



รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิค
ไมโครเอนแคปซูเลชันในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส

Application of Probiotic Immobilization with Microencapsulated
technique in Passion fruit Juice

กานต์ แยมพงษ์และคณะ
หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิค
ไมโครเอนแคปซูเลชันในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส

Application of Probiotic Immobilization with Microencapsulated
technique in Passion fruit Juice

กานต์ แยมพงษ์

หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รุ่งนภา สนั่นดี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ดวงเดือน โทปุรินทร์

หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนโดยมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2557

ชื่องานวิจัย	การประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้นในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส Application of Probiotic Immobilization with Microencapsulated technique in Passion fruit Juice
ผู้วิจัย	กานต์ แยมพงษ์
ผู้วิจัยร่วม	รุ่งนภา สนั่นดี ดวงเดือน โพธิ์รินทร์
สาขาวิชา	ชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2557

บทคัดย่อ

การศึกษาการประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชั้น โดยทำการศึกษาการตรึง *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ใช้การตรึงผ่านเยื่อหุ้มแบบกึ่งเลือกผ่านที่สร้างจากโครงสร้างโซเดียมอัลจิเนต-อินนูลิน-แซนแทนกัม ทำการเปรียบเทียบกับ *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ ในอาหารเหลว MRS และผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยอุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยทำการเติมเซลล์แขวนลอยตั้งต้นที่ 9.91 log₁₀ cfu/ml พบว่าปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์มีปริมาณเซลล์ มากที่อยู่ที่ 10.76 log₁₀ cfu/ml ในวันที่ 30 รองลงมาคือเซลล์ที่ผ่านการตรึงในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส เซลล์อิสระในอาหาร MRS และเซลล์อิสระในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ มีปริมาณ 9.80 9.52 และ 8.79 log₁₀ cfu/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงจะมีปริมาณมากกว่าเซลล์อิสระประมาณ 1 log₁₀ cfu/ml ทั้งในอาหาร MRS และผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส การศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีพบว่าค่า pH ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา ขณะที่ปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปของแลคติกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา โดยตัวอย่างทดสอบในอาหาร MRS จะมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปของแลคติก มากกว่าในตัวอย่างทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาพบปริมาณยีสต์และรา < 100 cfu/ml และแบคทีเรียโคลิฟอร์ม < 3 MPN/ml

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์, น้ำเสาวรส, โพรไบโอติก, ไมโครเอนแคปซูลชั้น

Research Title	Application of Probiotic Immobilization with Microencapsulated technique in Passion fruit Juice
Authors	Karn Yaempongsa
Co - Authors	Roongnapa Sanundee Duangduan Thopurin
Program	Biology Phetchabun Rajabhat University 2014

บทคัดย่อ

The studied of probiotic immobilization with microencapsulated technique used *Lactobacillus casei* TISTR 1463 as probiotic bacteria that Immobilized with semipermeable membrane created from Sodium alginate-Inulin-Xanthan gum in MRS broth and passion fruit juice, stored at 4°C for 30 days. The initial load of *L. casei* TISTR 1463 was Inoculated were $10.76 \log_{10}$ cfu/ml. The last of storage day found immobilized cell in MRS broth was the highest volumes of *L. casei* TISTR 1463 was $10.76 \log_{10}$ cfu/ml the later were immobilized cell in passion fruit juice, free living in MRS broth and free living cell in passion fruit juice, were 9.80 9.52 and $8.79 \log_{10}$ cfu/ml respectively. The competition of immobilized and free living cell showed the immobilized cells were higher volumes of *L. casei* TISTR 1463 than free living cell for $1 \log_{10}$ cfu/ml all of MRS broth and passion fruit comparison. The chemical properties found the pH were decreased for during stored period while the total acidity as lactic acid were increased, especially in MRS broth was apparently. The amount of yeast and mold were < 100 cfu/ml and coliform bacteria were < 3 MPN/ml during stored period for all treatments.

Keywords : cell immobilization, passion fruit juice, probiotic, microencapsulation

(ค)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการได้ด้วยความอนุเคราะห์ จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ได้เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัย และได้พิจารณาอบ
ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไปให้กับผู้วิจัย ทำให้สามารถดำเนินการทำการวิจัยได้อย่างลุล่วงไปได้
ด้วยดี ทั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่
ห้องปฏิบัติการทุกท่านในหลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา รวมไปถึงผู้ช่วยวิจัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ
ระหว่างการทำวิจัยจนงานเสร็จสมบูรณ์ได้

กานต์ แยมพงษ์ และคณะ

28 กรกฎาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญรูป.....	จ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมุติฐานงานวิจัย.....	2
1.4 ระเบียบวิธีวิจัย.....	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	2
1.6 ประโยชน์ของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โพรไบโอติก (Probiotic)	3
2.2 การตรึงเซลล์ (Cell Immobilization)	4
2.3 วิธีการตรึงเซลล์.....	4
2.4 เสาวรส.....	5
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	8
3.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์.....	8
3.2 การศึกษการรอดชีวิตของเซลล์แขวนลอย <i>L. casei</i> TISTR 1463	9
ในอาหาร MRS broth ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C	10
3.3 การศึกษการอยู่รอดของ <i>L. casei</i> TISTR 1463 ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส	
ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C.....	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	11
4.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอย <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 1463.....	11
4.2 การรอดชีวิตของ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการ ตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหารเลี้ยง เชื้อ MRS broth.....	11
4.3 การรอดชีวิตของ <i>Lactobacillus casei</i> TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการ ตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในผลิตภัณฑ์ น้ำเสาวรส.....	14
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	20
5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	20
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	21
บรรณานุกรม.....	22
ภาคผนวก.....	25
ภาคผนวก ก (วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ).....	26
ภาคผนวก ข (ประมวลภาพการศีกษา).....	33
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์.....	37
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	52

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
4.1 ปริมาณ <i>L. casei</i> TISTR 1463 ในอาหาร MRS broth ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	11
4.2 ค่า pH ของอาหาร MRS broth ที่ผ่านการเติม <i>L. casei</i> TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	13
4.3 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของอาหาร MRS broth ที่ผ่านการเติม <i>L. casei</i> TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	14
4.4 ปริมาณ <i>L. casei</i> TISTR 1463 ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	15
4.5 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ที่ผ่านการเติม <i>L. casei</i> TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	16
4.6 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ที่ผ่านการเติม <i>L. casei</i> TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	17
4.7 ปริมาณ <i>L. casei</i> TISTR 1463 ในตัวอย่างทดลองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	18
4.8 ค่า pH ของตัวอย่างทดลอง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	19
4.9 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของตัวอย่างทดลอง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน.....	20

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โพรไบโอติก (Probiotic) คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อผู้บริโภค โดยจะช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1992) และยังป้องกันความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร ช่วยลดผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะที่มีต่อลำไส้ ช่วยป้องกันโรคลำไส้อักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Gibson and Roberfroid, 1995; Walker and Duffy, 1998; Coakley et al., 2003) ปัจจุบัน โพรไบโอติกเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในบทบาทของอาหารส่งเสริมสุขภาพ ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพในหลายประเทศซึ่งโดยมากแล้วจะพบในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต (Fook et al., 1999) ซึ่งแนวโน้มการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกนั้นไม่ได้หยุดเพียงผลิตภัณฑ์นมหมักแต่ยังสามารถนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เนื้อหมัก น้ำสลัด น้ำผลไม้ (Holzapfel and Schillinger, 2002) เนื่องจากยังมีผู้บริโภคบางกลุ่มนั้นพบว่ามีปัญหาการย่อยน้ำตาลแลคโตสซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่มีโพรไบโอติกจึงนับว่าเป็นทางเลือกใหม่สำหรับผู้บริโภคที่ไม่สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์นมได้ เนื่องจากน้ำผลไม้เป็นเครื่องดื่มที่ดื่มได้ทุกเพศทุกวัย นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางโภชนาการเพราะมีส่วนผสมของเกลือแร่และวิตามิน สารต้านอนุมูลอิสระและไม่มีสารก่อให้เกิดภูมิแพ้ ทำให้มีเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโพรไบโอติกนั้นจะพบน้อยมากถ้าไม่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม ดังนั้นการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นจึงจำเป็นต้องคำนึงการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

เสาวรสนั้นเป็นพืชที่สามารถสามารถปลูกได้ในพื้นที่ราบและพื้นที่สูงซึ่งในจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณอำเภอเขาค้อที่เป็นแหล่งผลิตเสาวรสแหล่งใหญ่ของประเทศ เสาวรสมีวิตามินเอสูง ช่วยรักษาอาการนอนไม่หลับ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ลดอาการเจ็บคอ สร้างภูมิคุ้มกันโรค กำจัดสารพิษในเลือด บำรุงผิวพรรณ และช่วยฟื้นฟูตับและไตที่อ่อนแอ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการศึกษการตรึงเซลล์โพรไบโอติกเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสเสริมโพรไบโอติก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเลือกรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำเสาวรส โดยปรับปรุงการอยู่รอดของเซลล์โพรไบโอติกด้วยการประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

1.2.2 เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในน้ำเสาวรส

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

การตรึงเซลล์ผ่านโครงสร้าง ไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม จะทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอดได้มากกว่าการไม่ตรึงเซลล์

1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

1.4.1 น้ำเสาวรสบรรจุกระป๋องเป็นตัวแทนของน้ำเสาวรสในการวิจัย

1.4.2 ใช้ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 เป็นโพรไบโอติกในการวิจัย

1.4.3 เทคนิคการตรึงเซลล์ใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (Microencapsulation) ด้วยไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม

1.4.4 ศึกษาการเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้เกณฑ์พิจารณา คือ เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกต้องเหลือรอดอย่างน้อย 1×10^6 cfu/ml ซึ่งถือเป็นระดับที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งยังคงเหลือรอดหลังผ่านระบบทางเดินอาหารและก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ถูกอาศัย

การตรึงเซลล์ หมายถึง การยึดเซลล์ หรือห่อหุ้มเซลล์ ไว้กับตัวกลาง

ไมโครเอนแคปซูเลชัน หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ไว้ใน semipermeable membrane

1.6 ประโยชน์ของงานวิจัย

6.1 ทราบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

6.2 ทราบการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยไฮเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในน้ำเสาวรส

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โพรไบโอติก (Probiotic)

คำว่าโพรไบโอติก (Probiotic) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี 1965 งานวิจัยของ Lilly และ Stillwell เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด (Lilly and Stillwell, 1965)

ในปี 1974 Parker ได้ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Parker, 1974)

ในปี 1992 Fuller ได้ให้ความหมายของคำว่าโพรไบโอติกหมายถึงอาหารเสริมที่ได้จาก จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อระบบลำไส้ของร่างกายมนุษย์

คำจำกัดความล่าสุดโดยองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) อธิบายไว้ว่า โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งยังคงเหลือรอดหลังผ่านระบบทางเดินอาหารและก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้ถูกอาศัย

2.1.1 หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่นำมาเลือกใช้เป็นโพรไบโอติก (Salminen et al., 2000) จำเป็นต้องมีคุณลักษณะดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกต้องผ่านการพิสูจน์ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe) ซึ่งมีลักษณะดังต่อไปนี้

