การรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365 ที่หุ้มด้วยแคปซูลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง

Survival of encapsulated *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365 in simulated gastric and small intestinal conditions

สุดสายชล หอมทอง*
Sudsaichon Homthong
พนิดา สีขาว**
Panida Srikaw

Received : July 11, 2022
Revised : November 3, 2022
Accepted : November 28, 2022

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการห่อหุ้มและการรอดชีวิดของเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365 ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% ในการศึกษาประสิทธิภาพของการห่อหุ้ม พบว่าโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นที่ 2% และ 3% ไม่มีความตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อนำไปทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 2.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการหุ้ม *L. acidophilus* TISTR 2365 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% 3% และเซลล์อิสระ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% ทำให้เชื้อรอดชีวิตได้ดีที่สุด คือ 94.37% ในขณะที่เชื้อที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ทำให้เชื้อรอดชีวิต 90.57% และเซลล์อิสระเชื้อรอดชีวิตได้น้อยที่สุด คือ 85.61% สำหรับการทดสอบการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในสภาวะลำไส้เล็กจำลอง ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 8.0 และมี bile salt 0.3% ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง พบว่าการหุ้ม *L. acidophilus* TISTR 2365 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างจากเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

คำสำคัญ: *Lactobacillus acidophilus* / โซเดียมอัลจิเนต / สภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง / การหุ้มด้วยแคปซูล / การรอดชีวิต

*อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Lecturer in Department of Microbiology Faculty of Science Burapha University
e-mail: sudsaich@buu.ac.th
**นักศึกษาประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Student of the Department of Microbiology Faculty of Science Burapha University

ABSTRACT

This study aimed to determine the encapsulation efficiency and survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365 encapsulated in 2% and 3% sodium alginate. For encapsulation efficiency, no significant difference ($p>0.05$) was found between 2% and 3 % sodium alginate. The survival under simulated gastric condition at pH 2.0 and 37 °C for 3 hours revealed that encapsulated *L. acidophilus* TISTR 2365 in 2% 3% sodium alginate and free cell were significantly different ($p<0.05$), encapsulation in 3% sodium alginate showed the highest survival of 94.37 % while encapsulated in 2% sodium alginate and free cells showed 90.57 % and 85.61 % survival, respectively. Survival of *L. acidophilus* TISTR 2365 under simulated small intestinal condition was conducted at pH 8.0, bile salt 0.3% and 37 °C for 4 hours. Encapsulated *L. acidophilus* TISTR 2365 in 2% and 3% sodium alginate showed no significant difference ($p>0.05$) but were significantly different ($p<0.05$) from the free cell.

Keywords : *Lactobacillus Acidophilus* / Sodium Alginate / Simulated Gastric and Small Intestinal Conditions / Encapsulation / Survival

บทนำ

โพรไบโอติก (Probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย เมื่อบริโภคเข้าไปแล้วมีปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อที่มากเพียงพอ จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และป้องกันความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยลดผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อลำไส้ โดยป้องกันการเกิดโรคลำไส้อักเสบ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด (Coakley, et al., 2003; George, et al., 2018)

ในปัจจุบันผู้บริโภคจึงนิยมบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเติมหรือหมักแบคทีเรียโพรไบโอติก ลงไป เช่น โยเกิร์ต ชีส น้ำสลัด น้ำผลไม้ เป็นต้น โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้จะจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) เช่น สกุล *Lactobacillus* ยกตัวอย่าง เช่น *L. acidophilus*, *L. casei* เป็นต้น และสกุล *Bifidobacterium* เช่น *B. longum*, *B. bifidum* เป็นต้น เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถทนต่อกรดหรือด่างได้ดีและย่อยสลายน้ำตาลแลกโตสและกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลกติก (lactic acid) ซึ่งกรดแลกติกมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินทางอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหารและสร้างสารที่ไปยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมากที่สุด (Murry, et al., 2004; George, et al., 2018) โดยมีรายงานว่าเมื่อมีการบริโภค *L. acidophilus* เข้าไปโดยผ่าน

กระเพาะอาหารและลำไส้จะทำให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพในการสร้างสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ป้องกันลำไส้อักเสบจากไรต้าไวรัส โรคมะเร็งในลำไส้และช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น (Guarner, et at., 2011)

การรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสำคัญอย่างมากต่อผู้บริโภค เนื่องจากมีรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพของผู้บริโภคได้นั้นควรมีจำนวนไม่น้อยกว่า 10^6 - 10^7 CFU/ml (Gomes & Malcata, 1999) โดยพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เติมหรือหมักลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารจะมีชีวิตรอดอยู่ได้ แต่เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารแล้วจำนวนการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีจำนวนลดลง เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องเดินทางผ่านและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภคที่บริโภคโพรไบโอติก ดังนั้นสภาวะแวดล้อมแรกที่ส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกคือสภาวะแวดล้อมในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดและเอนไซมในกระเพาะอาหาร (gastric juice) ตลอดจนเกลือน้ำดี (bile salt) ในลำไส (Boke, et al., 2010) ดังนั้นการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย-โพรไบโอติกด้วยวิธีเอนแคปซูเลชัน (Encapsulation) โดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชัน (Extrusion) จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก

การห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวิธีเอนแคปซูเลชันเป็นวิธีการที่ใช้ในการป้องกันเซลล์โพรไบโอติกจากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อตัวเซลล์ โดยช่วยป้องกันแบคทีเรียโพรไบโอติกจากสภาพแวดล้อมภายในเซลล์เมื่อต้องอยู่ในอาหารที่มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตและช่วยให้แบคทีเรียโพรไบโอติกรอดชีวิตจากระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กได้ดีขึ้น (Serna-Cock & Vallejo-Castillo, 2013) โดยใช้อัลจิเนต (Alginate) เป็นวัสดุในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่เป็นพิษกับเซลล์แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้ม โดยอัลจิเนตเป็นสารสกัดที่ได้มาจากสาหร่ายสีน้ำตาลและจัดเป็นไฮโดรคอลลอยด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่าการห่อหุ้มเซลล์ *L. acidophilus* CSCC 2400 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) ที่ความเข้มข้น 2% ในสภาวะที่มีกรดและเกลือน้ำดีพบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระถึง 3 log CFU/ml (Chandramoulia, et al., 2004) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาการรอดชีวิตและปริมาณการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในการตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเติมหรือหมักแบคทีเรียโพรไบโอติก

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อโพรไบโอติก (ดัดแปลงจาก García-Ceja, et al., 2015)

นำเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เก็บรักษาไว้ด้วยวิธี Lyophilization มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง ใน Anaerobic jar ที่มี Anaerobic gas pack ทำการถ่ายเชื้อ (Subculture) อย่างน้อย 3 ครั้งลง MRS agar เพื่อกระตุ้นให้เชื้อเจริญและมีความแข็งแรงสม่ำเสมอ จากนั้นเลี้ยงเชื้อลงใน MRS broth อีกครั้งแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย

เครื่อง Centrifuge ที่ 8,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย NaCl 0.85 % และแขวนลอยเซลล์ด้วย NaCl 0.85%

2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเตรียมเชื้อโพรไบโอติก ในรูปแคปซูลที่เตรียมจากโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นต่างๆ (ดัดแปลงจาก จุฬาลักษณ์, 2553)

2.1 นำ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่เตรียมจากตอนที่ 1 มาปรับให้มีเชื้อเริ่มต้น 9-10 log CFU/ml (N_o) โดยปรับเชื้อด้วยสารละลาย NaCl 0.85% แล้วนำไปวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง McFarland และปรับให้เชื้อมีความขุ่นมากกว่า McFarland เบอร์ 4.0 ก่อนนำเชื้อไปห่อหุ้มให้นับจำนวนเชื้อเริ่มต้น โดยนำแบคทีเรียมาเจือจางแบบ Serial ten-fold dilution ด้วย NaCl 0.85% เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-8} - 10^{-11} แล้วนำไปนับจำนวนด้วยการ Pour plate ลงใน MRS agar หลังจากนั้นนำไปบ่มใน Anaerobic jar ที่มี Anaerobic gas pack ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลในหน่วย log CFU/ml

