

โพรไบโอติกไมโครแคปซูลโดยวิธีพ่นแห้ง

Probiotics Microcapsule by Spray Drying

ธีระวัฒน์ บุญโสม, เอกชัย ดำเกลี้ยง และธนาทิพย์ ธรรมาเจริญสุข
Teerawat Boonsom, Ekachai Dumkliang and Tanatip Thamacharoensuk

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย
Faculty of Pharmacy, Eastern Asia University

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีประโยชน์ต่อร่างกายก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกนั้นมีชีวิตรอดจนเข้าสู่ร่างกายและมีปริมาณที่เพียงพอ เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ หากนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาเติมในอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทันที จะไม่เกิดประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีพ่นแห้งเพื่อกักเก็บโพรไบโอติกในไมโครแคปซูล จะส่งผลให้เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความคงตัวของเซลล์ อีกทั้งเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและความคงตัวของเซลล์ระหว่างการผลิตและการเก็บ เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน เป็นกระบวนการห่อหุ้มสารแกนกลางด้วยสารห่อหุ้ม เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารแกนกลางและทำให้เกิดระบบการปลดปล่อยสารแกนกลาง สามารถควบคุมปริมาณ เวลาในการปลดปล่อย และบริเวณที่ต้องการปลดปล่อย ส่วนวิธีพ่นแห้ง คือผลิตผงแห้งจากของเหลวโดยการพ่นฝอย มี 3 ขั้นตอน คือ (1) การเตรียมอิมัลชันของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและสารห่อหุ้ม (2) การใช้แรงดัน ทำให้สารเกิดละอองฝอยขนาด 10-300 ไมโครเมตร (3) การอบแห้ง โดยผ่านละอองฝอยในอากาศร้อน ในช่วงเวลาสั้น ๆ ไม่กี่วินาทีจนถึงมีผลลิวนาที่ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการกักเก็บและการรอดชีวิตของโพรไบโอติก คือ ชนิดของโพรไบโอติก สารห่อหุ้ม ปริมาณของสารห่อหุ้ม อุณหภูมิขาเข้าและอุณหภูมิขาออก อัตราเร็วในการพ่น สัดส่วนของส่วนประกอบในสารห่อหุ้ม (กรณีใช้สารห่อหุ้มมากกว่า 1 ชนิดร่วมกัน)

คำสำคัญ: โพรไบโอติกไมโครแคปซูล, โพรไบโอติก, แลคโตบาซิลัสแลคโตนิสสายพันธุ์จีจี, ไมโครเอนแคปซูเลชัน, วิธีพ่นแห้ง

Abstract

Probiotics are microbial profiles healthful microorganisms when probiotics have survived until well into the body with acceptable amounts. The probiotic survival rates are low, if probiotic to fill in immediately foods or supplements will not be fully effective. Thus, microencapsulation technique applied with spray drying method for probiotic encapsulated, will contribute to increasing the survival rate of probiotics. The microencapsulation technology tends to stabilize cells, to enhance cell viability and stability during production and storage. Microencapsulation is the core substance encapsulated with wall material for increasing the stability of the core material and cause the system to release the core, it improve the release of the core area, as well as able to be control the amount,

duration time and sit of action. Spray drying is a method of producing a dry powder from a liquid or slurry by rapidly drying with a hot gas. Preparation of probiotics microcapsules are three main steps. (1) to prepare emulsions of probiotics and wall material (2) using a feed rate causes microemulsion droplets size 10-300 microns (3) drying through spray in hot condition, in a short time; a few seconds to milliseconds. Factors affecting probiotic encapsulated and survival of probiotics such as type of probiotics, encapsulated wall material, the amount of wall material, inlet and outlet air temperature, feed rate, the proportion of components in the wall material (if more than one type of wall material wrapped together).

Keywords: probiotic microcapsule, probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* GG, microencapsulation, spray drying



บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคมีความรู้และให้ความสนใจในสุขภาพของตนเองและคนรอบข้างมากขึ้น จึงมีการเลือกซื้ออาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเสริมสุขภาพมากขึ้น ดังนั้นอาหารที่มีประโยชน์ เช่นอาหารหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะอาหารหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีการเติมแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพโดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย หากได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การทำงานของระบบขับถ่ายดีขึ้น ลดการติดเชื้อในลำไส้ (Fuller, 1989) ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกเพื่อสุขภาพวางจำหน่ายในตลาดหลายชนิด และมีการขยายตัวของผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก อย่างต่อเนื่อง (Jankovic, et al., 2010) แบคทีเรียโพรไบโอติก ที่ได้รับการจดทะเบียนนำมาเติมหรือหมักในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม (โยเกิร์ต ชีส ไอศกรีม และนมอัดเม็ด) และผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่นม (ช็อกโกแลต ธัญพืช และน้ำผลไม้) (Anal & Singh, 2007) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโพรไบโอติกจะมีประโยชน์ต่อร่างกายก็ต่อเมื่อแบคทีเรียมีชีวิตรอดจนเข้าสู่ร่างกายและมีปริมาณสูงเพียงพอ แต่พบว่ามียางานที่ชี้ให้เห็นถึงการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเซลล์อิสระว่าเป็นไปได้ยาก หรือมีปริมาณลดลงต่ำกว่าเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด (10^6 CFU/g) (DeVos, et al., 2010)

ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางเภสัชกรรมมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก วิธีที่นิยมคือวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) ซึ่งเป็นวิธีในการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อช่วยป้องกันเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ เมื่อต้องอยู่กับอาหารที่มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิต และการห่อหุ้มช่วยให้เชื้อรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กได้ดีขึ้น (Serna-Cock & Vallejo-Castillo, 2013)

โพรไบโอติก (probiotics)

โพรไบโอติก มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก ซึ่งมีความหมายว่า “เพื่อชีวิต” (for life) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในรายงานวิจัยของ Lilly & Stillwell (1965) เพื่ออธิบายถึงสารจากจุลินทรีย์ที่กระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่จะทำลายจุลินทรีย์ และมีหลายงานวิจัยที่ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้ว่า เป็นสิ่งมีชีวิตและที่ผลิตสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1989 Fuller ได้ปรับปรุงคำจำกัดความของโพรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ถูกอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย และในปี ค.ศ. 1989 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration--FDA) ได้ให้คำจำกัดความของ โพรไบโอติก ว่าเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่ให้อินโดยตรงและจัดเป็น Generally Recognized as Safe (GRAS) ซึ่งเป็นอาหารและสารที่เติมในอาหารได้อย่างปลอดภัย สามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้ (Schrezenmeir & de Vrese, 2001)

จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus* sp. และกลุ่ม *Bifidobacterium* sp. ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* สายพันธุ์ GG, *L. casei* สายพันธุ์ shirota, *L. johnsonii*, *Bifidobacterium bifidum* และ *B. longum* ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp. นอกจากนี้ยีสต์และราบางชนิด เช่น *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp. ก็สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้ (Holzapfel, et al., 2001; Ouwehand, et al., 2002; Gaggia, et al., 2010)

อย่างไรก็ตามการพัฒนาหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่มาใช้เป็นโพรไบโอติก จะต้องมีการประเมินความปลอดภัยและความเสี่ยงอย่างชัดเจน รวมทั้งคำนึงถึงการทำงานของโพรไบโอติก และเทคโนโลยีหรือกระบวนการผลิตที่เหมาะสมในการนำโพรไบโอติกมาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก มีดังนี้ (Saarela, et al., 2000, Mattila-Sandholm, et al., 2002)

1. การพิจารณาด้านความปลอดภัย ได้แก่ (1) เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกว่ามีความปลอดภัย (2) ไม่มีประวัติการก่อโรค (3) ไม่ทำให้เกิดโรคและเป็นพิษ
2. การพิจารณาด้านการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีการลดลง (pH 2-4) และทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารระหว่างการส่งผ่านจากกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็ก

ส่วนต้น ทนต่อเกลือ น้ำดี และน้ำย่อยจากตับอ่อน เช่น แพนครีเอติน มีชีวิตรอดและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปยังทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ สามารถแข่งขันและขัดขวางการเกาะติดของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น *E. coli*, *Salmonella* sp. และ *Helicobacter pylori* ที่ผนังของทางเดินอาหาร เพื่อดำรงชีวิตอยู่ในทางเดินอาหารได้ (Mattila-Sandholm, et al., 2002)

3. การพิจารณาด้านกิจกรรมของโพรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน สารเหล่านี้มีสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่บุกรุก หรือก่อให้เกิดโทษ เช่น *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium difficile* นอกจากนี้ กรดแลคติกซึ่งเป็นสารหลักที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีผลทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Mattila-Sandholm, et al., 2002) มีการศึกษาการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในระบบทางเดินอาหาร และเป็นปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาที่จะเป็นมะเร็งในกระเพาะ พบว่า *L. johnsonii* La1 และ *L. gasseri* OLL2716 สามารถลดปริมาณ *H. pylori* ที่เจริญในลำไส้และลดการอักเสบได้ นอกจากนี้ *L. casei* สายพันธุ์ shirota และ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้เช่นกัน เคยมีการศึกษาในผู้ป่วยติดเชื้อ *H. pylori* จำนวน 14 คน ซึ่งดื่มนมที่มี *L. casei* สายพันธุ์ shirota (2×10^6 CFU/days) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตรวจประเมินจากปัสสาวะผู้ป่วยที่ดื่มนมหมักนี้ พบว่าปริมาณของเชื้อ *H. pylori* ลดลง 64% (Cats, et al., 2003) มีรายงานการใช้ *L. rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับ *Streptococcus thermophilus* เพื่อบรรเทาอาการท้องเสียในทารก โดยเฉพาะทารกที่ไม่ได้ดื่มนมมารดา พบว่าสามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของภาวะท้องเสียที่เกิดจากอาหารเป็นพิษได้ ช่วยป้องกันและรักษาโรคท้องเสียที่มีสาเหตุจาก Rotavirus (Guandalini, et al., 2011) และมีประสิทธิภาพดีในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีอาการท้องเสีย จากการติดเชื้อ *Clostridium difficile* ในลำไส้หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ (Huebner & Surawicz, 2006) จากรายงานของ Kalliomaki (2003)