- 1.1 แหล่งในการคัดแยกเชื้อต้องมีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (Genus) และสายพันธุ์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย

- 1.2 ไม่สร้างสารพิษ

- 1.3 มีการยึดติดภายในระบบทางเดินอาหาร

- 1.4 ต้องมีความสัมพันธ์กับเชื้อหรือใกล้ชิดกับแบคทีเรียเจ้าถิ่น

2. สามารถทนต่อกรดและความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านและสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้

3. สามารถยึดติดผนังลำไส้ของเจ้าบ้านและมีการแข่งกันการยึดติดกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
4. มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้มาก โดยใช้เซลล์เริ่มต้นน้อย
5. ผลิตภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารได้ เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) สารต้านจุลินทรีย์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ
6. สามารถป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรค และเพิ่มระดับภูมิคุ้มกัน
7. มีความคงตัวสูง หลังจากผ่านกระบวนการผลิตแล้วต้องสามารถมีชีวิตอยู่และเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน
8. ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสารบางชนิดได้ เช่น -galactosidase

2.2 การตรึงเซลล์ (Cell Immobilization)

ในช่วงเวลาประมาณ 50 ปีที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งใช้ในการวิเคราะห์และในทางการแพทย์ ทำให้มีงานวิจัยในสาขาใหม่ที่เรียกว่าเทคโนโลยีของเอนไซม์ (enzyme technology) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เพื่อให้มีความสะดวกต่อการใช้งานมากขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าเอนไซม์จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่จุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนในการสกัดเอนไซม์จึงได้มีการนำเซลล์มาตรึงเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนที่การอาศัยปฏิกิริยาต่อเนื่องของเอนไซม์ (สมใจ, 2550)

2.3 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งออกได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือการยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method) (สมใจ, 2550)

2.3.1 การยึดด้วยตัวนำ หมายถึงการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carrier)

2.3.2 การเชื่อมแบบไขว้ หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi reagent หรือ multifunctional reagent ซึ่งแตกต่างกันวิธีอื่นๆ คือ เซลล์จะไม่ถูกตรึงกับสารที่ทำหน้าที่ตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้ม แต่จะเชื่อมกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่รุนแรง ซึ่ง

อาจส่งผลให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จึงเหมาะกับการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยว (single reaction) เท่านั้น

2.3.3 การห่อหุ้ม เป็นการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ถูกห่อหุ้มอยู่ในเจล วิธีการนี้แบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ microencapsulation และ lattice type

- Microencapsulation หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ไว้ใน semipermeable membrane เช่น คอลโลอิดเียน หรือซิลิโคน ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้แต่จะยอมให้สารตั้งต้นหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ

- Lattice type หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ภายในช่องว่างสามมิติในเจลของสารพอลิเมอร์

2.4 เสาวรส

เสาวรสเป็นไม้เถา มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Passiflora laurifolia* L. ชื่อสามัญ คือ Jamaica honey-suckle, Passion fruit, Yellow granadilla เป็นพืชในวงศ์ Passifloraceae เถามีลักษณะกลม ใบ เป็นใบเดี่ยว ขอบใบหยักลึก ที่ก้านใบมีต่อมใบ ดอกหนา เป็นมันสีเขียวก่ำ ดอก ออกดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ ห้อยคว่ำคล้ายกับดวงไฟโคม กาบดอกหุ้มสีเขียวก่ำ กลีบชั้นนอกเป็นรูปกระบอกปลายแฉกด้านหลังมีสีเขียวก่ำ ด้านในมีสีม่วงอ่อนประขอบด้วยจุดแดง ๆ กลีบชั้นในลักษณะคล้ายกับตัวแฉกของกลีบชั้นนอก สีม่วงอ่อนหรือชมพูอ่อนมีประสีแดงแซม กลีบย่อยกลางมีเป็นชั้นๆ สองชั้นแต่ละกลีบค่อนข้างกลม สีม่วงก่ำ พาดด้วยปลายสีขาวสลับแดง มีเกสรอยู่ตรงกลางสีเขียวนวล ดอกมีกลิ่นหอมแรงจัดมาก ผล เป็นรูปไข่หรือไข่ยาว มีหลายพันธุ์ บางพันธุ์ ผิวผลสีม่วง สีเหลือง สีส้มอมน้ำตาล เปลือกผล เรียบ เนื้อรับประทานได้ มีเมล็ดจำนวนมาก อยู่ตรงกลางมีสรรพคุณ ช่วยลดไขมันในเส้นเลือด (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนจิตรลดา, มปป.)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Myllarinen และคณะ ได้ศึกษาการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกภายในเม็ดสตาร์ชจากมันฝรั่งขนาด 50 – 100 ไมครอน จากนั้นทำการเคลือบด้วยอะไมเลสและทำแห้งเป็นผง พบว่ามีจำนวนโพรไบโอติกรอดชีวิตมากกว่า 10^9 cfu/g และสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเซลล์ยังคงรอดชีวิตและยังรักษาคุณสมบัติไว้ได้ นอกจากนี้ในระบบย่อยอาหารจำลองพบว่า สตาร์ชแคปซูลสามารถทนต่อการย่อยในลำไส้เล็กส่วนบนถึงร้อยละ 90 แต่จะพบการย่อยสลายอย่างช้าๆ ในลำไส้ใหญ่ (Myllarinen et al., 2000)

ในปีเดียวกัน Saltana และคณะ ทำการศึกษาการตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคเอนแคปซูลชันร่วมกับการใช้พรีไบโอติก โดยใช้แคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับสตาร์ชข้าวโพดทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ผ่านการตรึงโดยไม่เติมพรีไบโอติก ในการทดลองเลือกใช้เชื้อโพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ในโยเกิร์ต พบว่าเมื่อผ่านการเก็บรักษานานกว่า 8 สัปดาห์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกตรึงลดลงประมาณ 0.5 log ในขณะที่เซลล์อิสระมีการลดลง 1 log (Saltana et al., 2000)

Lian Hsiao และ Chou ทำการศึกษาการเคลือบเซลล์จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *B. longum* B86 และ *B. infantis* CCRC 14633 ในปี 2003 โดยใช้สารเคลือบหลายชนิด คือ เจลติน สารละลายแป้ง หางนมและกัมอาราบิก ทำการเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์ในระบบกระเพาะอาหารจำลองพบว่าเซลล์ที่ผ่านการเคลือบจะสามารถอยู่รอดในระบบจำลองได้ยาวนานกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านกระบวนการเคลือบ (Lian Hsiao and Chou, 2003)

ในปี 2004 Chandramouli และคณะ ได้ทำการปรับปรุงเทคนิคการเคลือบเซลล์ *Lactobacillus* spp. โดยใช้อัลจิเนตที่เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ในการเคลือบ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอัลจิเนตจะมีผลต่อการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* และเมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการเคลือบไปศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในระบบทางเดินอาหารจำลองพบว่าเซลล์ที่ผ่านการเคลือบจะมีอัตราการรอดที่สูงกว่าเซลล์อิสระ 2 log cfu/ml (Chandramouli, 2004)

ในปี 2008 Ding และ Shah ได้ทำการศึกษารอดของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำแอปเปิลและน้ำส้ม โดยทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก 8 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus rhamnosus* *Bifidobacterium longum* *L. salivarius* *L. plantarum* *L. acidophilus* *L. paracasei* *B. lactis* type Bi-04 และ *B. lactis* type Bi-07. จากผลการศึกษาพบว่าน้ำผลไม้ที่ผ่านการเติมเซลล์ที่การตรึงเซลล์จะช่วยป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า โดยที่เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถมีชีวิตรอดนานกว่า 6 สัปดาห์ ซึ่งนานกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ 5 สัปดาห์ ในน้ำส้มและน้ำแอปเปิล (Ding and Shah, 2008)

ภคมน และคณะ (2542) ได้ทำการศึกษาโพรไบโอติก *L. acidophilus* ทนความร้อนเพื่อนำไปเป็นสารเสริมชีวภาพสำหรับอาหารสัตว์อัดเม็ดด้วยเทคนิคเอนแคปซูลชันด้วยไคโตแซนผสมกับอัลจิเนต หลังผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าจำนวนเซลล์ยังหลงเหลือเพียงพอต่อการเกิดประโยชน์ และหลังจากที่ทดลองปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลในระบบทางเดินอาหารจำลองพบว่า 98% ของจำนวนเซลล์เริ่มต้นถูกปลดปล่อยที่ลำไส้เล็ก ซึ่ง

เซลล์เหล่านี้สามารถทนเกลือได้ดีเหมือนเซลล์ปกติและยังคงความสามารถเหมือนเซลล์ปกติ
(ภคมน และคณะ, 2542)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดย *L. casei* TISTR 1463 ที่ได้รับจะอยู่ในลักษณะผงแห้งจากการแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry) นำมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อกระตุ้นให้เชื้อมีการเจริญและมีความแข็งแรง

3.1.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย *L. casei* TISTR 1463

3.1.2.1 เซลล์ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ *L. casei* TISTR 1463 โดยถ่ายเชื้อจากข้อ 3.1.1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใน MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย sterile phosphate buffered saline ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และทำให้เป็นเซลล์แขวนลอย

3.1.2.2 เซลล์ที่ผ่านกระบวนการตรึงเซลล์

ทำการตรึงเซลล์โดยประยุกต์จากวิธีของ Cortón et al. (2000) และ De Giulio et al. (2005) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *L. casei* TISTR 1463 โดยถ่ายเชื้อจากข้อ 3.1.1 ผสมสารละลาย Sodium alginate 2.0% Glycerol 5.0% Xanthan gum 0.15% Inulin 0.1% และ Tween 80 0.1% นำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น ปิเปตสารละลายผสมกับเซลล์แขวนลอยที่อัตราส่วน 2 ต่อ 1 จากนั้นหยดสารผสมลงในสารละลาย 0.05M CaCl_2 ปั่นเม็ดเจลที่ได้ในสารละลาย 0.05M CaCl_2 นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 °C) จากนั้นกรองเม็ดเจลที่ได้ผ่านตะแกรง ล้างเม็ดเจลด้วย 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)

3.2 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์แขวนลอย *L. casei* TISTR 1463 ในอาหาร MRS broth ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเซลล์แขวนลอย *L. casei* TISTR 1463 จากข้อ 3.1.2.1 และ 3.1.2.2 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 5 วัน โดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

3.2.1.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี

- ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity; TA) ใช้วิธีการจาก AOAC (1990) โดยนำตัวอย่างตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้สารละลาย phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ จำนวน 2-3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลาย 0.1N NaOH จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลาย 0.1N NaOH ที่ใช้มาคำนวณปริมาตรกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

- ค่า pH (ค่าความเป็นกรด-ด่าง) ตามวิธี AOAC (1990) โดยนำตัวอย่างของเหลวแบ่งใส่ปิ๊กเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ปิ๊กเกอร์ ปิ๊กเกอร์ละ 10 มิลลิลิตร นำของเหลวในปิ๊กเกอร์ทั้ง 3 มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH Meter บันทึกค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่วัดได้ทั้ง 3 ซ้ำ

