การใช้เจลบูรวมกับเพคตินเป็นสารเคลือบจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

UTILIZATION OF KONJAC-PECTIN GEL MIXTURE FOR PROBIOTIC ENCAPSULATION AND ITS APPLICATION IN DRINKING YOGHURT

สาวรยา เม้งเกร็ด

SAWANYA MENGGRED

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้เจลบุกร่วมกับเพคตินเป็นสารเคลือบจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

UTILIZATION OF KONJAC-PECTIN GEL MIXTURE FOR PROBIOTIC ENCAPSULATION AND ITS APPLICATION IN DRINKING YOGHURT

สวรรยา เม้งเกร็ด

SAWANYA MENGGRED

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 74566
วัน,เดือน,ปี - 3 ต.ค. 2550

b 11803952
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้เจลบุกร่วมกับเพคตินเป็นสารเคลือบจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

Utilization of Konjac-Pectin Gel Mixture for Probiotic Encapsulation and its Application in Drinking Yoghurt

ชื่อนักศึกษา นางสาวสวรรยา เม้งเกร็ด

รหัสประจำตัว 47063205

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ประพันธ์	ปิ่นศิโรดม	
ดร.ศศิวิมล	ชื่นอิ่ม อาเหม็ด	
รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.สุนีย์	นิธิสินประเสริฐ	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 16 พฤษภาคม 2550 เวลา 13.00 น. เป็นต้น

สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D213/2 อาคารเจ้าคุณทหาร

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่....24....**เดือน**....พฤษภาคม....**พ.ศ.**....2550....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เจลบุกร่วมกับเพคตินเป็นสารเคลือบจุลินทรีย์โพรไบโอติกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม
นักศึกษา	นางสาวสวรรยา เม้งเกร็ด
รหัสนักศึกษา	47063205
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยใช้เจลบุกผสมเพคติน โดยแปรอัตราส่วนระหว่างสารละลายบุก (1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์) และสารละลายเพคติน (6 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1:0 1:0.7 1:1 และ 1:2 พบว่าที่อัตราส่วนของสารละลายบุก (1.5 เปอร์เซ็นต์) และสารละลายเพคติน (6 เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1:2 ให้ค่าความแข็งแรงของเจลผสมสูงที่สุด ในขั้นตอนการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น พบว่าสัดส่วนระหว่างสารละลายเจลผสม 20 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร ให้ค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% encapsulation yield) สูงกว่าที่อัตราส่วน 25:100 และ 30:100 ตามลำดับ และเมื่อแปรระยะเวลากวนผสม (mixing time) เท่ากับ 30 60 90 และ 120 วินาที ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที พบว่าที่ระยะเวลากวนผสม 90 วินาทีให้ค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 97.08 เปอร์เซ็นต์ และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดเจลเท่ากับ 4.97 ไมโครเมตร จากผลการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* La5 และ *Bifidobacterium lactis* BB12 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเคลือบด้วยเจลบุกผสมเพคตินมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นและจากผลการทดลองพาสเจอไรซ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที พบว่า *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากผ่านการพาสเจอไรซ์ เท่ากับ 84.31 เปอร์เซ็นต์ และ 59.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระ *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 68.49 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่า 11.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินเปรียบเทียบกับการเติมเซลล์อิสระ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title	Utilization of Konjac-Pectin Gel Mixture for Probiotic Encapsulation and its Application in Drinking Yoghurt
Student	Miss. Sawanya Menggred
Student ID.	47063205
Degree	Master of Science
Program	Food science
Year	2007
Thesis Advisor	Dr. Sasivimol Chuen-Im Ahmed

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the optimum conditions of probiotic encapsulation using konjac-pectin gel mixture by emulsion method. The ratios of konjac gel solution (1, 1.5 and 2%) to pectin gel solution (6%) were varied at 1:0, 1:0.7, 1:1 and 1:2 (v/v). The result showed that the ratio of konjac gel (1.5%) to pectin gel (6%) at 1:2 (v/v) gave the highest gel strength. In encapsulation steps using emulsion method, the highest encapsulation yield was obtained when the ratio of konjac-pectin gel mixture to sunflower oil at 20 g : 100 mL was used, compared with the ratios at 25 g : 100 mL and 30 g : 100 mL, respectively. The mixing time was also varied at 30, 60, 90 and 120 seconds at 11,000 rpm, and it was found that the highest encapsulation yield of 97.08% was obtained at 90s with an average gel bead size of 4.97 μm. The effect of encapsulation on probiotic survival in drinking yoghurt was also studied. The results showed that the survival rates of encapsulated *Lb. acidophilus* La5 and *B. lactis* BB12 during storage of drinking yoghurt at refrigerated temperature ($5 \pm 2^{O}C$), tended to be higher than those of free cells. After pasteurization (at $72^{O}C$ 15s), the survival rates of encapsulated *Lb. acidophilus* La5 and *B. lactis* BB12 in pasteurized drinking yoghurt were 84.31% and 59.03%, respectively. However, the survival rates of free cells of *Lb. acidophilus* La5 and *B. lactis* BB12 were 68.49% and less than 11.66%, respectively. The results of sensory evaluation showed that there was no significant difference in texture, at 95% confidence level, between the drinking yoghurt containing encapsulated probiotic cells and the free cells.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด ที่กรุณาให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น แนวทางการแก้ไขปัญหาตลอดจนให้กำลังใจและความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งกรุณาสละเวลาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้าอย่างยิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคุณครูและคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการศึกษาจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณบริษัท FMC Chemical Biopolymer (Thailand) จำกัด ที่ให้ความกรุณาและอนุเคราะห์ผงบุกเพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณรุจิพร ประทีปเสน ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกและช่วยให้การศึกษาโครงสร้างลักษณะภายนอกของเม็ดเจลเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ พ่อและแม่และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ ปริญญาเอก เพื่อนๆ และน้องนักศึกษาระดับปริญญาตรีและปริญญาโททุกท่านที่สละเวลามาประเมินคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตพร้อมดื่ม และคอยให้กำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานตลอดจนเจ้าหน้าที่ธุรการในงานเอกสารต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบความดีทั้งหมดแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สวรรยา เม้งเกร็ด

16 พฤษภาคม 2550

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 วัตถุประสงค์.....2

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 จุลินทรีย์โพรไบโอติก.....3

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lb. acidophilus*.....3

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Bifidobacteria.....4

2.1.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก.....6

2.1.4 ความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติก.....9

2.2 เทคนิคการเคลือบเซลล์.....12

2.2.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่น.....12

2.2.2 เทคนิคอิมัลชั่น.....14

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการเคลือบเซลล์.....17

2.3.1 บุก.....17

2.3.2 เพคติน.....24

2.4 โยเกิร์ตพร้อมดื่ม.....27

2.4.1 กระบวนการผลิตโยเกิร์ตพร้อมดื่ม.....28

2.4.2 บทบาทของจุลินทรีย์โยเกิร์ตในผลิตภัณฑ์นมหมัก.....30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....32

3.1 วัสดุอุปกรณ์.....32

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย.....33

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....39

4.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนของบุกและเพคตินต่อความแข็งแรงของเจลผสม.....39

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลผสม.....41
ระหว่างบุกและเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น

4.3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบ.....44
เซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

4.4 ศึกษาการคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่.....58
เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....61

