็น 6.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดเจล การละลายแปรผันตามค่า pH (Krasaekoopt *et al.*, 2003) ทั้งนี้อัลจิเนตมีข้อจำกัดในการใช้ คือ เม็ดเจลสามารถละลายได้ในสารละลายที่มีไอออนหรือโมเลกุลที่สามารถจับกับ Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} และ Al^{3+} ได้ เช่น PO_4^{3-} , $\text{C}_3\text{H}_5(\text{COO})_3^{3-}$ และ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) เป็นต้น รูปแบบการทำปฏิกิริยาระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ได้เป็นแคลเซียมอัลจิเนตแสดงดังสมการ (Fundueanu *et al.*, 1999)

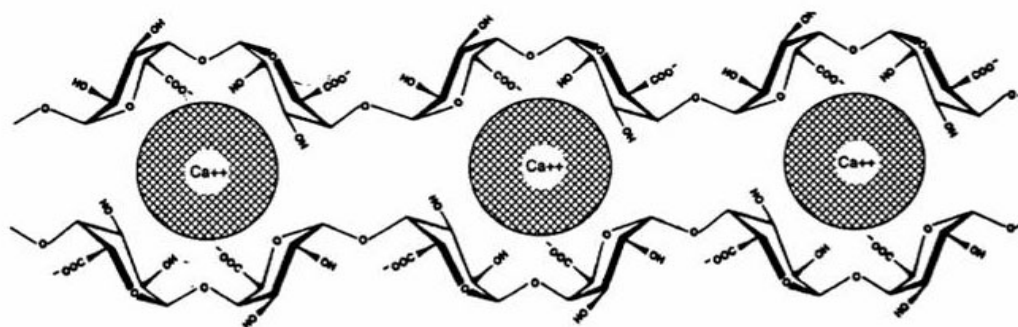


อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เป็นพอลิเมอร์ห่อหุ้มจุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถหาได้ง่าย มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์และผู้บริโภค เซลล์ภายหลังการเอ็นแคปซูลชันมีความคงตัวและมีชีวิต สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ภายในเจล และยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตสารที่ต้องการสูง (Cheetham *et al.*, 1979; Mortazavian *et al.*, 2007) สามารถปกป้องเซลล์จากการสัมผัสความร้อนได้ (Se-Jin *et al.* 2008)



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของอัลจินต์ที่มีองค์ประกอบเป็น D-mannuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G)

ที่มา: Rousseau *et al.* (2004)



ภาพที่ 4 โครงสร้าง egg box ของเจลแคลเซียมอัลจินต์

ที่มา: Rousseau *et al.* (2004)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการเอ็นแคปซูลชันจุลินทรีย์ด้วยแคลเซียมอัลจินต์ ได้แก่

Sheu and Marshall (1993) ศึกษาการเอ็นแคปซูลชัน *Lactobacillus bulgaricus* L2 และ *L. bulgaricus* rr แบบอิมัลชันเพื่อปกป้องเชื้อจากสภาวะการแช่เยือกแข็งน้ำมันที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลชัน คือ โซเดียมอัลจินต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) น้ำมันพืชที่มี Tween 80 อยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยเม็ดเชื้อที่ได้มีขนาดเฉลี่ย 25-35 ไมโครเมตร และการปลดปล่อยเชื้อเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ด้วยการเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที ในสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่า pH เป็น 7.5 เมื่อทดสอบการรอดชีวิตจากสภาวะการแช่เยือกแข็งน้ำมัน พบว่า เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระ 40 เปอร์เซ็นต์

Chandramouli *et al.* (2004) ศึกษาผลของการเอนแคปซูเลชัน *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ *L. acidophilus* CSCC 2409 แบบเอ็กซ์ทราเซลล์ต่อการปกป้องเชื้อจากสภาวะ pH 2 และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร และมีการศึกษาวิธีการเอนแคปซูเลชันเพื่อปรับปรุงให้เป็นมาตรฐานสำหรับการนำไปใช้เพื่อการปกป้องเซลล์ โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ จำนวนเซลล์เริ่มต้น ขนาดเม็ดเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และเวลาที่ทำให้เกิดเป็นเจล (hardening time) พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเอนแคปซูเลชันเพื่อป้องกันเชื้อให้สามารถรอดชีวิตได้ คือ จำนวนเซลล์เริ่มต้นอย่างน้อย 10^9 CFU/ml ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตอย่างน้อย 1.80 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ขณะที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการป้องกันเชื้อ แต่ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเม็ดเชื้อในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ต้องใช้ประมาณ 30 นาที ซึ่งการใช้เวลามากกว่า 30 นาที ไม่ทำให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตมีความแตกต่างกัน เมื่อทดสอบในระบบทางเดินอาหารโดยใช้เม็ดเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอนแคปซูเลชันดังกล่าว พบว่า เชื้อที่ผ่านการ เอนแคปซูเลชันมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตมากกว่าเชื้ออิสระแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ภายใต้สภาวะการทดสอบเดียวกัน โดยที่สภาวะ pH 2 และเกลือน้ำดีจำนวนเชื้ออิสระลดลง 3.0 และ 0.8 log cycle ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันปริมาณเชื้อลดลง 0.5 และ 0.3 log cycle ตามลำดับ แต่การรอดชีวิตของเชื้อเมื่อใช้เม็ดเชื้อขนาด 450 และ 1000 ไมโครเมตร ในการทดสอบสภาวะทั้ง 2 ในระบบทางเดินอาหาร ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Grosso and Favaro-trindade (2004) ศึกษาความคงตัวของ *Bifidobacterium lactic* (Bb-12) และ *Lactobacillus acidophilus* (La-05) ในโยเกิร์ตที่หมักที่ pH 4.2 และนมเปรี้ยวหมักที่ pH 3.8, 4.4 และ 5.0 เปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่า เชื้ออิสระทั้งสองสายพันธุ์สามารถรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดได้ โดยเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีประสิทธิภาพในการปกป้องเชื้อสูงกว่าและทำให้จุลินทรีย์มีความคงตัวในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดีกว่าเชื้ออิสระ สำหรับโยเกิร์ตที่หมักที่ pH 4.2 จำนวนเชื้ออิสระลดลง 3 log cycle ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลดลง 2 log cycle ส่วนในนมเปรี้ยวที่หมักที่ pH 3.8, 4.4 และ 5.0 จำนวนเชื้ออิสระลดลง 2 log cycle ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลดลง 1 log cycle

Capela *et al.* (2006) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเอนแคปซูเลชัน *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* และ *Bifidobacterium* spp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยวิธีอิมัลชัน

กับการเติมสารป้องกันเซลล์ (cryoprotectant) และฟรีไบรโอติก ต่อการรอดชีวิตในโยเกิร์ตและโยเกิร์ตแช่เยือกแข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน โดยสารป้องกันเซลล์ที่ใช้ ได้แก่ Unipeptine™ RS150 และ Satialgine™ GPF639 และฟรีไบรโอติกที่ใช้ ได้แก่ Hi-maize ราฟทิโลส (rafitilose; FOS) และราฟทิไลน์ (rafitiline; inulin) พบว่า การเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจินตจำนวนเชื้อรอดชีวิตเหลือมากกว่าการเติมสารป้องกันเซลล์และฟรีไบรโอติก โดยการเอนแคปซูเลชัน การเติมสารป้องกันเซลล์และฟรีไบรโอติก จำนวนเชื้อลดลงประมาณ 0.31, 0.56 และ 1.42 log cycle จากเชื้อเริ่มต้น 9 log cycle ตามลำดับ

Kraseakoopt *et al.* (2006) ศึกษาผลของการเอนแคปซูเลชัน *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1994, *Lactobacillus acidophilus* 547 และ *L. casei* 01 โดยเทคนิคอิเล็กซ์ทรูชันด้วยแคลเซียมอัลจินตที่เคลือบด้วยไคโตซานต่อการรอดชีวิตของเชื้อในโยเกิร์ตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เม็ดเชื้อมีขนาดเฉลี่ย 1.89 มิลลิเมตร เมื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิต พบว่า *L. casei* 01 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ขณะที่ *B. bifidum* ATCC 1994 และ *L. acidophilus* 547 มีการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน โดยเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันสามารถรอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระประมาณ 1 log cycle ซึ่งเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตเป็น 7.2 และ 8.4 log cycle ตามลำดับ จากเชื้อเริ่มต้น 9 log cycle

Se-Jin *et al.* (2008) ศึกษาผลของการเอนแคปซูเลชัน *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 ด้วยแคลเซียมอัลจินตโดยวิธีอิเล็กซ์ทรูชันต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารจำลองและสภาวะการทดสอบความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที ซึ่งการศึกษาความสามารถในการทนความร้อนมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการปกป้องเชื้อจากการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งใช้อุณหภูมิประมาณ 62.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ได้ศึกษาการย่อยคอเลสเตอรอลและการยึดเกาะในลำไส้ของเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่สภาวะน้ำย่อยกระเพาะจำลอง ที่ pH 1.2 และ 1.5 เชื้อที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันไม่สามารถรอดชีวิตได้ ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีปริมาณลดลงประมาณ 3 และ 2 log cycle ที่ pH 1.2 และ 1.5 ตามลำดับ และที่สภาวะน้ำย่อยลำไส้จำลอง เชื้อที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันมีปริมาณลดลง 1 log cycle ขณะที่เชื้อที่ผ่านการ เอนแคปซูเลชันไม่มีการลดลงของเชื้อ ในส่วนของการทดสอบความร้อน พบว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการ เอนแคปซูเลชันลดลง 3 log cycle ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันลดลง 2 log cycle จากเชื้อเริ่มต้น 1.4×10^7 CFU/ml และ 1.2×10^7 CFU/ml และผลการย่อยคอเลสเตอรอล พบว่าอัตราการลดลงของคอเลสเตอรอลเป็น 35.98 เปอร์เซ็นต์ และ 32.84 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อที่ไม่

ผ่านและผ่านการเย็นแปกชูเลชัน ตามลำดับ และผลการยืดเกาะที่ลำไส้ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน

งานวิจัยเกี่ยวกับการเก็บรักษาเชื้อที่ผ่านการเย็นแปกชูเลชัน โดยส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของการศึกษาอายุการเก็บรักษาเมื่อผสมในผลิตภัณฑ์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่เนื่องจากการนำเชื้อที่ผ่านการเย็นแปกชูเลชันไปประยุกต์ใช้ในอาหารไก่มีคอาจไม่ได้นำมาเชื้อไปใช้โดยทันที จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาเชื้อก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ โดยวิธีการเก็บรักษานั้นไม่ทำให้เกิดความเสียหายกับเชื้อในด้านกิจกรรมของเชื้อและปริมาณเชื้อ

4. การทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ (fluidized bed drying)

การทำแห้งเป็นกระบวนการลดความชื้นวัสดุจนถึงระดับที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เพื่อให้วัสดุมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา ด้วยการถ่ายเทความร้อนและมวลสารไปพร้อม ๆ กัน การทำแห้งมักจะใช้อากาศร้อนเป็นตัวกลาง (drying medium) ในการพาความชื้นออกไปจากวัสดุ

การทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อโดยมีหลักการ คือ การทำให้อนุภาคนำมาทำแห้งลอยตัวอยู่ในอากาศร้อนและสัมผัสกับอากาศร้อนอย่างทั่วถึง โดยที่อุณหภูมิในการทำแห้งมีความสม่ำเสมอ อีกทั้งสามารถเพิ่มอุณหภูมิการทำแห้งได้สูงกว่าวิธีอื่น ๆ ทำให้ระยะเวลาในการทำแห้งลดลง ขนาดของเครื่องทำแห้งเล็กกว่าเครื่องทำแห้งแบบอื่น ๆ จึงไม่เปลืองพื้นที่ในการติดตั้ง (สมศักดิ์, 2528; Bahu, 1991; Syahrul *et al.*, 2002) อัตราการทำแห้งจะเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น เวลาในการทำแห้ง ความชื้นของอนุภาคที่ทำแห้ง อุณหภูมิในการทำแห้ง การไหลเวียนและความสม่ำเสมอของลมร้อนรวมทั้งพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอนุภาคและลมร้อน เป็นต้น (Mujumdar, 1987) ด้วยเหตุนี้ปรากฏการณ์หลักที่เกิดขึ้นกับการทำแห้งด้วยลมร้อน คือ การถ่ายเทความร้อนและมวลสารระหว่างวัสดุและของไหล โดยอาศัยแรงขับเคลื่อนจากความต่างของอุณหภูมิและความชื้น กล่าวคือ ความร้อนสัมผัสจากของไหลจะถูกถ่ายเทสู่วัสดุทำให้ความชื้นระเหยออกไปกับอากาศ ในขณะเดียวกันไอน้ำก็จะเคลื่อนที่จากผิวหน้าวัสดุไปยังอากาศ โดยการไหลเวียนของลมร้อนที่คือนั้นจะทำให้เกิดการถ่ายเทความร้อนและถ่ายเทมวลสาร (heat and mass transfer) เร็วขึ้น ลมร้อนที่มีความชื้นเพิ่มขึ้นจะไหลออกทางด้านบนของคอลัมน์ ทำให้เกิดการถ่ายเทน้ำออกจากอนุภาคนำมาทำแห้งได้อย่างรวดเร็วเป็นผลให้อัตราการทำแห้งเร็วขึ้น (Bahu, 1991)

การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เป็นการใช้ความร้อนแห้งเพื่อระเหยนํ้าออกจากผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งซึ่งในงานวิจัยนี้คือ เม็ดเจล ซึ่งน้ำที่เป็นส่วนประกอบหลัก ได้แก่ นํ้าอิสระ (free water) และน้ำที่เกาะเกี่ยวกับสารอื่น (bound water) นํ้าอิสระเป็นน้ำที่แทรกตัวอยู่ในโครงสร้างของเม็ดเจล อาจมีการเกาะตัวอยู่กับองค์ประกอบของโครงสร้างเม็ดเจล ด้วยแรงที่ไม่แข็งแรงมากนัก สามารถเป็นตัวทำละลายได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีและจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ส่วนน้ำที่เกาะตัวอยู่กับโครงสร้างของเม็ดเจลหรือผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งเป็นน้ำที่เกาะติดด้วยพันธะที่แข็งแรงมาก อาจเป็นพันธะโควาเลนต์หรือพันธะอื่น ๆ ไม่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลาย ไม่มีส่วนในปฏิกิริยาเคมีและจุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ซึ่งการทำแห้งเป็นการลดปริมาณนํ้าอิสระเพื่อไม่ให้จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (วิไล, 2545)

จากความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาในการทำแห้งจะเห็นว่าปริมาณความชื้นลดลงเมื่อระยะเวลาในการทำแห้งเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันปริมาณเชื้อก็มีแนวโน้มลดลงไปด้วย เกิดจากผลของความแตกต่างระหว่างความชื้นหรือปริมาณน้ำที่ผิวเม็ดเชื้อกับอัตราส่วนปริมาณน้ำในช่วงแรกมีการถ่ายเทได้ดี เนื่องจากความชื้นที่ผิวนอกของเม็ดเชื้อมีปริมาณมากแต่เมื่อเวลาผ่านไปการถ่ายเทความชื้นจะเคลื่อนที่จากภายในมาภายนอกก่อนที่จะระเหยที่ผิวเม็ดเชื้อ เป็นผลให้การถ่ายเทความชื้นเกิดได้ยากอัตราการแห้งจึงช้าลง จะเห็นว่าปริมาณความชื้นเริ่มคงที่หลังจากการทำแห้ง 60 นาที ซึ่งตามหลักการทำแห้งแล้วเรียกว่าความชื้นสมดุล (equilibrium moisture content) คือ ค่าความชื้นที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์และจะไม่เปลี่ยนแปลงแม้เพิ่มระยะเวลาในการทำแห้งนานขึ้น นอกจากการเปลี่ยนสภาวะการทำแห้ง (Mujumdar, 1987)

Bayrock and Ingledew (1997) ศึกษาผลของการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) ต่อการรอดชีวิตและปริมาณความชื้น แบ่งเป็นตัวอย่างยีสต์ที่ 1 (บริษัท mann yeast) ซึ่งเก็บเชื้อโดยการใส่ในถุงที่ป้องกันความชื้นแล้วนำไปใส่ในกล่องกระดาษเก็บในตู้เย็น และตัวอย่างยีสต์ที่ 2 (บริษัท Lallemand) ซึ่งเก็บในถุงพลาสติกชนิดที่ป้องกันความร้อนและเย็น (styrofoam) แล้วบรรจุในกล่องปิดผนึกโดยห่อหุ้มถุงเชื้อด้วยผ้าเพื่อรักษาความเย็น โดยต้องทดลองในหนึ่งวันหลังจากได้รับเชื้อโดยไม่ให้อายุของยีสต์เกิน 2 วัน เพื่อลดความแปรปรวนของการทดลอง อุณหภูมิที่ศึกษา คือ 30-80 องศาเซลเซียส ระดับความชื้นที่ต้องการ คือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเชื้อรอดชีวิตของตัวอย่างยีสต์ที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าตัวอย่างยีสต์ที่ 1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำแห้ง คือ 30-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 50 นาที และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็น 37 และ 46 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตัวอย่างยีสต์ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน

Linders *et al.* (1997) ศึกษาผลของการเติมคาร์โบไฮเดรตต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantalum* ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ โดยคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการทำจัดน้ำ ได้แก่ ซอร์บิทอล ซูโครส มอลโทส แลกโตส ทรีฮาโรส กลูโคสและฟรุกโตส สภาวะการทำแห้ง คือ อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง พบว่า เชื้อที่เติมคาร์โบไฮเดรตมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าเชื้อที่ไม่ได้เติมคาร์โบไฮเดรต 10-20 เปอร์เซ็นต์ โดยคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์แตกต่างกัน ซึ่งซูโครสและกลูโคสมีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซอร์บิทอล มอลโทส แลกโตส ทรีฮาโรสและ ฟรุกโตส มีประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

Mille *et al.* (2004) ศึกษาผลของการเติมผงเคซีน (casein power) และกลีเซอรอล 99 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ ต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantalum* โดยสภาวะการทำแห้ง คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที พบว่า ประสิทธิภาพการทำแห้งขึ้นอยู่กับ การเติมผงเคซีนและกลีเซอรอล การเติมผงเคซีนสามารถปกป้องเซลล์ได้ดีกว่าการเติมกลีเซอรอล โดยเมื่อเติมกลีเซอรอลปริมาณเชื้อรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 70 เปอร์เซ็นต์ ค่า aw น้อยกว่า 0.20 ขณะที่เมื่อเติมผงเคซีนปริมาณเชื้อรอดชีวิตเพิ่มขึ้น 2.1 เปอร์เซ็นต์ ค่า aw น้อยกว่า 0.64 นอกจากนี้ ประสิทธิภาพการทำแห้งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดย *L. bulgaricus* มีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่า *L. plantalum* ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

พบรายงานเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเชื้อจากการทำแห้งเชื้อที่ไม่ผ่านการเอนแคปซูเลชันวิธีต่าง ๆ กล่าวว่า การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและแบบฟลูอิดไรซ์ซึ่งมีการเติมสารป้องกันเซลล์ เชื้อสามารถรอดชีวิต 75-100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอยมีเชื้อรอดชีวิต 20 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อไม่เติมสารป้องกันเซลล์ พบว่า การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีเชื้อรอดชีวิตเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทำแห้งแบบพ่นฝอยมีเชื้อรอดชีวิตต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Larena *et al.*, 2003; Yi-Chieh *et al.*, 2004) นอกจากนี้เชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์สามารถเก็บรักษาได้ 90 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Larena *et al.*, 2003) ซึ่งจะเห็นว่า การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์มีข้อดีในด้านของปริมาณเชื้อรอดชีวิต ฉะนั้นจากรายงานดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงข้อดีของการนำวิธีการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์มาใช้เมื่อรวมกับข้อดีของการเอนแคปซูเลชันในแง่ของการปกป้องเชื้อจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแล้ว การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อที่ศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (MLS-3020, Sanyo, Japan)
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (3K18, Sigma, Germany)
3. ตะแกรงร่อน เบอร์ 14, 18, 20, 30, 40 และ 60 (Retsch, Germany)
4. เครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ (6 MAS 1009, Sherwood Scientific, England) พร้อมแผ่นกรองอากาศขนาด 0.1 ไมครอน
5. เครื่องกวนผสมความเร็วสูง (Mechanical overhead stirrer) (RW 20n, IKA Laboratory, Germany) พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ 4 ใบพัด ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 และ 10 เซนติเมตร ความกว้าง 0.5 และ 1 เซนติเมตร ตามลำดับ
6. เครื่องอัดเม็ดอาหารไก่ (Laboratory pellet mill, NH-396165, CPM, U.S.A.)
7. เครื่องกรองสุญญากาศ (SUE 30E, SUE Heto, Denmark)
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (C252, New Brunswick Scientific, U.S.A.)
9. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UVG 111607, Hexios, England)
10. เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Mastersizer APA 2000, Malvern, วัดขนาดอนุภาคที่เป็น wet cell ด้วย Hydro 2000 MU (A), England)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (NE1-14CE, Clifton, England)
12. เครื่องวัดความแข็งของเม็ดยา (แบบมือหมุน, KSL, Thailand)
13. ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ชนิด PET/AL/LLDPE ขนาด 10x13 เซนติเมตร หนา 80 ไมโครเมตร
14. เครื่องผสมอาหารไก่แบบมือ (HM009, OTTO, Thailand)
15. Peristaltic pump (323E, Watson, England)

วิธีการ

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

โปรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เตรียมเชื้อโดยถ่ายเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายโคโลนีบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณเชื้อโดยการถ่ายเชื้อปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เหยี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ปรับปริมาตรเซลล์ที่ได้จากการเหยี่ยงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็น 5 มิลลิลิตร

2. การศึกษาสภาวะการเอ็นแคปซูลชันที่เหมาะสม

วิธีเอ็นแคปซูลชันคัดแปลงจาก Sheu and Marshall (1993) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ผสมสารแขวนลอยเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากข้อ 1 กับโซเดียมอัลจินเต (71238, Fluka, U.S.A. ความหนืด 270 cP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หยดส่วนผสมลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันปาล์มปริมาณ 62.5 มิลลิลิตร ซึ่งผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) กวนผสมด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และแปรผันเป็น 250 และ 300 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง Mechanical overhead stirrer ที่ใช้ใบพัดแบบเทอร์ไบน์ แล้วเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 125 มิลลิลิตร และแปรผันเป็น 0.05 และ 0.20 โมลาร์ ที่อัตราเร็วในการหยด 2.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยหยดลงบริเวณด้านข้างของบีกเกอร์ โดยกวนผสมที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อย่างต่อเนื่อง เมื่อหยดหมดให้กวนผสมต่อ 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของสาร แล้วแยกน้ำมันด้านบนออก ล้างเม็ดเชื้อเพื่อเอาน้ำมันออก 1 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ด้วยเครื่อง Mechanical overhead stirrer ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

กลั่น 2 ครั้ง กรองแยกเม็ดย่อยด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และกระดาษกรองเบอร์ 412 (Albet) วัดการกระจายขนาดของเม็ดย่อยจากแต่ละสภาวะของการเย็นแช่แข็งด้วย Mastersizer 2000 วิเคราะห์ผลได้ของเม็ดย่อย (เปอร์เซ็นต์) 3 ช่วงขนาด ได้แก่ 0.02-400 ไมโครเมตร, 400-1200 ไมโครเมตร และ 1200-2000 ไมโครเมตร โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MATLAB version 7.4 (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเม็ดย่อย (ภาคผนวก ข) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3 การศึกษาความสามารถในการทนความร้อน

3.1 การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมหลอดทดลองขนาด 2.25x20 เซนติเมตร ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมเม็ดย่อยปริมาณ 1 กรัม ควบคุมอุณหภูมิเป็น 75 องศาเซลเซียส โดยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 0, 40, 60, 80 และ 100 วินาที เมื่อครบเวลาแล้วลดอุณหภูมิของน้ำกลั่นให้เป็น ± 5 องศาเซลเซียส ของอุณหภูมิห้อง โดยการแช่หลอดทดลองในน้ำที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปลดปล่อยเซลล์จากเม็ดย่อยด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 7 โดยชั่งเชื้อปริมาณ 0.5 กรัม ละลายในสารละลาย phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 49.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน plate count ด้วยอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 0.6 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ศึกษาการทนความร้อนเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการเย็นแช่แข็ง (free cell) ที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2 การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนจากการอัดเม็ดอาหารไก่

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบอาหารไก่เม็ด

เตรียมอาหารไก่เนื้อ 1 กิโลกรัม ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารไก่กระทุง อายุ 0-21 วัน (ภาคผนวก ก) โดยบดวัตถุดิบอาหารไก่เม็ดแต่ละชนิดให้มีขนาดเล็กกว่า 1200 ไมโครเมตร นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอบวัตถุดิบเพื่อลดความชื้นให้อยู่ในช่วง 8-9 เปอร์เซ็นต์ ผสมเม็ดย่อยขนาดเล็กกว่า 1200 ไมโครเมตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) กับวัตถุดิบอาหารไก่ด้วยเครื่องผสมแบบมือ โดยมีขั้นตอนการผสม คือ ผสมกากถั่วเหลืองกับน้ำมันปาล์ม (ส่วนที่ 1) และเม็ดย่อยกับปลาป่น (ส่วนที่ 2) แล้วผสมส่วนที่ 1 และ 2 เข้า

ด้วยกัน พร้อมเติมสารละลาย propionic acid sodium salt ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นผสมส่วนผสมทั้งหมดกับข้าวโพดป่น

3.2.2 การอัดเม็ดอาหารไก่

ปรับอุณหภูมิในการคลุกไอน้ำในเครื่องอัดเม็ดเป็น 75-80 องศาเซลเซียส และกำหนดระยะเวลาของการสัมผัสไอน้ำเป็น 25-30 วินาที ให้ขนาดเม็ดอาหารไก่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0-4.2 มิลลิเมตร และยาว 8-10 มิลลิเมตร บันทึกสภาวะการอัดเม็ด ได้แก่ อุณหภูมิของเทอร์โมมิเตอร์ที่เครื่องอัดเม็ด (T_p) อุณหภูมิที่วัดได้บริเวณปล่องปล่อยวัตถุดิบก่อนเข้าสู่การอัดเม็ด (T_m) อุณหภูมิตัวอย่างที่ผ่านการอัดเม็ดอาหารไก่ (T_s) เวลาที่เริ่มเก็บตัวอย่าง (t_p) ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ตัวอย่างจนได้อาหารไก่เม็ด (t_{total}) และน้ำหนักอาหารไก่เม็ดที่ได้ (W) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพอาหารไก่เม็ด

การวิเคราะห์คุณภาพอาหารไก่เม็ดประกอบด้วย

ก. การวิเคราะห์ความชื้นก่อนและหลังการผสมเม็ดเชื้อตามวิธีภาคผนวก ข ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ข. การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการผสมด้วยสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation; CV) วิเคราะห์โดยสุ่มตัวอย่างในปริมาณที่คำนวณได้จากสูตรทาโรยามาเน (ภาคผนวก ข) จำนวน 3 จุด

ค. การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อก่อนและหลังการอัดเม็ดโดยวิธีมาตรฐาน plate count ด้วยอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple 0.03 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ propionic acid sodium salt 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปลดปล่อยเม็ดเชื้อที่ผสมในวัตถุดิบก่อนการอัดเม็ดและผ่านการอัดเม็ดอาหารไก่ด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 7

ง. การวิเคราะห์ความแข็ง (hardness) ของอาหารไก่ ด้วยเครื่องวัดความแข็งของเม็ดยา

4. การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ (Fluidized bed drying)

4.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

ทำแห้งเมล็ดเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน ด้วยเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ โดยใช้ปริมาณเมล็ดเชื้อ 50 กรัม อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที และแปรผันเวลาเป็น 0, 15, 30, 45, 60 และ 90 นาที ตรวจนับจำนวนเชื้อรอดชีวิตและวิเคราะห์ปริมาณความชื้นก่อนและหลังทำแห้ง (ภาคผนวก ข) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

4.2 การเก็บรักษาเมล็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

บรรจุเมล็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้งปริมาณ 5 กรัม ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ โดยปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกถุงระบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเมล็ดเชื้อและจำนวนเชื้อรอดชีวิตในวันที่ 0, 7, 14, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน เปรียบเทียบกับเมล็ดเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการทำแห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองของข้อมูลโดยวิธี One-Way ANOVA แบบ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมทางสถิติ spss version 15.0

ผลและวิจารณ์

1. การเอ็นแคปซูลชั้น *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเอ็นแคปซูลชั้น

สภาวะที่เหมาะสมในการเอ็นแคปซูลชั้นโปรไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารไก่เม็ดพิจารณาจากผลได้ของเม็ดเชื้อในช่วง 400-1200 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดวัตถุดิบอาหารไก่ที่เหมาะสม (Nir *et al.*, 1994) ปัจจัยที่มีผลต่อการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อที่ได้จากการเอ็นแคปซูลชั้นมีหลายปัจจัยด้วยกัน แต่ปัจจัยที่ศึกษาครั้งนี้มี 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวน โดยวางแผนการทดลองแบบศึกษาที่ละปัจจัยแล้วคัดเลือกปัจจัยที่มีผลได้มากที่สุดไปศึกษาต่อ

จากการแปรผันทั้ง 2 ปัจจัย พบว่า การแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อซึ่งเห็นได้จากผลได้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2) ขณะที่ความเร็วรอบในการกวนมีผลต่อการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อโดยผลได้ของเม็ดเชื้อลดลงเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาการแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในการเอ็นแคปซูลชั้น พบว่าผลได้ของเม็ดเชื้อในช่วงขนาด 0.02-400 ไมโครเมตร และ 1200-2000 ไมโครเมตร ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) กับความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ โดยที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เม็ดเชื้อมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเชื้อที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ และจากการที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ มีผลได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นั้น แสดงว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อ โดยมีลักษณะกราฟดังภาพที่ 5 แต่การทดลองนี้พิจารณาผลได้ในช่วงขนาด 400-1200 ไมโครเมตร ซึ่งจะเห็นว่าทั้ง 3 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ให้ผลได้ที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้น ทั้ง 3 ความเข้มข้นจึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลชั้น

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อผลได้ของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อ

ความเข้มข้น CaCl_2 (โมลาร์)	ผลได้เฉลี่ย $\pm$ SD (เปอร์เซ็นต์)			$D(3,2)^1$ (μm)
	0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm	
0.05	10.02 ± 1.20^b	60.83 ± 1.57^a	29.15 ± 2.05^a	387.688^a
0.10	13.12 ± 3.90^a	60.47 ± 1.45^a	26.41 ± 4.15^b	367.735^b
0.20	14.10 ± 2.35^a	60.74 ± 1.18^a	25.16 ± 3.30^b	364.294^b

หมายเหตุ ^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

¹ ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อ โดยปริมาตรต่อพื้นที่

เมื่อพิจารณาค่า $D(3,2)$ จากตารางที่ 2 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อโดยปริมาตรต่อพื้นที่ ซึ่งพบว่า ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ เม็ดเชื้อมีขนาดเล็กกว่าที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เนื่องจากเมื่อโครงสร้างของเจลเข้ามาชิดกันมากขึ้นจากการเชื่อมขวางระหว่าง Ca^{2+} กับ L-guluronic acid ทำให้เม็ดเชื้อมีขนาดเล็กลง แต่ทั้งนี้ปริมาณ Ca^{2+} ต้องสัมพันธ์กับสัดส่วนของ L-guluronic acid ของ อัลจิเนตในระบบด้วย การเพิ่มปริมาณจุดเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์เป็นผลให้น้ำถูกกำจัดออกจากโครงสร้างมากยิ่งขึ้น ซึ่งเห็นได้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเม็ดเชื้อ พบว่า ปริมาณความชื้นลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ มีปริมาณความชื้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3)

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ทำให้เม็ดเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีความคงตัวในแง่ของการปกป้องเชื้อจากสภาวะต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเชื้อมีค่าอยู่ในช่วง 0.05-0.20 โมลาร์ สำหรับโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ (Jankowski *et al.*, 1997; Lee and Heo, 2000)

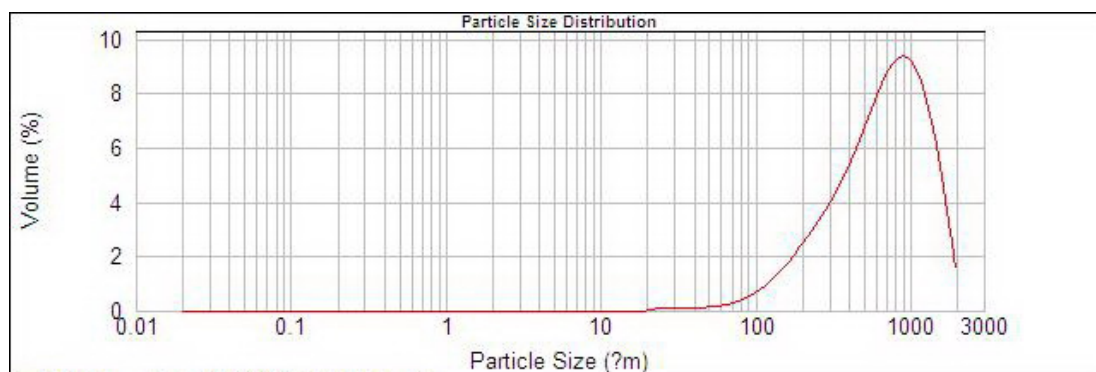
ตารางที่ 3 ปริมาณความชื้นของเมล็ด *L. reuteri* KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (โมลาร์)	ปริมาณความชื้นเฉลี่ย $\pm$ SD (เปอร์เซ็นต์)
0.05	93.87 $\pm$ 0.14 ^a
0.10	91.36 $\pm$ 0.16 ^b
0.20	91.05 $\pm$ 0.12 ^b