3.2.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

ทำการตรวจนับปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 โดยใช้เทคนิค pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำปริมาณของโคลีนี *L. casei* TISTR 1463 ที่ขึ้นบนอาหาร MRS agar มาทำการคำนวณปริมาณ

3.2.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3 การศึกษาการอยู่รอดของ *L. casei* TISTR 1463 ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเซลล์ *L. casei* TISTR 1463 ที่ได้จากข้อ 3.1.2.1 และ 3.1.2.2 มาเลี้ยงในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.3.1.1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity; TA) ในรูปของกรดแลกติก (lactic acid) โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบในข้อ 3.2.1.1
- ค่า pH โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบในข้อ 3.2.1.1
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ Hand Refractometer

3.3.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

- ทำการตรวจนับปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 โดยใช้เทคนิค pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar หลังจากนั้นไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำปริมาณของโคลีนี *L. casei* TISTR 1463 ที่ขึ้นบนอาหาร MRS agar มาทำการคำนวณปริมาณ
- ตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ด้วยวิธีการ MPN (Most Probable Number) ด้วยอาหาร Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST broth) นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ตรวจหาีสต์และราด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

บทที่ 4

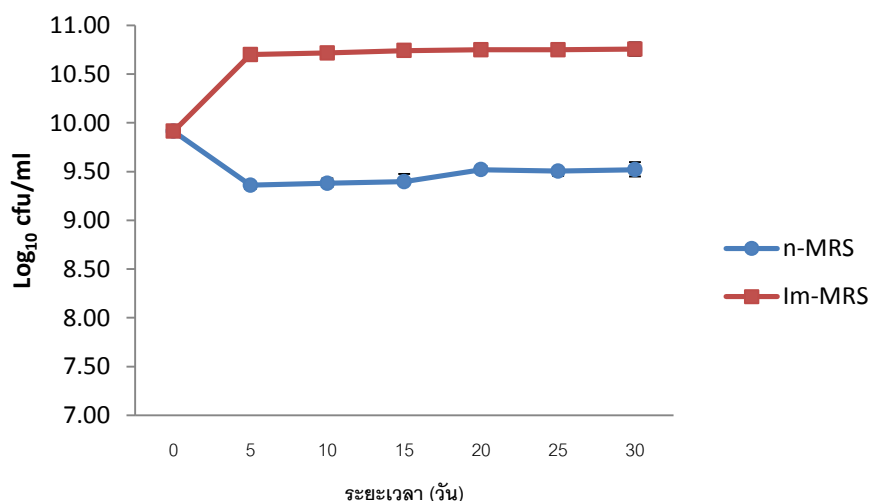
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอย *Lactobacillus casei* TISTR 1463

การเตรียมเซลล์แขวนลอยของ *L. casei* TISTR 1463 เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น เตรียมโดยทำการกระตุ้น *L. casei* TISTR 1463 จากสภาพผงด้วยอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth ทำการสร้างเซลล์แขวนลอยโดยทำเพาะเลี้ยง *L. casei* TISTR เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที พบว่า *L. casei* TISTR 1463 ปริมาณ $9.91 \pm 0.01 \log_{10} \text{cfu/ml}$

4.2 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจินท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

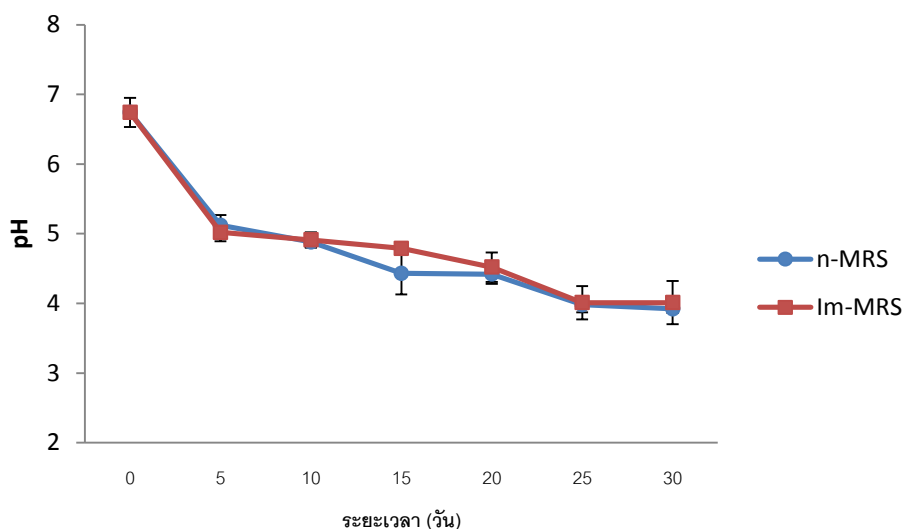
จากการศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) และไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) ในอาหาร MRS broth ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มตรวจตัวอย่างทุก 5 วัน เมื่อนำผลปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 มาศึกษาแสดงผลดัง ภาพที่ 1



ภาพที่ 4.1 ปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 ในอาหาร MRS broth ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

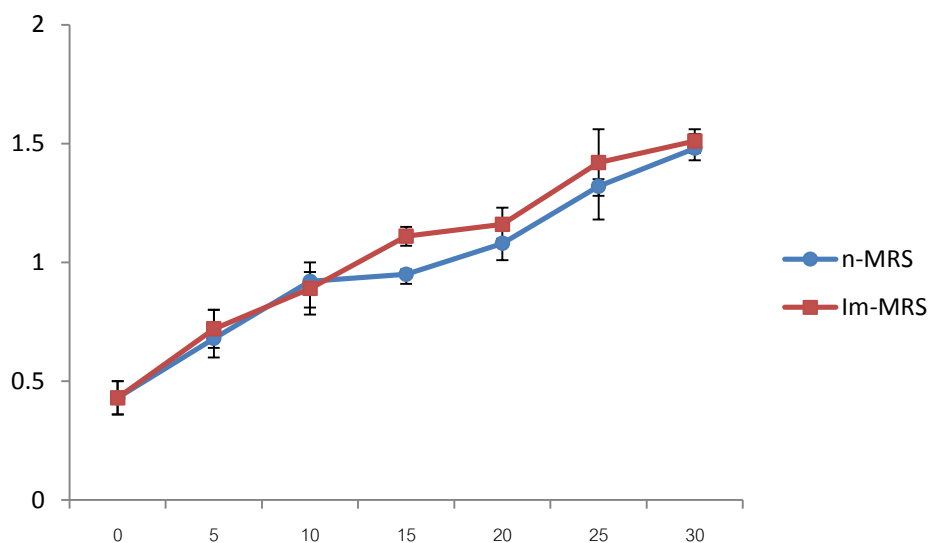
จากภาพที่ 1 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ระหว่างการเก็บรักษาโดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ $9.91 \pm 0.03 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ เมื่อเก็บรักษาผ่านระยะเวลา 5 วัน จะปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ใน n-MRS จะปรับตัวลดลงเหลืออยู่ที่ $9.36 \pm 0.02 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ซึ่งมีความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 96.45% หลังจากนั้นจะมีปริมาณที่คงที่ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง $9.45 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ สำหรับ Im-MRS นั้นปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 จะเพิ่มมากขึ้น โดยจะเพิ่มมากขึ้นในระยะเวลา 5 วันแรก โดยพบความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 จะเพิ่มขึ้นไปอยู่ที่ปริมาณ $10.70 \pm 0.04 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ หลังจากนั้นปริมาณจะค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง $10.73 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ จากผลการศึกษาก็จะเห็นได้ว่าเซลล์ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 5 วันแรกของการทดสอบ โดยเซลล์ที่ผ่านการตรึงเซลล์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น $0.79 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ โดยมีปริมาณมากกว่าเซลล์อิสระที่ไม่ผ่านการตรึง $1.34 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสวรรรยา (2550) Chandramouli และคณะ (2004) และ Ding และ Shah (2008) ที่ทำการศึกษการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ ซึ่งรายงานผลว่าเซลล์ที่ผ่านการตรึงนั้นจะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

เมื่อพิจารณาค่า pH ในอาหาร MRS broth ที่เติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงและไม่ตรึงเซลล์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน โดยทำการสุ่มตรวจตัวอย่างทุก 5 วัน มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 4.2 ค่า pH ของอาหาร MRS broth ที่ผ่านการเติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

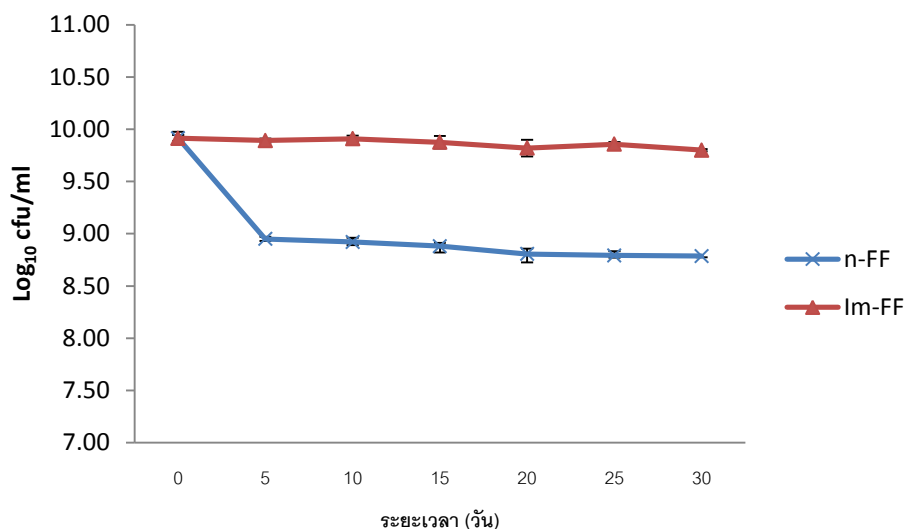
จากผลการศึกษพบว่าค่า pH ของอาหาร MRS broth มีแนวโน้มที่จะลดลง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างอาหารที่เติมเซลล์ที่ผ่านการตรึงและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษาพบว่าค่า pH ในแต่ละตัวอย่างการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยค่า pH ของ n-MRS มี pH ลดลง 2.82 และ Im-MRS มี pH ลดลง 2.74 ระหว่างการศึกษา การเปลี่ยนแปลงของ pH เป็นผลจากที่ *L. casei* ทำการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส (glucose) ให้กลายเป็นกรดแลกติก ทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา และส่งผลให้ค่า pH ลดลง (Saloff-Coste, 1995) และค่า pH ที่ลดลงมีความสอดคล้องกับปริมาณร้อยละของกรดแลกติกที่ได้จากการศึกษาโดยพบว่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมด (แลกติก) จะมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นดังแสดงในภาพที่ 3 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของปริมาณกรดแลกติกระหว่าง n-MRS และ Im-MRS ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และปริมาณร้อยละของกรด ของภคมน และคณะ (2542) ได้ทำการศึกษาโพรไบโอติก *L. acidophilus* ทนความร้อนเพื่อนำไปเป็นสารเสริมชีวภาพสำหรับอาหารสัตว์อัดเม็ดด้วยเทคนิคเอนแคปซูเลชันด้วยไคโตแซนผสมกับอัลจิเนต หลังผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าจำนวนเซลล์ยังหลงเหลือเพียงพอต่อการเกิดประโยชน์