5.1 สรุปผลการทดลอง.....61

5.2 ข้อเสนอแนะ.....62

เอกสารอ้างอิง.....63

ภาคผนวก.....72

ก การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี.....73

ข การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา.....76

ค การคำนวณสูตรโยเกิร์ตและน้ำเชื่อม.....82

ง แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส.....86

จ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนมเปรี้ยว.....88

ฉ ขั้นตอนการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....95

ประวัติผู้เขียน.....97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	จุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นโพรไบโอติก	4
2.2	ตัวอย่างของวัตถุดิบที่ใช้ในการเคลือบ Bifidobacteria	16
2.3	ข้อกำหนดของการใช้แป้งบุก (konjac flour/Konjac gum) ในอาหาร	23
4.1	ค่าความแข็งแรงของเจลบุกกับเพคติน (gel strength) ที่ระดับความเข้มข้นของบุก 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และแปรอัตราส่วนต่างๆ	39
4.2	ผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% Encapsulation yield) และขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยวิธีอิมัลชั่น เมื่อใช้สัดส่วนของสารละลายเจลผสมเท่ากับ 20 25 และ 30 กรัม ต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร	41
4.3	ผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% Encapsulation yield) และขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยวิธีอิมัลชั่น เมื่อใช้ระยะเวลากวนผสม (mixing time) 30 60 90 และ 120 วินาทีตามลำดับ	44
4.4	จำนวนเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	45
4.5	จำนวนเซลล์ *B.lactis* BB12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	46
4.6	จำนวนเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	53
4.7	จำนวนเซลล์ *B.lactis* BB12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน	54
4.8	คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.9	คะแนนความแตกต่างทางด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม.....	60
	ที่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและ	
	ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน	

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1 (ก)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lb. acidophilus*	5
2.1 (ข)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Bifidobacteria	5
2.2	ขั้นตอนการเคลือบเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่น	13
2.3	ขั้นตอนการเคลือบเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น	14
2.4	ลักษณะโครงสร้างของกลูโคแมนแนน	18
2.5	โครงสร้างของเพคตินที่ประกอบด้วยกรดกาแลกทูโรนิก และ methoxy galacturonic	25
3.1	ขั้นตอนการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม	37
4.1	ลักษณะของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น ซึ่งใช้สัดส่วนของสารละลายเจลผสม 20 กรัม ต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า)	42
4.2	ลักษณะโครงสร้างภายนอกของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น (ภาพจากกล้อง Cryo-SEM ที่กำลังขยาย 7,500 เท่า)	43
4.3	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	47
4.4	การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	48
4.5	การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	49
4.6	การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.7	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 และผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	55
4.8	การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 และผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน	56
4.9	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 และผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน	57
4.10	การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 และผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน	58
ค.1	แผนภาพขั้นตอนการเตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่ม	85
ฉ.1	แผนภาพขั้นตอนการส่องกล้อง Cryo-SEM	96

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

โยเกิร์ต (Yoghurt) หรือ นมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย โยเกิร์ตมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีแบคทีเรียแลคติกที่มีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารและลำไส้ของมนุษย์รวมถึงจุลินทรีย์โพรไบโอติกซึ่งสามารถยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่ และเจริญเติบโตสร้างผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้บริโภค ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นกล้าเชื้อร่วมกับจุลินทรีย์โยเกิร์ตในการหมักหรือมีการเติมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตภายหลังจากกระบวนการหมัก ในหลายประเทศได้มีข้อกำหนดให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตควรมีแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตมากกว่า 10^6 ถึง 10^8 CFU/mL ตลอดอายุการเก็บรักษาจึงจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้บริโภค (Birollo *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่วางจำหน่ายตามร้านค้าทั่วไปมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตต่ำกว่ามาตรฐาน (Dave and Shah, 1996) ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช และออกซิเจน เป็นต้น (Martin and Chou, 1992; Klaver *et al.*, 1993; Samona and Robinson, 1994; Dave and Shah, 1996) รวมถึงค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (post acidification) อันเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการเคลือบเซลล์ (encapsulation) โพรไบโอติกด้วยสารชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในธรรมชาติ เพื่อช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะที่ไม่เหมาะสม เทคนิคการเคลือบเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่เป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยให้เซลล์สามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษาอาหารรวมถึงในระหว่างการเคลื่อนผ่านระบบทางเดินอาหารและลำไส้ได้ ในงานวิจัยนี้มีความสนใจในการนำบุกและเพคตินมาใช้เป็นวัตถุดิบในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติก เนื่องจากเจลบุกมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเจลของโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ กล่าวคือ เจลบุกมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงซึ่งอาจส่งผลในการปกป้องเซลล์จากการพาสเจอไรซ์และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ทั้งบุกและเพคตินจัดเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additives) ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์นมได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างบุกและเพคตินต่อความแข็งแรงของเจลผสม

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลบุกร่วมกับเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น

3. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกหลังการพาสเจอไรซ์และในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

4. เพื่อศึกษาผลของการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติกมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก มีความหมายว่า เพื่อชีวิต ซึ่งคำว่า "โพร" หมายถึง การเตรียม ส่วน "ไบโอติก" หมายถึง ชีวิต Lilly และ Stillwel (1965) เป็นผู้ริเริ่มให้ใช้คำว่า "โพรไบโอติก" หมายถึงปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ และได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นสารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ในเวลาต่อมา Parker (1974) ได้ใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นกับสัตว์ พบว่ามีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้มีคุณสมบัติคล้ายยาปฏิชีวนะแต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด ต่อมา Fuller (1989) ได้ให้ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติกว่าเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตใช้เสริมลงในอาหารสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ เมื่อบริโภคแล้วสามารถเข้าไปยึดเกาะบริเวณผิวหน้าของผนังทางเดินอาหาร สามารถเจริญเติบโตและเอื้อประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้ เช่น ปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและให้สารบางอย่างเป็นการทดแทนหรือเป็นการแก่งแย่งกับจุลินทรีย์แปลกปลอมที่เข้ามาสู่ระบบทางเดินอาหาร อาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตในปริมาณที่เพียงพอ (ไม่น้อยกว่า 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ต่อการทำหน้าที่ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร เรียกว่า อาหารโพรไบโอติก (probiotic food) (Fuller, 1992)

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกมีหลายชนิด ได้แก่ Bifidobacteria เช่น *Bifidobacterium lactis, B. bifidum, B. longum* Lactobacilli เช่น *Lactobacillus acidophilus, Lb. johnsonii, Lb. rhamnosus, Lb. casei* อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ที่จัดเป็นโพรไบโอติก เช่น Enterococcus Streptococcus Propionibacterium และยีสต์ *Saccharomyces boulardii* ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งโพรไบโอติกที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ Bifidobacteria และ Lactobacilli เป็นต้น

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lb. acidophilus*

Lb. acidophilus เป็นแบคทีเรียในไฟลัม *Firmicutes* แฟมิลี่ *Lactobacilliaceae* จีนัส *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อนกลมรูปทรงกระบอก (rod) หรือมีลักษณะเป็นแท่งปลายมน ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (ก) เซลล์อาจเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่หรือเป็น

สายสั้นๆ ไม่มีเอนไซม์คะตาเลส ไม่สร้างสปอร์ มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลแลคโตส มีการหมักน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) แบบ Homofermentative แยกได้จากลำไส้ของคนและสัตว์ ปาก และช่องคลอดของคน ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นออกเหลือง บางครั้งเกาะกันเป็นกลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร อุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส และ 4.5-4.6 ตามลำดับ (Dale, 2001; Prescott *et al.*, 2002)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นโพรไบโอติก

***Lactobacillus* sp.**	***Bifidobacterium* sp.**	**Other LAB**	**Non-lactics**
Lb. acidophilus	*B. adolescentis*	*Ent. faecalis*[a]	*Bacillus cereus*[a,d]
Lb. casei	*B. animalis*	*Ent. faecium*	*Escherichia coli*[d]
Lb. cripatus	*B. bifidum*	*Lc. lactis*[c]	*Propionibacterium freudenreichii*[a,d]
Lb. gallinarum[a]	*B. breve*	*Leuc. mesenteroides*[c]	*Saccharomyces cerevisiae (boulardii)*[d]
Lb. gasseri	*B. infantis*	*Ped. acidilactici*[c]	
Lb. johnsonii	*B. lactis*[b]	*Sporolactobacillus inulinus*[a]	
Lb. paracasei	*B. longum*	*Strep. thermophilus*	
Lb. plantarum			
Lb. reuteri			
Lb. rhamnosus			