2.2 หลังจากนั้นนำเชื้อจากข้อ 2.1 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้เทคนิคเอ็กทรูชั่น โดยผสมเชื้อ 4 ml กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 40 ml ที่มีความเข้มข้น 2% และ 3% ลงในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อแล้วนำไปกวนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Hotplate stirrer โดยใช้ Magnetic bar ในการกวนโดยปรับความร้อนให้เป็นศูนย์และปรับระดับความแรงของการหมุนตามความเหมาะสม

2.3 นำเชื้อที่ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่เข้ากันแล้วใส่ลงในเข็มฉีดยาขนาด 18 G แล้วหยดใส่ลงในสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 M โดยใส่สารละลาย $CaCl_2$ 0.1 M ในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อแล้วใช้ Magnetic bar กวนสารละลาย ขณะหยดเชื้อที่ผสมโซเดียมอัลจิเนตลงไป เพื่อป้องกันไม่ให้เม็ดเจลติดกัน โดยให้ความสูงของปลายเข็มฉีดยากับสารละลาย $CaCl_2$ ห่างกัน 5 cm เมื่อหยดเสร็จให้แช่เม็ดเจลในสารละลาย $CaCl_2$ เป็นเวลา 30 นาที ทำการแยกเม็ดเจลด้วยการกรองโดยการเทเม็ดเจลในสารละลายลงในกรวยกรองสแตนเลสที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้มาล้างด้วยสารละลาย NaCl 0.85% 2 ครั้ง

2.4 ก่อนนำไปศึกษาต่อในตอนที่ 3 ให้นับจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์โพรไบโอติกที่อยู่ในเม็ดเจล (N) โดยนำเม็ดเจล 1 g ใส่ลงใน PBS 0.05 M 9 ml (pH 7.5) แช่เม็ดเจลใน PBS อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเจลแตกตัว

2.5 นำเซลล์แขวนลอยไปเจือจางแบบ Serial ten-fold dilution ด้วย NaCl 0.85 % ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-6} - 10^{-9} นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยการ Pour plate ลงใน MRS agar บ่มใน Anaerobic jar ที่มี Anaerobic gas pack ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลในหน่วย log CFU/ml

2.6 ทุกการทดลองทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ และคำนวณหาประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก โดยคำนวณจากสมการด้านล่าง

$$\text{ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเซลล์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ (N) (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ (N_o) (log CFU/ml)}} \times 100$$

3. เปรียบเทียบการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียที่หุ้มด้วยแคปซูลและไม่หุ้มแคปซูล เมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง (ดัดแปลงจาก สิรสา, 2556)

3.1 นำ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ที่หุ้มด้วยแคปซูลที่เตรียมจากสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้น 2% และ 3% ใส่ลงในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองที่เตรียมจาก PBS 0.05 M แล้วปรับ pH ด้วย HCl 0.1 M ให้ได้ pH 2.0 แช่ไว้นาน 3 ชั่วโมงที่ 37 °C และนำมาใส่ลงในสภาวะลำไส้เล็กจำลองที่เตรียมจาก PBS 0.05 M ที่ผสม Bile salt 0.3% แล้วปรับ pH ด้วย NaOH 0.1 M ให้ได้ pH 8.0 แช่ไว้นาน 4 ชั่วโมง ที่ 37 °C

3.2 หลังจากครบตามเวลาที่ศึกษาแล้วนำเม็ดเจลในขั้นตอนที่ 3.1 มานับจำนวนการรอดชีวิต โดยนำเม็ดเจล 1 g ใส่ลงใน PBS 0.05 M 9 ml (pH 7.5)) แช่เม็ดเจลใน PBS อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เพื่อให้เม็ดเจลแตกตัว แล้วนำมาเจือจางแบบ Serial ten-fold dilution ด้วย NaCl 0.85% จนได้ความเข้มข้นที่ 10^{-5} - 10^{-8} นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยการ Pour plate ลงใน MRS agar บ่มใน Anaerobic jar ที่มี Anaerobic gas pack ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลในหน่วย log CFU/ml

3.3 สำหรับเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มนำมานับจำนวนการรอดชีวิต โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 8,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งแล้วแขวนลอยเซลล์โดยใช้ NaCl 0.85% หลังจากนั้นนำไปเจือจางแบบ Serial ten-fold dilution ด้วย NaCl 0.85% จนได้ความเข้มข้น 10^{-4} - 10^{-7} นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยการ Pour plate ลงใน MRS agar บ่มใน Anaerobic jar ที่มี Anaerobic gas pack ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง รายงานผลในหน่วย log CFU/ml