ภาพที่ 4.3 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของอาหาร MRS broth ที่ผ่านการเติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

4.3 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ ด้วยโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส

จากการศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ผ่านผ่านโครงสร้าง โซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม (Im-FF) และไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-FF) ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสปริมาณเต็ม ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มตรวจตัวอย่างทุก 5 วัน เมื่อนำผลปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 มาศึกษาแสดงผลดัง ภาพที่ 4

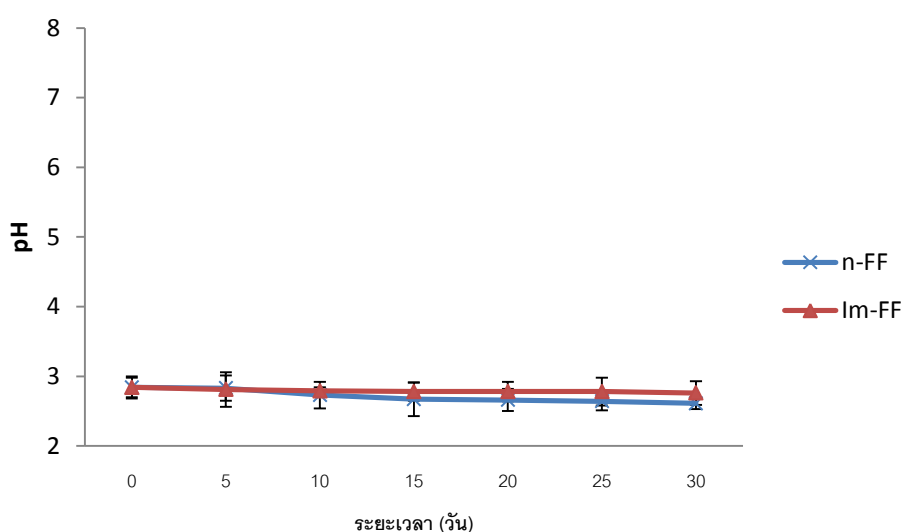


ภาพที่ 4.4 ปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

จากภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ระหว่างการเก็บรักษาโดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ $9.91 \pm 0.03 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ เมื่อเก็บรักษาผ่านระยะเวลา 5 วัน จะปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ใน n-FF ปริมาณลดลงอย่างชัดเจน โดยมีปริมาณเซลล์รอดชีวิตเหลืออยู่ที่ $8.95 \pm 0.06 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ซึ่งมีความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับเซลล์ตั้งต้น โดยคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 90.31% หลังจากนั้นปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 จะมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง $8.86 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ สำหรับ Im-FF นั้นปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 อยู่ในระดับคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง $9.86 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ซึ่งไม่พบความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการศึกษพบว่า เซลล์ *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณอย่างเห็นได้ชัดในช่วง 5 วันแรกของการทดลอง เช่นเดียวกับที่มีการเปลี่ยนแปลงในการศึกษากับอาหาร MRS broth ขณะที่เซลล์ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสนั้นจะมีปริมาณคงที่ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมของน้ำเสาวรสที่อาจไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของ *L. casei* TISTR 1463 ส่งผลให้การศึกษาในน้ำเสาวรสนั้นเซลล์จะมีปริมาณที่ลดลงมากกว่าในอาหาร MRS broth ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มแลคติก อย่างไรก็ตามจากการศึกษา

แสดงให้เห็นว่า Im-FF นั้นจะมีปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 ที่คงที่โดยไม่ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมของน้ำเสาวรส ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandramouli และคณะ (2004) และ งานวิจัยของ Ding และ Shah (2008) ที่กล่าวถึงประสิทธิภาพของการตรึงเซลล์ จะทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

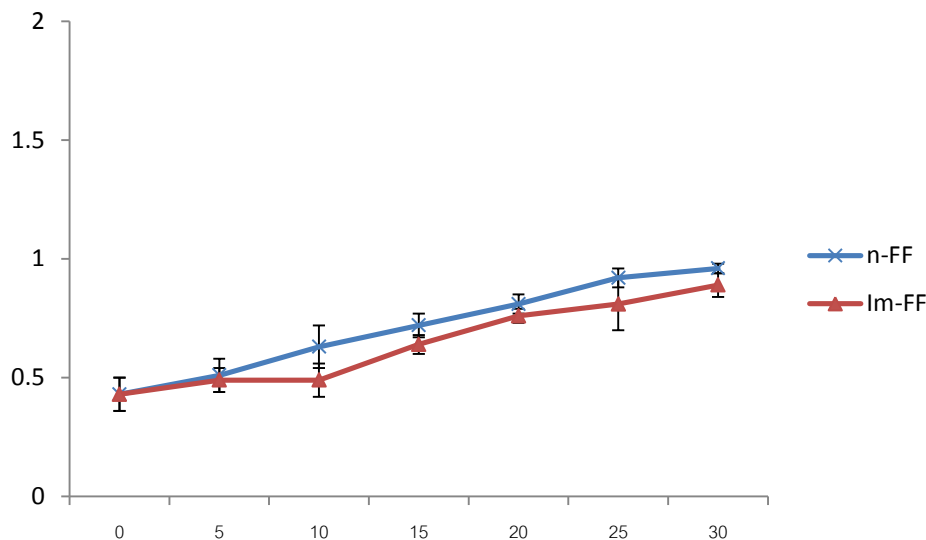
เมื่อพิจารณาค่า pH ในน้ำเสาวรส ที่เติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงและไม่ตรึงเซลล์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน โดยทำการสุ่มตรวจตัวอย่างทุก 5 วัน มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4.5 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ที่ผ่านการเติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

จากผลการศึกษาพบว่าค่า pH ของน้ำเสาวรส มีแนวโน้มที่จะลดลง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างน้ำเสาวรสที่เติมเซลล์ที่ผ่านการตรึงและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการเก็บรักษาพบว่าค่า pH ในแต่ละตัวอย่างการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมาก เนื่องจาก pH เริ่มต้นของน้ำเสาวรสมีค่า pH = 2.8 ซึ่งจัดได้ว่ามีความเป็นกรดสูง และจัดได้ว่าเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 ที่จะเจริญได้ดีในช่วง pH 5.5 ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาปริมาณร้อยละกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติก (ภาพที่ 6) จะพบว่าปริมาณร้อยละกรดทั้งหมด (แลกติก) จะมีปริมาณที่น้อยมาก และมีการปรับเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสมีปริมาณร้อยละกรดทั้งหมด (แลกติก) เริ่มต้นอยู่ที่ร้อยละ 0.43 และจะปรับตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากระยะเวลาการเก็บรักษา เนื่องจากเป็นผลจากการใช้น้ำตาลในการหมัก

ของ *L. casei* TISTR 1463 ที่จะสร้างกรดแลกติกเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า pH และปริมาณกรดมีการเปลี่ยนแปลง

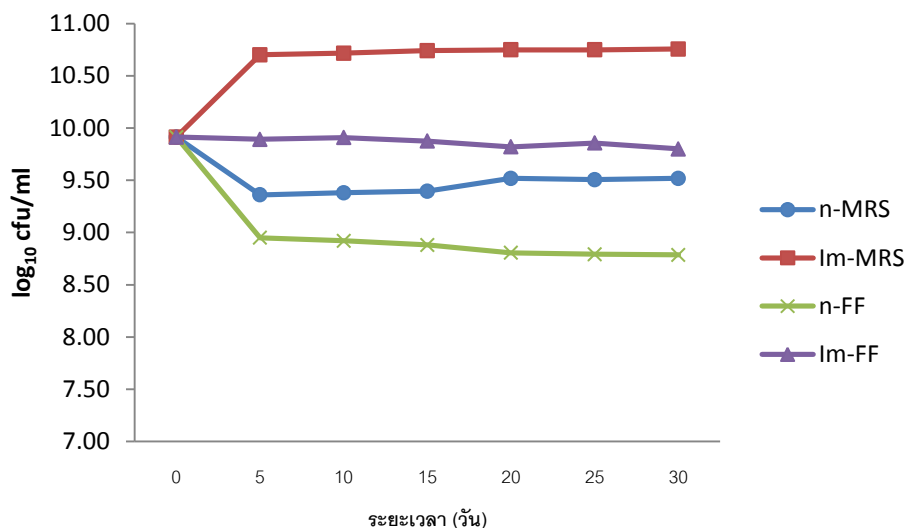


ภาพที่ 4.6 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ที่ผ่านการเติม *L. casei* TISTR 1463 ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ (n-MRS) และผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

4. การเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ในอาหาร MRS broth และ ผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส

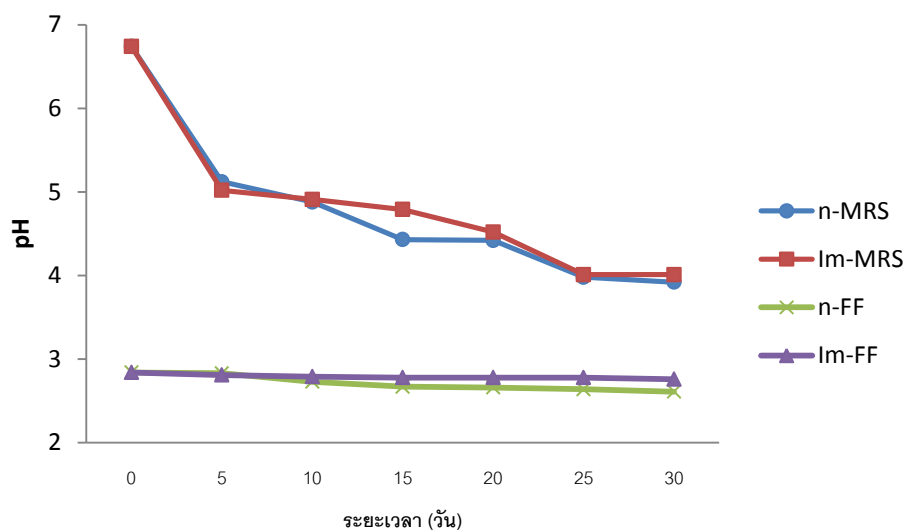
เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ในอาหาร MRS broth และ ผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน แสดงผลดังภาพที่ 7 พบว่าเซลล์อิสระที่ไม่ผ่านการตรึงในอาหาร MRS broth (n-MRS) และเซลล์อิสระที่ไม่ผ่านการตรึงในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส (n-FF) นั้นจะมีการปรับลดปริมาณลงจากเซลล์ตั้งต้นหลังจากนั้นจะมีปริมาณคงที่ ขณะที่เซลล์ที่ผ่านการตรึงเซลล์ (Im-MRS และ Im-FF) นั้นจะคงปริมาณอยู่ในสภาพแวดล้อมใหม่ได้ดีกว่า ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ สวรรยา (2550) และ Ding and Shah (2008) ที่ทำการศึกษการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ ซึ่งรายงานผลว่าเซลล์ที่ผ่านการตรึงนั้นจะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเซลล์อิสระ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการศึกษา แสดงให้เห็นว่าปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์นั้นมีอยู่ที่ 6.3×10^9 cfu/ml ซึ่งมากกว่า 10^6 cfu/ml จัดว่าอยู่ในระดับที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยสอดคล้องกับรายงานของภคมน และคณะ