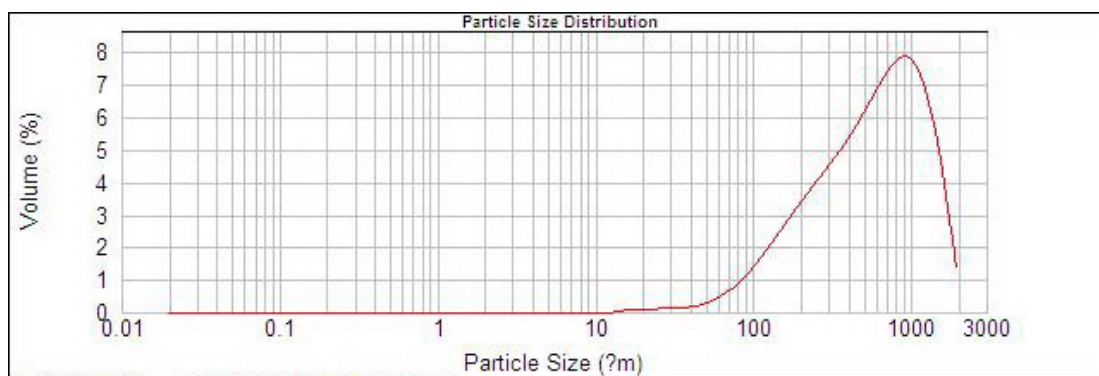
หมายเหตุ ^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

มีงานวิจัยศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดเมล็ดเจลที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตน้อยมาก โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 5.0, 6.0, 7.3, 8.7, 10.0 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ (Silva *et al.*, 2006) โดยงานวิจัยที่ศึกษาดังกล่าวใช้วิธีการเอนแคปซูเลชันแบบอิมัลชัน ซึ่งสอดคล้องกับผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อที่ได้ศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้นงานวิจัยของ Chandramouli *et al.* (2004) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในการเอนแคปซูเลชัน *L. acidophilus* เพื่อปกป้องเชื้อจากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร โดยศึกษา 2 สภาวะ คือ สภาวะ pH 2 และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 5 and 10 กรัมต่อลิตร (Oxgall, Sigma) โดยแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 0.1, 0.2 และ 1.0 โมลาร์ พบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการปกป้องเชื้อเนื่องจากปริมาณเชื้อรอดชีวิตแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งงานวิจัยนี้สันนิษฐานได้ว่าจากการปกป้องเชื้อไม่แตกต่างกันเนื่องจากเมล็ดเชื้อมีขนาดประมาณ 450 ไมโครเมตร โดยแต่ละสภาวะมีขนาดไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีการศึกษาผลของการแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่าง ๆ ต่อความสามารถในการปกป้องเชื้อต่อไป

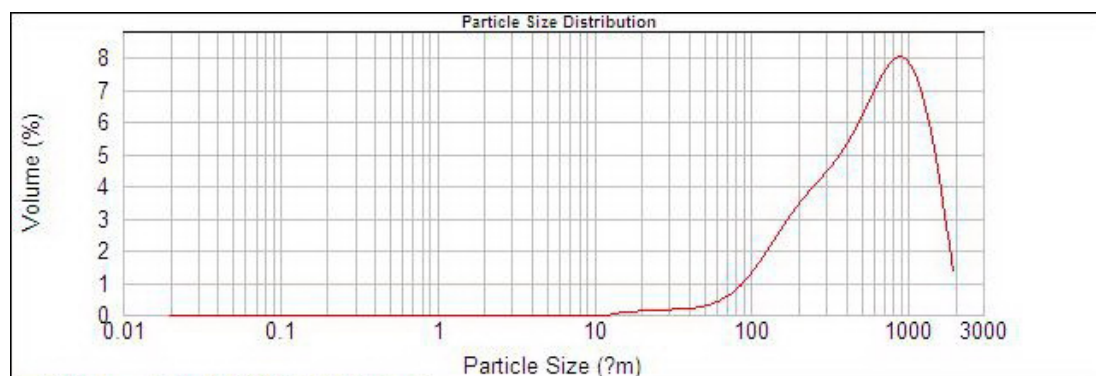
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 5 ลักษณะการกระจายขนาดของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ (ก) 0.05 โมลาร์ (ข) 0.10 โมลาร์ และ (ค) 0.20 โมลาร์

ปัจจัยอีกหนึ่งปัจจัยของการเอ็นแคปซูลเลชันที่ศึกษา คือ ความเร็วรอบในการกวน ซึ่งแปรผันเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที พบว่า ผลได้ลดลงเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น โดยเมื่อพิจารณาผลได้ในช่วงขนาด 0.02-400 ไมโครเมตร และ 1200-2000 ไมโครเมตร พบว่า การแปรผันความเร็วรอบให้ผลได้ของการกระจายขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อความเร็วรอบในการกวนสูงขึ้นเม็ดเชื้อจะมีขนาดเล็กลง ซึ่งมีลักษณะกราฟแสดงดังภาพที่ 6 โดยการกระจายขนาดสอดคล้องกับค่า $D(3,2)$ ที่มีขนาดเล็กโดยนำหาค่าร้อยละของเมื่อความเร็วรอบในการกวนสูงขึ้น แต่สำหรับการทดลองครั้งนี้พิจารณาผลได้ในช่วงขนาด 400-1200 ไมโครเมตร ซึ่งเห็นได้ว่าที่ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที เท่านั้นที่มีการกระจายขนาดที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลเลชัน โดยให้ผลได้ของการกระจายขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับความเร็วรอบอื่น ๆ ดังรายงานเกี่ยวกับผลของความเร็วรอบในการกวนของ Capela *et al.* (2007) ที่ศึกษาการเอ็นแคปซูลเลชันโปรไบโอติกด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยวิธีอิมัลชัน โดยทดสอบผลของการกวนผสมในช่วงก่อนการหดยแคลเซียมคลอไรด์ต่อขนาดของเม็ดเชื้อ สำหรับประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น โยเกิร์ตและนม เป็นต้น โดยพบว่า เมื่อวัดขนาดเม็ดเชื้อด้วย Mastersizer ขนาดเม็ดเชื้อแปรผกผันกับอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อกวนผสมด้วยความเร็วรอบสูง (13,500 รอบต่อนาที) ด้วยเครื่อง Ultra-Turrax benchtop homogenizer เม็ดเชื้อมีการกระจายขนาดไปที่ขนาดเล็กประมาณ 200-500 ไมโครเมตร จากสภาวะปกติ ที่ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที ด้วย magnetic stirrer ที่มีขนาดเม็ดเชื้อ 1300 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4 ผลของความเร็วรอบในการกวนต่อผลได้ของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อ

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ผลได้เฉลี่ย $\pm$ SD (เปอร์เซ็นต์)			$D(3,2)^1$ (μm)
	0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm	
200	11.74 ± 1.82^c	60.43 ± 1.78^a	27.83 ± 1.48^a	354.990^a
250	35.04 ± 4.18^b	49.04 ± 2.20^b	15.92 ± 4.05^b	323.691^b
300	46.15 ± 2.76^a	46.92 ± 3.70^b	6.93 ± 3.11^c	289.760^c

หมายเหตุ ^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

¹ ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อ โดยปริมาตรต่อพื้นที่

ตารางที่ 5 ปริมาณความชื้นของเมล็ด *L. reuteri* KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเร็วรอบในการกวน

ความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)	ปริมาณความชื้นเฉลี่ย $\pm$ SD (เปอร์เซ็นต์)
200	91.32 $\pm$ 0.14 ^a
250	92.19 $\pm$ 0.03 ^b
300	92.85 $\pm$ 0.07 ^c

หมายเหตุ ^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

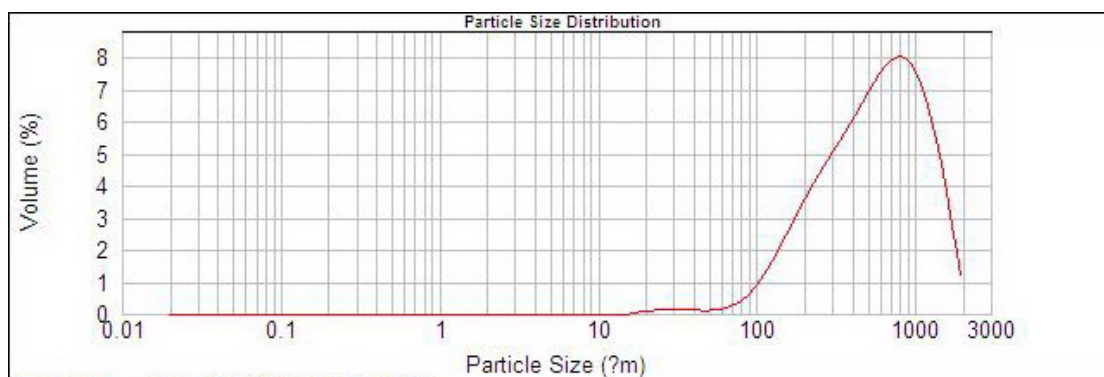
เมื่อพิจารณาปริมาณความชื้นของเมล็ดเชื้อจากการแปรผันความเร็วรอบในการกวนพบว่า ความชื้นของเมล็ดเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5) แม้การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นควบคู่ไปกับการทดลองนี้สามารถชี้วัดได้เพียงว่าเมล็ดเชื้อจากสภาวะต่าง ๆ มีปริมาณน้ำแตกต่างกันอย่างไร ซึ่งประโยชน์ที่ได้จากการวิเคราะห์ครั้งนี้ คือ การนำไปอธิบายความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อน ซึ่งจะกล่าวในส่วนของการศึกษาความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนต่อไป

การที่ความเร็วรอบมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ผลได้นั้น เนื่องจากวิธีการเอ็นแคปซูลชันที่ศึกษาเป็นวิธีอิมัลชัน ซึ่งกลไกหลักของการเอ็นแคปซูลชัน คือ การผสม (mixing) ดังนั้นปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการเอ็นแคปซูลชัน ได้แก่ ความเร็วรอบในการกวน ขนาดใบพัดและระดับสมดุลของใบพัดกับภาชนะที่ใช้ในการเอ็นแคปซูลชัน เป็นต้น (Poncelet *et al.*, 1992) สำหรับการกวนนั้นผลทำให้เกิดความถี่ระหว่างการทำปฏิกิริยามากขึ้น ซึ่งเป็นการส่งเสริมให้เกิดการแพร่ของไอออนเพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการถ่ายโอนมวล (mass transfer) ระหว่างสารมากขึ้น นอกจากนี้การกวนยังเกี่ยวข้องกับแรงเฉือน (shear) ที่เกิดขึ้นในระบบการเอ็นแคปซูลชันด้วย โดยเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนมากขึ้นทำให้เกิดแรงเฉือนในระบบมากขึ้นไปด้วย (สาโรจน์ และคณะ, 2544) และการกวนเป็นการเพิ่มโอกาสให้ Ca^{2+} เข้าทำปฏิกิริยากับ L-guluronic acid ของอัลจินต์มากยิ่งขึ้น

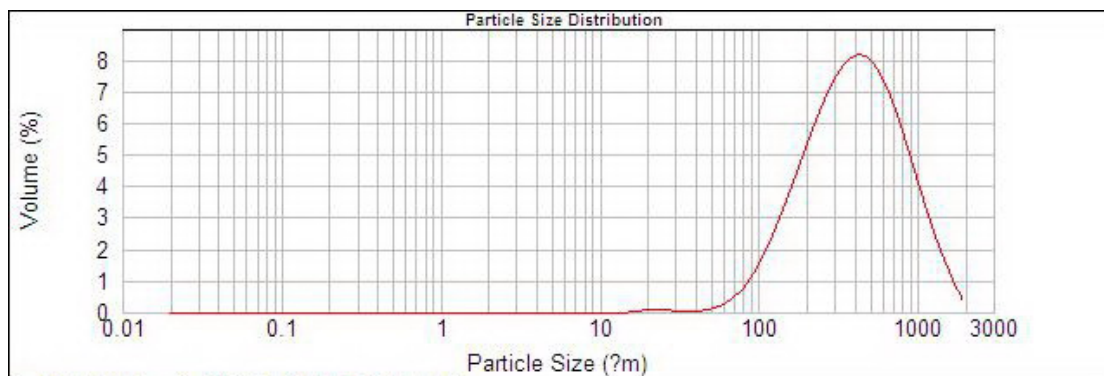
จากการศึกษาจะเห็นว่าผลได้ของการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินต์วิธีอิมัลชันอยู่ที่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาช่วงขนาด 400-1200 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นข้อดีอย่างหนึ่ง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลชันเพื่อนำเมล็ดเชื้อไปผสมในอาหารไก่เนื้อ ในแง่

ของการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อ คือ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์ และความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที (สภาวะ 0.05/200, 0.10/200 และ 0.20/200) เนื่องจากมีผลได้ในช่วงขนาด 400-1200 ไมโครเมตร สูงที่สุด ฉะนั้นการเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการ เอ็นแคปซูลเชื้อเพื่อปกป้องเชื้อจากการอัดเม็ดอาหารไก่จึงต้องใช้เกณฑ์ในด้านความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนในการคัดเลือก เนื่องจากเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการนำเม็ดเชื้อไปใช้ในอาหารไก่เม็ดซึ่งประสบปัญหาในด้านของความร้อนในขั้นตอนการคลุกไอน้ำที่ใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อชีวิตของเชื้อ เพื่อให้ได้มาซึ่งสภาวะการเอ็นแคปซูลเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารไก่จริง ๆ

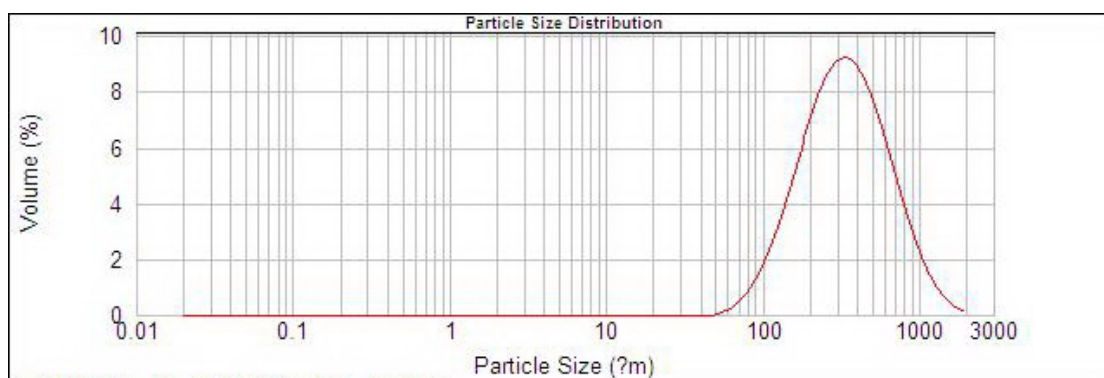
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพที่ 6 ลักษณะการกระจายขนาดของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเร็วรอบในการกวน (ก) 200 รอบต่อนาที (ข) 250 รอบต่อนาที (ค) 300 รอบต่อนาที

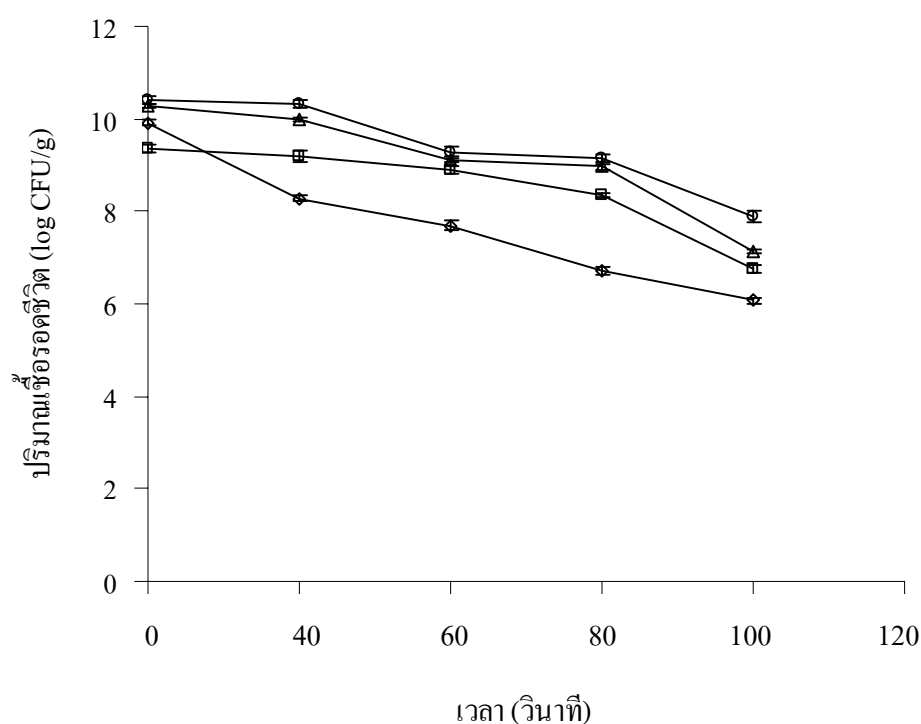
1.2 การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนระดับห้องปฏิบัติการ