3.4 ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์หลังแช่ในสภาวะต่างๆ (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนเซลล์ก่อนนำไปแช่สภาวะต่างๆ (log CFU/ml)}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ประมวลผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Minitab 18 และนำผลการทดลองที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงมาตรฐาน เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้วิธี Tukey Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

1. ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติก

จากการห่อหุ้มเชื้อ *L.acidophilus* TISTR 2365 ซึ่งเป็นเชื้อโพรไบโอติกที่ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ3 % เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการห่อหุ้ม พบว่า การใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในการหุ้มเชื้อโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการหุ้มเท่ากับ 90.42±0.38% และการใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% ในการการหุ้มเชื้อโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการหุ้มเท่ากับ 87.46±2.05% แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งประสิทธิภาพของการหุ้มเชื้อโพรไบโอติกนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มเชื้อ *L.acidophilus* TISTR 2365 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3%

ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต	ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (%±SD)
2%	90.42±0.38
3%	87.46±2.05

หมายเหตุ SD หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. การรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกเมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง

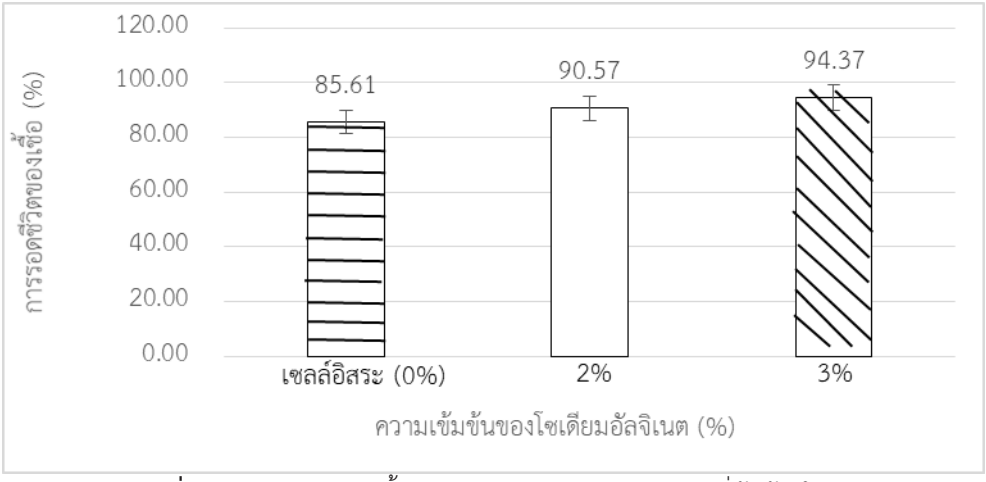
เมื่อศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% 3% และไม่ผ่านการห่อหุ้ม (เซลล์อิสระ) ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง 3 ชั่วโมง และสภาวะลำไส้เล็กจำลอง 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่า การรอดชีวิตในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองของเซลล์อิสระมีค่าเท่ากับ 85.61±3.65% และเชื้อที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% และ 3% มีค่าเท่ากับ 90.57+2.62% และ 94.37+3.40% ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 ซึ่งค่าการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ไม่ถูกห่อหุ้มและถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3 % ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยเชื้อที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 3 % มีค่าการรอดชีวิตได้ดีที่สุดในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง สำหรับการรอดชีวิตในสภาวะลำไส้เล็กจำลองของเซลล์อิสระ เซลล์ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% และ 3% ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง พบว่า มีค่าการรอดชีวิตเท่ากับ 79.44+0.26% 90.75+2.12% และ91.84+1.87% ตามลำดับ โดยค่าการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ผ่านการหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% และ 3% ในสภาวะ

ลำไส้เล็กจำลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่แตกต่างกับเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2