(2542) ได้ทำการศึกษาโพรไบโอติก *L. acidophilus* ทนความร้อนเพื่อนำไปเป็นสารเสริมชีวภาพ สำหรับอาหารสัตว์อัดเม็ดด้วยเทคนิคเอนแคปซูเลชันด้วยไคโตแซนผสมกับอัลจิเนต หลังผ่านการ เก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าจำนวนเซลล์ยังหลงเหลือเพียงพอต่อการเกิดประโยชน์

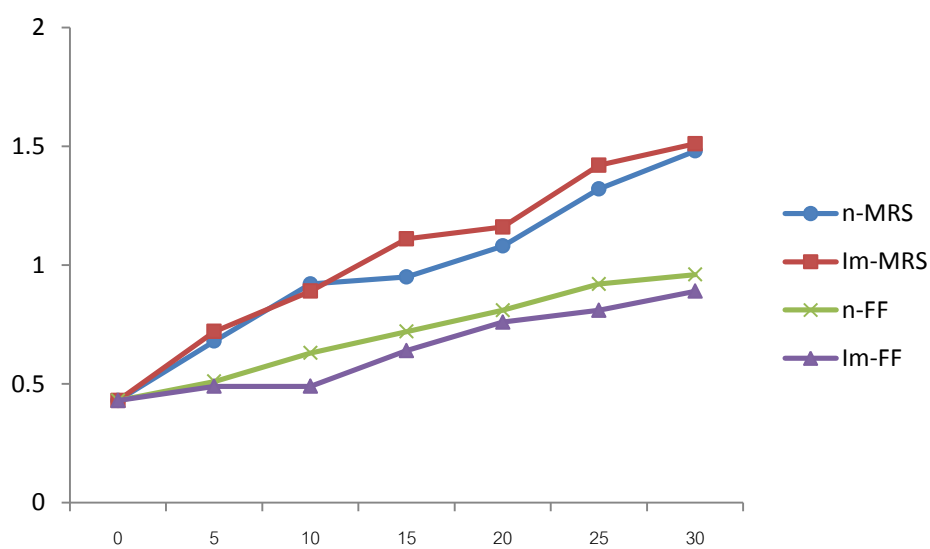


ภาพที่ 4.7 ปริมาณ *L. casei* TISTR 1463 ในตัวอย่างทดลองระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH (ภาพที่ 8) และปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมด (แลกติก) (ภาพที่ 9) จะพบว่าค่า pH จะมีแนวโน้มที่ลดลง และส่งผลให้ปริมาณร้อยละของกรด ทั้งหมด (แลกติก) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดของตัวอย่างจะพบว่าอาหาร MRS broth มี pH เริ่มต้น 6.74 ขณะที่น้ำเสารสมี pH 2.84 เป็นผลให้ *L. casei* TISTR 1463 เจริญเติบโตได้ดีกว่า เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงและมีเงื่อนไขสภาวะที่เหมาะสมกว่า ทำให้ปริมาณกรดที่วัดได้มีปริมาณที่สูงกว่าในผลิตภัณฑ์น้ำเสารสด้วย



ภาพที่ 4.8 ค่า pH ของตัวอย่างทดลอง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4.9 ค่าร้อยละของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติกของตัวอย่างทดลอง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 วัน

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลและอภิปรายผลงานวิจัย

5.1.1 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

L. casei TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยโครงสร้าง โซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในอาหาร MRS broth จะมีปริมาณสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ โดยในวันที่ 30 เซลล์ที่ผ่านการตรึงจะมีปริมาณมากกว่า $1.24 \log_{10}$ cfu/ml โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วง 5 วันแรกของการศึกษา หลังจากนั้นจะมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีพบว่าค่า pH จะมีปริมาณลดลงระหว่างการศึกษา และแปรผันผกผันกับค่าร้อยละความเป็นกรด (แลกติก) ที่เพิ่มมากขึ้น

5.1.2 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสด

L. casei TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยโครงสร้าง โซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัม ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสด จะมีปริมาณสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการตรึงเซลล์ โดยในวันที่ 30 เซลล์ที่ผ่านการตรึงจะมีปริมาณมากกว่า $1.01 \log_{10}$ cfu/ml โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วง 5 วันแรกของการศึกษา หลังจากนั้นจะมีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ เช่นเดียวกับการศึกษาในอาหาร MRS broth เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีพบว่าค่า pH จะมีปริมาณลดลงระหว่างการศึกษา และแปรผันผกผันกับค่าร้อยละความเป็นกรด (แลกติก) ที่เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาในอาหาร MRS broth

5.1.3 การเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ในอาหาร MRS broth และ ผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสด

เมื่อทำการเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านและไม่ผ่านการตรึงเซลล์ ในอาหาร MRS broth และผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรสด พบว่า *L. casei* TISTR 1463 จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในอาหาร MRS broth เนื่องจากมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมกว่า

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการตรึงเซลล์ผ่านโครงสร้างโซเดียมอัลจิเนท-อินนูลิน-แซนแทนกัมที่จะทำให้เซลล์ *L. casei* TISTR 1463 สามารถที่จะอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวร ซึ่งมีความเป็นกรดสูงโดยการตรึงเซลล์จะทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ ดังจะเห็นจากผลการศึกษาที่พบว่าปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรนั้นจะมีปริมาณคงที่ ต่างกับเซลล์อิสระที่ลดปริมาณลงถึง $1.12 \log_{10}$ cfu/ml ซึ่งปริมาณของ *L. casei* TISTR 1463 ที่ผ่านการตรึงเซลล์ในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรนั้นมีปริมาณมากกว่า 10^6 cfu/ml โดยมีปริมาณในวันสุดท้ายของการทดลองถึง 6.3×10^9 cfu/ml ซึ่งอยู่ในระดับที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากผลการศึกษาพบว่าช่วงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจะอยู่ในช่วงวันที่ 5 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมาก ดังนั้นถ้าต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในช่วง 5 วันแรกควรเพิ่มความถี่ในการเก็บผลเพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน

5.2.2 ควรศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในระบบจำลองทางเดินอาหาร เพื่อพิจารณาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

5.2.3 ควรศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้อื่นๆ โดยเฉพาะที่สิ้นค้าที่มีมูลค่าของจังหวัดเพชรบูรณ์ เช่น น้ำมะขาม น้ำหม่อน

5.3.4 ควรมีการทดสอบทางประสาทสัมผัส เพื่อยืนยันการยอมรับจากผู้บริโภค

บรรณานุกรม

- โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนจิตรลดา. (มปป.). สรรพคุณสมุนไพรแบ่งตามกลุ่มอาการ. **เสาวรส**. สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2555, จาก http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_01_2.htm
- สวรยา เม็งเกร็ด. (2550). การใช้เจลบุกพร้อมกับเพคตินเป็นสารเคลือบจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม. **วิทยานิพนธ์ วท.ม.**, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- สมใจ ศิริโชค. (2550). **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สื่อเสริมกรุงเทพ.
- ภคมน จิตประเสริฐ นันทพร พึ่งสังวร อาภา สุเวชวัฒนกุล อารีวัลย์ วนาอุปถัมภ์กุล ณัฏชา วรรณพฤษ และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. (2542). โพรไบโอติก "*Lactobacillus*" **บทความร้อน: สารเสริมชีวภาพสำหรับอาหารสัตว์อัดเม็ด**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2555 จาก http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/03-foods/pakamol/food_00.html.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., and Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, 56 (1), 27 - 35.
- Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, Fitzgerald, G., Devery, R. and Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by humanderived Bifidobacterium species. **Journal of Applied Microbiology**, 94, 138–145.
- Cortón, E., Piuri, M., Battaglini, F. and Ruzal, S.M. (2000). Characterization of *Lactobacillus* Carbohydrate Fermentation Activity Using Immobilized Cell Technique. **Biotechnology Progress**, 16(1), 59–63.
- De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P.P. and Nazzaro, F. (2005). Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and

- freeze-drying. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, 739-746.
- Ding, W. K. and Shah, N. P. (2008). Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. **International Food Research Journal**, 15 (2), 219-232.
- Fook, J., Munford, R. and Sanders, J. (1999) Interviewing and Evaluating, **Evaluation and Social Work Practice**. London: Sage.
- Fuller, R. (1992). **Probiotics**. London: The Scientific Basis Chapman & Hall.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, 125, 1401–1412.
- Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. (2002). Introduction to preand probiotics. **Food Research International**. 9, 109–116.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C., Chou C.C., (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, 86(3), 293-301.
- Lilly D.M. and Stillwell R.H. (1965). Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Journal of Science**, 147, 747-748. Gathersburg: Aspen Publishers.
- Myllarinen, P., Forssell, P., Von Wright, A., Alander M., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. (2000). Starch capsules containing microorganisms and/or polypeptides or proteins and a process for producing them. World patent FI104405, Application WO9952511A1.
- Parker, R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, 29, 4-8.
- Saloff-Coste, C.J. (1995). *Lactobacillus casei*. **Danone Newsletter No.7**, www.danonenewsletter.fr/France.

- Salminen, S., Wright, V.A., Ouwehand, C.A. and Holzapfel, H.W. (2002). Safety assessment of starters and probiotics, In M Adams and R. Nout(Eds.), Fermentation and food safety.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 47–55.
- Walker, W. A., and Duffy, L. C. (1998). Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 9, 668–675.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Buffered Peptone Water (BPW)

1.1 ส่วนประกอบ

Tryptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ (12H ₂ O)	9.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

1.2 วิธีการเตรียม

1.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามอัตราส่วนที่กำหนด กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปให้ชั่งตามผู้ผลิตระบุไว้ข้างขวด ใส่ลงใน Beaker ขนาดที่เหมาะสมแล้วเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ผสมให้เข้ากันดี

1.2.1 ปรับ pH ในกรณีที่ค่า pH ไม่ได้ตามช่วงที่กำหนดด้วย 1N NaOH และ 1N HCl

1.2.3 บรรจุใส่ขวดเตรียมอาหารขนาดที่เหมาะสม ปริมาตรขวดละ 225 ml หรือใส่หลอดทดลองขนาดที่เหมาะสม ปริมาตรหลอดละ 10 ml

1.2.4 ติดฉลากชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Batch no. ผู้เตรียม ปริมาตรที่เตรียม วันที่เตรียม และวันหมดอายุ

1.2.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121±3°C เป็นเวลา 15 นาที

1.2.6 ทำการสุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 คุณสมบัติ

1.3.1 ลักษณะสี (Color) = สีเหลืองอ่อน

1.3.2 ความใส (Clarity) = ใส

1.3.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของเหลว

1.3.4 Final pH = 7.0±0.2

1.4 การเก็บรักษา

1.4.1 Dehydrate medium เก็บที่อุณหภูมิ 25±3°C ตามวันหมดอายุที่ผู้ผลิตระบุไว้ข้างขวด

1.4.2 BPW ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 25±3°C ได้เป็นเวลา 3 วัน

2. Butterfield's Phosphate-Buffered dilution water (BPB)

2.1 ส่วนประกอบ (Stock solution)