[a]Mainly used for animals

[b]Probably synonymous with *B. animalis*

[c]Little known about probiotic properties

[d]Mainly as pharmaceutical preparations

ที่มา : Holzapfel *et al.* (1998)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Bifidobacteria

Bifidobacteria จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน การย้อมติดสีแกรมไม่สม่ำเสมอ รูปร่างแตกต่างกัน บางเซลล์โค้ง บางเซลล์เป็นกระบอง (clubbed) การเรียงตัวมักเรียงตัวเป็นสาย บางครั้งอาจเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือบางครั้งเรียงตัวเป็นรูปตัววี ดังแสดงในภาพที่ 2.1 (ข) บางครั้งเซลล์บวมอาจมองเห็นเป็นรูปกลมได้ รูปร่างของ Bifidobacteria เปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ และ

พบว่าปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น อะลานีน (alanin), กรดกลูตามิค (glutamic acid) และแคลเซียมไอออนยังมีผลต่อรูปร่างเซลล์ของ Bifidobacteria คือ ถ้ามีในปริมาณน้อย Bifidobacteria จะมีรูปร่างเป็นกิ่งมาก (Ballongue, 1993) รูปร่างที่เฉพาะตัวของเชื้อแบคทีเรียนี้จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการยึดเกาะพื้นผิวของผนังลำไส้ของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ได้ (Scardovi, 1986) Bifidobacteria เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) บางชนิดสามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตเอนไซม์คะตาเลส (ผลิตเอนไซม์ได้บ้างแต่น้อยขณะเจริญในอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์) ไม่สร้างแคปซูล ไม่เคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต คือ 37-41 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 6.5-7.0 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่พีเอชต่ำกว่า 4.5-5.0 และสูงกว่า 8.0-8.5 ไม่มีสมบัติเป็น acid-fast ไม่รีดิวซ์ไนเตรต อย่างไรก็ตามถ้าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีเม็ดเลือดแดงผสมอยู่อาจรีดิวซ์ไนเตรตได้ (Scardovi, 1986) Bifidobacteria สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสได้ในวิถีฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-phosphate) โดยใช้เอนไซม์ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโตเลส (fructose-6-phosphate phosphoketolase), อัลโดเลส (aldolase) และ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะได้ผลิตผลเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติกในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 (Ballongue, 1993)

(ก) (ข)

ภาพที่ 2.1 (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lb. acidophilus* ,
(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Bifidobacteria

ที่มา : www.theralac.com/Images/acidophilus.gif
www.csa.com/.../probiotic/images/bifido.jpg

2.1.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายเนื่องจากช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้และส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค Salminen และ Playne (2001) พบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ รังสีบำบัด หรือเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็งเป็นการชักนำจุลินทรีย์ประจำถิ่นให้ทำงานผิดปกติเกิดความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยอย่างฉับพลัน เช่น ท้องร่วง คลื่นไส้ และอาเจียน มีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ และจำแนกประโยชน์ของโพรไบโอติกดังนี้

1. การต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ

โพรไบโอติกมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น (bacteriocin) โดยผลิตกรดแลคติก และกรดอะซิติกได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดทั้งหมด กรดอินทรีย์อื่นที่ผลิตได้ เช่น กรดซิตริก กรดฮิพพูริก (hippuric acid) กรดออโรติก (orotic acid) และกรดยูริก (uric acid) เป็นต้น (Lankaputhra and Shah, 1998) สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial substances) ที่ผลิตโดยโพรไบโอติกมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Salmonella* typhimurium และ *Escherichia coli* เป็นต้น

Lankaputhra และ Shah (1998) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ พบว่าสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ร่วมกันสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียว

Shah (1999) ศึกษาพบว่า Bifidobacteria *L. acidophilus* และ *L. casei* เป็นโพรไบโอติกที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติก L (+) isomer ซึ่งเป็นกรดแลคติกชนิดที่ร่างกายสามารถเผาผลาญและเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก (piruvic acid) และสามารถผลิตสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้

2. การต่อต้านการกลายพันธุ์

กลไกในการยับยั้งการกลายพันธุ์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีการคาดเดาว่าสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens) ถูกยับยั้งไว้โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Orrhage *et al.*, 1994) และจากการศึกษาของ Lankaputhra และ Shah (1998) พบว่ากรดอะซิติกมีความสามารถในการต้านการกลายพันธุ์ได้สูงกว่ากรดแลคติกและกรดไพรูวิก และจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถต้านการกลาย

พันธุ์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถเผาผลาญหรือจับกับสารก่อการกลายพันธุ์ได้ดี

3. การยับยั้งสารก่อมะเร็ง

Goldin และ Gorbach (1984) อธิบายกลไกในการต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor) ของ *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria ว่า การบริโภค *Lb. acidophilus* ช่วยลดปริมาณเอนไซม์จากแบคทีเรีย เช่น เบต้า-กลูคิวโรนิเดส (β-glucuronidase) เอโซรีดักเตส (azoreductase) และ ไนโตรรีดักเตส (nitroreductase) ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนสารตั้งต้นก่อมะเร็ง (procarcinogen) ให้เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) นอกจากนี้ *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria มีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

Shah (2001) รายงานว่า *B. longum* และ *B. infantis* เป็นโพรไบโอติกที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์จากแบคทีเรียอื่น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์นั้นอาศัยอยู่ และทำให้ค่าพีเอชลดลง ซึ่งช่วยยับยั้งการก่อมะเร็ง

Morohashi (2002) รายงานว่า Bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่สามารถย่อยสลายโอลิโกฟรุกโตสที่จัดเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์เกิดเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) ที่สำคัญ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโปรปิโอนิก และกรดบิวทิริก ซึ่งกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ค่าพีเอชลดลงมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้บิวทิเรต (butyrate) ที่เกิดขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งคุณสมบัติทั้ง 3 นี้อาจมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งได้ กรดอะซิติกและกรดโปรปิโอนิกช่วยขยายหลอดเลือดทำให้เลือดหมุนเวียนจากลำไส้ใหญ่ไปสู่ตับได้สะดวกขึ้นจึงช่วยลำเลียงกรดไขมันสายสั้นไปสู่ตับอย่างรวดเร็ว ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้กลายเป็นพลังงานเสริมของเซลล์ตับ กรดไขมันสายสั้นเมื่ออยู่ในตับจะทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ซึ่งโดยปกติตับจะสังเคราะห์คอเลสเตอรอลถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอยู่ในร่างกาย ดังนั้นฤทธิ์ดังกล่าวของกรดไขมันสายสั้นจึงช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลด้วยการยับยั้งที่ตับ สำหรับกรดโปรปิโอนิกยังมีฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ใหญ่ จึงทำให้ถ่ายสะดวก ท้องไม่ผูก กรดอะซิติก ช่วยส่งเสริมการดูดซึมเกลือแร่สำคัญๆ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียมและธาตุเหล็ก เป็นผลให้กระดูกแข็งแรง ป้องกันกระดูกพรุน และธาตุเหล็กช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดง

4. การเพิ่มความสามารถในการย่อยแลคโตส

แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในนม แลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) ประกอบด้วยกลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) และถูกย่อยเป็น