การทดลองในระดับห้องปฏิบัติการมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของการเอ็นแคปซูลชันด้วยเคลเซียมอัลจิเนตเพื่อปกป้องโปรไบโอติกจากความร้อน อุณหภูมิที่เลือกใช้ในการทดสอบ คือ อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และแปรผันเวลาที่ใช้ในการทดสอบเป็น 0-100 วินาที เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในช่วงของอุณหภูมิการอัดเม็ดอาหารไก่ที่ 65-85 องศาเซลเซียส และเป็นเวลาที่อยู่ในช่วงของเวลาการอัดเม็ดอาหารไก่ที่ 2-4 นาที ทั้งนี้จากการใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นแหล่งให้ความร้อนกับเม็ดเชื้อที่แขวนลอยในน้ำกลั่น พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิของสารแขวนลอยของเม็ดเชื้อจากอุณหภูมิห้องให้สูงเป็น 75 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 15 วินาที จึงเริ่มจับเวลาของการบ่มเป็น 0 วินาที

ผลการทดสอบความสามารถในการทนความร้อนระดับห้องปฏิบัติการแสดงดังภาพที่ 7 โดยพบว่า จำนวนเชื้อของทุกตัวอย่างลดลงเมื่อสัมผัสกับความร้อนเป็นเวลานานขึ้น โดยเฉพาะเชื้ออิสระ นั่นคือ จากจำนวนเชื้อเฉลี่ย 8.22×10^6 CFU/g ที่ 0 วินาที เหลือเพียง 1.16×10^6 CFU/g ที่เวลา 100 วินาที อย่างไรก็ตาม *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ใช้ในการทดสอบจัดเป็นเชื้อที่ทนความร้อน (thermotolerant) จากรายงานของ Nitisinprasert *et al.* (2000) ที่ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนอุณหภูมิสูงและผลิตสารต้านจุลชีพเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. จากลำไส้ไก่ แม้เชื้อสามารถทนความร้อนได้ในระดับหนึ่ง แต่จากรายงานของ Pungsungworn (2008) ที่ศึกษาผลของการเสริม *L. reuteri* KUB-AC5 ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่เนื้อ โดยใช้เชื้อในรูปเชื้ออิสระผสมกับวัตถุดิบอาหารไก่ในสัดส่วน 1 เปอร์เซ็นต์ อัดเม็ดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-30 วินาที พบว่า เชื้อรอดชีวิต 10^1 - 10^2 CFU/g feed จากเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU/g feed ซึ่งรอดชีวิตเพียง 14-29 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าสภาวะดังกล่าวมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อเป็นอย่างมากและทำให้ปริมาณเชื้อไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ในไก่ ดังนั้นการปกป้องเชื้อจากความร้อนในการอัดเม็ดอาหารไก่จึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเอ็นแคปซูลชันมีประสิทธิภาพในการปกป้องเชื้อให้รอดชีวิตจากความร้อนได้ดีกว่าการที่ให้เชื้อได้รับความร้อนโดยตรง

สำหรับการทดลองนี้เปอร์เซ็นต์การเอ็นแคปซูลชันมีค่าเป็น 96.80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณเชื้อที่ถูกเก็บกักไว้ในเม็ด โดยงานวิจัยครั้งนี้ให้ความสำคัญกับปริมาณเชื้อรอดชีวิตมากที่สุด ดังนั้น เปอร์เซ็นต์การเอ็นแคปซูลชันจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งหากมีค่ามากเท่าไรจะหมายความว่า ปริมาณเชื้อในเม็ดก็ยังมีค่ามาก ทำให้โอกาสที่จะได้เชื้อรอดชีวิตก็มีปริมาณมากขึ้นด้วย

เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการปกป้องเชื้อ โดยความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลชันเป็น 96.81, 96.83 และ 96.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ที่ทุกเวลาของการบ่มตัวอย่าง การใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีการรอดชีวิตน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ ที่เวลา 0, 40, 60 และ 80 วินาที ของการบ่ม



ภาพที่ 7 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่รอดชีวิตจากการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ :—◇— เชื้ออิสระ —□— เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ —△— เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ —○— เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของ Ca^{2+} ต่อความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนของเม็ดเจล ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับโครงสร้างของเม็ดเจล เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดเจลประกอบด้วยของแข็ง ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับโครงสร้างของเม็ดเจล เนื่องจากโครงสร้างของ

เจลประกอบด้วยของแข็ง คือ แคลเซียมอัลจิเนต ส่วนที่เป็นของเหลว คือ น้ำ โดยน้ำที่อยู่ในเม็ดเจลมีปริมาณมากที่สุด ดังนั้นจะเห็นว่าน้ำเป็นปัจจัยที่เด่นชัดมากกว่าพอลิเมอร์ในด้านของการนำความร้อน จึงสามารถอธิบายการส่งผ่านความร้อนในเม็ดเจลต่อความสามารถในการทนความร้อนของเชื้อจากการทดสอบความร้อนได้ว่า เม็ดเจลที่ได้จากสภาวะการเอ็นแคปซูลชันใดมีปริมาณน้ำมากกว่าส่งผลให้การส่งผ่านความร้อนเกิดขึ้นได้มากกว่าด้วย และการรอดชีวิตของเชื้อมีน้อยกว่าตามไปด้วย ฉะนั้น จากการทดลองครั้งนี้การที่สภาวะการใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ มีความสามารถในการปกป้องเชื้อมากกว่าความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เนื่องจากการเชื่อมขวางระหว่าง Ca^{2+} กับ L-guluronic acid (G) ของอัลจิเนตเกิดขึ้นได้มากกว่าทำให้ปริมาณน้ำในโครงสร้างมีปริมาณน้อยกว่า และนอกจากนี้เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ ในการเอ็นแคปซูลชันแล้ว ให้ผลการปกป้องเชื้อไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลทำให้โครงสร้างเม็ดเจลเกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เนื่องจากตามหลักการแล้วเพื่อให้เกิดการดำเนินไปของปฏิกิริยาทางเคมีอย่างสมดุลสำหรับการเชื่อมขวางของเม็ดเจล ต้องมีปริมาณไอออนของสารเชื่อมขวางที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณไอออนของพอลิเมอร์ด้วย ซึ่งการเพิ่มปริมาณไอออนของสารเชื่อมขวางหรือความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์แต่เพียงอย่างเดียวจึงไม่มีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น

การศึกษาของ Se-Jin *et al.* (2008) เกี่ยวกับผลของการเอ็นแคปซูลชัน *L. acidophilus* ATCC 43121 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยวิธีอิเล็กซ์ทรูชันต่อการรอดชีวิตของเชื้อ โดยทดสอบความสามารถในการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 15 และ 30 นาที ด้วยการให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เปรียบเทียบระหว่างเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชัน พบว่า ปริมาณเชื้อรอดชีวิตลดลงเมื่อระยะเวลาในการทดสอบนานขึ้น โดยเฉพาะเชื้ออิสระ ซึ่งมีเชื้อรอดชีวิต 3.50×10^4 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้น 2.00×10^7 CFU/g มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 32.84 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันมีจำนวนเชื้อรอดชีวิต 2.10×10^5 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้น 1.20×10^7 CFU/g และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 35.98 เปอร์เซ็นต์ แม้การใช้อุณหภูมิแตกต่างจากงานวิจัยในครั้งนี้แต่สามารถใช้เป็นการอ้างอิงเกี่ยวกับประสิทธิภาพการเอ็นแคปซูลชันต่อการปกป้องเชื้อได้ ซึ่งการเอ็นแคปซูลชันเชื้อสามารถปกป้องเชื้อจากความร้อนได้ดีกว่าการใช้เชื้ออิสระ และจากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น พบว่า เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตมากกว่าเชื้ออิสระประมาณ 2 log cycle และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางต่อความสามารถในการปกป้องเชื้อ พบว่า ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารไก่เม็ด โดยพิจารณาจากปริมาณเชื้อรอดชีวิตและต้นทุนการผลิต แม้มีการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการก่อนการนำเม็ดเชื้อไปอัดเม็ดอาหารไก่เพื่อทำให้สามารถตั้ง

สมมติฐานการทดลองได้ แต่ปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้ออาจไม่ใช่เพียงอุณหภูมิเท่านั้น ขั้นตอนการอัดเม็ดอาจส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อได้เช่นกัน เช่น การบีบอัดเพื่อขึ้นรูปเป็นเม็ดอาหารไก่ ดังนั้น เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์เกี่ยวกับการศึกษาประสิทธิภาพการปกป้องเชื้อจึงต้องมีการนำไปทดสอบในระบบการอัดเม็ดจริง

1.3 การอัดเม็ดอาหารไก่

จากข้อดีของอาหารไก่เม็ดในด้านการขนส่ง องค์ประกอบของอาหารเม็ดที่สมดุล ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีน้อย และประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ดีขึ้น อาหารเม็ดจึงเป็นที่นิยมสำหรับใช้เลี้ยงไก่มากกว่าอาหารผง เนื่องจากกระบวนการอัดเม็ดต้องผ่านการคลุกไอน้ำและการทำให้แห้ง การทดลองครั้งนี้จึงศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่เสริมในอาหารไก่เม็ดจากกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 25-30 วินาที เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อกับข้อมูลการทดสอบความสามารถในการทนความร้อนในห้องปฏิบัติการ โดยดัชนีชี้วัดสำหรับการทดลองนี้ คือ ปริมาณเชื้อรอดชีวิตอย่างน้อย 10^7 CFU/g

การอัดเม็ดอาหารไก่เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่ผสมเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลชันเป็น 95.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทั้ง 2 ตัวอย่าง มีจำนวนเชื้อลดลง โดยเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตมากกว่าเชื้ออิสระ ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเหลือเป็น 2.93×10^5 และ 3.23×10^6 CFU/g จากเชื้อเริ่มต้นก่อนการอัดเม็ด 2.30×10^9 และ 1.85×10^9 CFU/g สำหรับตัวอย่างที่ผสมเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันตามลำดับ (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่า เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าเชื้ออิสระ โดยมีค่าเป็น 70.23 และ 58.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความสามารถในการทนความร้อนในห้องปฏิบัติการ พบว่า ที่เวลาสัมผัสความร้อนนานที่สุด 100 วินาที จำนวนเชื้อรอดชีวิตที่ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการมีปริมาณมากกว่าการอัดเม็ดอาหารไก่จริงประมาณ 1 log CFU/g แม้ที่เวลาสัมผัสความร้อน 100 วินาที เป็นเวลาที่ใกล้เคียงกับระบบการอัดเม็ดอาหารไก่จริง เป็นการบ่งบอกได้ว่าในสถานะการอัดเม็ดจริงน่าจะมีความรุนแรงมากกว่าในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งในระบบจริงนั้นตัวแปรที่ส่งผลต่อเชื้ออาจไม่ใช่เพียงความร้อนเท่านั้น

การเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินตสามารถปกป้องเชื้อให้รอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้ออิสระถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อรอดชีวิตอาจยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ จากการพิจารณาค่าการนำ

ความร้อนของสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเม็ดเชื้อแล้วพบว่า หากปรับปรุงให้เม็ดเชื้อมีน้ำน้อยที่สุด นั่นคือเกิดการเชื่อมขวางมากที่สุด อาจทำให้เชื้อรอดชีวิตมากขึ้น นอกจากนี้หากเปลี่ยนเครื่องอัดเม็ดปริมาณการรอดชีวิตอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ เนื่องจากลักษณะของเครื่องมีความแตกต่างกัน เช่น ปริมาณไอน้ำและขนาดของเครื่อง เป็นต้น ซึ่งนอกจากนี้จะเห็นได้จากการทดลองว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการอัดเม็ดอาหารไก่ (ภาคผนวก ค) ในแต่ละซ้ำการทดลองมีความแปรปรวนมากเนื่องจากเครื่องอัดเม็ดอาหารไก่ค่อนข้างควบคุมยาก ฉะนั้น ค่าความแปรปรวนของการรอดชีวิตของเชื้อจึงสูง ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงจำเพาะสำหรับเครื่องอัดเม็ดนี้เท่านั้น แต่อาจใช้ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดเป็นพื้นฐานแก้ปัญหาเพื่อปกป้องเชื้อจากความร้อนด้วยวิธีอื่นแคปซูลเช่นกันต่อไป

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อรอดชีวิตของ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินเตจากสภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่

สภาวะ	ปริมาณเชื้อ (CFU/g)	
	เชื้ออิสระ	เชื้อที่ผ่านการเ็นแคปซูลชัน
ก่อนการอัดเม็ด	$2.30 \pm 0.22 \times 10^9$	$1.85 \pm 0.03 \times 10^9$
หลังการอัดเม็ด	$2.93 \pm 0.05 \times 10^5$	$3.23 \pm 0.44 \times 10^6$

ผลการวิเคราะห์ความแข็งของอาหารไก่เม็ด พบว่า อาหารไก่เม็ดที่ผสมเชื้อที่ผ่านการเ็นแคปซูลชันมีความแข็งมากกว่าอาหารไก่ที่ผสมเชื้ออิสระ เนื่องจากก่อนการอัดเม็ดปริมาณความชื้นเริ่มต้นน้อยกว่า โดยความชื้นของอาหารไก่เม็ดอยู่ที่ประมาณ 17.40 และ 17.70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาคผนวก ค) โดยความแข็งของอาหารไก่เม็ดเป็นดัชนีบ่งบอกคุณภาพของอาหารไก่เม็ด ทั้งนี้อาหารไก่ก่อนการอัดเม็ดควรมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 13-15 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อผ่านการอัดเม็ดแล้วความชื้นจะเพิ่มขึ้นประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความชื้นสุดท้ายหลังผ่านการคลุกไอน้ำก่อนเข้าสู่หัวอัดควรอยู่ในช่วงไม่เกิน 18 เปอร์เซ็นต์ จากข้อจำกัดของเครื่องอัดเม็ดหากความชื้นเกินขีดจำกัดของเครื่องจะมีผลให้ลูกกลิ้งภายในส่วนอัดเม็ดมีความดันไม่เพียงพอที่จะดันอาหารผงเปียกขึ้นผ่านรูเปิดออกมาได้ ทำให้อาหารค้างในส่วนของรูเปิด (ณัฐชนก, 2548)

2. การทำแห้งเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันแบบฟลูอิดซ์

เนื่องจากการใช้เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันอาจไม่ได้กระทำทันที ทางเลือกหนึ่งที่สามารถยืดอายุของเม็ดเชื้อได้ นั่นคือ การทำแห้ง ซึ่งโดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดปริมาณน้ำในวัสดุ ทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น และสามารถยืดอายุการเก็บนานขึ้น โดยวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมนั้นควรเป็นวิธีที่ไม่ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงและสูญเสียกิจกรรมมากนัก เนื่องด้วยข้อจำกัดของลักษณะทางกายภาพของเม็ดเชื้อที่เป็นเจล ซึ่งมีขนาดที่เป็นอุปสรรคต่อการทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นพวยซึ่งเป็นที่ยอมรับ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงใช้การทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ซึ่งเหมาะสมกับลักษณะของเม็ดเชื่อดังกล่าวและยังเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Larena *et al.*, 2003) อีกทั้งเชื้อที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีนี้ได้รับความเสียหายน้อยและมีอัตราการรอดชีวิตสูง (Morgan *et al.*, 2006)

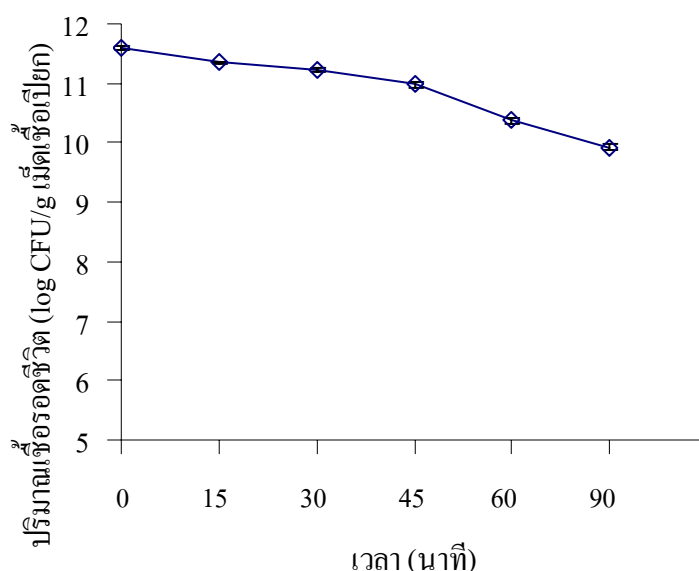
2.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งแบบฟลูอิดซ์