พบว่า ในเด็กอายุ 2 ขวบที่ได้รับ LGG สามารถลดการเกิดภาวะผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic eczema) ได้ร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับแบคทีเรียดังกล่าว การวิจัยแบบ Meta-analysis พบว่าโพรไบโอติก โดยเฉพาะในสกุลของ *Lactobacillus* ช่วยลดความเสี่ยงของอาการท้องเสียที่เกิดจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic-associated diarrhea) ลดอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้ LGG ยังมีบทบาทในการป้องกันและรักษาอาการผื่นภูมิแพ้ผิวหนังในเด็กทารกที่แพ้นมวัว พบว่าเมื่อได้รับนมสูตร Extensively hydrolyzed (EH) cow's milk ร่วมกับแบคทีเรีย LGG สามารถช่วยปรับการทำงานของเนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหารและช่วยให้ร่างกายทนต่อโปรตีนนมวัวได้ดีขึ้น Scalabrin, et al. (2016) ศึกษาถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของ LGG ที่ให้ร่วมกับนมสูตร EH ในเด็กทารกเป็นระยะเวลา 5 ปี พบว่าช่วยสนับสนุนด้านการเจริญเติบโตและการพัฒนาการในเด็กทารก นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยสูง ไม่ก่อให้เกิดการแพ้หรืออาการข้างเคียงอื่น ๆ ที่ร้ายแรงและไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถนำมาใช้เติมในอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามปัญหาของจุลินทรีย์โพรไบโอติกคือการไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกและการลดจำนวนลงของจุลินทรีย์โพรไบโอติก จึงทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่ำกว่ามาตรฐาน จึงทำให้ไม่ได้ประสิทธิภาพตามที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นการนำวิธีไมโครเอนแคปซูเลชันมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีพ่นแห้งเพื่อห่อหุ้มจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่น่าสนใจ

การทำไมโครเอนแคปซูเลชันโพรไบโอติก (microencapsulation of probiotics)

โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่รับประทานเข้าไปแล้วช่วยให้ร่างกายของผู้นั้นสุขภาพดีขึ้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกคือ ชนิด/สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในบริเวณลำไส้ จากรายงานการวิจัยในปัจจุบันทำให้ทราบชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการรับประทาน

แต่เนื่องจากกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์ การขนส่ง การเก็บรักษา วิธีการรับประทาน ตลอดจนถึงระบบนำส่ง โพรไบโอติกล้วนมีผลต่อปริมาณอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนั้น การทำไมโครเอนแคปซูเลชันโพรไบโอติก เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญและจำเป็น

ไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) คือ กระบวนการห่อหุ้มสารแกนกลาง (core material) ด้วยสารห่อหุ้ม (wall material) ทำให้เกิดอนุภาคผนังขนาดตั้งแต่ 1-1,000 ไมโครเมตร หรือที่เรียกว่า ไมโครแคปซูล (microcapsules) การที่สารแกนกลางถูกห่อหุ้มไว้ภายในไมโครแคปซูลก่อให้เกิดผลดี คือ (1) ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารแกนกลาง โดยป้องกันการทำลายจากอุณหภูมิ ความชื้น ปฏิกริยาเคมีในระหว่างกระบวนการขนส่งและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ตลอดจนสามารถป้องกันการทำลายสารแกนกลางจากกรดและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (2) ก่อให้เกิดระบบควบคุมการปลดปล่อยตัวยาซึ่งเป็นสารแกนกลางออกจากผนังของไมโครแคปซูล ทำให้สามารถควบคุมปริมาณ บริเวณ ตลอดจนถึงระยะเวลาในการปลดปล่อยได้ จากประโยชน์ข้างต้นจึงมีการนำกระบวนการไมโครเอนแคปซูเลชันมาใช้ในกักเก็บสารแกนกลางหลายชนิดทั้งยา อาหารและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ (Promrahsa, et al., 2014; De Prisco & Mauriello, 2016; Dordevic, et al., 2015)

กระบวนการกักเก็บโพรไบโอติกในไมโครแคปซูลด้วยวิธีการพ่นแห้ง

การทำไมโครเอนแคปซูเลชันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่วิธีที่ประสบความสำเร็จและนิยมใช้อุตสาหกรรมอาหารและโพรไบโอติก คือ การพ่นแห้ง (spray drying) และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีมีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติกหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมตัวรับไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ผงไมโครแคปซูลที่ได้จากการพ่นแห้งมีปริมาณน้ำในตัวรับสูงกว่าการทำแห้งแบบเยือกแข็งซึ่งมีผลในการยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หลังเตรียมนานกว่า นอกจากนี้การผลิตไมโครแคปซูลของจุลินทรีย์