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-D-galactosidase) การขาดความสามารถในการย่อยแลคโตส (lactose maladsorption หรือ lactose intolerance) เกิดขึ้นเนื่องจากมีเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสไม่เพียงพอ ทำให้เกิดอาการเกี่ยวกับกระเพาะอาหาร เช่น เสียดท้อง ท้องร่วง หรือแก๊สในกระเพาะอาหาร หลังจากการบริโภคนมสดหรือผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ (Onwnlata *et al.*, 1989) *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) และ *Streptococcus thermophilus* ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตมีเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสในปริมาณมากสามารถย่อยแลคโตสได้อย่างมีประสิทธิภาพ การบริโภคโยเกิร์ตจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการบริโภคผลิตภัณฑ์นมของผู้ที่ขาดความสามารถในการย่อยแลคโตส เพราะไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ และการบริโภคโยเกิร์ตซึ่งเป็นอาหารที่มีลักษณะหนืดช่วยชะลอการเกิดกรดในกระเพาะอาหารได้ (Shah, 2001)

กลไกในการย่อยแลคโตสของจุลินทรีย์โยเกิร์ตและโพรไบโอติกยังไม่แน่ชัด แต่คาดว่าน่าจะมีบทบาทในการย่อยแลคโตสดังนี้ ข้อหนึ่งคือแลคโตสบางส่วนถูกไฮโดรไลซ์ด้วยจุลินทรีย์โยเกิร์ตระหว่างการบ่ม ข้อสองคือเอนไซม์จากแบคทีเรียย่อยแลคโตสภายในเซลล์ก่อนถึงส่วนของลำไส้เล็ก และข้อสุดท้ายคือแลคโตสถูกย่อยตั้งแต่ในปากจนถึงลำไส้ใหญ่ตอนต้น (Shah, 2001)

5. การลดคอเลสเตอรอลในเลือด

Mann และ Spoerry (1974) ได้ศึกษาพบว่าหนูทดลองที่มีการบริโภคนมหมักซึ่งใช้แลคโตบาซิลลัสเป็นกล้าเชื้อมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง เนื่องจากความสามารถในการผลิตไฮดรอกซิเมทิล กลูตาริล โคเอ-รีดักเตส (hydroxymethyl-glutaryl-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากตับที่มีความจำเป็นในการสร้างคอเลสเตอรอลมีปริมาณลดลง นอกจากนี้มีรายงานว่ากรดออโรติก กรดยูริก และกรดไฮรอกซิเมทิลกลูตามิก (hydroxymethyl glutamic acid) ที่ได้จากการหมักนมด้วย *S. thermophilus* มีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของหนูทดลอง (white wister male rats) โดยพบว่ากลุ่มตัวอย่างหนูทดลองที่บริโภคนมเทอร์โมฟีลัสมีระดับคอเลสเตอรอลในตับลดลง เช่นกัน (Rao *et al.*, 1981; Jasper *et al.*, 1984) เช่นเดียวกับ Homma (1988) ศึกษาพบว่าการบริโภคนมหมักที่มีโพรไบโอติกชนิด Bifidobacteria สามารถลดคอเลสเตอรอลได้เช่นกัน

Klaver และ Meer (1993) อธิบายการทำงานของ *Lb. acidophilus* ต่อการลดคอเลสเตอรอลว่า *Lb. acidophilus* ไม่ได้ยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอลแต่มีผลทำให้คอเลสเตอรอล ไม่จับตัวกับน้ำดีจึงไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้เป็นผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง

6. การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

Lb. acidophilus และ Bifidobacteria มีส่วนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด มีข้อสันนิษฐานว่าการส่งผ่านแบคทีเรียที่เข้ามาในร่างกายโดย M-cells ไปสู่ Payer's patches ของกระเพาะอาหารที่ยึดอยู่กับเนื้อเยื่อลิมฟอยด์ (lymphoid) ในลำไส้เล็ก (gut-associated lymphoid tissue) อาจเป็นกลไกในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และมีการรายงานว่าการบริโภคโพรไบโอติกในโยเกิร์ตกระตุ้นการผลิตไซโตคีน (cytokine) ในเซลล์เม็ดเลือดและเสริมการทำงานของมาโครฟาจ (macrophages) (Shah, 2001)

Schiffrin และคณะ (1995) ศึกษาการบริโภคโพรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าการบริโภค *Lb. acidophilus* (LA-1) และ *B. bifidum* (BB-12) วันละ 10^7 CFU/mL เป็นเวลาติดต่อกัน 3 สัปดาห์ ทำให้มีกิจกรรมการทำลายเซลล์แบคทีเรียของเม็ดเลือดขาว (phagocyte activity) สูงขึ้นเท่าตัว

2.1.4 ความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติก

ปัจจุบันโพรไบโอติกเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในบทบาทของสารเสริมสุขภาพ (Functional Ingredient) ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพในหลายประเทศ (Stanton *et al.*, 2001) ทั้งผลิตภัณฑ์นมหมัก (Baron *et al.*, 2000; Gilliland *et al.*, 2002) เนยแข็ง (Boylston *et al.*, 2004) และผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกในกลุ่มอาหารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นม (non-dairy foods) และกลุ่มที่ไม่ใช่อาหารหมัก (non-fermented foods) เช่น น้ำผลไม้ ช็อคโกแลต ซีเรียล ไอศกรีม มายองเนส (Kailasapathy and Chin, 2000; Godward and Kailasapathy, 2003) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเสถียรภาพ (stability) ในแง่ของอัตราการรอดชีวิตและคุณสมบัติทางหน้าที่ (Functionality) ของโพรไบโอติกสู่เป้าหมายหลักคือลำไส้ใหญ่นั้นยังเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคไม่ได้รับประโยชน์จากการบริโภคอาหารโพรไบโอติกอย่างแท้จริง และไม่สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ของโพรไบโอติกเพื่อการบำบัดรักษาและส่งเสริมสุขภาพตามที่ได้อ้างอิงไว้ (Fulfilling health claims) (ศศิวิมล, 2549) ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในท้องตลาดส่วนใหญ่มีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตต่ำกว่ามาตรฐาน (Shah *et al.*, 1995; Kailasapathy and Rybka, 1997) ขณะที่มาตรฐานสากลได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกต้องมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 10^7 เซลล์ต่อกรัม ณ จุดขาย (Ouwehand and Salminen, 1998) การลดลงของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื่องจากอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ เหล่านี้

1. ค่าพีเอช

Medina และ Jordano (1994) ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โยเกิร์ตและ Bifidobacteria ในผลิตภัณฑ์นมหมักระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 วัน ค่าพีเอชลดลงจาก 4.57 เป็น 3.81 และ *S. thermophilus* มีจำนวนเซลล์ลดลงเพียง 10.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *Lb. bulgaricus* และ Bifidobacteria ซึ่งลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ลดลงถึง 85.4 และ 92.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. สภาวะความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์นมหมักและระบบทางเดินอาหาร

Ravula และ Shah (1998) พบว่าค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (post acidification) อันเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์โยเกิร์ตที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนลดลง 10^5–10^6 CFU/mL ภายใน 8–12 สัปดาห์

Lankaputhra และ Shah (1995) พบว่าการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria ลดลงในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีสภาพเป็นกรดและเกลือน้ำดี ทำให้มีจำนวนโพรไบโอติกเหลือไม่เพียงพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค

3. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในผลิตภัณฑ์

Bifidobacteria เป็นโพรไบโอติกชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ออกซิเจนมีสถานะเป็นก๊าซจึงสามารถเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิต และซึมผ่านภาชนะบรรจุได้ นอกจากนี้ยังมีออกซิเจนอีกส่วนหนึ่งกระจายอยู่ในนม ออกซิเจนเหล่านี้เป็นสาเหตุให้ Bifidobacteria เจริญได้ไม่ดี Ishibashi และ Shimamura (1993) แนะนำให้ใช้ *S. thermophilus* ร่วมกับ Bifidobacteria ในการผลิตโยเกิร์ตจะช่วยป้องกันการลดลงของ Bifidobacteria จากอิทธิพลของออกซิเจน เนื่องจาก *S. thermophilus* มีความสามารถในการใช้ออกซิเจนสูง จึงทำให้ปริมาณออกซิเจนที่กระจายอยู่ในโยเกิร์ตลดลง Bifidobacteria จึงมีความสามารถในการเจริญดีขึ้น