เนื่องด้วยเวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำแห้ง การทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำแห้งเม็ดเชื้อ โดยมีดัชนีชี้วัด คือ ปริมาณเชื้อรอดชีวิตที่เพียงพอต่อการเก็บรักษาและการออกฤทธิ์ในไก่ นั่นคือ หลังการทำแห้งเม็ดเชื้อต้องมีเชื้อรอดชีวิตอย่างน้อย 10^9 CFU/g และไม่เกิดการปนเปื้อนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ *L. reuteri* KUB-AC5 โดยการทดลองนี้มีเปอร์เซ็นต์การเอนแคปซูเลชันเป็น 94.33 เปอร์เซ็นต์

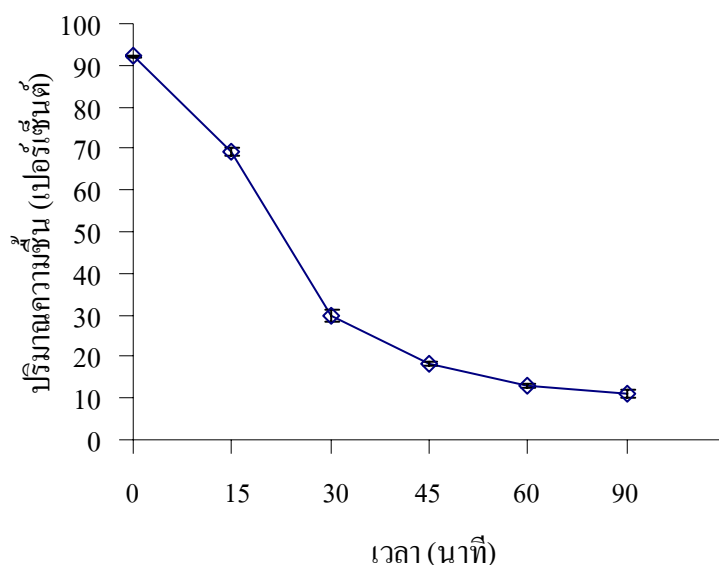
จากการแปรผันเวลาทำแห้งแบบฟลูอิดซ์ในช่วง 0-90 นาที พบว่า ปริมาณเชื้อรอดชีวิตและความชื้นลดลงเมื่อเวลาในการทำแห้งเพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 60 และ 90 นาที ความชื้นอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่าที่สามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ ได้ นั่นคือ 16 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่เวลาทำแห้ง 60 นาที ให้จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตมากกว่าซึ่งมีจำนวน 2.40×10^{10} CFU/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ย 4.05×10^{11} CFU/g (ภาพที่ 8) และความชื้นเฉลี่ย 13.08 เปอร์เซ็นต์ จากความชื้นเริ่มต้นเฉลี่ย 92.17 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)

จากภาพที่ 9 จะเห็นว่า ปริมาณความชื้นของเม็ดเชื้อลดลงเมื่อระยะเวลาในการทำแห้งเพิ่มขึ้น โดยในช่วงแรกของการทำแห้งค่าความชื้นของเม็ดเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากน้ำอิสระระเหยออกและเมื่อเวลาผ่านไปความชื้นของเม็ดเชื้อเริ่มลดลงอย่างช้า ๆ ทั้งนี้เกิดจากผลของความชื้นที่ผิวเม็ดเชื้อในช่วงแรกมีการถ่ายเทได้ดี เนื่องจากความชื้นที่ผิวนอกของเม็ดเชื้อมีปริมาณ

มาก แต่เมื่อเวลาผ่านไปการถ่ายเทความชื้นเริ่มช้าลงเนื่องจากการถ่ายเทเคลื่อนที่ของน้ำจากภายในเมล็ดเชื้อออกมาภายนอก ก่อนที่จะระเหยที่ผิวเมล็ดเชื้อ เป็นผลให้การถ่ายเทความชื้นเกิดได้ยากอัตราการทำแห้งจึงช้าลง และนอกจากนี้จะเห็นว่า ปริมาณความชื้นเริ่มคงที่หลังจากการทำแห้งเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งตามหลักการทำแห้งแล้วเรียกความชื้นที่เริ่มคงที่นี้ว่า ความชื้นสมดุล (equilibrium moisture content) นั่นคือ ค่าความชื้นที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแม้เพิ่มระยะเวลาในการทำแห้งขึ้น ซึ่งเป็นน้ำที่เกาะเกี่ยวอยู่ในโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ นอกจากการเปลี่ยนสถานะการทำแห้ง เช่น อุณหภูมิในการทำแห้ง (Mujumdar, 1987)



ภาพที่ 8 ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตของ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที ที่ระยะเวลาต่าง ๆ



ภาพที่ 9 ปริมาณความชื้นของ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่แข็งด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 2.25 เมตรต่อวินาที ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

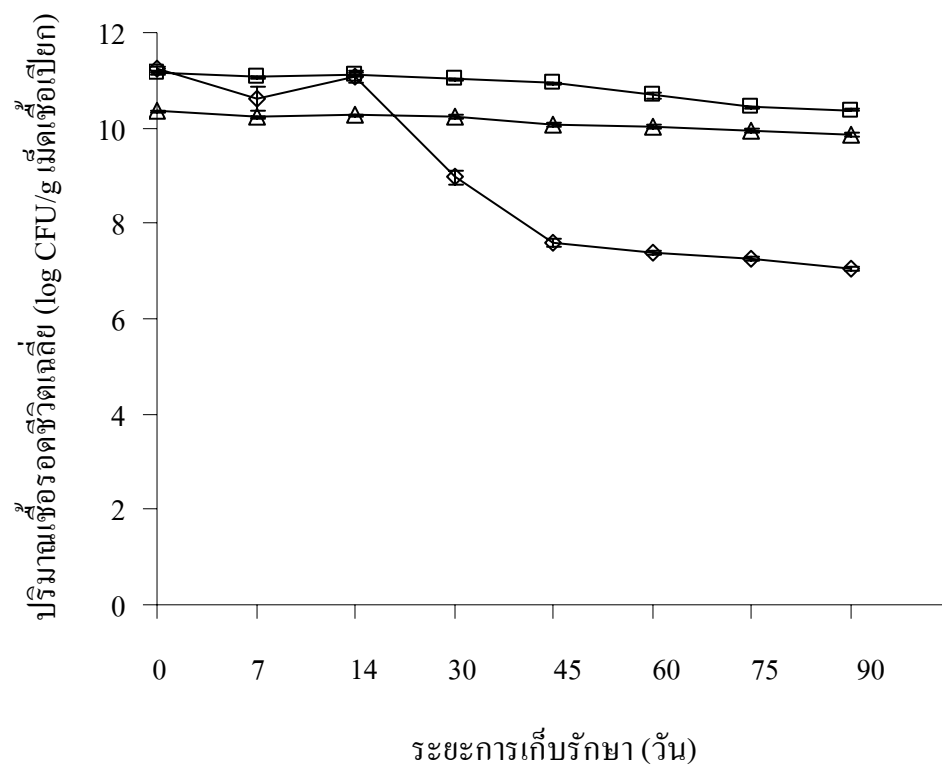
แม้ผลของการทำแห้งที่แสดงให้เห็นว่าเม็ดเชื้อที่ได้จากการทำแห้ง 60 นาที เหมาะสมต่อการนำไปเก็บรักษา แต่เมื่อคำนึงถึงสถานะในการเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ทำแห้ง 45 นาที ควรนำมาศึกษาอายุการเก็บรักษาด้วยเนื่องจากมีจำนวนเชื้อสูงพอ แม้จะมีความชื้นเฉลี่ย 18.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ โดยคาดว่า การเก็บรักษาเม็ดเชื้อในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ (PET/AL/LLDPE) ที่สถานะสุญญากาศ สามารถช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

2.2 การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์

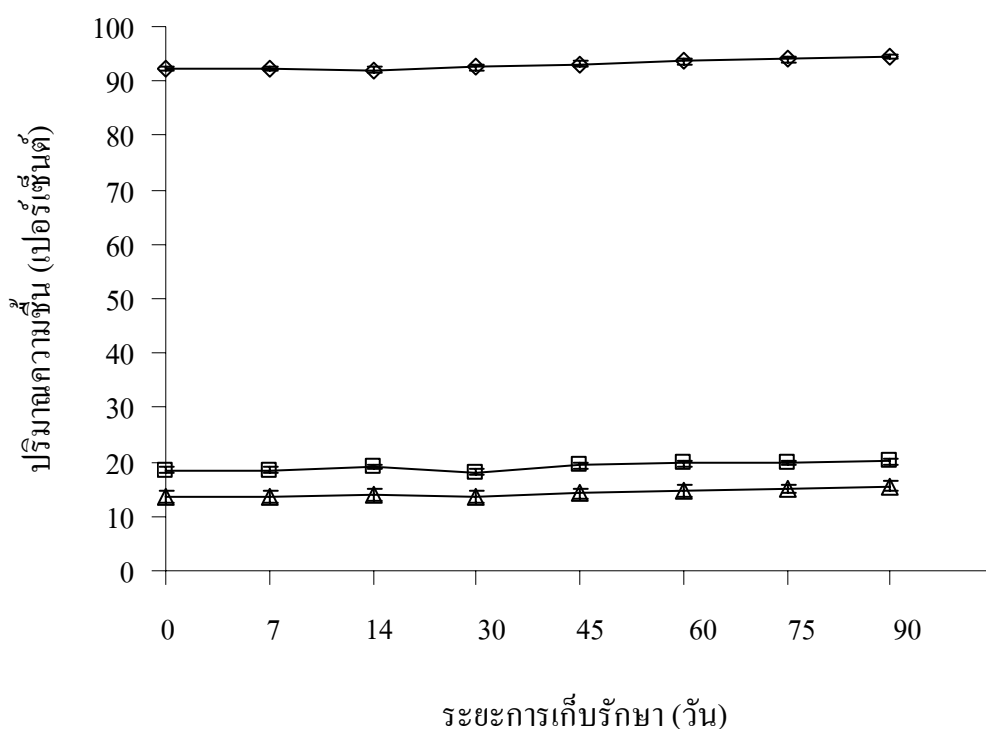
การเก็บรักษาเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ด้วยเวลาทำแห้งที่เหมาะสมได้ทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา มากกว่าอุณหภูมิห้อง เนื่องจากความเย็นสามารถยับยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ ปฏิกริยาของเอนไซม์ และอัตราการเจริญของเซลล์ให้ช้าลงหรือหยุดชะงักไว้ (Ray, 1996) ทั้งนี้เกณฑ์ของการประเมินอายุการเก็บรักษาเม็ดเชื้อ คือ ปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงและการไม่ปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น โดยการทดลองนี้มีเปอร์เซ็นต์การเย็นแช่แข็งเป็น 94.59 เปอร์เซ็นต์

ผลของการเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้งและผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เป็นเวลา 45 และ 60 นาที พบว่า เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้งมีอายุการเก็บรักษามากกว่าเม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้ง โดยปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 10) ขณะที่ปริมาณความชื้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 11) และพบว่า ปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในช่วง 3 เดือนของการเก็บรักษา สำหรับเวลาทำแห้ง 45 และ 60 นาที เม็ดเชื้อมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 2.36×10^{10} CFU/g และ 7.16×10^9 CFU/g และความชื้นเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 20.16 เปอร์เซ็นต์ และ 15.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของความชื้นของทุกตัวอย่าง พบว่า ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ (PET/AL/LLDPE) มีประสิทธิภาพในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้เป็นอย่างดี

จากผลการเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้ง พบว่า เม็ดเชื้อมีอายุการเก็บรักษาเพียง 14 วัน โดยปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 1.16×10^{11} CFU/g และมีความชื้นเฉลี่ย 92 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนั้น พบว่า เม็ดเชื้อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มต้นของการเก็บรักษา และเมื่อมีสภาวะอำนวยที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเจริญเติบโตได้ นั่นคือ ความชื้นที่มากพอจึงเกิดการปนเปื้อนขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าจำนวนเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 14 เนื่องจากเชื้ออาจสามารถเจริญเติบโตได้และเกิดการถูกยับยั้งการเจริญเติบโตจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อน โดยในการทดลองครั้งนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย



ภาพที่ 10 ปริมาณเชื้อรอดชีวิตของเมด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเ็นแปะชุเลชันด้วย แคลเซียมอัลจินตและทำแห้งแบบฟลูอิดไอซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส: —◇— เมดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้ง; —□— เมดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที; —△— เมดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 60 นาที



ภาพที่ 11 ปริมาณความชื้นของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่แข็งด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแล้วทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส: —◇— เม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง; —□— เม็ดเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง 45 นาที; —△— เม็ดเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง 60 นาที

นอกจากการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เม็ดเชื้อที่ได้ศึกษานี้ ยังมีการใช้วิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) Kaushik และ Roos (2007) ศึกษาการเย็นแช่แข็ง Limonene ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สกัดจากส้มโดยวิธีอิมัลชัน โดยใช้ gum arabic, sucrose, gelatin เพื่อคงสภาพกลิ่นของ Limonene ไว้ จากนั้นแช่เยือกแข็งเม็ด Limonene เพื่อศึกษาผลการแช่เยือกแข็งต่อลักษณะของเม็ดและความคงตัวของกลิ่น Limonene สำหรับเก็บรักษาต่อไป พบว่า การแช่เยือกแข็งมีผลให้พื้นผิวของเม็ด Limonene หดและเป็นแอ่งแต่ยังคงสภาพกลิ่นของ Limonene ไว้เหมือนเดิม สำหรับเม็ดเชื้อโดยส่วนใหญ่แล้วการเก็บรักษาเม็ดเชื้อจะศึกษาในรูปของการผสมเม็ดเชื้อในผลิตภัณฑ์แล้วศึกษาอายุการเก็บรักษา เช่น การผสมเม็ดเชื้อในโยเกิร์ตแล้วแช่เยือกแข็งหรือแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วศึกษาอายุการเก็บรักษา (Grosso and Favaro-Trindade, 2004; Capela *et al.*, 2007) แม้ว่าพบรายงานการแช่เยือกแข็งเม็ดเอ็นแคปซูลแล้วเก็บรักษาแล้ว แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์มาก

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลेशन พบว่า การแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการกระจายขนาดของเม็ดเชื่อน้อยมาก ขณะที่การแปรผันความเร็วรอบในการกวนเม็ดเชื่อนี้มีขนาดเล็กลงเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้น โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลेशन คือ ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์ และความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที

การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนในระดับห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบระหว่างเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลेशनด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยใช้อ่างน้ำควบคุมความร้อนในการให้ความร้อน พบว่า เชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลेशनมีประสิทธิภาพในการปกป้องเชื้อได้ดีกว่าเชื้ออิสระ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนความร้อนที่สภาวะเดียวกัน

การศึกษาผลของการแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในการเอ็นแคปซูลेशनต่อความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนในระดับห้องปฏิบัติการ แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.10 และ 0.20 โมลาร์ พบว่า สภาวะการเอ็นแคปซูลेशनโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 โมลาร์ มีความสามารถในการปกป้องเชื้อจากความร้อนไม่แตกต่างกัน และความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีปริมาณเชื้อรอดชีวิตน้อยที่สุด

การศึกษาความสามารถในการทนความร้อนโดยการอัดเม็ดอาหารไก่ พบว่า ตัวอย่างที่เป็นเชื้ออิสระและเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลेशनมีจำนวนเชื้อลดลง โดยเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลेशनสามารถรอดชีวิตจากกระบวนการอัดเม็ดได้ดีกว่าเชื้ออิสระ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเป็น 58.39 และ 70.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาการทำแห้งแบบฟลูอิดไดซ์เพื่อคัดเลือกเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเม็ดเชื้อ โดยพิจารณาจากปริมาณเชื้อรอดชีวิตและปริมาณความชื้นของเม็ดเชื้อร่วมกัน พบว่า เวลาที่เหมาะสมต่อการทำแห้งและเก็บรักษาเม็ดเชื้อ คือ 45 และ 60 นาที

การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ที่เวลา 0, 45 และ 60 นาที และเก็บ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยระบบสุญญากาศในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้งมีอายุการเก็บรักษามากกว่าเม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้ง โดยเม็ดเชื้อที่ทำแห้ง 45 และ 60 นาที เก็บรักษาได้ในช่วงเวลา 3 เดือน มีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 2.36×10^{10} CFU/g และ 7.16×10^9 CFU/g และความชื้นเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 20.16 เปอร์เซ็นต์ และ 15.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งปราศจากการปนเปื้อนของ จุลินทรีย์อื่น ๆ ขณะที่เม็ดเชื้อที่ไม่ผ่านการทำแห้งสามารถเก็บรักษาได้ 14 วัน ปริมาณเชื้อเฉลี่ยเหลือ 1.16×10^{11} CFU/g และมีความชื้นเฉลี่ย 92 เปอร์เซ็นต์ โดยหลังจากนั้นพบว่าเม็ดเชื้อมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ

ข้อเสนอแนะ

1. วิธีการเ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแบบอิมัลชันเพื่อปกป้องเชื้อให้รอดชีวิตจากความร้อนอาจยังไม่ดีเพียงพอ ดังนั้นการปรับปรุงเม็ดเชื้อให้สามารถปกป้องเชื้อจากความร้อน ควรพิจารณาโครงสร้างของเม็ดเชื้อที่ต้องสามารถปกป้องเชื้อให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงขึ้น เช่น การปรับปรุงพอลิเมอร์โดยอาจมีการเคลือบหลายชั้นหรือใช้พอลิเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิดผสมกันหรือการปรับปรุงระบบการเ็นแคปซูลชันเพื่อให้ได้เม็ดเชื้อที่สามารถปกป้องเชื้อได้ดีกว่า เป็นต้น แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงการปลดปล่อยในร่างกายเป้าหมายที่ประยุกต์ใช้ด้วย

2. การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนโดยการอัดเม็ดอาหารไก่ ควรให้มีสถานะการทดสอบเหมือนกันทุกครั้ง เช่น ปริมาณตัวอย่าง ระยะเวลาการปรับเครื่องในแง่ของอุณหภูมิและเวลา ลักษณะการเก็บตัวอย่าง ภาชนะสำหรับเก็บตัวอย่าง เป็นต้น ควรสังเกตลักษณะของอาหารไก่ที่ผ่านการอัดเม็ด เพราะสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดสถานะที่เหมาะสมต่อการอัดเม็ดได้ นอกจากนี้เครื่องที่ใช้อัดเม็ดอาหารไก่เป็นระบบเปิด ฉะนั้น ปัญหาเรื่องการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นเป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งการปนเปื้อนดังกล่าวอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ ควรหาวิธีที่สามารถยับยั้งการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นเพื่อความสำเร็จของการทดลองยิ่งขึ้น และการตรวจสอบปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อควรเว้นระยะให้เซลล์ซ่อมแซมตัวเองก่อน เนื่องจากเซลล์บาดเจ็บจากความร้อนที่ใช้ในการอัดเม็ด

3. การทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เพื่อเก็บรักษาเม็ดเชื้อ ควรเตรียมเม็ดเชื้อให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันก่อนการทำแห้ง ได้แก่ ขนาดเม็ดเชื้อ ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณเม็ดเชื้อ เป็นต้น เพื่อให้ประสิทธิภาพการทำแห้งเหมือนกันทุกการทดลอง และควรระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนเนื่องจากต้องเก็บรักษาเป็นเวลานาน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ณัฐชนก อมรเทวภัทร. 2548. เทคโนโลยีการผลิตอาหารสัตว์. เอกสารประกอบการสอนวิชา 056486 เทคโนโลยีการผลิตอาหารสัตว์ โครงการจัดตั้งภาควิชาเทคโนโลยีทางกระบวนการเคมีและฟิสิกส์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2539. **หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2 หลักโภชนาการศาสตร์และการประยุกต์**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- สมศักดิ์ ดำรงเลิศ. 2528. **ฟลูอิดเซชัน**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ลาโรจน์ ศิริคันสนินกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานการค้าต่างประเทศ. 2550. **แนวโน้มการส่งออกสินค้าไก่เนื้อปี 2550**, กรมการค้าต่างประเทศ. แหล่งที่มา: <http://www.dft.moc.go.th/chonburi/newsdetail.asp?ID=68>. 17 กุมภาพันธ์ 2551.
- วิไล รัชดาทอง. 2545. **เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร**. สำนักพิมพ์แท็กซี่เอนด์เจอร์นัลพับบลิเคชัน, กรุงเทพฯ.
- Adhikari, K., A. Mustapha, I.U. Grun and L. Fernando. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **J. Dairy Sci.** 83: 1946-1951.
- Aguirre-Guzman, G., D. Ricque-Marie and L.E. Cruz-Suarez. 2002. Survival of agglomerated *Saccharomyces cerevisiae* in pelleted shrimp feed. **Aquaculture**. 208: 125-135.

- Ahmad, I. 2006. Effect of probiotics on broilers performance. **Int. J. Poult. Sci.** 5: 593-597.
- Arslan, C. 2004. Effect of dietary probiotic supplementation on growth performance in the rock partridge (*Alectoris graeca*). **Vet. Anim. Sci.** 28: 887-891.
- Bahu, R.E. 1991. Energy consumption in dryer design. *In* A.S. Mujumdar, I. Filkova. Drying 91. **Elsevier Sci. Publishers.** 553-557.
- Bayrock, D. and W.M. Ingledew. 1997. Fluidized bed drying of baker's yeast: moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. **Food Res. Int.** 30: 407-415.
- Capela, P., T.K.C. Hay and N.P. Shah. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Res. Int.** 39: 203-211.
- _____, _____, _____. 2007. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Res. Int.** 40: 1261-1269.
- Capurso, L. 2001. Probiotics and prebiotics and food intolerance. **Allergy.** 56: 125-126.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris and M. Jones. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Microbiol. Meth.** 56: 27-35.
- Cheetham, P.S.J., K.W. Blunt and C. Bucke. 1979. Physical studies in immobilization using calcium alginate gels. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 2155-2168.

- Clark, P.M. 2006. **The effects of nutrient uniformity and modified feed processing on animal performance.** Doctor of Philosophy. Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- FAO/WHO Experts' Report. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **World Health Organization**, October.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. **J. Appl. Bact.** 66: 365-378.
- Fundueanu, G., C. Nastruzzi, A. Carpov, J. Desbrieres and M. Rinaudo. 1999. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials** 20: 1427-1435.
- Garriga, M., M. Pascual, J.M. Monfort and M. Hugas. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **J. Appl. Microbiol.** 84: 125-132.
- Gibson, G.R. and R. Fuller. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **J. Nutri.** 130: 391-395.
- Grosso, C.R.F. and C.S. Favaro-Trindade. 2004. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. Lactis* in yoghurt. **Braz. J. Microbiol.** 35: 151-156.
- Guarner, F. and G.J. Schaafsma. 1998. Probiotics. **Int. Food Microbiol.** 39: 237-238.
- Gustafson, R.H. and R.E. Bowen. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. **J. Appl. Microbiol.** 83: 531-541.
- Hamsupo, K., P. sukyai, G. Loiseau, S. Nitisinprasert, D. Montet and P. Wanchaitanawong. 2005. Prediction on the stability of spray-dried *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 by arrhenius equation for long-term storage. **Microbiol. Biotechnol.** 15: 1178-1182.

- Isolauri, E., S. Salminen and A.C. Ouwehand. 2004. Probiotics. **Best Practice & Res. Clinical Gastroenterol.** 18: 299-313.
- Iyer, C. and K. Kailasapathy. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotic with prebiotic on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **Food Sci.** 70: 18-23.
- Jankowski, T., M. Zielinska and A. Wysakowska. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Biotechnol. Technol.** 11: 31-34.
- Jin, L.Z., Y.W. Ho, N. Abdullah, M.A. Ali and S. Jalaludin. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers feed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. **Poult. Sci.** 79: 886-891.
- Kailasapathy, K. 2005. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT.** 39: 1221-1227.
- Kaushik, V. and Y.H. Roos. 2007. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. **LWT.** 40: 1381-1391.
- Khaksefidi, A. and T. Ghoorchi, 2006. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. **Jap. Poult. Sci.** 43: 296-300
- Khotimchenko, Y.S., V.V. Kovalev, O.V. Savchenko and O.A. Ziganshina. 2001. Physical-chemical properties, physiological activity, and usage of alginates, the polysaccharides of brown algae. **Russ. J. Mari. Biol.** 27: 53-64.
- Kirkpinar, F. and H. Basmacioglu. 2006. Effects of pelleting temperature of phytase supplemented broiler feed on tibia mineralization, calcium and phosphorus content of serum and performance. **Czech J. Anim. Sci.** 51: 78-84.

- Krasaekoopt, W., B. Bhandari and H.C. Deeth. 2003. Evalution of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **Int. Dairy J.** 13: 3-13.
- _____,_____,_____. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT and conventionally treated milk during storage. **LWT.** 39: 177-183.
- Larena, I., A. De Cal, M. Linan and P. Melgarejo. 2003. Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a sheif-stable biological product against brown rot disease. **Appl. Microbiol.** 94: 508-514.
- Lee, K.Y. and T.R. Heo. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 869-73.
- Lee, J.S., D.S. Cha and H.J. Park. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. **J. Agric. Food Chem.** 52: 7300-7305.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 747-748.
- Linders, L.J.M., W.F. Wolkers, F.A. Hoekstra and K. Van't Riet. 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behaviour and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. **Cryobiology.** 35: 31-40.
- Males, R.J. and B. Johnson. 1990. Probiotic-What are they ? What do they do ?. **J. Anim. Sci.** 68: 505-508.
- Mille, Y., J.P. Obert, L. Beney and P. Gervais. 2004. New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. **Biotechnol. Bioeng.** 88: 71-76.

- Mortazavian, A., S.H. Razavi, M.R. Ehsani and S. Sohrabvandi. 2007. Principle and method of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iran. J. Biotechnol.** 5: 1-18.
- Morgan, C.A., N. Herman, P.A. White and G. Vesey. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Microbiol. Meth.** 66: 183-193.
- Muthukumarasamy, P., P. Allan-Wojtas and R.A. Holley. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different type of microcapsules. **Food Sci.** 71: 20-24.
- Mujumdar, A.S. 1987. **Handbook of Industrial drying**. Marcel Dekker. New York.
- Nir, I., R. Hillel, G. Shefet and Z. Nitsan. 1994. Effect of grain particle size on performance. 2. grain texture interaction. **Poult. Sci.** 73: 178-791.
- Nitisinprasert, S., V. Nilphai, P. Bungun, P. Sukyi, K. Doi and K. Sonomoto. 2000. Screening and identification of effect thermotolant *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to antibiotics. **Kasetsart J. (Nat. Sct.)**. 34: 387-400.
- _____, N. Pungsungworn, P. Wanchaitanawong, G. Loiseau and D. Montet. 2006. *In vitro* adhesion assay of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. By microbiological and PCR methods. **Songklanakarin J. Sci.** 28: 99-106.
- Nussinovitch, A. 1997. **Hydrocolloid Application; Gum technology in the food and other industries**. Blackie academic & professional. United Kingdom.
- Parker, R.B. 1974. Probitics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutri. Health.** 29: 4-9.
- Pascual, M., M. Hugas, J.I. Badiola, J.M. Monfort and M. Garriga. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbial.** 65: 4981-4986.

- Pfost, H.B. 1976. Criteria for evaluating feed mixer performance. **Feed stuffs.** 38: 30-32.
- Playne, M.J. 2002. The health benefits of probiotics. **Food Aust.** 54: 71-74.
- Poncelet, D., R. Lencki, C. Beaulieu, J.P. Halle, R.J. Neufeld and A. Fournier. 1992. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38: 39-45.
- Priyankarage, N., S.S.P. Silva, S.P. Gunaratne, M.W.C.D. Palliyaguru, Weerasinghe, W M P B. and P.S. Fernando. 2003. Comparison of different probiotic for broilers. **Br. Poult. Sci.** 44. 44-48.
- Pungsungworn, N. 2008. Effect of probiotic *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 to microbial community in the broiler chicken intestine. **Doctor of Philosophy (Biotechnology) Kasetsart University, Bangkok.**
- Ray, B. 1996. **Fundamental Food Microbiology.** CRC press, Boca Raton.
- Rousseau, I., D.L. Cerf, L. Picton, J.F. Argillier and G. Muller. 2004. Entrapment and release of sodium polystyrene sulfonate (SPS) from calcium alginate gel beads. **Eur. Polym. J.** 40: 2709-2715.
- Safalaoh, A.C.L. 2006. Body weight gain, dressing percentage, abdominal fat and serum cholesterol of broilers supplemented with a microbial preparation. **Afr. J. Food Agric. Nutri. Dev.** 6: 1-10.
- Se-Jin, K., S.Y. Cho, S.H. Kim, S. Ok-Ja, S. II-Shin, D.S. Cha and H.J. Park. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT** 41: 493-500.

- Sheu, T.Y. and R.T. Marshall. 1993 Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Food Sci.** 54: 557-561.
- Silva, C. M., A. J. Ribeiro, I. V. Figueiredo, A. R. Goncalves and F. Veiga. 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. **Int. J. Pharm.** 311: 1-10.
- Sukyai, P. 2003. Detection and partial characterization of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5, KUB-AC16, KUB-AC20. **Master of science thesis. Kasetsart University, Thailand.**
- Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastro-intestinal conditions and in yoghurt. **Int. J. Food Microbiol.** 62: 47-55.
- Syahrul, S., F. Hamdullahpur and I. Dincer. 2002. Thermal analysis in fluidized bed drying of moist particles. **Appl. Therm. Eng.** 22: 1763- 775.
- Thomas, M. and A.F.B. van der Poel. 1996. Physical quality of pelleted animal feed 1. criteria for pellet quality. **Anim. Feed Sci. Technol.** 61: 89-112.
- _____, D.J. van Zuilichem and A.F.B. van der Poel. 1997. Physical quality of pelleted animal feed 2. contribution of processes and its conditions. **Anim. Feed Sci. Technol.** 64: 173-192.
- Truelstrup-Hansen, L., P.M. Allan-Wojtas, Y.L. Jin and A.T. Paulson. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiol.** 19: 35-45.

- Vicente, J.L., L. Avina, A. Torres-Rodriguez¹, B. Hargis and G. Tellez¹. 2007. Effect of a *Lactobacillus* Spp-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. **Int. J. Poult. Sci.** 6: 154-156.
- Yi-Chieh W., Y. Roch-Chui and Ch. Cheng-Chun. 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **Int. J. Food Microbiol.** 93: 209-217.
- Zohuriaan, M.J. and F. Shokrolahi. 2004. Thermal studies on natural and modified gums. **Polym. Test.** 23: 575-579.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
MgSO ₄	0.2	กรัม
MnSO ₄	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม
Agar*	1.5	เปอร์เซ็นต์

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.2 ± 0.5 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

หมายเหตุ * สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง MRS มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือ bromocresol purple 0.03 เปอร์เซ็นต์

2. Phosphate buffer pH 7

เตรียมสารละลาย A และ B โดยสารละลาย A คือ NaH₂PO₄ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สารละลาย B คือ Na₂HPO₄ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (v/v) กับสารละลาย B ปริมาตร 61 มิลลิลิตร (v/v) ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

3. อาหารไก่เนื้อดัดแปลง

อาหารไก่สำหรับการทดลองดัดแปลงจากอาหารไก่เนื้อที่เป็นไก่กระทางอายุ 0-21 วัน โดยการเตรียมในน้ำหนัก 100 กรัม ประกอบด้วย ข้าวโพด 53.54 กรัม น้ำมัน 3.86 กรัม กากถั่วเหลือง 30.51 กรัม ปลาป่น 6.08 กรัม เม็ดเชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน 5 กรัม และ propionic acid sodium salt 1 กรัม

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธีการ pour plate

เจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คูลสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งผสมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็ง MRS ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเป็นโคโลนีที่สร้างวงใสรอบโคโลนี คำนวณจำนวนเซลล์โดยใช้สูตรดังนี้

$$X = N \times 10^n \quad \text{CFU/ml}$$

เมื่อ

X = จำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร

N = จำนวนแบคทีเรียที่นับได้จากตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

n = ค่าการเจือจางของหลอดที่นับจำนวนแบคทีเรีย

2. การวิเคราะห์ความชื้น

อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใช้คีมคีบถ้วยอะลูมิเนียมใส่ในโถดูดความชื้นให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 30 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมคงที่ (ผลต่างที่ชั่ง 2 ครั้ง น้อยกว่า 1 มิลลิกรัม) ชั่งตัวอย่างลงในถ้วยอะลูมิเนียมอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใช้คีมคีบถ้วยอะลูมิเนียมที่มีตัวอย่างใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณค่าความชื้นโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้นร้อยละของน้ำหนัก} = \{ [W - (Y - X)] / W \} \times 100$$

เมื่อ

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

X = น้ำหนักสุดท้ายของถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา

Y = น้ำหนักสุดท้ายของถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝาและตัวอย่าง

3. การคำนวณปริมาณการสุ่มตัวอย่าง

สูตรของทาโร ยามาเน

$$n = \frac{N}{1 + Ne^2}$$

เมื่อ

n = ปริมาณของกลุ่มตัวอย่าง

N = ปริมาณของประชากร

e = ความคลาดเคลื่อนของกลุ่มตัวอย่าง

4. การคำนวณผลได้

$$\text{ผลได้ของเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณเม็ดเชื้อในช่วงขนาดที่ต้องการ}}{\text{ปริมาณเม็ดเชื้อทั้งหมด}} \times 100$$

5. การคำนวณเปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลชัน

$$\text{เอ็นแคปซูลชัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\log \text{ของจำนวนเชื้อที่ปลดปล่อยจากเม็ดเชื้อ}}{\log \text{ของจำนวนเชื้อเริ่มต้น}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์การกระจายขนาดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MATLAB version 7.4

```
X=zeros(1,50);
```

```
Y=zeros(1,50);
```

```
Z=zeros(1,50);
```

```
X=[particle diameter,Dp (μm)];
```

```
Y=[bigger than Dp];
```

```
Z=trapz(X,Y);
```

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

1. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเอ็นแคปซูลชั้น

ตารางผนวกที่ ค1 การกระจายขนาดของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชั้นด้วย
แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	D(3,2)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
1	0.05/200 ⁵	1	408.857 ¹	216.559 ²	693.959 ³	1394.294 ⁴
		2	405.330	218.976	701.523	1399.664
		3	401.798	221.394	679.938	1381.518
	0.1/200	1	382.191	167.663	649.842	1377.333
		2	375.856	172.794	672.196	1399.334
		3	372.056	171.517	679.073	1406.651
	0.2/200	1	369.193	161.792	615.396	1355.479
		2	357.988	153.441	574.051	1324.147
		3	367.018	156.075	595.024	1345.076
2	0.05/200	1	392.082	150.626	676.970	1429.097
		2	390.230	145.343	652.750	1406.111
		3	391.176	149.357	656.345	1396.421
	0.1/200	1	372.496	177.048	528.216	1235.461
		2	360.126	170.541	508.812	1237.024
		3	359.402	169.283	503.350	1249.438
	0.2/200	1	370.876	189.164	579.771	1302.090
		2	369.803	187.889	581.863	1310.556
		3	365.156	185.494	570.854	1283.347

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	D(3,2)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
3	0.05/200	1	356.457	171.170	599.968	1286.286
		2	383.423	177.564	668.272	1374.996
		3	359.838	168.352	624.852	1328.526
	0.10/200	1	356.189	186.380	596.167	1315.119
		2	382.706	215.012	655.218	1346.640
		3	348.595	185.711	558.479	1274.661
	0.20/200	1	365.310	178.359	509.195	1213.506
		2	360.816	181.382	518.079	1223.846
		3	352.485	173.623	504.842	1206.255

หมายเหตุ ¹ ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อโดยน้ำหนัก 408.857 ไมโครเมตร (D(3,2))

² เม็ดเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 216.559 ไมโครเมตร (d(0.1))

³ เม็ดเชื้อ 50 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 693.959 ไมโครเมตร (d(0.5))

⁴ เม็ดเชื้อ 90 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 1394.294 ไมโครเมตร (d(0.9))

⁵ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ และความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที

ตารางผนวกที่ ค2 การกระจายขนาดของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันด้วย
แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเร็วรอบในการกวน

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	D(3,2)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
1	0.10/200 ⁵	1	356.913 ¹	182.431 ²	581.398 ³	1308.891 ⁴
		2	371.447	185.596	593.103	1312.302
		3	349.893	177.544	559.584	1290.654
	0.10/250	1	333.735	149.693	404.352	987.398
		2	333.033	147.566	390.794	963.683
		3	297.904	158.128	409.436	968.871
	0.10/300	1	289.637	174.706	427.306	963.538
		2	296.654	172.829	428.718	983.170
		3	297.872	174.345	426.905	962.593
2	0.10/200	1	355.588	163.058	620.056	1354.595
		2	342.767	156.805	609.400	1358.149
		3	345.841	155.980	605.573	1328.626
	0.10/250	1	336.785	168.414	500.731	1221.573
		2	334.874	167.588	495.947	1180.098
		3	342.618	164.828	493.796	1181.718
	0.10/300	1	276.926	147.136	338.847	777.400
		2	272.965	143.903	335.664	776.051
		3	271.009	145.316	330.407	776.858

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	D(3,2)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
3	0.10/200	1	357.211	153.958	611.056	1329.798
		2	353.067	155.507	609.400	1331.249
		3	362.184	159.980	605.771	1320.739
	0.10/250	1	312.397	156.409	410.178	1036.010
		2	306.100	154.751	398.749	970.845
		3	315.770	158.862	415.502	1004.139
	0.10/300	1	300.740	162.182	371.717	813.530
		2	292.403	159.625	358.793	759.169
		3	282.631	156.989	363.249	799.089

หมายเหตุ ¹ ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อโดยน้ำหนัก 356.913 ไมโครเมตร (D(3,2))

² เม็ดเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 182.431 ไมโครเมตร (d(0.1))

³ เม็ดเชื้อ 50 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 581.398 ไมโครเมตร (d(0.5))

⁴ เม็ดเชื้อ 90 เปอร์เซนต์ ที่มีขนาดเฉลี่ยไม่เกิน 1308.891 ไมโครเมตร (d(0.9))

⁵ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.10 โมลาร์ และความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที

ตารางผนวกที่ ค3 ผลได้ของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)		
			0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm
1	0.05/200	1	8.88	60.94	30.18
		2	8.64	60.88	30.48
		3	9.28	61.36	29.37
	0.1/200	1	10.08	59.80	30.12
		2	9.58	59.00	31.42
		3	9.50	58.52	31.98
	0.2/200	1	11.48	59.31	29.20
		2	12.88	59.37	27.74
		3	12.13	59.03	28.84
2	0.05/200	1	11.45	58.19	30.36
		2	10.66	59.13	30.22
		3	8.94	60.47	30.59
	0.1/200	1	15.62	61.65	22.73
		2	16.53	60.21	23.26
		3	20.69	59.22	20.09
	0.2/200	1	13.01	61.24	25.75
		2	12.94	60.76	26.30
		3	13.30	61.94	24.76

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)		
			0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm
3	0.05/200	1	11.76	63.69	24.55
		2	9.65	60.77	29.58
		3	10.98	62.01	27.01
	0.1/200	1	12.20	61.46	26.34
		2	9.96	62.74	27.30
		3	13.95	61.59	24.46
	0.2/200	1	16.67	61.44	21.89
		2	16.19	61.56	22.25
		3	18.30	61.96	19.74

ตารางผนวกที่ ค4 ผลได้ของเมล็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียม
อัลจิเนตเมื่อแปรผันความเร็วรอบในการกวน

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)		
			0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm
1	0.1/200	1	26.28	60.69	13.03
		2	26.27	61.16	12.56
		3	25.55	60.56	13.89
	0.1/250	1	13.35	47.33	39.32
		2	12.50	46.40	41.11
		3	12.10	48.36	39.54
	0.1/300	1	11.33	44.37	44.31
		2	12.16	44.19	43.65
		3	8.09	40.04	51.87
2	0.1/200	1	11.18	59.85	28.96
		2	11.61	58.87	29.52
		3	14.30	56.86	28.84
	0.1/250	1	30.04	47.37	22.60
		2	30.74	48.80	20.46
		3	31.70	48.09	20.21
	0.1/300	1	47.10	46.38	6.52
		2	46.77	47.02	6.21
		3	47.52	49.23	3.25

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

ซ้ำที่	ตัวอย่าง	ครั้งที่	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)		
			0.02-400 μm	400-1200 μm	1200-2000 μm
3	0.1/200	1	9.99	60.75	29.26
		2	9.84	62.71	27.45
		3	9.27	62.44	28.29
	0.1/250	1	32.19	52.23	15.57
		2	34.46	52.69	12.85
		3	36.25	50.13	13.62
	0.1/300	1	42.23	52.12	5.65
		2	45.98	50.56	3.46
		3	45.91	48.38	5.72

ตารางผนวกที่ ค5 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวน (ซ้ำที่ 1)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
11.482	0	0	0	0	0	0
13.183	0	0	0	0	0	0
15.136	0	0	0.04	0	0	0
17.378	0	0.04	0.08	0.01	0.03	0
19.953	0	0.08	0.09	0.06	0.05	0.01
22.909	0.03	0.09	0.11	0.09	0.05	0.02
26.303	0.07	0.11	0.13	0.11	0.06	0.02
30.200	0.08	0.12	0.14	0.12	0.05	0.02
34.674	0.09	0.15	0.15	0.12	0.05	0.02
39.811	0.10	0.17	0.16	0.11	0.04	0.02
45.709	0.10	0.21	0.18	0.10	0.04	0.02
52.481	0.12	0.26	0.22	0.10	0.09	0.07
60.256	0.14	0.34	0.30	0.11	0.16	0.12
69.183	0.19	0.44	0.41	0.17	0.30	0.20
79.433	0.27	0.58	0.59	0.28	0.54	0.35
91.201	0.4	0.76	0.83	0.48	0.87	0.58
104.713	0.57	0.98	1.12	0.76	1.30	0.91
120.226	0.79	1.23	1.48	1.14	1.85	1.36
138.038	1.06	1.51	1.87	1.58	2.47	1.93

ตารางผนวกที่ คร5 (ต่อ)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
158.480	1.37	1.82	2.27	2.09	3.17	2.64
181.970	1.72	2.13	2.67	2.60	3.90	3.45
208.930	2.10	2.45	3.04	3.12	4.65	4.37
239.883	2.50	2.76	3.37	3.60	5.37	5.31
275.423	2.94	3.08	3.68	4.06	6.04	6.24
316.228	3.42	3.42	3.97	4.48	6.60	7.06
363.078	3.97	3.80	4.29	4.91	7.03	7.70
416.869	4.60	4.26	4.65	5.34	7.29	8.08
478.630	5.32	4.82	5.09	5.80	7.35	8.16
549.541	6.11	5.48	5.60	6.27	7.19	7.91
630.957	6.92	6.21	6.15	6.71	6.79	7.35
724.436	7.66	6.94	6.68	7.06	6.18	6.54
831.764	8.21	7.56	7.08	7.23	5.41	5.55
954.993	8.45	7.94	7.25	7.16	4.54	4.49
1096.478	8.28	7.93	7.08	6.78	3.64	3.46
1258.925	7.61	7.44	6.51	6.06	2.77	2.52
1445.440	6.45	6.41	5.52	5.02	1.99	1.73
1659.587	4.89	4.93	4.19	3.74	1.31	1.09
1905.461	2.81	2.85	2.41	2.12	0.68	0.55
2187.762	0.67	0.68	0.57	0.50	0.16	0.12

ตารางผนวกที่ ค6 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอนแคปซูเลชันด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวน (ซ้ำที่ 2)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
11.482	0	0	0	0	0	0
13.183	0	0	0	0	0	0
15.136	0.04	0.03	0	0	0	0
17.378	0.07	0.06	0	0	0.03	0
19.953	0.08	0.08	0	0	0.05	0
22.909	0.09	0.09	0.03	0	0.05	0
26.303	0.11	0.10	0.07	0	0.05	0
30.200	0.12	0.10	0.07	0	0.05	0
34.674	0.13	0.11	0.06	0	0.03	0
39.811	0.15	0.13	0.07	0	0	0
45.709	0.19	0.17	0.08	0	0.04	0
52.481	0.25	0.23	0.11	0	0.08	0
60.256	0.35	0.33	0.16	0.08	0.15	0.11
69.183	0.49	0.48	0.25	0.18	0.27	0.26
79.433	0.70	0.68	0.38	0.38	0.45	0.53
91.201	0.97	0.92	0.57	0.66	0.71	0.93
104.713	1.29	1.21	0.81	1.05	1.05	1.49
120.226	1.67	1.55	1.10	1.53	1.47	2.21
138.038	2.07	1.90	1.46	2.08	1.50	3.07

ตารางผนวกที่ ค6 (ต่อ)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
158.480	2.46	2.27	1.87	2.68	2.49	4.04
181.970	2.81	2.63	2.33	3.29	3.06	5.05
208.930	3.09	3.00	2.84	3.90	3.65	6.06
239.883	3.28	3.35	3.37	4.45	4.22	6.96
275.423	3.38	3.69	3.94	4.95	4.79	7.68
316.228	3.43	4.03	4.50	5.37	5.31	8.15
363.078	3.49	4.38	5.07	5.74	5.80	8.32
416.869	3.63	4.75	5.62	6.05	6.22	8.17
478.630	3.95	5.16	6.15	6.31	6.56	7.69
549.541	4.48	5.60	6.61	6.49	6.79	6.94
630.957	5.23	6.08	6.99	6.60	6.88	5.99
724.436	6.12	6.54	7.22	6.59	6.81	4.92
831.764	7.00	6.91	7.29	6.43	6.55	3.85
954.993	7.68	7.10	7.12	6.10	6.09	2.84
1096.478	7.95	7.00	6.68	5.56	5.45	1.98
1258.925	7.64	6.50	5.95	4.82	4.65	1.29
1445.440	6.69	5.57	4.93	3.89	3.71	0.78
1659.587	5.19	4.26	3.69	2.85	2.69	0.44
1905.461	3.01	2.46	2.10	1.60	1.50	0.19
2187.762	0.72	0.59	0.50	0.38	0.35	0.05

ตารางผนวกที่ ค7 ปริมาณเฉลี่ยของเม็ด *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วย
แคลเซียมอัลจิเนตเมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์และความเร็ว
รอบในการกวน (ซ้ำที่ 3)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
11.482	0	0	0	0	0	0
13.183	0	0	0	0	0	0
15.136	0	0	0	0	0	0
17.378	0.02	0	0	0	0	0
19.953	0.06	0.02	0	0.02	0	0
22.909	0.08	0.06	0	0.06	0	0
26.303	0.07	0.07	0	0.08	0	0
30.200	0.07	0.08	0	0.08	0	0
34.674	0.07	0.08	0	0.07	0	0
39.811	0.07	0.09	0	0.07	0	0
45.709	0.09	0.10	0	0.11	0	0.02
52.481	0.14	0.13	0.08	0.13	0.08	0.07
60.256	0.23	0.18	0.14	0.15	0.15	0.12
69.183	0.36	0.26	0.24	0.26	0.29	0.22
79.433	0.54	0.37	0.40	0.32	0.50	0.39
91.201	0.77	0.53	0.62	0.54	0.81	0.66
104.713	1.04	0.74	0.92	0.70	1.22	1.06
120.226	1.35	1.00	1.29	1.20	1.75	1.63
138.038	1.67	1.32	1.74	1.30	2.38	2.36

ตารางผนวกที่ ค7 (ต่อ)

ขนาดเม็ดเชื้อ (ไมโครเมตร)	ปริมาณเม็ดเชื้อเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)					
	แปรผันความเข้มข้นของ CaCl_2 (โมลาร์)			แปรผันความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)		
	0.05	0.10	0.20	200	250	300
158.480	2.00	1.70	2.27	1.72	3.10	3.28
181.970	2.31	2.12	2.85	2.12	3.86	4.33
208.930	2.61	2.59	3.48	2.55	4.64	5.48
239.883	2.89	3.10	4.13	3.10	5.39	6.59
275.423	3.21	3.65	4.78	3.69	6.07	7.60
316.228	3.57	4.22	5.39	4.2	6.62	8.37
363.078	4.03	4.82	5.95	4.81	7.02	8.81
416.869	4.61	5.42	6.41	5.40	7.25	8.86
478.630	5.30	6.03	6.76	6.00	7.28	8.49
549.541	6.07	6.59	6.98	6.58	7.10	7.76
630.957	6.84	7.09	7.04	7.09	6.73	6.73
724.436	7.48	7.45	6.93	7.45	6.17	5.52
831.764	7.88	7.61	6.65	7.61	5.46	4.27
954.993	7.92	7.50	6.18	7.50	4.65	3.08
1096.478	7.53	7.07	5.55	7.06	3.81	2.05
1258.925	6.71	6.30	4.74	6.33	2.98	1.22
1445.44	5.51	5.19	3.80	5.18	2.20	0.64
1659.587	4.07	3.85	2.77	3.85	1.50	0.27
1905.461	2.29	2.18	1.55	2.17	0.81	0.09
2187.762	0.54	0.52	0.37	0.50	0.19	0.02

ตารางผนวกที่ ค8 ปริมาณความชื้นของเมล็ด *L. reuteri* KUB-AC5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของ
แคลเซียมคลอไรด์และความเร็วรอบในการกวน

สภาวะ	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)						ปริมาณความชื้น	SD
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			เฉลี่ย	
	1	2	3	1	2	3	(เปอร์เซ็นต์)	
0.05/200 ¹	93.99	93.96	94.02	93.79	93.65	93.80	93.87	0.14
0.10/200	91.51	91.44	91.56	91.22	91.15	91.28	91.36	0.16
0.20/200	91.26	90.93	90.93	91.08	91.09	91.01	91.05	0.12
0.10/200	91.48	91.48	91.37	91.20	91.23	91.18	91.32	0.14
0.10/250	92.21	92.15	92.22	92.21	92.15	92.22	92.19	0.03
0.10/300	92.89	92.88	92.83	92.73	92.91	92.88	92.85	0.07

หมายเหตุ ¹ สภาวะที่ใช้ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ และความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที

2. การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนในห้องปฏิบัติการ

ตารางผนวกที่ ค9 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่รอดชีวิตจากการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ ของเชื้ออิสระ (FC) และเชื้อที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยโซเดียมอัลจินต (EC) และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ในหน่วยโมลาร์