โพรไบโอติกด้วยวิธีการพ่นแห้งยังมีข้อดีในแง่ของต้นทุน และกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Serna-Cock & Vallejo-Castillo, 2013; Ying, et al., 2010) โดยการเตรียมการกักเก็บโพรไบโอติกในไมโครแคปซูลด้วยวิธีพ่นแห้งมี 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การเตรียมอิมัลชันหรือสารแขวนตะกอนของโพรไบโอติกและสารห่อหุ้ม (2) การใช้แรงดันโดยการดันสารที่เตรียมได้ผ่านหัวฉีด ทำให้เกิดละอองฝอยขนาด 10-300 ไมโครเมตร (3) การอบแห้ง โดยผ่านละอองฝอยในอากาศร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 120-180°C ในช่วงเวลาสั้น ๆ ไม่กี่วินาทีจนถึงมิลลิวินาที จึงทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่กักเก็บในไมโครแคปซูลสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้หลังการเตรียมตัวรับ (Promrahsa, et al., 2014; Huang, et al., 2013; Mortazavian, et al., 2007) วิธีพ่นแห้ง มีข้อดีกว่าวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เนื่องจากสามารถผลิตโพรไบโอติกไมโครแคปซูลได้จำนวนมากกว่า ประหยัดพลังงานมากกว่า และวิธีการมีความเหมาะสมยิ่งขึ้น นอกจากนี้ไมโครแคปซูลจากวิธีพ่นแห้ง ยังมีข้อดีในเรื่องความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บ มีความทนทานต่อสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

จากกระบวนการข้างต้นพบปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการกักเก็บและการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกคือ

1. ชนิดของโพรไบโอติก (type of probiotics)

โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเตรียมในรูปไมโครแคปซูลนอกจากต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และเจริญเติบโตได้ในร่างกายแล้ว ยังต้องมีคุณสมบัติในการทนความร้อนและทนต่อสภาวะความเครียด (stress conditions) จากกระบวนการเตรียมได้ หลายงานวิจัยพบว่าเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. เป็นจุลินทรีย์มีคุณสมบัติที่ดีและสามารถทำไมโครแคปซูลได้ด้วยวิธีพ่นแห้งได้ (Corona-Hernandez, et al., 2013; Huang, et al., 2013)

2. สารห่อหุ้ม (wall material)

คุณสมบัติของสารห่อหุ้มโพรไบโอติกที่ดี นอกจากจะต้องเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการบริโภค ให้สี กลิ่น

รส ที่น่ารับประทานแล้ว ควรเป็นสารที่ละลายหรือกระจายตัวในน้ำได้ดี ให้ความหนืดต่ำ เพื่อให้ง่ายในการเกิดไมโครแคปซูลและไม้อุดตันหัวฉีดขณะพ่นแห้ง เมื่ออยู่ในรูปไมโครแคปซูลต้องให้อนุภาคที่มีความพรุนหรือรอยแตกที่ผิวอนุภาคน้อย เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์จากการทำลายของสภาวะต่าง ๆ ขณะเตรียมตัวรับและสภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษา อีกทั้งไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จะต้องสามารถกักเก็บน้ำไว้ในอนุภาคในปริมาณที่เหมาะสมในการรอดชีวิตของเชื้อชนิดนั้น ๆ (Serna-Cock & Vallejo-Castillo, 2013; Muhammad, et al., 2017)

สารห่อหุ้มที่นิยมใช้กักเก็บโพรไบโอติก ได้แก่ (1) สารกลุ่มโปรตีน ซึ่งจากรายงานการวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้เวย์โปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักของสารห่อหุ้ม เนื่องจากสามารถเกิดไมโครแคปซูลได้ดีด้วยวิธีพ่นแห้ง อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการปกป้องเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในระหว่างขั้นตอนการพ่นแห้งและในระหว่างการเก็บรักษา ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ระดับสูง (2) สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต แม้ความสามารถในการกักเก็บเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าสารกลุ่มโปรตีน แต่จากการที่มีคุณสมบัติลด osmotic stress ขณะให้ความร้อนในขั้นตอนพ่นแห้งจึงช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (3) สารกลุ่มอื่น ๆ เช่น เจลาตินและกัมอะราบิก เป็นต้น (Huang & Surawicz, 2017; Muhammad, et al., 2017)