KH_2PO_4	34.0	g
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	500	ml

2.2 วิธีการเตรียม Stock solution

2.2.1 ชั่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ในข้อ 1 ใส่ลงใน Beaker ขนาดที่เหมาะสม เติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ตามอัตราส่วนที่กำหนด

2.2.2 บรรจุใส่ Volumetric flask (1,000 ml) ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml

2.2.3 ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1N NaOH และ 1N HCl

2.2.4 ติดฉลาก แสดงชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Batch No. ผู้เตรียม ปริมาตรที่เตรียม วันที่เตรียม และวันหมดอายุ

2.2.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ $121 \pm 3^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที

2.2.6 เก็บที่อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$ ได้เป็นเวลา 3 เดือน

2.3 วิธีเตรียม Dilution blanks

2.3.1 ดูด 1.25 ml ของ Stock solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำกรองให้ได้ 1,000 ml

2.3.2 บรรจุอาหารใส่ขวดเตรียมอาหารขนาดที่เหมาะสม ปริมาตร 450 ml 90 ml หรือ 9 ml ตามความเหมาะสมของวิธีการทดสอบ

2.3.3 ติดฉลาก แสดงชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Batch No. ผู้เตรียม ปริมาตรที่เตรียม วันที่เตรียม และวันหมดอายุ

2.3.4 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ $121 \pm 3^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที

2.3.5 ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4 คุณสมบัติ

2.4.1 ลักษณะสี (Color) = ไม่มีสี

2.4.2 ความใส (Clarity) = ใส

2.4.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของเหลว

2.4.4 Final pH = 7.2 ± 0.2

2.5 การเก็บรักษา

เก็บ BPB ที่อุณหภูมิ $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ได้เป็นเวลา 3 วัน

3. 0.1 % Peptone water

3.1 ส่วนประกอบ

Peptone	1.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

3.2 วิธีการเตรียม

3.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามอัตราส่วนที่ระบุในข้อ 1 กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปให้ชั่งตามผู้ผลิตระบุไว้ข้างขวด ใส่ลงในขวดขนาดที่เหมาะสมแล้วเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ผสมให้เข้ากันดี

3.2.2 ปรับ pH ให้ได้ตามที่กำหนดด้วย 1N NaOH และ 1N HCl

3.2.3 ติดฉลากชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Batch No. ผู้เตรียม ปริมาตรที่เตรียม วันที่เตรียมและวันหมดอายุ

3.2.4 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที

3.2.5 ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3 คุณสมบัติ

3.3.1 ลักษณะสี (Color) = สีเหลือง

3.3.2 ความใส (Clarity) = ใส

3.3.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของเหลว

3.3.4 Final pH = 7.2 ± 0.2

3.4 การเก็บรักษา

3.4.1 Dehydrate medium เก็บที่อุณหภูมิ $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ตามวันหมดอายุที่ผู้ผลิต ระบุไว้ข้างขวด

3.4.2 อาหาร 0.1% Peptone water ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ได้เป็นเวลา 3 วัน

4. Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth)

4.1 ส่วนประกอบ

Proteose peptone	10.000 g
Beef extract	10.000 g
Yeast extract	5.000 g
Dextrose	20.000 g
Polysorbate 80	1.000 g
Ammonium citrate	2.000 g
Sodium acetate	5.000 g
Magnesium sulphate	0.100 g
Manganese sulphate	0.050 g
Dipotassium phosphate	2.000 g
Final pH (at 25°C) 6.5±0.2	
น้ำกลั่น	1,000 ml

4.2 วิธีการเตรียม

4.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามอัตราส่วนที่กำหนด กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปให้ชั่งตามผู้ผลิต ระบุไว้ข้างขวด ใส่ลงใน Beaker ขนาดที่เหมาะสมแล้วเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ผสมให้เข้ากันดี

4.3 คุณสมบัติ

4.3.1 ลักษณะสี (Color) = เหลืองครีมน้ำตาล

4.3.2 ความใส (Clarity) = ใส

4.3.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของเหลว

4.3.4 Final pH = 6.5±0.2

4.4 การตอบสนองต่อเชื้อ

สามารถติดตามผลหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C โดยใช้ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น

5. Lactobacillus MRS Agar (MRS agar)

5.1 ส่วนประกอบ

Proteose peptone	10.000 g
Beef extract	10.000 g
Yeast extract	5.000 g
Dextrose	20.000 g
Polysorbate 80	1.000 g
Ammonium citrate	2.000 g
Sodium acetate	5.000 g
Magnesium sulphate	0.100 g
Manganese sulphate	0.050 g
Dipotassium phosphate	2.000 g
Agar	12.000 g
Final pH (at 25°C) 6.5±0.2	
น้ำกลั่น	1,000 ml

5.2 วิธีการเตรียม

5.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามอัตราส่วนที่กำหนด กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปให้ชั่งตามผู้ผลิต ระบุไว้ข้างขวด ใส่ลงใน Beaker ขนาดที่เหมาะสมแล้วเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ผสมให้เข้ากันดี

5.3 คุณสมบัติ

- 5.3.1 ลักษณะสี (Color) = เหลืองครีมน้ำตาล
- 5.3.2 ความใส (Clarity) = ใส
- 5.3.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของแข็ง
- 5.3.4 Final pH = 6.5±0.2

5.4 การตอบสนองต่อเชื้อ

สามารถติดตามผลหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C โดยใช้ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือมากกว่านั้น

6. Rose bengal Agar Base

6.1 ส่วนประกอบ

Papaic digest of soyabean meal	5.000 g
Dextrose	10.000 g
Monopotassium phosphate	1.000 g
Magnesium sulphate	0.500 g
Rose bengal	0.050 g
Agar	15.000 g
Final pH (at 25°C)	7.2±0.2
น้ำกลั่น	1,000 ml

5.2 วิธีการเตรียม

5.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามอัตราส่วนที่กำหนด กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปให้ชั่งตามผู้ผลิตระบุไว้ข้างขวด ใส่ลงใน Beaker ขนาดที่เหมาะสมแล้วเติมน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง ผสมให้เข้ากันดี นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการด้วยเครื่องออโตไคลป์ (121 °C 15 นาที)

5.3 คุณสมบัติ

5.3.1 ลักษณะสี (Color) = เหลืองอมชมพูเป็นเนื้อเดียวกัน

5.3.2 ความใส (Clarity) = ชมพู

5.3.3 เนื้อสัมผัส (Texture) = ของแข็ง

5.3.4 Final pH = 7.2±0.2

5.4 การตอบสนองต่อเชื้อ

สามารถติดตามผลหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 20-25°C โดยใช้ระยะเวลา 5 วัน สามารถเติม Chloramphenical ในการเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกได้

ภาคผนวก ข

ประมวลภาพการศึกษา



ภาพที่ 10 เซลล์ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 ลักษณะผงแห้ง



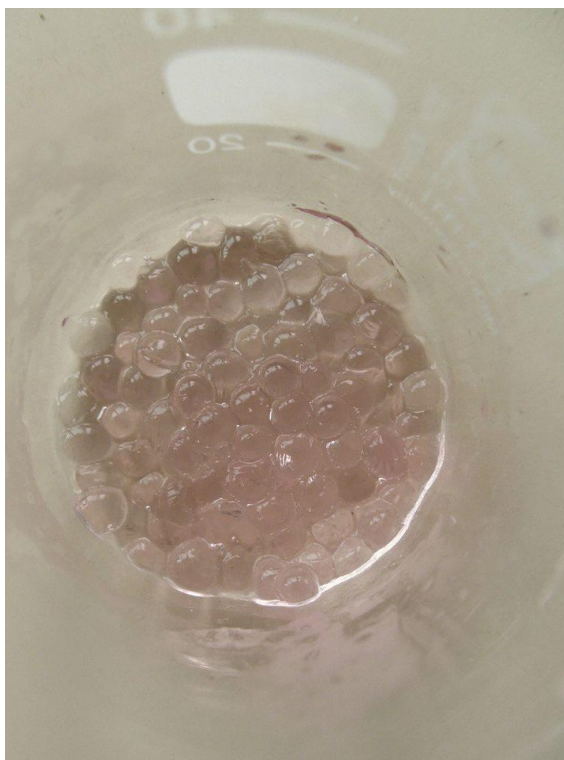
ภาพที่ 11 การกระตุ้น *L. casei* TISTR 1463 ในอาหารเหลว MRS



ภาพที่ 12 ลักษณะของ *L. casei* TISTR 1463 บนอาหาร MRS agar



ภาพที่ 14 เซลล์ *L. casei* TISTR 1463 หลังการปั่นเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ออกจากอาหาร MRS broth



ภาพที่ 15 ลักษณะการห่อหุ้มเซลล์ด้วยโครงสร้างอัลจินต-อินนูลิน-แซนแทนกัน



ภาพที่ 16 การเตรียมตัวอย่างน้ำเสาวรสเพื่อใช้ในการทดลอง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันในผลิตภัณฑ์น้ำเสาวรส ได้นำผลจากงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ในการเรียนการในรายวิชา BIOL507 จุลชีววิทยาทางอาหาร ในหัวข้อเรื่อง งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลชีววิทยาทางอาหาร ซึ่งอยู่ในการเนื้อหาสัปดาห์ที่ 15 ที่จะกล่าวถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการจุลินทรีย์และอาหาร รวมถึงการควบคุม ประโยชน์ของจุลินทรีย์ในด้านการอาหาร ปัจจุบัน ดังแสดงใน มคอ. 3 ของรายวิชา BIOL507 จุลชีววิทยาทางอาหาร



รายละเอียดของรายวิชา

ชื่อสถาบันอุดมศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
วิทยาเขต/คณะ/ภาควิชา	ชีววิทยา

หมวดที่ 1 ข้อมูลโดยทั่วไป

1. รหัสและชื่อรายวิชา BIOL507 จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)
2. จำนวนหน่วยกิต 3(2-3-6)
3. หลักสูตรและประเภทของรายวิชา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา และวิชาเฉพาะด้านเอกเลือก
4. อาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชาและอาจารย์ผู้สอน อาจารย์ที่ได้รับการแต่งตั้งให้เป็นผู้สอนหมวดวิชาชีววิทยา ตามคำสั่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และได้รับการฝึกอบรมด้านการสอนวิชานี้มาแล้ว
5. ภาควิชา/ชั้นปีที่เรียน ระดับปริญญาตรี
6. รายวิชาที่ต้องเรียนมาก่อน (Pre-requisites) (ถ้ามี) BIOL501 จุลชีววิทยา BIOL502 ปฏิบัติการจุลชีววิทยา
7. รายวิชาที่ต้องเรียนพร้อมกัน (Co-requisites) (ถ้ามี) ไม่มี
8. สถานที่เรียน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
9. วันที่จัดทำรายละเอียดของรายวิชา หรือวันที่มีการปรับปรุงครั้งล่าสุด วันที่ 26 พฤศจิกายน 2554

หมวดที่ 2 จุดมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1. จุดมุ่งหมายของรายวิชา

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์
2. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียเชื้อโรคและสารพิษจากจุลินทรีย์ในอาหาร
3. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และลักษณะการเน่าเสีย
4. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเน่าเสียของอาหารประเภทต่าง ๆ
5. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการสุ่มตัวอย่าง วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหาร
6. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการถนอมอาหารทางจุลชีววิทยา
7. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับวิธีป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ในอาหาร