Dinaker และ Mistry (1994) ศึกษาการเติม *B. bifidum* ร่วมกับกล้าเชื้อในการผลิตเชดดาร์ชีส (cheddar cheese) พบว่าสภาวะที่มีออกซิเจนและความร้อนในกระบวนการผลิต รวมถึงกล้าเชื้อที่เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophillic) มีผลต่อการรอดชีวิตของ *B. bifidum* ซึ่งสอดคล้องกับ Stanton และคณะ (1998) กล่าวว่า Bifidobacteria ไม่สามารถเจริญในขั้นตอนการผลิตชีสได้เนื่องจากมีขั้นตอนการกวนทำให้เกิดอากาศในนม

4. ปริมาณน้ำตาล

Shah และ Ravula (2000) ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์โยเกิร์ตชนิด *L. bulgaricus* และ *S. thermophilus* และโพรไบโอติกชนิด *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria ในโยเกิร์ตที่ผลิตจากหางนมผงและเติมน้ำตาล (ซูโครส) ในระดับต่างกัน พบว่าเมื่อปริมาณซูโครสเพิ่มขึ้นค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (A_w) ของโยเกิร์ตลดลงและใช้เวลาในการหมักจนค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 มากขึ้น และพบการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโยเกิร์ตที่มีปริมาณซูโครส 12 และ 16 เปอร์เซ็นต์

5. สภาวะการแช่แข็งและการเก็บรักษา

Modler และคณะ (1990) พบว่าการเก็บรักษาไอศกรีมโยเกิร์ตในสภาวะแช่แข็ง (-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 70 วัน ทำให้ Bifidobacteria อยู่รอดได้ 90 เปอร์เซ็นต์

Hekmat และ McMahon (1992) ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ในไอศกรีมเหลวและไอศกรีมโยเกิร์ตเป็นเวลา 17 สัปดาห์ พบว่า *L. acidophilus* และ *B. bifidum* สามารถเจริญได้ดีในไอศกรีมเหลวและสามารถอยู่รอดได้ระหว่างการแช่แข็ง (-29 องศาเซลเซียส) โดย *Lb. acidophilus* ลดลงจาก 1.5×10^8 เป็น 4×10^6 CFU/mL. ส่วน *B. bifidum* ลดลงจาก 2.5×10^8 เป็น 1×10^7 CFU/mL. และพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต

Ravula และ Shah (1998) ศึกษาความสามารถในการเจริญของโพรไบโอติกในไอศกรีมโยเกิร์ต พบว่า *Lb. acidophilus* และ *B. bifidum* ถูกทำลายโดยกระบวนการแช่แข็งเพียงเล็กน้อย โดยการลดลงของ *Lb. acidophilus* ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ส่วน *B. bifidum* มีปริมาณลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ 5.6-5.8

Davidson และคณะ (2000) กล่าวว่ากระบวนการแช่แข็งมีผลทำให้โพรไบโอติกลดลงประมาณ 0.5-1 Log CFU/mL. การเก็บรักษาในสภาวะที่มีการขึ้นลงของอุณหภูมิเป็นเหตุให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกฉีกขาดจึงมีอัตราการอยู่รอดลดลง

6. ความร้อนในกระบวนการผลิต

โดยทั่วไปอุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ไม่มีผลเสียต่อโพรไบโอติก ซึ่งความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ Champagne และ Gardner (2005) พบว่า *Lb. acidophilus* ค่อนข้างไวต่อความร้อน และมีจำนวนเซลล์ลดลงประมาณ 4 Log CFU/mL. อย่างไรก็ตามการเติมโพรไบโอติกภายหลังจากการพาสเจอไรซ์ผลิตภัณฑ์แล้วบรรจุด้วยภาชนะปลอดเชื้อ เช่น มายองเนส (Khalil and Mansour, 1998) หรือ

การใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชั่นกับเซลล์โพรไบโอติกจัดเป็นหนทางหนึ่งในการช่วยปกป้องเซลล์จากผลของความร้อนได้

7. จำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์

ปริมาณกล้าเชื้อโยเกิร์ตเป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่คงอยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย Gilliland และ Speck (1977) รายงานว่า การเติมแบคทีเรียแลคติก เช่น *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* เจริญในนมร่วมกับ *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria ช่วยสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเหล่านี้ได้ดีขึ้น

Anon (1994) พบว่าถ้ามีการใช้ *Lb. bulgaricus* และ *S. thermophilus* เป็นกล้าเชื้อในปริมาณที่สูงเกินไปทำให้ปริมาณ *Lb. acidophilus* และ *B. bifidum* ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายลดลง ส่วน Dave และ Shah (1997) พบว่าการเพิ่มปริมาณ Bifidobacteria เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตไม่มีผลต่อปริมาณการอยู่รอดของเชื้อในโยเกิร์ต นอกจากนี้กระบวนการผลิต ความเข้มข้นของกรดแลคติกและกรดอะซิติกและปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ (Dave and Shah, 1996) ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์อ่อนแอลง

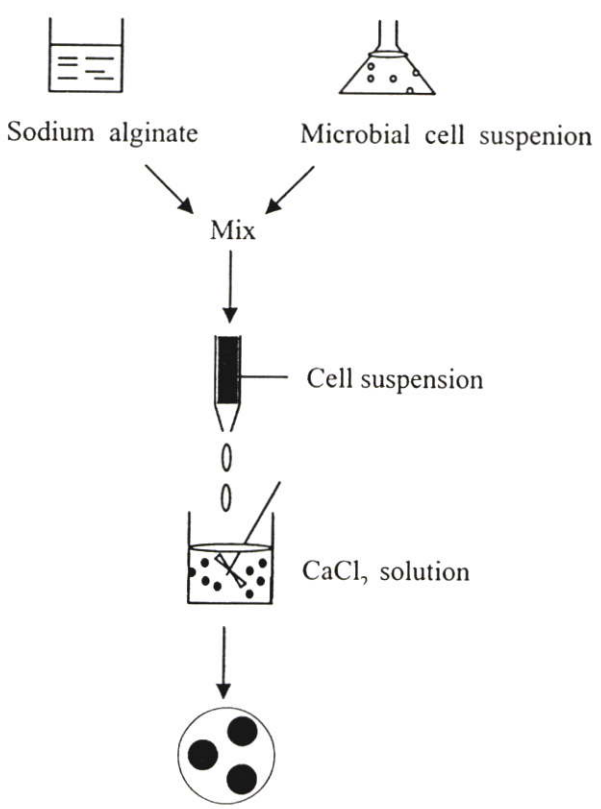
2.2 เทคนิคการเคลือบเซลล์ (Encapsulation)

การเคลือบเซลล์ คือ กระบวนการที่เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเยื่อหุ้ม (encapsulating membrane) เพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์หรือการสูญเสียของเซลล์จากสภาวะแวดล้อม วิธีเคลือบเซลล์ได้ถูกประยุกต์ใช้ในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก หรือการผลิตมวลเซลล์ (biomass production) สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นถึง 80-95 เปอร์เซ็นต์ (Krasaekoopt *et al.*, 2003) การเคลือบเซลล์จัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องตัวเซลล์ไว้ภายในเม็ดเจลไฮโดรคอลลอยด์ช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกภายในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร (Rao *et al.*, 1989) แบ่งประเภทตามวิธีการที่ใช้เคลือบเซลล์ได้เป็น 2 วิธี (Krasaekoopt *et al.*, 2003) ดังนี้