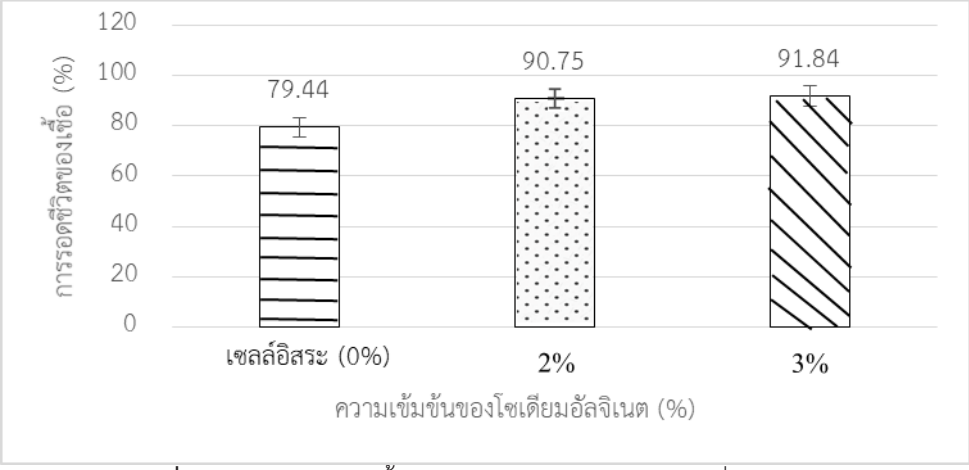
ตารางที่ 2 การรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% 3% และที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม (เซลล์อิสระ) เมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง

สภาวะจำลอง	การรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกที่ถูกหุ้มด้วยอัลจิเนต (%±SD)		
	เซลล์อิสระ	2%	3%
กระเพาะอาหาร	85.61 ± 3.65^{C}	90.57 ± 2.62^{AB}	94.37 ± 3.40^{A}
ลำไส้เล็ก	79.44 ± 0.26^{B}	90.75 ± 2.12^{A}	91.84 ± 1.87^{A}

หมายเหตุ ตัวอักษร A B และ C ที่แตกต่างกันภายในแถว หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) SD หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 1 การรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% 3% และที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม (เซลล์อิสระ) เมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.0 นาน 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 การรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2% 3% และที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม (เซลล์อิสระ) เมื่ออยู่ในสภาวะลำไส้เล็กจำลองที่ pH 8.0 นาน 4 ชั่วโมง ที่ 37 °C

อภิปรายผล

โพรไบโอติก (Probiotic) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต อาจมีเพียงสายพันธุ์เดียวหรือหลายสายพันธุ์ จุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิดแห้ง (Freeze-dried cells) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ให้สมดุลและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์เจ้าถิ่นที่มีประโยชน์ (กระทรวงสาธารณสุข, 2554) และในปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมาดูแลใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้น การนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารจึงเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากเชื้อโพรไบโอติกมีความปลอดภัย สามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหารและส่งเสริมให้ผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดี แต่เชื้อโพรไบโอติกเมื่อถูกบริโภคแล้วเชื้อเดินทางไปถึงระบบทางเดินอาหารจะมีอัตราในการรอดชีวิตน้อย เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรดและในลำไส้เล็กมีการหลั่งน้ำดี ซึ่งจะไปทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติกด้วยวิธีเอนแคปซูเลชัน (Encapsulation) โดยใช้เทคนิคเอ็กทรูชัน (Extrusion) มาใช้ในการเพิ่มจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติก โดยใช้อัลจิเนตเป็นวัสดุในการหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว ใช้งานได้ง่าย มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ไม่เป็นพิษกับเซลล์แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มและมีต้นทุนต่ำ (Krasaekoopt, et al., 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาเกี่ยวกับการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่อยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง เมื่อถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% และศึกษาประสิทธิภาพในการหุ้มเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% พบว่า เชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% มีประสิทธิภาพการหุ้มที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเท่ากับ 90.42+0.38% และ 87.46+2.05% ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตทั้งสองความเข้มข้นจึงไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