อย่างไรก็ตามพบรายงานการใช้สารมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันเป็นสารห่อหุ้ม เพื่อลดข้อด้อยหรือเสริมคุณสมบัติในการทำไมโครแคปซูล เช่น การใช้เวย์โปรตีนร่วมกับคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กอย่างน้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส ซึ่งนอกจากช่วยลด osmotic stress แล้วยังพบการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างโมเลกุลน้ำตาลกับโมเลกุลเวย์โปรตีนทำให้ผนังของไมโครแคปซูลมีความแข็งแรงมากขึ้น จึงช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของตัวรับได้ กรณีคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่หรือพอลิแซ็กคาไรด์มีการนำมาใช้ร่วมกับโปรตีนเพื่อลดสัดส่วนของเวย์โปรตีนและเพิ่มคุณสมบัติที่ดีแก่ไมโครแคปซูล โดยคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่เฉพาะกลุ่มแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ (Resistant starch--SR) เป็นสารกลุ่มที่ได้รับความนิยมค่อนข้างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นแป้งที่ถูกย่อยช้ากว่าแป้งทั่วไปจึงมี

การปลดปล่อยน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือดช้า ทำให้สามารถรักษาระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้นาน ยืดระยะเวลาในการให้ทำให้มีประโยชน์อย่างมากในการควบคุมระดับน้ำตาลโดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Ying, et al., 2013; Vatanasuchart, Niyomwit & Wongkrajang, 2009; Gua, et al., 2015) และพบว่าเมื่อนำโพรไบโอติกมาทำไมโครเอนแคปซูลด้วย RS ระบบนำส่งที่ได้จะช่วยลดการปลดปล่อยของเชื้อโพรไบโอติกในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมในการดำรงชีวิตของเชื้อ และเพิ่มสัดส่วนการปลดปล่อยเชื้อในบริเวณลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นบริเวณออกฤทธิ์ของเชื้อโพรไบโอติกได้มากขึ้น (Mortazavian, et al., 2007) นอกจากการใช้ SR เป็นสารห่อหุ้มแล้วยังมีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไมโครแคปซูลที่ได้ เช่นในรายงานการวิจัยของ Muhammad, et al. (2017) พบว่าการใช้แป้งมันฝรั่งที่ผ่านการดัดแปรโครงสร้างให้เป็นแป้งทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (Potato resistance starch-- PRS) เป็นสารห่อหุ้มร่วมกับเวย์โปรตีนและสารร่วมอื่น ๆ พบว่านอกจาก PRS มีคุณสมบัติเป็น thermoprotectant formulations จากการลด osmotic stress ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์แล้ว ไมโครแคปซูลที่ได้มีความคงตัวของผนังและปริมาณความชื้นในระดับที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อีกด้วย

3. ปริมาณของสารห่อหุ้ม (amount of wall material)

พบว่าปริมาณสารห่อหุ้มหรือของแข็งที่ใช้เตรียมสารห่อหุ้ม (total solid) มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บและการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยพบว่าการเพิ่มสารห่อหุ้มช่วยเพิ่มความสามารถในการกักเก็บโพรไบโอติกและได้ไมโครแคปซูลที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดี อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนต่อหน่วยในการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการใช้ปริมาณสารห่อหุ้มในปริมาณสูงก็มีผลลดปริมาณการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ เนื่องจากไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จะมีขนาดใหญ่จึงสัมผัสกับความชื้นได้นานกว่าอนุภาคขนาดเล็กที่ได้จากการใช้สารห่อหุ้มที่ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นในปัจจุบันจึงยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ในทิศทางที่ชัดเจนของปริมาณสาร

ห่อหุ้ม ร้อยละของการกักเก็บ และอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกได้ ส่วนหนึ่งเกิดจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ สัดส่วนของสารห่อหุ้มต่อจุลินทรีย์ ตลอดจนวิธีการและสภาวะในการเตรียมซึ่งเป็นปัจจัยร่วม อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสารห่อหุ้มที่มีรายงานความสำเร็จในการทำไมโครเอนแคปซูลชั้นโพรไบโอติกมีการใช้สารห่อหุ้มอยู่ในช่วงร้อยละ 20 ถึง 30 โดยน้ำหนัก (Huang & Surawicz, 2017; Mortazavian, et al., 2007)

4. อุณหภูมิขาเข้า (inlet temperature) และอุณหภูมิขาออก (outlet temperature)

ความร้อนในกระบวนการพ่นแห้งมีผลทำให้โพรไบโอติกตายหรือเสียสภาพได้ และการเกิดฟองอากาศขณะเตรียมตัวรับก็สามารถทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกตายหรือเสียสภาพได้เช่นกัน นอกจากนี้ความร้อนยังมีผลต่อปริมาณความชื้นในไมโครแคปซูลหลังการเตรียมตัวรับ โดยโพรไบโอติกจะมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่ความชื้นประมาณ 4% และค่า water activity ประมาณ 0.2 ดังนั้นเพื่อลดผลกระทบจากความร้อนในการเตรียมข้างต้นจึงนิยมทำไมโครเอนแคปซูลชั้นที่อุณหภูมิต่ำ คือ อุณหภูมิขาเข้าไม่เกิน 180°C สำหรับความร้อนขาออกก่อนเก็บตัวรับเข้าสู่ไซโคลน (cyclone) เองก็มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกและปริมาณความชื้นในตัวรับ โดยพบความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงของอุณหภูมิขาออกกับอัตราการรอดชีวิต คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขาออกอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะลดลงตามลำดับ จากรายงานการวิจัยพบว่าการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกหลังผ่านกระบวนการพ่นแห้งที่อุณหภูมิขาออกต่ำกว่า 80°C ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Huang & Surawicz, 2017)