2. วัตถุประสงค์ในการพัฒนา/ปรับปรุงรายวิชา

เพื่อให้สอดคล้องกับสาระวิชาในกรอบมาตรฐานหลักสูตรกลุ่มวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ สอดคล้องกับอัตลักษณ์และลักษณะที่พึงประสงค์ของนักศึกษาตามมาตรฐานผลการเรียนรู้ของหมวดวิชาเฉพาะและเปิดโอกาสให้แต่ละหลักสูตรได้เลือกเรียนวิชาในกลุ่มวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์มากขึ้น

หมวดที่ 3 ลักษณะและการดำเนินการ

1. คำอธิบายรายวิชา

จุลินทรีย์กับอาหาร จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย เชื้อโรคและสารพิษจากจุลินทรีย์ในอาหาร องค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และลักษณะการเน่าเสีย การเน่าเสียของอาหารประเภทต่าง ๆ การสุ่มตัวอย่าง วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหาร น้านม ผลิตภัณฑ์นม มาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยา วิธีป้องกันและกำจัด จุลินทรีย์ในอาหาร การถนอมอาหารทางจุลชีววิทยา วิธีป้องกันและกำจัดจุลินทรีย์ในอาหาร การถนอมอาหาร การศึกษาภาคสนาม

Microbial food. Microorganisms cause spoilage. Pathogens and toxins from microorganisms in food. Composition of foods that affect microbial growth and spoilage characteristics. Spoilage of various food samples. How to detect microorganisms in food, milk products, milk. Food standards in microbiology. How to prevent and eliminate microorganisms in food Microbiological preservation. How to prevent and eliminate microorganisms in food preservation. Field study.

2. จำนวนชั่วโมงที่ใช้/ภาคการศึกษา

บรรยาย	สอนเสริม	การฝึกปฏิบัติ/งาน ภาคสนาม/การฝึกงาน	การศึกษาด้วยตนเอง
30 ชั่วโมง	มี	45	90 ชั่วโมง

3. จำนวนชั่วโมงต่อสัปดาห์ที่อาจารย์ให้คำปรึกษาและแนะนำทางวิชาการแก่นักศึกษาเป็นรายบุคคล

1 ชั่วโมง/สัปดาห์

หมวดที่ 4 การพัฒนาการเรียนรู้ของนักศึกษา

1. คุณธรรม จริยธรรม
1.1 คุณธรรม จริยธรรมที่ต้องพัฒนา 1.1.1 มีความเสียสละ และซื่อสัตย์สุจริต 1.1.2 มีวินัยตรงต่อเวลา และมีความรับผิดชอบทั้งต่อตนเอง วิชาชีพและสังคม 1.1.3 เคารพสิทธิและรับฟังความคิดเห็นของผู้อื่นรวมทั้งเคารพในคุณค่าและศักดิ์ศรีของความเป็นมนุษย์ 1.1.4 เคารพกฎระเบียบและข้อบังคับต่าง ๆ ขององค์กรและสังคม 1.1.5 มีจรรยาบรรณทางวิชาการและวิชาชีพ
1.2 วิธีการสอนที่จะใช้พัฒนาการเรียนรู้ 1.2.1 กำหนดให้มีวัฒนธรรมองค์กรเพื่อปลูกฝังความมีระเบียบวินัย เคารพในกฎระเบียบของมหาวิทยาลัย เช่น การเข้าชั้นเรียนตรงเวลา แต่งกายตามระเบียบของมหาวิทยาลัย มีความซื่อสัตย์ไม่ทุจริตในการสอบหรือการลอกการบ้าน 1.2.2 จัดกิจกรรมเสริมหลักสูตรและสอนสอดแทรกตามโอกาสอันควรเพื่อเน้นย้ำให้ผู้เรียนเข้าใจเข้าถึงคุณธรรมจริยธรรมที่ต้องการปลูกฝังบ่มเพาะให้ปรากฏในตัวผู้เรียนอย่างเป็นรูปธรรม
1.3 วิธีการประเมินผล 1.3.1 ประเมินจากการตรงเวลาของนักศึกษาในการเข้าชั้นเรียน การส่งงานที่ได้รับมอบหมายตามกำหนดเวลา และการร่วมกิจกรรม 1.3.2 ประเมินจากการมีวินัย และพร้อมเพรียงของนักศึกษาในการเข้าร่วมกิจกรรม 1.3.3 ประเมินจากการกระทำทุจริตในการสอบ และความรับผิดชอบต่อหน้าที่ที่ได้รับมอบหมาย 1.3.4 ประเมินจากความร่วมมือในการแต่งกายที่ถูกระเบียบ
2. ความรู้

2.1 ความรู้ที่ต้องได้รับ 2.1.1 มีความรู้ความเข้าใจในหลักการ ทฤษฎีที่สำคัญของชีววิทยาสาขาต่าง ๆ รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้ให้มีความก้าวหน้าทางวิชาการอยู่เสมอ 2.1.2 มีความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับกฎ ระเบียบ ข้อบังคับที่เกี่ยวข้องกับทางชีววิทยา
2.2 วิธีการสอน 2.2.1 จัดการเรียนการสอนที่มีลักษณะยึดผู้เรียนเป็นสำคัญโดยจัดกิจกรรมในลักษณะการบรรยาย ค้นคว้า เน้นทฤษฎี และกฎเกณฑ์ต่าง ๆ ในเชิงวิเคราะห์ 2.2.2 มีการมอบหมายงานให้ผู้เรียนฝึกฝนทักษะให้รู้จักคิด วางแผนการทดลอง วิจัย วิเคราะห์ และแก้ปัญหาด้วยตนเอง
2.3 วิธีการประเมินผล 2.3.1 ประเมินด้วยการสอบย่อย สอบปฏิบัติการ สอบกลางภาคการศึกษาและสอบปลายภาคการศึกษา 2.3.2 ประเมินจากการปฏิบัติกิจกรรมต่างๆ ของรายวิชา เช่น การนำเสนอ รายงาน โครงการวิจัย 2.3.3 ประเมินจากการแก้ปัญหที่ได้รับมอบหมาย และจากการฝึกประสบการณ์วิชาชีพหรือสหกิจศึกษา

3. ทักษะทางปัญญา
3.1 ทักษะทางปัญญาที่ต้องพัฒนา 3.1.1 มีทักษะในการจัดการประมวลผลความคิดอย่างเป็นระบบ 3.1.2 สามารถนำความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการและทฤษฎีทางชีววิทยามาแก้ปัญหาได้อย่างเหมาะสม 3.1.3 มีทักษะในการทำปฏิบัติการด้วยวิธีมาตรฐานที่ทันสมัย 3.1.4 มีสมรรถนะในการวางแผนการทำวิจัย ออกแบบปฏิบัติการ รวมถึงเลือกใช้เครื่องมือเทคนิคที่เหมาะสมเป็นปัจจุบัน
3.2 วิธีการสอน 3.2.1 การทำรายงาน และการนำเสนอ 3.2.2 การอภิปรายกลุ่ม 3.2.3 การฝึกให้นักศึกษามีโอกาสปฏิบัติจริง
3.3 วิธีการประเมินผล 3.3.1 ประเมินตามสภาพจริงจากผลงาน และการปฏิบัติของนักศึกษา 3.3.2 ประเมินจากการนำเสนอรายงานหน้าชั้นเรียน การทดสอบ การสัมภาษณ์ การทดลอง
4. ทักษะความสัมพันธ์ระหว่างบุคคลและความรับผิดชอบ
4.1. ทักษะความสัมพันธ์ระหว่างบุคคลและความรับผิดชอบที่ต้องพัฒนา 4.1.1 การมีมนุษยสัมพันธ์ในการทำงานและพร้อมมีส่วนร่วมในกิจกรรมในทางสร้างสรรค์ทั้งในฐานะผู้นำและผู้ตาม 4.1.2 ความรับผิดชอบในการทำงานทั้งที่เป็นงานอิสระและงานที่ร่วมกับผู้อื่น และมีความรับผิดชอบต่อตนเองและสังคม
4.2. วิธีการสอน 4.2.1 จัดกิจกรรมให้มีการทำงานเป็นกลุ่ม และการทำงานที่ต้องประสานกับผู้อื่น 4.2.2 ค้นหาหาข้อมูลจากการสัมภาษณ์บุคคลอื่น หรือผู้มีประสบการณ์
4.3. วิธีการประเมินผล 4.3.1 ประเมินจากพฤติกรรม และการแสดงออกของนักศึกษาในการนำเสนอรายงานในชั้นเรียน 4.3.2 สังเกตจากพฤติกรรมที่แสดงออกจากการร่วมกิจกรรมต่าง ๆ

5. ทักษะการวิเคราะห์เชิงตัวเลข การสื่อสาร และการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศ	
5.1.ทักษะการวิเคราะห์เชิงตัวเลข การสื่อสาร และการใช้เทคโนโลยีสารสนเทศที่ต้องพัฒนา	
5.1.1	ทักษะด้านการสื่อสาร สามารถถ่ายทอดความรู้ นำเสนอผลงานได้อย่างถูกต้อง
5.1.2	ทักษะในการสืบค้นข้อมูลโดยใช้เทคโนโลยีสารสนเทศทั้งในและต่างประเทศได้อย่างเหมาะสม
5.1.3	ทักษะในการเข้าถึงแหล่งข้อมูลใหม่ ๆ เก็บรวบรวม วิเคราะห์ และประมวลผลโดยใช้เครื่องมือสารสนเทศได้เหมาะสม
5.2.วิธีการสอน	
5.2.1	จัดกิจกรรมการเรียนการสอนด้วยการวิเคราะห์สถานการณ์จำลอง และเสมือนจริง
5.2.2	การนำเสนอการแก้ปัญหาที่เหมาะสม ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีสารสนเทศที่หลากหลายสถานการณ์
5.3.วิธีการประเมินผล	
5.3.1	ประเมินจากเทคนิค และการใช้เทคโนโลยีในการนำเสนอ
5.3.2	ประเมินจากความสามารถในการอภิปราย นำเสนอต่อชั้นเรียน

หมวดที่ 5 แผนการสอนและการประเมินผล

1. แผนการสอน

สัปดาห์ที่	หัวข้อ/รายละเอียด	จำนวน ชั่วโมง	กิจกรรมการเรียนรู้ การสอน สื่อที่ใช้	ผู้สอน
1	ปฐมนิเทศการเรียนรู้ (Pre-school) - แนะนำการเรียนรู้และการประเมินผล - แนะนำแหล่งเรียนรู้และเอกสารการค้นคว้า - วิเคราะห์ความรู้พื้นฐานผู้เรียน - วิเคราะห์รูปแบบการเรียนรู้ผู้เรียน	5	- อธิบายประมวลการสอนรายวิชา - อธิบายแผนการเรียนรู้วิธีการเรียน การให้คะแนน - กำหนดกิจกรรมการเรียนรู้ - Power Point	