L. acidophilus TISTR 2365 ที่อยู่ในแคปซูลอัลจิเนต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Hasiah, Punnanee & Suphitchaya (2014) กล่าวว่า ในการห่อหุ้มเชื้อ *L. plantarum* CM53 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 1% 2% และ 3% ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง ซึ่งมีความเป็นกรด โดยมีค่า pH เท่ากับ 2.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง พบว่า เซลล์อิสระ เซลล์ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 85.61+3.65% 90.57+2.62% และ 94.37+3.40% ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% มีความ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยเซลล์ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง ดังนั้นการหุ้มเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% มีผลทำให้เชื้อรอดชีวิตได้ดีที่สุดในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ อภิชาติ และคนอื่นๆ (2558) กล่าวว่า การหุ้มเชื้อ *L. plantarum* SKI19 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.5% 2.0% 2.5% และ 3.0% ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองที่มี pH เท่ากับ 2.5 ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง พบว่า การหุ้มเชื้อด้วยด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% ทำเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) คือ 79.46% และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Mandal, Puniya & Singh (2006) กล่าวว่า การห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus casei* NCDC-298 ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้น 2.0% 3.0% และ 4.0% พบว่า เซลล์อิสระมีการรอดชีวิตน้อยกว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในสภาวะกรดในทางเดินอาหารที่มี pH เท่ากับ 1.5 เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง และการห่อหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้นข้นสูงสุดจะทำให้มีเชื้อรอดชีวิตมากที่สุด โดยเซลล์ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 4.0% สามารถรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 7.54 log CFU/g

ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในสภาวะลำไส้เล็กจำลอง ซึ่งมีความเป็นเบส โดยมีค่า pH เท่ากับ 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ ซึ่งเซลล์อิสระมีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด คือ 79.44+0.26% ดังนั้นการหุ้มเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตจึงมีผลต่อการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* TISTR 2365 ในสภาวะลำไส้เล็กจำลอง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของรายงานของ Mandal, Puniya & Singh (2006) กล่าวว่า *L. casei* NCDC-298 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.0% 3.0% และ 4.0% เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี bile slat 1.0% นาน 3 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนการรอดชีวิตของเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Afzaal, et al. (2019) กล่าวว่า *L. acidophilus* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2.0% มีการรอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระ 4 log CFU/ml เมื่ออยู่ในสภาวะลำไส้จำลองที่มี pH เท่ากับ 7.5 และมี bile salt 0.3% นาน 120 นาที นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Srisuk & Jirasatid (2020) ที่รายงานว่า *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

มีการรอดชีวิตมากกว่าเซลล์อิสระ 3.4 และ 3.3 log CFU/g ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองและลำไส้จำลองตามลำดับ

จากการศึกษาทั้งหมดจะเห็นได้การใช้โซเดียมอัลจิเนตในการห่อหุ้มเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 จะมีการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนตเป็น supporting material ที่มีความแข็งแรงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและลำดับของ β-D-mannuronic acid (M) และ α-L-guluronic acid (G) ที่ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 โดยความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มจำนวนแขน (binding site) ที่ใช้จับกับ Ca^{2+} ทำให้ M และ G เกิดการจับกันแบบเชื่อมไขว้กับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ได้มากขึ้น ทำให้เพิ่มความแข็งแรงให้กับเม็ดเจลซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เซลล์รอดชีวิตได้มากขึ้น (Lee & Heo, 2000) ซึ่งโซเดียมแอลจิเนตที่มีโครงสร้างแบบ G จับกับ G จะมีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาห่อหุ้ม เนื่องจากมีความแข็งแรงมากที่สุดเมื่อเทียบกับโครงสร้างแบบอื่นๆ ซึ่งอัตราส่วนของ M และ G จะแตกต่างกันไปตามแหล่งชนิดของสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งส่งผลให้อัลจิเนตมีคุณสมบัติแตกต่างกันด้วย (เอื้องกาญจน์ และวิรัตน์, 2554) นอกจากนี้อัลจิเนตยังเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติประเภทพอลิแซคคาไรด์ ทำให้ไม่มีคุณสมบัติความเป็นพิษ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถรับประทานได้ มีโครงสร้างที่เรียบง่าย ไม่เป็นพิษ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพและมีต้นทุนต่ำ (Korbekandi, Mortazavian & Iravani, 2011) ดังนั้นโซเดียมอัลจิเนตจึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการห่อหุ้มเชื้อโพรไบโอติก เพราะไม่มีความเป็นพิษต่อเชื้อโพรไบโอติกและต่อมนุษย์ และการห่อหุ้มเชื้อด้วยโซเดียมอัลจิเนตจะช่วยปกป้องเชื้อโพรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหาร ทำให้เชื้อโพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารได้และส่งผลดีต่อสุขภาพร่างกาย (Chávarri, et al., 2010)