2.2.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่น (Extrusion)

เทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่นเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดและเป็นที่นิยม วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งอาศัยการฟอร์มเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เริ่มจากมีการเตรียมสารละลายไฮโดรคอลลอยด์และเติมจุลินทรีย์ลงไปดังแสดงในภาพที่ 2.2 จากนั้นขับเซลล์ให้ไหลออกจากรูของเข็มฉีดยาในรูปของหยดสารละลายและทำให้แข็งตัวหรือขึ้นรูปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขนาด

และรูปร่างของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม และระยะห่างของหยดแต่ละหยด วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากง่าย สะดวก ราคาถูก และไม่มีสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น ความร้อนหรือแรงเฉือน วัตถุดิบที่นิยมใช้เคลือบเซลล์โพรไบโอติก ได้แก่ อัลจีเนต การฟอร์มเจลทำได้โดยเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมอัลจีเนตจะถูกหยดลงในสารละลายที่มีประจุบวกมาก (multication) โดยทั่วไปใช้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในรูปของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ หยดของของผสมจะฟอร์มเป็นเม็ดเจลในทันที การดักจับเซลล์ของอัลจีเนตจะอยู่ในรูปโครงสร้างที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติที่มีการเชื่อมของพันธะไอออนิกระหว่างแคลเซียมไอออนกับโพลีเมอร์ การเคลือบเซลล์จะให้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับตัวที่ใช้ในการดักจับ (entrapped material) โดยมีราคาถูก ใช้งานง่าย และเข้ากันได้ (biocompatibility) กับสิ่งมีชีวิต (ศศิวิมล, 2549) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการฟอร์มเป็นเม็ดเจลโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชั่นค่อนข้างใช้เวลานาน ทำให้การขยายขนาดการผลิตทำได้ค่อนข้างยากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอิมัลชั่น (Krasaekoopt *et al.*, 2003)

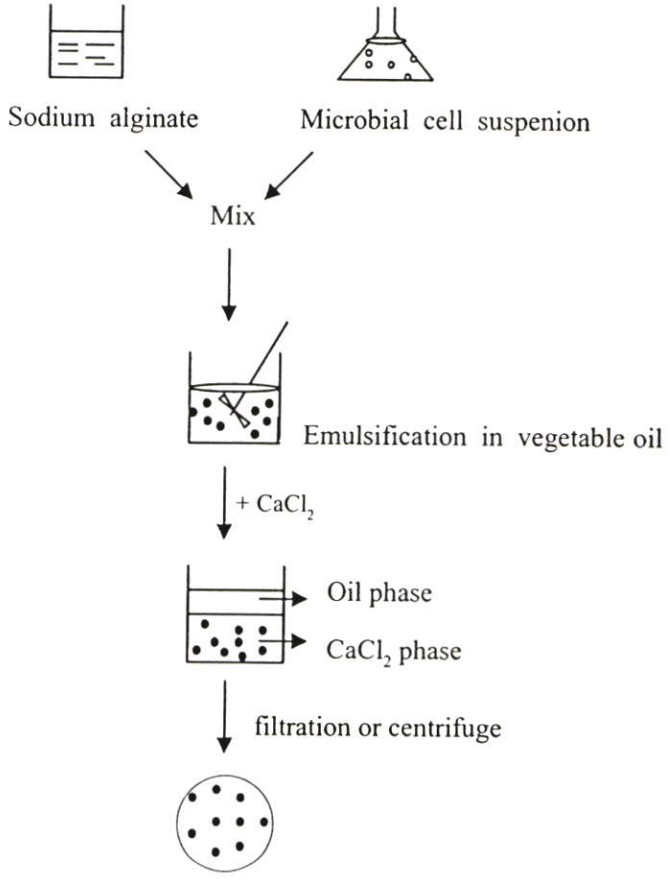


ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการเคลือบเซลล์ด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชั่น

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

2.2.2 เทคนิคอิมัลชั่น (Emulsion)

เทคนิคนี้ของผสมระหว่างเซลล์กับโพลีเมอร์จะถูกเติมลงในน้ำมันพืช (continuous phase) เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันคาโนลา (canola oil) และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจนอยู่ในรูปของอิมัลชั่นชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion) ซึ่งประกอบด้วย 2 เฟส ได้แก่ เฟสน้ำ (internal phase) และ เฟสน้ำมัน (continuos phase) โดยที่เฟสน้ำจะมีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าเฟสน้ำมัน ซึ่งเฟสน้ำจะประกอบด้วยวัตถุดิบที่ใช้เคลือบเซลล์และเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในรูปของอนุภาคเม็ดเจลเล็กๆ ภายในเฟสน้ำมัน เม็ดเจลจะถูกเก็บเกี่ยวหลังจากการเติมแคลเซียมคลอไรด์ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ขนาดของเม็ดเจลจะถูกควบคุมโดยความเร็วในการกวน (agitation speed) และสามารถผันแปรได้ระหว่าง 25 ไมโครเมตร และ 2 มิลลิเมตร ซึ่งเล็กกว่าเม็ดเจลที่ได้จากวิธีเอ็กซ์ทรูชั่น เทคนิคนี้เหมาะกับการเคลือบเซลล์แบคทีเรียแลคติก (Krasaekoopt *et al.*, 2003) การเติมอิมัลซิไฟเออร์(emulsifier) สามารถช่วยในการเกิดอิมัลชั่นที่ดี



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการเคลือบเซลล์ด้วยเทคนิคอิมัลชั่น

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

เพราะอิมัลซิไฟเออร์ช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างเฟสเป็นผลทำให้ได้ทรงกลมที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ สารอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้กันมากที่สุด คือ Tween 80 Sheu และคณะ (1993) ได้ทดลองใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับโซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในการเคลือบเซลล์ได้ขนาดเม็ดเจลเท่ากับ 25-35 ไมโครเมตร

อย่างไรก็ตามวิธีอิมัลชั่นอาจก่อให้เกิดแรงเฉือนจากการกวนผสม วิธีการในการฟอร์มเจลบางชนิดที่ต้องใช้ความร้อน รวมถึงการใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งทำให้เซลล์บาดเจ็บและส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเคลือบเซลล์ลดลงได้ (Picot and Lacroix, 2004) ดังนั้นในการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชั่นจึงควรศึกษาสภาวะและวัตถุดิบที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกแต่ละชนิดเพื่อป้องกันการเกิดปัญหาดังกล่าว (ศศิวิมล, 2549)

วัตถุดิบที่ใช้เคลือบเซลล์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์จากสภาวะแวดล้อม วัตถุดิบที่ใช้เคลือบเซลล์โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นโพลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติ ได้แก่ อัลจีเนต คาร์ราจีแนน เจลแลนกัม กัมอาราบิค แซนแทนกัม เซลลูโลส และแป้งข้าวโพดดัดแปร นอกจากนี้ยังสามารถใช้ เจลาติน เวย์โปรตีน ไขมันนม และไคโตซานดังตารางที่ 2.2 โดยอาจใช้วัตถุดิบเหล่านี้เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกันได้

Myllarinen และคณะ (2000) ได้ทำการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกภายในเม็ดสตาร์ชมันฝรั่ง (Potato starch granules) ขนาด 50-100 ไมโครเมตร ซึ่งถูกย่อยให้เป็นรูพรุนด้วยเอนไซม์เพื่อบรรจุเซลล์โพรไบโอติกไว้ภายในจากนั้นจึงเคลือบด้วยอะไมโลสอีกครั้ง แล้วทำให้แห้งเป็นผง พบว่ามีจำนวนโพรไบโอติกที่รอดชีวิตไม่น้อยกว่า 10^9 เซลล์ต่อกรัม และสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 6 เดือนที่อุณหภูมิห้องโดยยังคงอัตราการรอดชีวิตและคุณสมบัติทางหน้าที่ไว้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสตาร์ชแคปซูลนี้สามารถต้านทานต่อการย่อยในลำไส้เล็กส่วนบนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ แต่ถูกย่อยอย่างช้าๆ โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ (Puupponen-Pimia *et al.*, 2002)