ลำดับที่	หัวข้อ/รายละเอียด	จำนวน ชั่วโมง	กิจกรรมการเรียนรู้ การสอน สื่อที่ใช้	ผู้สอน
2	บทที่ 1 บทนำ - ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับจุลชีววิทยา ทางอาหาร	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
3	บทที่ 2 ปัจจัยภายในและปัจจัย ภายนอกของอาหารที่มีผลต่อการ เจริญของจุลินทรีย์	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม - แบบฝึกหัด ทดสอบย่อย	
4	บทที่ 3 เนื้อสัด ผลิตภัณฑ์เนื้อและ สัตว์ปีก	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
5	บทที่ 4 อาหารทะเล	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
6	บทที่ 5 อาหารประเภทผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์จากผลไม้	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
7	บทที่ 6 นม การหมักและผลิตภัณฑ์ อาหารประจำวันจากการหมักและ ไม่หมัก	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม - อภิปรายกลุ่ม	
8	สอบกลางภาค	-	-	
9	บทที่ 7 อาหารหมักและผลิตภัณฑ์ หมัก	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
10	บทที่ 8 การตรวจสอบจุลินทรีย์ บทที่ 9 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ ทางอ้อม	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
11	บทที่ 11 การป้องกันอาหารโดยใช้ การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ บทที่ 12 การป้องกันการเน่าเสีย ของอาหารโดยการฉายรังสีและ ธรรมชาติของจุลินทรีย์ในการ ต้านทานรังสี	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	

สัปดาห์ที่	หัวข้อ/รายละเอียด	จำนวน ชั่วโมง	กิจกรรมการเรียนรู้ การสอน สื่อที่ใช้	ผู้สอน
12	บทที่ 13 การป้องกันอาหารโดย การใช้อุณหภูมิต่ำ บทที่ 14 การป้องกันอาหารโดย การใช้อุณหภูมิสูง บทที่ 15 กรรมวิธีป้องกันอาหาร ด้วยวิธีอื่นๆ	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
13	บทที่ 16 เทคโนโลยีเฮอเดิล	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม	
14	บทที่ 17 ตัวบ่งชี้ความปลอดภัย และคุณภาพทางจุลชีววิทยาใน อาหาร บทที่ 18 ระบบ HACCP	5	- บรรยายประกอบสื่อการสอน - อภิปรายซักถาม - อภิปรายกลุ่ม	
15	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลชีววิทยา ทางอาหาร - ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุล ชีววิทยาทางอาหาร	5	- ตัวอย่างงานวิจัยเรื่องการ ประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์โพ ไบโอติกด้วยเทคนิคไมโครเอน แคปซูลชั้นในผลิตภัณฑ์น้ำ เสาวรส - ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ การถนอมอาหาร - อภิปรายกลุ่ม - อภิปรายซักถาม	
16	สอบปลายภาค	-	-	

2. แผนการประเมินผลการเรียนรู้

ที่	ผลการเรียนรู้	วิธีการประเมิน	สัปดาห์ที่ประเมิน	สัดส่วนของการประเมินผล
1	1.3, 2.3, 3.3	สังเกตและจดบันทึก - การเข้าเรียน - การตรงต่อเวลา - การรับผิดชอบต่องานที่มอบหมาย	2 - 7 9 - 15	15 %
2	2.3, 3.3	สอบกลางภาค	8	20 %
3	1.3, 2.3, 3.3, 4.3, 5.3	สังเกตและสอบปากเปล่า - การนำเสนอ - การสื่อความหมาย - การแสดงเหตุผลจากการอภิปรายและนำเสนอ	14 - 15	15 %
4	1.3, 2.3, 3.3, 4.3	สอบบทปฏิบัติการ	15	20%
5	2.3, 3.3	สอบปลายภาค	16	30 %

หมวดที่ 6 ทรัพยากรประกอบการเรียนการสอน

1. ตำราและเอกสารหลัก

- ธีรพร กงบังเกิด. (2546). **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. พิษณุโลก: คณะเกษตรศาสตร์
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- นวพร ล้าเลิศกุล. (2549). **จุลชีววิทยาทางอาหาร** (พิมพ์ครั้งที่ 1). เชียงใหม่: พิกซ์การพิมพ์.
- สุนันทา วัฒนสินธุ์. (2549). **ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร**. กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุมาลี เหลืองสกุล. (2527). **จุลชีววิทยาทางอาหาร** (ฉบับปรับปรุงใหม่). กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

2. เอกสารและข้อมูลสำคัญ

- สุกิจ นวนวงศ์. (2548). **วัตถุเจือปนอาหาร**. กรุงเทพฯ: หจก. เอมี เทรตติ้ง.
- Branen, A. L. (2002). **Food additives**. United States of America: Marcel Dekker.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. (2005). **Modern food microbiology**
(7th edition). United States of America: Aspen.
- Smith, J. and Hong, L. (2003). **Food Additives Data Book**. England: Blackwell
Publishing. John C. Beaulieu, Jeanne M. Lea. (2003). Volatile and quality
changes in fresh-cut mangos prepared from firm-ripe and soft-ripe fruit,
stored in clamshell containers and passive MAP. **Postharvest Biology**
and Technology, 30(1), 15-28.

3. เอกสารและข้อมูลแนะนำ

- เว็บไซต์ที่เกี่ยวข้องกับหัวข้อในประมวลรายวิชา เช่น Wikipedia คำอธิบายศัพท์

หมวดที่ 7 การประเมินและปรับปรุงการดำเนินการของรายวิชา

1. กลยุทธ์การประเมินประสิทธิผลของรายวิชาโดยนักศึกษา 1.1 การสนทนากลุ่มระหว่างผู้สอนและผู้เรียน 1.2 การสังเกตการณ์จากพฤติกรรมของผู้เรียน 1.3 แบบประเมินผู้สอนและแบบประเมินรายวิชา 1.4 ข้อเสนอแนะผ่านเว็บบอร์ดที่อาจารย์ผู้สอนได้จัดทำเป็นช่องทางการสื่อสารกับนักศึกษา
2. กลยุทธ์การประเมินการสอน 2.1 สังเกตการสอนของผู้ร่วมทีมการสอน 2.2 ผลการสอบ 2.3 การทวนสอบผลประเมินการเรียนรู้ 2.4 การตอบสนองและการมีส่วนร่วมในการทำกิจกรรม
3. การปรับปรุงการสอน หลังจากผลการประเมินการสอนในข้อ 2 จึงมีการปรับปรุงการสอนโดยการจัดกิจกรรมในการระดมสมองและหาข้อมูลเพิ่มเติมในการปรับปรุงการสอน ดังนี้ 3.1 สัมมนาการจัดการเรียนการสอน 3.2 การวิจัยในและนอกชั้นเรียน 3.3 ใช้อุปกรณ์การสอนที่มีความหลากหลาย
4. การทวนสอบมาตรฐานผลสัมฤทธิ์ของนักศึกษาในรายวิชา ในระหว่างกระบวนการสอนรายวิชา มีการทวนสอบผลสัมฤทธิ์ในรายหัวข้อ ตามที่คาดหวังจากการเรียนรู้ในวิชา ได้จากการสอบถามนักศึกษา หรือการสุ่มตรวจผลงานของนักศึกษา รวมถึงพิจารณาจากผลการทดสอบย่อย และหลังการออกผลการเรียนรายวิชา มีการทวนสอบผลสัมฤทธิ์โดยรวมในวิชาได้ดังนี้ 4.1 การทวนสอบการให้คะแนนจากการสุ่มตรวจผลงานของนักศึกษาโดยอาจารย์อื่น หรือผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ไม่ใช่อาจารย์ประจำหลักสูตร 4.3 ทวนสอบจากการประเมินพฤติกรรมของผู้เรียน (ลักษณะนิสัย ได้แก่ การเข้าเรียน และการสังเกตพฤติกรรม) โดยอาจารย์ผู้รับผิดชอบรายวิชา 4.2 มีการตั้งคณะกรรมการในสาขาวิชาตรวจสอบผลการประเมินการเรียนรู้ของนักศึกษา โดยตรวจสอบข้อสอบ รายงานวิธีการให้คะแนนสอบและการให้คะแนนพฤติกรรม รวมถึงประเมินผลการเรียน

5. การดำเนินการทบทวนและการวางแผนปรับปรุงประสิทธิภาพของรายวิชา

จากผลการประเมิน และทวนสอบผลสัมฤทธิ์ประสิทธิผลรายวิชา ได้มีการวางแผนการปรับปรุงการสอน และรายละเอียดวิชาเพื่อให้เกิดคุณภาพมากขึ้น ดังนี้

5.1 ปรับปรุงรายวิชาทุก 3 ปีหรือตามข้อเสนอแนะและผลการทวนสอบมาตรฐานผลสัมฤทธิ์ตามข้อ 4

5.2 เปลี่ยนหรือสลับอาจารย์ผู้สอน เพื่อให้นักศึกษามีมุมมองในเรื่องการประยุกต์ความรู้กับปัญหาที่มาจากงานวิจัยของอาจารย์หรืออุตสาหกรรมต่าง ๆ

5.3 นำผลประเมินจากนักศึกษา มาปรับปรุงแก้ไขในการสอน

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นายกานต์ แยมพงษ์
Mr. Karn Yaempongsa
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
3670101080211
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. ตำแหน่งทางวิชาการ -
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ 056-717120 # 2710
E-mail yaempongsa_karn@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
วท.บ. (จุลชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยนเรศวร
วท.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)
มหาวิทยาลัยนเรศวร
7. สาขาที่ชำนาญเป็นพิเศษ
เทคโนโลยีการเก็บรักษาและยืดอายุอาหาร
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
หัวหน้าโครงการวิจัย
 - ประสิทธิภาพของสารละลายเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสมในการลดปริมาณและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในกะหล่ำปลีหั่นฝอย
 - ประสิทธิภาพของสารละลายกรดอินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผักสลัด : กะหล่ำปลี
 - อิทธิพลร่วมของการใช้สารกันเสียทั่วไปในครัวเรือนและความร้อนต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* ในผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.)

1. ชื่อ-นามสกุล นางรุ่งนภา สนุ่นดี
Mrs. Roongnapa Sanundee
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
3670300228669
3. ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป
4. ตำแหน่งทางวิชาการ -
5. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ 056-717120 # 1410
E-mail roong_p@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
ค.บ. (ชีววิทยา)
สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์
7. สาขาที่ชำนาญเป็นพิเศษ
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
หัวหน้าโครงการวิจัย
- สารสกัดจากตะไคร้หอมที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Shigella* spp.
Salmonella spp. *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*
- การศึกษาความพึงพอใจต่อการจัดการเรียนการสอนที่เน้น
ผู้เรียนเป็นสำคัญ
ผู้ร่วมโครงการวิจัย
- สารสกัดจากดีปลาทั้งที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Shigella* spp.
Salmonella spp. *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวดวงเดือน โทปุรินทร์
Miss Duangduan Thopurin
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
1670800121760
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษา หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
4. ตำแหน่งทางวิชาการ -
5. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อ. เมือง จ. เพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ 056-717120
E-mail namwan14_dd@hotmail.com
6. ประวัติการศึกษา
มัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนชัยบอนวิทยาคม
7. สาขาที่ชำนาญเป็นพิเศษ
ชีววิทยา
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย
- ผลของความเครียดแล้งต่อคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ ดัชนี
ความเขียวและค่าคลอโรฟิลล์ในใบของข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผั่ว (*Oryza sativa* L.cv.Luempua) ใน
ระยะต้นกล้า