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อโพรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 2365 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตสามารถรอดชีวิตได้ดีว่าเซลล์อิสระในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง เนื่องจากอัลจิเนตสามารถกักเก็บเซลล์และช่วยปกป้องเชื้อโพรไบโอติกจากการถูกทำลายในสภาวะความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารและเพิ่มความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งจะสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกให้มีปริมาณที่อยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการส่งเสริมสุขภาพ นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ยังสามารถช่วยกลบรสชาติ สี และกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้อีกด้วย (Zuidam & Shimoni, 2009) ดังนั้นโซเดียมอัลจิเนตจึงถือเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติมเชื้อโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำผลไม้ ไอศกรีม โยเกิร์ต เป็นต้น

จากการทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและการรอดชีวิตของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 2365 ซึ่งเป็นเชื้อโพรไบโอติก พบว่า ประสิทธิภาพการห่อหุ้มของโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% มีประสิทธิภาพไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และ พบว่า เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์อิสระในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กจำลอง โดยเซลล์ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3% สามารถรอดชีวิตได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองและเซลล์ที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% และ 3% สามารถรอดชีวิตได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในสภาวะลำไส้เล็กจำลอง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และงบประมาณจากเงินรายได้ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สาธารณสุข, กระทรวง. (2554). การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. **พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522,** 128(86ง). 21-25.

จุฬาลักษณ์ ชูพรหม. (2553). **การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติคร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีในหลอดทดลอง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิรสา สุมงคล. (2556). **การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อภิชาติ อู่ไพจิตร, สุธาศิน นิลเพชร และอ้อมใจ ช่อกุหลาบ. (2558). การห่อหุ้มเซลล์ของโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* SKI19 และการประเมินความสามารถในการทนต่อสภาวะของกรดในกระเพาะอาหาร. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54 วันที่ 2-5 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559**(หน้า 797-806). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอื้องกาญจน์ ทาทอง และวิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา. (2554). การเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร. **สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ**, **1**(2), 13.

Afzaal, M., Khan, A.U., Saeed, F., Ahme, A., Ahmad, M.H., Maan, A.A., Tufail, T., Anjum, F.M. & Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic. **Food Science & Nutrition**, **7**, 3931-3940

Boke, H., Aslim, B. & Alp. G. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biological Sciences, 62**, 323-328.

Chandramoulia, V., Kailasapathya, K., Peirisb, P. & 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.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F. & Villarán Mdel, C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate– chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology, 142**(1-2), 185-189.

Coakley, M., Ross, R. P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R. & Stanton, C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, **94**(1), 45-138.

García-Ceja A., Mani-López E., Palou E. & López-Malo A. (2015) Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan**. Food Science and Technology**, **63**(1), 482-489.

George Kerry, R.; Patra, J.K.; Gouda, S.; Park, Y.; Shin, H.S. & Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, **26**, 927-939.

Gomes, A.M.P. & Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological,biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, **10**(4-5), 139-157.

Guarner, F., Khan, G.A., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J. & Lemair, T. (2011). **Probiotics and Prebiotics**. USA: World Gastroenterology Organisation.

Hasiah, A., Punnanee, S. & Suphitchaya, C. (2014). Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Journal of Science and Technology, 36**(3), 291-299.

Korbekandi, H., Mortazavian, A.M. & Iravani, S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. **Journal Food Reviews International**, **27**(2), 192-212.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal, 13**(1), 3-13.

Lee, K.Y. & Heo, T.R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulate gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology, 66**(2), 869-873.

Mandal, S., Puniya, A.K. & Singh K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, **16**, 1190-1195.

Murry, A.C., Hinton, A. & Morrison, H. (2004). Inhibition of Growth of *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium and *Clostridium perfringens* on Chicken Feed Media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Poultry Science, 3**, 603-607.

Serna-Cock, L. & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. **African Journal of Microbiology Research, 7**(40), 4743-4753.

Srisuk, N. & Jirasatid, S. (2020). Characteristics co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with *Dictyophora Indusiata*. **Current Research in Nutrition and Food Science, 8**(3), 1013-1024.

Zuidam, N.J. & Shimoni, E. (2009). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In N.J. Zuidam & V. Nedovic (Eds.), **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**(pp. 3-29). New York : Springer-Verlag.