Sultana และคณะ (2000) ศึกษาการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria ด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพด (Hi-maize resistant starch) โดยวิธีอิมัลชั่นสามารถเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

Hansen และคณะ (2002) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *B. longum* ในผลิตภัณฑ์นมสูงขึ้นเมื่อถูกเคลือบด้วยอัลจีเนต

Hou และคณะ (2003) ทำการเคลือบเซลล์ *Lb. bulgaricus* ด้วยน้ำมันงา (artificial sesame oil) โดยใช้เทคนิคอิมัลชั่น เติมลงในผลิตภัณฑ์นมและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 วัน พบว่า *Lb. bulgaricus* ที่ถูกเคลือบไว้มีจำนวนเซลล์ลดลงจาก 2.2×10^8 เป็น 1.2×10^7 CFU/mL. ในขณะที่ *Lb. bulgaricus* ที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบมีจำนวนเซลล์ลดลงจาก 2.6×10^8 เป็น 6.0×10^4 CFU/mL. เมื่อนำไปทดสอบในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารที่มี

ค่าพีเอชเท่ากับ 2 และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตได้ประมาณ 10^4 CFU/mL.

Krasaekoopt และคณะ (2003) กล่าวว่าการเคลือบเซลล์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมักช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียคงที่และคงคุณภาพที่ดีไว้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารเคลือบ Bifidobacteria

สารเคลือบ	เทคนิคการเคลือบเซลล์	ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเจล	จุลินทรีย์	การประยุกต์ใช้
Carragenan	Gel beads/emulsion	5-100 μm	*B. longum*	Yoghurt
Carragenan/locust bean gum	Gel beads/emulsion	1-2 mm	*B. longum*	Starter culture
Alginate	Gel beads/extrusion	1-2.6 mm	*B. longum*	SGI
Alginate	Gel beads/extrusion	1-2.5 mm	*B. lactis*	SGI
Alginate	Gel beads/emulsion	20-70 μm	*B.* longum, B. *bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*	Milk
Alginate/starch	Gel beads/extrusion	2-2.5 mm	*B. lactis*	High oxygen tension
Alginate/starch	Gel beads/emulsion Gel	0.5-1 mm	*B. infantis*	Yoghurt
Alginate/starch	beads/emulsion Gel	0.5-1 mm	*B. infantis*	Ice cream
Gellan/xanthan gum	beads/extrusion	3 mm	*B. infantis*	Yoghurt
Modified waxy maize starch	Spray-dried powder	5 μm	*Bifidobacterium PL1*	-
Gelatin	Spray-dried powder	10-20 μm	*B. longum*	SGI
Cellulose acetate phthalate	Spray-dried powder	22 μm	*B. lactis*	SGI
Milk fat/whey proteins	Spray-dried powder	20-75 μm	*B. breve*	Yoghurt

SGI = simulated gastrointestinal condition

ที่มา : Doleyres and Lacroix (2005)

Lian และคณะ (2003) ศึกษาการเคลือบเซลล์จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *B. longum* B6 และ *B. infantis* CCRC14633 โดยใช้สารเคลือบหลากหลายชนิดเช่น เจลาติน สารละลายแป้ง (soluble starch) หางนม (skim milk) และกัมอาราบิค เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Bifidobacteria อิสระในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (ค่าพีเอชเท่ากับ 2 และ 3) และเกลือน้ำดี (ความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์) พบว่า *B. longum* B6 และ *B. infantis* CCRC14633 ที่ถูกเคลือบไว้มีการรอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารและเกลือน้ำดีได้ยาวนานกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเคลือบ

Chandramouli และคณะ (2004) ปรับปรุงเทคนิคการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* โดยสารโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ในการเคลือบคือ อัลจีเนต พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอัลจีเนตมีผลช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์ *Lb. acidophilus* เมื่อนำ *Lb. acidophilus* ที่ผ่านการเคลือบไปศึกษาอัตราการรอดชีวิตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *Lb. acidophilus* ที่ผ่านการเคลือบมีจำนวนลดลง 2 Log CFU/mL. และเซลล์อิสระมีจำนวนลดลง 4 Log CFU/mL. สามารถเพิ่มการรอดชีวิตได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

Picot และ Lacroix (2004) ศึกษาการรอดชีวิตของ *B. breve* ที่ถูกเคลือบด้วยเวย์โปรตีน (whey-protein) เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการรอดชีวิตของ *B. breve* ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษาโยเกิร์ตเพิ่มขึ้น แสดงว่าการเคลือบเซลล์ทำให้อัตราการรอดชีวิตของ *B. breve* ในผลิตภัณฑ์สูงขึ้น

Kailasapathy (2006) เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* และ *B. lactis* BB12 ที่เป็นเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้ง เมื่อใช้โพรไบโอติกเป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตโยเกิร์ตร่วมกับจุลินทรีย์โยเกิร์ต เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าเซลล์อิสระของ *Lb. acidophilus* และ *B. lactis* BB12 มีจำนวนเซลล์ลดลง 4 และ 3 Log CFU/mL. ตามลำดับ แต่เซลล์ที่ผ่านการเคลือบมีจำนวนเซลล์ลดลงเพียง 2 และ 1 Log CFU/mL. ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเคลือบเซลล์มีผลช่วยปกป้องเซลล์จากสภาวะความเป็นกรดในผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (Hussein and Kebary, 1999; Krasaekoopt *et al.*, 2003)

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการเคลือบเซลล์

2.3.1 บุก (Konjac glucomannan, KGM)

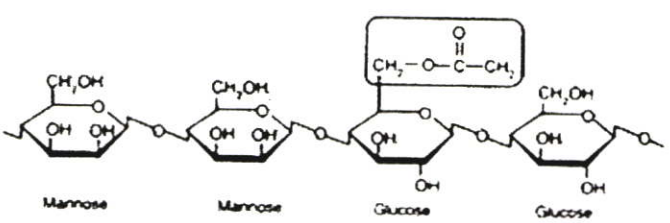
บุกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amorphophallus konjac* เป็นพืชหัวพื้นเมืองของหลายประเทศในแถบทวีปเอเชีย มีต้นกำเนิดมาจากประเทศญี่ปุ่นและจีน เป็นไม้เนื้ออ่อนมีหัวอยู่ใต้ดิน มีทั้งหมดประมาณ 90 ชนิด แต่เท่าที่พบในประเทศไทยมีไม่ต่ำกว่า 15 ชนิด (กัลยาณี, 2546) บุกถูกนำมาใช้เป็นอาหารมากกว่า 1,000 ปีแล้วในประเทศญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์บุกที่บริโภคผลิตโดยตรงจาก

74566

ผงบุก ซึ่งนิยมนำผงบุกมาผลิตเป็นเส้น (vermicilli) หรือเป็นก้อน เป็นที่รู้จักกันดีในนามของคอนนิยากุ (Konnyaku) ประเทศไทยมีการปลูกบุกพันธุ์เนื้อทรายที่สามารถนำมาผลิตเป็นผงบุกที่มีคุณสมบัติของสารกลูโคแมนแนนเช่นเดียวกับบุกของญี่ปุ่น (บุปผา, 2535) อย่างไรก็ตามบุกของไทยได้รับการพัฒนาน้อยมาก เนื่องจากเป็นพืชป่าท้องถิ่น ดังนั้นจึงควรมีการส่งเสริมการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากบุกให้มากขึ้น (กัลยาณี, 2546)