ตัวอย่าง	ระยะเวลาของการบ่ม (วินาที)	จำนวนเชื้อรอดชีวิต (CFU/g)			จำนวนเชื้อ รอดชีวิตเฉลี่ย (CFU/g)	SD
		1	2	3		
ซ้ำที่ 1						
FC	0	9.01E+09	9.31E+09	8.71E+09	9.01E+09	2.97E+08
	40	2.20E+08	2.08E+08	2.16E+08	2.15E+08	6.05E+06
	60	5.84E+07	5.45E+07	6.24E+07	5.84E+07	3.96E+06
	80	5.35E+06	6.73E+06	5.94E+06	6.01E+06	6.95E+05
	100	1.29E+06	1.34E+06	1.27E+06	1.30E+06	3.57E+04
EC-0.05	0	2.33E+09	2.35E+09	2.39E+09	2.35E+09	3.02E+07
	40	1.66E+09	1.57E+09	1.62E+09	1.62E+09	4.46E+07
	60	8.12E+08	7.62E+08	7.23E+08	7.66E+08	4.46E+07
	80	2.24E+08	2.33E+08	2.18E+08	2.25E+08	7.47E+06
	100	4.75E+06	5.05E+06	3.96E+06	4.59E+06	5.63E+05
EC-0.10	0	1.89E+10	1.90E+10	1.97E+10	1.92E+10	4.15E+08
	40	9.04E+09	9.32E+09	9.65E+09	9.34E+09	3.05E+08
	60	1.28E+09	1.30E+09	1.36E+09	1.32E+09	4.18E+07
	80	8.81E+08	9.25E+08	9.91E+08	9.32E+08	5.53E+07
	100	1.45E+07	1.36E+07	1.39E+07	1.40E+07	4.54E+05
EC-0.20	0	2.30E+10	2.32E+10	2.38E+10	2.33E+10	4.12E+08
	40	1.67E+10	1.70E+10	1.73E+10	1.70E+10	2.97E+08
	60	1.79E+09	1.80E+09	1.88E+09	1.82E+09	4.88E+07
	80	1.39E+09	1.37E+09	1.47E+09	1.41E+09	5.24E+07
	100	7.92E+07	7.13E+07	8.91E+07	7.99E+07	8.93E+06

ตารางผนวกที่ ค9 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ระยะเวลาของการบ่ม (วินาที)	จำนวนเชื้อโรคชีวิต (CFU/g)			จำนวนเชื้อ โรคชีวิตเฉลี่ย (CFU/g)	SD
		1	2	3		
ซ้ำที่ 2						
FC	0	7.43E+09	7.92E+09	6.93E+09	7.43E+09	4.95E+08
	40	1.74E+08	1.65E+08	1.68E+08	1.69E+08	4.54E+06
	60	3.56E+07	4.26E+07	4.46E+07	4.09E+07	4.68E+06
	80	3.96E+06	4.65E+06	5.45E+06	4.69E+06	7.43E+05
	100	9.90E+05	1.07E+06	1.04E+06	1.03E+06	4.00E+04
EC-0.05	0	2.23E+09	2.21E+09	2.28E+09	2.24E+09	3.57E+07
	40	1.54E+09	1.57E+09	1.44E+09	1.52E+09	7.30E+07
	60	7.92E+08	8.32E+08	8.81E+08	8.35E+08	4.46E+07
	80	2.05E+08	2.07E+08	2.10E+08	2.07E+08	2.49E+06
	100	6.04E+06	6.44E+06	7.43E+06	6.63E+06	7.14E+05
EC-0.10	0	1.75E+10	1.87E+10	1.91E+10	1.84E+10	8.33E+08
	40	9.99E+09	1.03E+10	1.04E+10	1.02E+10	2.30E+08
	60	1.33E+09	1.21E+09	1.26E+09	1.27E+09	5.76E+07
	80	9.11E+08	8.89E+08	9.30E+08	9.10E+08	2.06E+07
	100	1.24E+07	1.20E+07	1.28E+07	1.24E+07	4.21E+05
EC-0.20	0	2.77E+10	2.84E+10	2.92E+10	2.84E+10	7.43E+08
	40	2.43E+10	2.54E+10	2.59E+10	2.52E+10	8.65E+08
	60	1.94E+09	2.16E+09	2.06E+09	2.05E+09	1.09E+08
	80	1.44E+09	1.48E+09	1.50E+09	1.47E+09	3.48E+07
	100	7.72E+07	7.33E+07	8.71E+07	7.92E+07	7.14E+06

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลเฉลี่ยเป็น 96.81 (EC-0.05), 96.83 (EC-0.10) และ 96.53
เปอร์เซ็นต์ (EC-0.20)

ตารางผนวกที่ ค10 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการอัดเม็ดอาหารไก่ด้วยอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 25-30 วินาที

ซ้ำที่	จำนวนเชื้อร็อคชีวิต (CFU/g)				จำนวนเชื้อเกล็ด (CFU/g)	
	ก่อนการอัดเม็ด		หลังการอัดเม็ด		ก่อนการอัดเม็ด	หลังการอัดเม็ด
	1	2	1	2		
1	1.40E+09	1.45E+09	2.70E+05	2.79E+05	1.43E+09	2.75E+05
2	3.78E+09	4.05E+09	2.61E+05	3.60E+05	3.92E+09	3.11E+05
3	1.56E+09	1.58E+09	2.70E+05	3.15E+05	1.57E+09	2.93E+05
เฉลี่ยทั้งหมด $\pm$ SD					2.30E+09 $\pm$ 0.22	2.93E+05 $\pm$ 0.05

ตารางผนวกที่ ค11 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลชันด้วยแคลเซียมอัลจินต แล้วอัดเม็ดอาหารไก่ด้วยอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 25-30 วินาที

ซ้ำที่	จำนวนเชื้อร็อคชีวิต (CFU/g)				จำนวนเชื้อเกล็ด (CFU/g)	
	ก่อนการอัดเม็ด		หลังการอัดเม็ด		ก่อนการอัดเม็ด	หลังการอัดเม็ด
	1	2	1	2		
1	1.68E+09	1.72E+09	6.75E+05	6.12E+05	1.70E+09	6.44E+05
2	1.85E+09	1.91E+09	3.96E+06	5.22E+06	1.88E+09	4.59E+06
3	1.92E+09	2.04E+09	3.78E+06	5.13E+06	1.98E+09	4.46E+06
เฉลี่ยทั้งหมด $\pm$ SD					1.85E+09 $\pm$ 0.03	3.23E+06 $\pm$ 0.44

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลชันเกล็ดเป็น 95.25 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ค12 สภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่

ชนิดตัวอย่าง อาหารไก่	สภาวะการอัดเม็ดอาหารไก่							
	T_t (°C)	T_m (°C)	T_s (°C)	t_0 (min:sec)	t_{total} (min:sec)	W (g)	Hardness (Kg/mm ²)	mc (%)
ชุดควบคุม อาหารไก่	65-67	74-76	54-60	0:40-1:15	4:00-5:50	600-680	1.758	14.53
ผสม FC อาหารไก่	65-75	65-75	60-63	0:30-1:00	3:00-6:00	550-700	1.167	17.70
ผสม EC	65-75	65-75	60-63	0:30-1:00	3:00-6:00	550-730	1.033	17.40

หมายเหตุ T_t = อุณหภูมิของเทอร์โมมิเตอร์ที่เครื่องอัดเม็ด (องศาเซลเซียส)

T_m = อุณหภูมิที่วัดได้จากบริเวณปล่องปล่อยวัตถุดิบก่อนเข้าสู่การอัดเม็ด (องศาเซลเซียส)

T_s = อุณหภูมิตัวอย่างอัดเม็ด (องศาเซลเซียส)

t_0 = เวลาที่เริ่มเก็บตัวอย่างอัดเม็ด (นาที่ : วินาที)

t_{total} = ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มใส่ตัวอย่างจนได้อาหารไก่เม็ด (นาที่ : วินาที)

W = น้ำหนักอาหารไก่เม็ด ที่ได้จากน้ำหนักอาหารเริ่มต้น 800 กรัม

FC = เชื้ออิสระ

EC = เชื้อที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน

Hardness = ความแข็งของอาหารไก่เม็ด (Kg/mm²)

mc = ความชื้นของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)

4. การทำแห้งแบบฟลูอิดไอซ์

ตารางผนวกที่ ค13 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่แข็งด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และทำแห้งแบบฟลูอิดไอซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ

เวลา	จำนวนเชื้อโรคชีวิต (CFU/g)						จำนวนเชื้อ	
ทำแห้ง	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			โรคชีวิตเฉลี่ย	SD
(นาทีก)	1	2	3	1	2	3	(CFU/g)	
0	4.05E+11	4.32E+11	4.50E+11	3.78E+11	3.60E+11	4.05E+11	4.05E+11	3.32E+10
15	2.28E+11	2.31E+11	2.33E+11	2.18E+11	2.15E+11	2.20E+11	2.24E+11	7.39E+09
30	1.78E+11	1.82E+11	1.85E+11	1.58E+11	1.63E+11	1.65E+11	1.72E+11	1.11E+10
45	1.01E+11	1.05E+11	1.08E+11	9.01E+10	8.61E+10	8.42E+10	9.57E+10	1.02E+10
60	2.57E+10	2.62E+10	2.65E+10	2.14E+10	2.24E+10	2.18E+10	2.40E+10	2.40E+09
90	7.43E+09	7.62E+09	7.92E+09	9.50E+09	8.91E+09	9.11E+09	8.42E+09	8.68E+08

หมายเหตุ : เพอร์เซ็นต์เย็นแช่แข็งเฉลี่ยเป็น 94.33 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ค14 ปริมาณความชื้นของ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่แข็งและทำแห้งแบบฟลูอิดไอซ์ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ

เวลาทำแห้ง (นาทีก)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)				ความชื้นเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	SD
	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2			
	1	2	1	2		
0	92.46740	92.46710	91.83507	91.92200	92.17289	0.34174
15	69.47840	69.47820	68.02380	69.84060	69.20525	0.80594
30	30.92710	30.92690	28.55110	28.79190	29.79925	1.30592
45	18.55640	18.55600	17.95505	18.05170	18.27979	0.32160
60	13.55000	13.54980	12.57804	12.65360	13.08286	0.54017
90	11.91910	11.91900	10.13250	10.78460	11.18880	0.88425

5. การเก็บรักษามดเชื้อ *L. reuteri* KUB-AC5 โดยการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์ เป็นเวลา 3 เดือน

ตารางผนวกที่ ค15 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่ขุเลชันและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

ระยะ เวลา (วัน)	จำนวนเชื้อรอดชีวิต (CFU/g)						จำนวน เชื้อเฉลี่ย (CFU/g)	SD
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2				
	1	2	3	1	2	3		
0	1.62E+11	1.69E+11	1.67E+11	1.81E+11	1.79E+11	1.88E+11	1.74E+11	9.95E+09
7	2.18E+10	2.25E+10	2.10E+10	6.84E+10	5.94E+10	6.30E+10	4.27E+10	2.31E+10
14	8.28E+10	8.55E+10	9.00E+10	1.41E+11	1.51E+11	1.46E+11	1.16E+11	3.31E+10
30	1.17E+09	1.23E+09	1.20E+09	5.76E+08	7.29E+08	6.75E+08	9.30E+08	3.00E+08
45	3.06E+07	3.60E+07	3.24E+07	4.50E+07	4.23E+07	4.68E+07	3.89E+07	6.79E+06
60	2.28E+07	2.34E+07	2.25E+07	2.44E+07	2.57E+07	2.67E+07	2.42E+07	1.68E+06
75	1.53E+07	1.68E+07	1.76E+07	1.81E+07	2.07E+07	2.00E+07	1.81E+07	2.00E+06
90	1.08E+07	9.27E+06	9.99E+06	1.23E+07	1.16E+07	1.31E+07	1.12E+07	1.43E+06

ตารางผนวกที่ ค16 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเย็นแช่ขุเลชันและผ่านการทำแห้ง 45 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

ระยะ เวลา (วัน)	จำนวนเชื้อรอดชีวิต (CFU/g)						จำนวน เชื้อเฉลี่ย (CFU/g)	SD
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2				
	1	2	3	1	2	3		
0	1.34E+11	1.38E+11	1.41E+11	1.45E+11	1.41E+11	1.49E+11	1.41E+11	5.19E+09
7	1.10E+11	1.15E+11	1.06E+11	1.17E+11	1.28E+11	1.19E+11	1.16E+11	7.55E+09
14	1.19E+11	1.29E+11	1.24E+11	1.38E+11	1.35E+11	1.39E+11	1.30E+11	7.99E+09
30	1.09E+11	9.70E+10	1.02E+11	1.04E+11	9.90E+10	1.09E+11	1.03E+11	4.96E+09
45	8.71E+10	7.92E+10	8.42E+10	8.91E+10	9.70E+10	8.42E+10	8.68E+10	6.03E+09
60	4.95E+10	5.15E+10	5.45E+10	5.25E+10	4.46E+10	3.96E+10	4.87E+10	5.58E+09
75	2.67E+10	2.79E+10	2.87E+10	2.70E+10	2.64E+10	2.86E+10	2.76E+10	9.80E+08
90	2.28E+10	2.38E+10	2.20E+10	2.49E+10	2.45E+10	2.39E+10	2.36E+10	1.09E+09

ตารางผนวกที่ ค17 ปริมาณ *L. reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการเอ็นแคปซูลเลชันและผ่านการทำแห้ง 60 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

ระยะ เวลา (วัน)	จำนวนเชื้อโรคชีวิต (CFU/g)						จำนวน เชื้อเฉลี่ย (CFU/g)	SD
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2				
	1	2	3	1	2	3		
0	2.15E+10	2.20E+10	2.28E+10	2.20E+10	2.25E+10	2.33E+10	2.23E+10	6.41E+08
7	1.72E+10	1.78E+10	1.80E+10	1.61E+10	1.45E+10	1.57E+10	1.66E+10	1.37E+09
14	1.88E+10	1.93E+10	1.99E+10	1.78E+10	1.86E+10	1.83E+10	1.88E+10	7.34E+08
30	1.98E+10	1.89E+10	1.85E+10	1.50E+10	1.57E+10	1.57E+10	1.73E+10	2.01E+09
45	1.19E+10	1.31E+10	1.34E+10	1.11E+10	1.09E+10	1.04E+10	1.18E+10	1.21E+09
60	1.10E+10	1.19E+10	1.07E+10	1.00E+10	9.60E+09	9.41E+09	1.04E+10	9.39E+08
75	1.06E+10	9.41E+09	8.61E+09	7.92E+09	8.81E+09	9.11E+09	9.08E+09	8.98E+08
90	7.03E+09	8.12E+09	7.43E+09	7.03E+09	6.44E+09	6.93E+09	7.16E+09	5.66E+08

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์เอ็นแคปซูลเลชันเฉลี่ยสำหรับการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เพื่อเก็บรักษาเป็น 94.59 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ ค18 ความชื้นของเมล็ด *L.reuteri* KUB-AC5 ที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไดซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

เวลาทำแห้ง (นาทีก)	ระยะเวลา (วัน)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)				ความชื้นเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์)	SD
		ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2			
		1	2	1	2		
0	0	92.69	92.54	91.84	91.92	92.25	0.4300
	7	92.74	92.68	91.99	92.10	92.38	0.3873
	14	92.43	92.50	91.50	91.58	92.00	0.5358
	30	92.96	92.80	92.11	92.17	92.51	0.4329
	45	93.65	93.54	92.54	92.63	93.09	0.5860
	60	94.06	94.11	93.05	93.12	93.59	0.5784
	75	94.34	94.45	93.46	93.52	93.94	0.5250
	90	94.71	94.78	94.11	94.23	94.46	0.3368
45	0	18.96	18.78	17.95	18.05	18.44	0.5093
	7	19.06	19.01	18.04	18.10	18.55	0.5581
	14	19.28	19.25	18.60	18.73	18.97	0.3507
	30	18.52	18.48	17.60	17.71	18.08	0.4902
	45	19.84	19.73	18.91	19.00	19.37	0.4827
	60	20.15	20.11	19.24	19.30	19.70	0.4974
	75	20.37	20.30	19.49	19.55	19.93	0.4720
	90	20.59	20.70	19.65	19.68	20.16	0.5677
60	0	14.35	14.46	12.58	12.65	13.51	1.0348
	7	14.44	14.53	12.68	12.72	13.59	1.0314
	14	14.88	14.82	13.01	13.09	13.95	1.0400
	30	14.58	14.57	12.87	12.75	13.69	1.0202
	45	15.04	15.10	13.37	13.41	14.23	0.9704
	60	15.58	15.62	13.84	13.91	14.74	0.9965
	75	15.79	15.82	14.36	14.41	15.10	0.8202
	90	16.35	16.43	14.79	14.80	15.59	0.9215

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ - นามสกุล

นางสาวณัชชา วรรณพุกษ์

วัน เดือน ปี ที่เกิด

1 พฤศจิกายน 2524

สถานที่เกิด

จ. กำแพงเพชร

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์
นครศรีธรรมราช สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