5. อัตราเร็วในการพ่นแห้ง (feed rate)

อัตราเร็วในการพ่นแห้งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและความชื้นของไมโครแคปซูล กล่าวคือ การเพิ่มอัตราในการพ่นแห้งทำให้มีระยะเวลาในการสัมผัสความร้อนของโพรไบโอติกลดลง ทำให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราเร็วในการพ่นแห้งที่ต่ำกว่า แต่การเพิ่มอัตราเร็วในการพ่นแห้งจะทำให้ได้ไมโครแคปซูลที่มีปริมาณความชื้น

ในตำรับสูงขึ้น อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเสียสภาพ การแตกหัก หรือเกาะกลุ่มของผงไมโครแคปซูล ซึ่งมีผล ต่ออายุของผลิตภัณฑ์หลังการเตรียมตำรับ อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิเข้าและอัตราเร็วในการพ่นแห้งต่ออัตราการรอดชีวิตและความชื้นของตำรับ เป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่พบว่าอุณหภูมิเข้ามีอิทธิพล สูงกว่าอัตราเร็วในการพ่นแห้งมาก ดังนั้นจึงพบการใช้ อัตราเร็วในการพ่นแห้งที่หลากหลายตั้งแต่ 3.5 mL/min ถึง 60 mL/min ขึ้นอยู่กับชนิดของโพรไบโอติกและสาร ห่อหุ้ม แต่ทุกรายงานการวิจัยจะมีการใช้อุณหภูมิเข้า ไม่เกิน 180°C (Huang & Surawicz, 2017; Mortazavian, et al., 2007)

6. สัดส่วนของส่วนประกอบในสารห่อหุ้ม (กรณี ใช้สารห่อหุ้มมากกว่า 1 ชนิดร่วมกัน)

เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีจุดเด่นจุดด้อยที่แตกต่างกันในการนำมาใช้เป็นสารห่อหุ้ม ทั้งในส่วนของคุณสมบัติ การเป็นสารห่อหุ้ม / คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและราคา ดังนั้นเพื่อให้ได้สารห่อหุ้มที่มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ที่ดี อัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสูง และราคาไม่แพง อาจมีการใช้สารห่อหุ้มร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด เช่น งานวิจัย ของ Ying, et al. (2013) ซึ่งมีการใช้เวย์โปรตีนและแป้ง ข้าวโพดที่ผ่านการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีให้เป็นแป้ง ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ (Resistant starch--RS) เป็น สารห่อหุ้ม พบว่า เวย์โปรตีนมีคุณสมบัติในการเกิดไมโคร แคปซูลและป้องกันการทำลายเชื้อจุลินทรีย์จากสภาวะ แวดล้อมได้ดีกว่าการใช้ RS เดียว ๆ และเมื่อใช้เวย์โปรตีน ร่วมกับ RS ในสัดส่วนโดยมวลตั้งแต่ 4:1 จนถึง 1:4 พบว่า คุณสมบัติการทนต่อสภาวะแวดล้อมลดลงตามสัดส่วน เวย์โปรตีนในตำรับที่ลดลง โดยไมโครแคปซูลที่เตรียม ได้ที่สัดส่วน 1:4 สามารถป้องกันจุลินทรีย์โพรไบโอติก จากสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ดีกว่าการใช้ RS เดียว ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นการใช้เวย์โปรตีน ร่วมกับแป้งที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ที่สัดส่วน 4:1 มีความสามารถในการป้องกันจุลินทรีย์โพรไบโอติกจาก สภาวะแวดล้อมได้ไม่แตกต่างจากการใช้เวย์โปรตีนเดี่ยว ๆ

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไมโครแคปซูลที่กักเก็บ โพรไบโอติก

การเตรียมตำรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกซึ่งเดิมอยู่ ในรูปคอลลอยด์กระจายตัวในของเหลวให้อยู่ในรูปไมโคร แคปซูลซึ่งเป็นของแข็งช่วยเพิ่มความเสถียรในการขนส่ง การเก็บรักษา และการใช้งาน ทั้งนี้การใช้ประโยชน์จาก ไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติกมี 2 ลักษณะ คือ การใช้ประโยชน์ในการเป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรม อาหารโดยการผสมลงไปเป็นอาหารระหว่างกระบวนการผลิต เช่น การผลิตไอศกรีม นมและผลิตภัณฑ์จากนม เป็นต้น ส่วนอีกลักษณะหนึ่ง คือ การที่ผู้บริโภคใช้ประโยชน์จาก ไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติกโดยตรง เช่น การนำ ผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติกไปเติมผสมในน้ำ น้ำผลไม้ หรืออาหารที่ตนต้องการเพื่อรับประทานเป็น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตลอดจนถึงการบริโภคแคปซูล ที่บรรจุผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติกโดยตรง อย่างไรก็ตามพบว่าไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมในกลุ่ม ผู้รักสุขภาพ และการแพทย์ทางเลือก ทำให้ไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติก เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางการตลาดและเพิ่มศักยภาพใน การแข่งขัน (De Prisco & Mauriello, 2016)

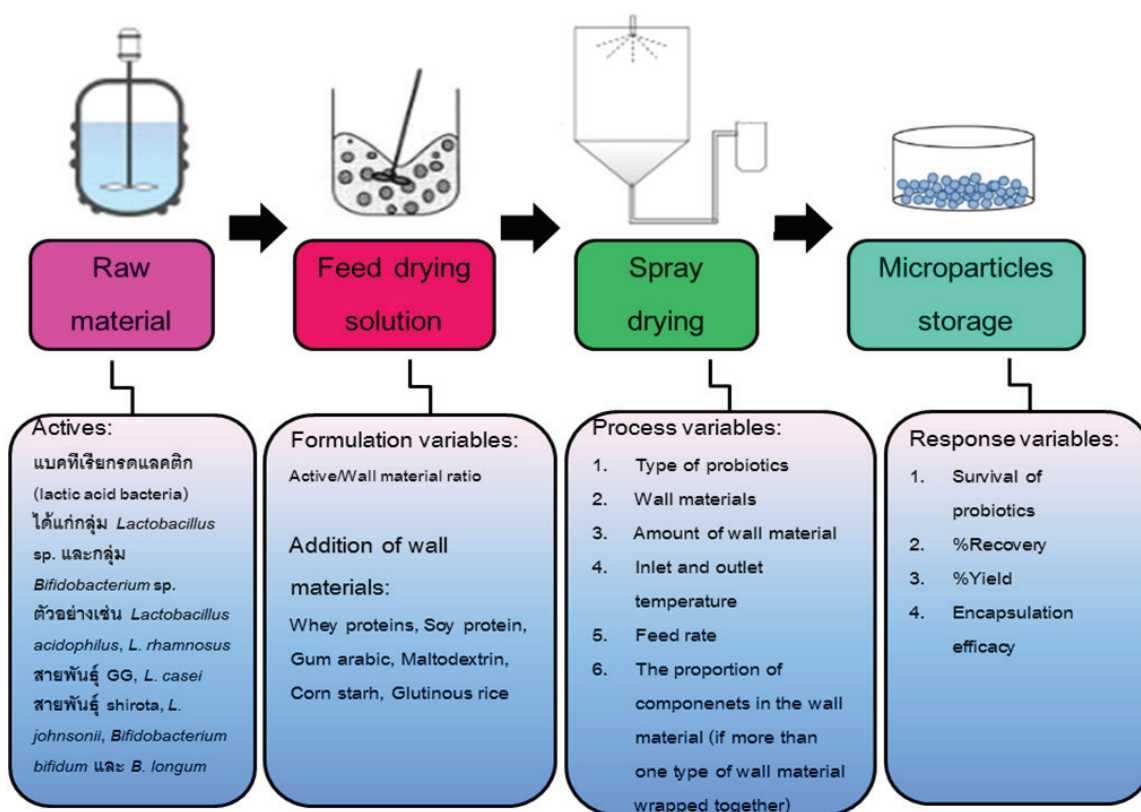
บทสรุป

จุลินทรีย์โพรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ต่อร่างกายมนุษย์ รับประทานได้ สามารถใช้เติมในอาหาร ได้อย่างปลอดภัย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ *Lactobacillus rhamnosus* GG เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยและมีการใช้เติมในอาหารและผลิตภัณฑ์ เสริมอาหาร แต่เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โพรไบโอติกที่ต่ำ ส่งผลให้เมื่อนำมาผสมในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จะไม่ได้ประสิทธิภาพตาม ความคาดหวัง ดังนั้นการนำเทคนิคทางเภสัชกรรม มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โพรไบโอติก วิธีที่นิยมคือวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน ซึ่งเป็นวิธีในการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ เพื่อช่วยป้องกันเชื้อ แบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ เมื่อต้องอยู่ กับอาหารที่มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิต และ

การห่อหุ้มช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร และเคลื่อนน้ำดีในลำไส้เล็กได้ดีขึ้น

โดยเฉพาะปัจจัยที่สำคัญในการทำไมโครเอนแคปซูเลชัน คือสารห่อหุ้ม ดังนั้นการเลือกสารห่อหุ้มสำหรับทำไมโครแคปซูลโพรไบโอติก จึงมีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อความสำเร็จ มีสารห่อหุ้มที่น่าสนใจตัวอย่างเช่น แป้งข้าวเหนียว ซึ่งเตรียมได้จากเมล็ดข้าวเหนียว (*Glutinous rice, Oryza sativa* L.) ได้เนื้อแป้งมีลักษณะทึบแสง เนื้อสัมผัสนุ่ม เป็นที่นิยมในการบริโภคทั้งเพื่อเป็นอาหารและเป็นส่วนประกอบของยาแผนโบราณ มีปริมาณ amylopectin สูง เป็นแป้งทนการย่อยของเอนไซม์ตามธรรมชาติโดยไม่ต้องดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี (Guo, et al., 2014; Zhang,

et al., 2014) เมื่อเตรียมในรูปไมโครแคปซูลให้อนุภาคที่มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ดี (Surojanametakul, et al., 2005) จากคุณสมบัติที่ดีของแป้งข้าวเหนียวจึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นสารห่อหุ้มร่วมกับเวย์โปรตีนในการกักเก็บโพรไบโอติก เพื่อเป็นการปรับลดสัดส่วนของเวย์โปรตีนซึ่งมีราคาแพงลง ด้วยการเพิ่มสัดส่วนแป้งข้าวเหนียวซึ่งมีราคาถูกและผลิตได้ในประเทศไทย การเลือกใช้สารห่อหุ้มร่วมกับการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำไมโครแคปซูล เพื่อให้ไมโครแคปซูลที่ได้มีร้อยละผลผลิตและอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสูงขึ้น โดยมีต้นทุนในการผลิตที่ลดลง เพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลที่กักเก็บโพรไบโอติกเดิมที่มีอยู่ในท้องตลาด การใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นสารห่อหุ้มร่วมยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยได้อีกด้วย



ภาพ 1 ขั้นตอนการผลิตโพรไบโอติกไมโครแคปซูลโดยวิธีการพ่นแห้ง



References

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240-251.
- Cats, A., Kuipers, E. J., Bosschaert, M. A. R., Pot, R. G. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Kusters, J. G. (2003). Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17(3), 429-435.
- Corona-Hernandez, R. I., Alvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, L., Islas-Rubio, A. R., De La Rosa L. A., & Wall-Medrano, A. (2013). Structural Stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 614-628.
- De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016) Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science and Technology*. 48(2016), 27-39.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Dordevic, V., Balanc, B., Belscak-Cvitanovic, A., Levic, S., Trifkovic, K., Kalusevic, A., . . . Nedovic, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(1989), 365-378.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(S1), 15-28.
- Gao, X. Q., Zhang, W. G., & Zhou, G. G. (2014). Effects of glutinous rice flour on the physiochemical and sensory qualities of ground pork patties. *Food Science and Technology*, 58(1), 135-141.
- Gua, L., Zhang, J., Hu, J., Li, X., & Du, X. (2015). Susceptibility of glutinous rice starch to digestive enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 128(2015), 154-162.
- Guandalini, S. (2011). Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(S1), 149-153.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365-373.
- Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Loir, Y. L., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63(2017), 1-17.

- Huebner, E. S., & Surawicz, C. M. (2006). Treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhea. *Gastroenterology & hepatology*, 2(3), 203-208.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E., & Mercenier, A. (2010). Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., & Isolauri, E. (2003). Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 361(9372), 1869-1871.
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2), 173-182.
- Mortazavian, A., Hadi, R. S., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-18.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X. (2017). Integration of polysaccharide thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food Hydrocolloids*, 66(2017), 286-295.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effect. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279-289.
- Promrahsa, B., Daduang, J., Khampitak, T., Hongssprabhas, P., & Boonsiri, P. (2014). Microencapsulation techniques and its role in medicine. *Srinagarind Medical Journal*, 29(1), 90-97.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Scalabrin, D. M. F., Harris, C., Johnston, W. H., & Berseth, C. L. (2016). Long-term safety assessment in children who received hydrolyzed protein formulas with *Lactobacillus rhamnosus* GG: A 5-year follow-up. *European Journal of Pediatrics*, 176(2), 1-8.
- Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743-4753.
- Schrezenmeir, J. & de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361-364.
- Surojanametakul, V., Tungtrakul, P., Varannanond, W., Supasri, R., Boonbumrourng, B., & Themtakul, K. (2005). Properties of spray-dried rice starch microcapsule. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 39(2005), 730-738.

- Vatanasuchart, N., Niyomwit, B., & Wongkrajang, K. (2009). Resistant starch contents and the in vitro starch digestibility of Thai starchy foods. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 43(2009), 178-186.
- Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., & Augustin, M. A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75(9), 588-595.
- Ying, D. Y., Schwander, S., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microcapsuled *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 98-105.
- Zhang, H. J., Liu, Y. L., Zhou, J., & Sun, B. G. (2014). Amylopectin is the anti-fatigue ingredient in glutinous rice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63(2014), 240-243.