2.3.1.1 องค์ประกอบของผงบุก

องค์ประกอบหลักที่พบในผงบุก คือ กลูโคแมนแนน (glucomannan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ กลูโคแมนแนนเป็นแหล่งของเส้นใยอาหารที่สามารถละลายน้ำได้และเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ (soluble dietary fiber) กลูโคแมนแนนมีลักษณะเป็นสายโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีมวลโมเลกุลสูงมากกว่า 300,000 ดาลตัน ประกอบด้วย แมนโนส (mannose) และกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก ในอัตราส่วนโมลแมนโนสต่อกลูโคส คือ 3:2 โมเลกุลเส้นตรงของกลูโคแมนแนนนี้มีหมู่อะซิทิล (acetyl groups) กระจายอยู่อย่างไม่มีแบบแผน โดยจะพบอะซิทิล 1 หมู่ต่อน้ำตาลกลูโคสหรือแมนโนส 19 หน่วย (Tye, 1991 ; Thomas, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างของกลูโคแมนแนน

ที่มา : www.glucomannan.com/index.htm

2.3.1.2 สมบัติของผงบุก (อดิศักดิ์, 2538; Tye, 1991)

จากการที่ผงบุกประกอบด้วย แมนโนส และ กลูโคส ต่อกันเป็นสายยาว จึงทำให้ผงบุกมีคุณสมบัติต่างจากแป้งในธัญพืชหรือพืชหัวอื่นๆ เนื่องจากแป้งจากธัญพืชและพืชหัวอื่นๆ ประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพกติน (amylopectin) ที่โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แต่กลูโคแมนแนนเป็นโครงสร้างต่อเนื่องของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแมนโนส จึงทำให้มีคุณสมบัติพิเศษต่าง ๆ กันดังนี้ (Tye, 1991)

1) ความข้นหนืด (Water thickening)

เมื่อนำผงบุกมาละลายน้ำอนุภาคของผงบุกจะดูดซับน้ำเอาไว้ แล้วเกิดการพองตัวได้ 20-30 เท่า ทำให้ได้สารละลายที่มีความหนืดเพิ่มขึ้น ลักษณะโซล (sol) ของผงบุกจะเป็นแบบซูโดพลาสติก (Pseudoplastic) อัตราการดูดซับน้ำ (hydration) จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลา โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลทำให้อัตราการดูดซับน้ำเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นการเพิ่มอัตราแรงเฉือนก็มีผลทำให้อัตราการดูดซับน้ำเพิ่มขึ้นด้วย

2) สมบัติในการเกิดเป็นซูโดพลาสติก

เนื่องจากกลูโคแมนแนนประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ที่เป็นสายยาวอยู่ภายในแกรนูล (granule) เมื่อแกรนูลดูดซึมน้ำเข้าไปจะบวมขึ้นจนกระทั่งผนังชั้นนอกแตกออก โมเลกุลที่อยู่ภายในแกรนูลจะหลุดออกมาและจับตัวกันกลายเป็นสารละลายซูโดพลาสติก(Pseudoplastic solution) ซึ่งเป็นลักษณะของสารละลายที่มีความหนืด ใส และโปร่งแสง

3) การเกิดฟิล์ม (Film formation)

เมื่อสารละลายบุกเกิดการสูญเสียน้ำหรือนำไปทำแห้งจะได้ฟิล์มที่มีลักษณะเหนียว (tough film) ซึ่งฟิล์มที่เกิดขึ้นนี้มีเสถียรภาพทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น หรือในสภาวะที่เป็นกรดและด่างได้ดี ฟิล์มจะมีความคงตัวสูงแม้จะนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลาหลายชั่วโมงก็ตาม ฟิล์มจากผงบุกจะมีลักษณะอ่อน (suppleness) และสามารถทำได้ทั้งฟิล์มในลักษณะโปร่งใสและทึบแสง การเพิ่มปริมาณของกลีเซอรีนมีผลทำให้ค่าความแข็งแรงของฟิล์ม (film strength) ลดลง แต่กลับมีผลทำให้ค่าลักษณะอ่อนของฟิล์มเพิ่มขึ้น การแพร่ผ่านของน้ำ (water permeability) ในฟิล์มชนิดนี้ขึ้นกับสารที่เติมลงไปว่าจะเป็นแบบ hydrophilic หรือ hydrophobic material โดยอัตราการแพร่ผ่านของน้ำในฟิล์มจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ hydrophilic substance เช่น กลีเซอรีน และจะมีอัตราการแพร่ผ่านของน้ำในฟิล์มลดลงเมื่อใช้ hydrophobic substance เช่น น้ำมันข้าวโพด (Tye, 1991)

4) ความหนืด (Viscosity)

ผงบุกได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับแป้งหรือใช้ร่วมกับกัมชนิดอื่นๆ และสารให้ความคงตัว (stabilizer) เพื่อเพิ่มความหนืดของผลิตภัณฑ์โดยไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางด้านกลิ่นรส ผงบุกยังส่งผลให้ความหนืดของแป้งหรือไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้ร่วมด้วยมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก และรักษาค่าความหนืดของระบบให้คงที่ทั้งในกระบวนการให้ความร้อนและการทำให้เย็น เช่น การใช้ผงบุกร่วมกับแป้งข้าวโพด (corn starch) เป็นต้น

5) การเกิดเจล (Gel formation)

การเกิดเจลของผงบุกเป็นเรื่องที่น่าสนใจมาก โดยทั่วไปแล้วเจลที่ได้จากโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ เมื่อนำมาให้ความร้อนจนถึงระดับอุณหภูมิหนึ่งๆ เจลจะแตกหรือเกิดการแยกตัวของโครงสร้างตาข่ายโพลิเมอร์ (polymer network) ทำให้สูญสียความเป็นเจลไป ในสภาวะที่มีด่างอ่อนๆ เช่น โพแตสเซียมคาร์บอเนต ผงบุกจะให้เจลที่ทนต่อความร้อน (thermal stability) มีความแข็งแรงมาก และยังมีความคงตัวสูงแม้นำไปต้มในน้ำเดือด การให้ความร้อนซ้ำแก่เจลมีส่วนทำให้เจลมีความแข็งแรงและเสถียรภาพเพิ่มขึ้น การเกิดเจลของผงบุกสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

(5.1) การใช้สารละลายด่างในการเกิดเจล

สารละลายด่างจะช่วยในการเกิดเจลของบุก เนื่องจากธรรมชาติของบุกจะไม่สามารถเกิดเจลได้เพียงแต่สามารถรวมตัวกับน้ำและเกิดการพองตัวได้เป็นสารละลายที่ข้นหนืดเท่านั้น (Tye, 1991) การที่บุกไม่สามารถเกิดเจลได้เนื่องจากหมู่อะซิทิลที่กระจายอยู่ทั่วไปบนสายของกลูโคแมนแนนซึ่งจะไปขัดขวางการรวมตัวกันของโมเลกุล ดังนั้นการเติมสารละลายด่างจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาดีอะซิทิลเลชั่น (deacetylation) โดยจะไปจับกับหมู่อะซิทิลของกลูโคแมนแนนและหลุดออกในระหว่างที่เกิดเจล ทำให้เกิดการฟอร์มตัวเป็นโครงสร้างตาข่ายสามมิติโดยพันธะไฮโดรเจน เจลที่ได้มีความยืดหยุ่นสูงและเป็นชนิดไม่ผันกลับด้วยความร้อน (thermal irreversible gel) สารละลายด่างที่นิยมใช้ ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแตสเซียมคาร์บอเนต และแคลเซียมคาร์บอเนต (Nozaki and Sakurai, 1992) แต่การใช้สารละลายด่างในการเกิดเจลทำให้เกิดปัญหาบางประการ เช่น เจลที่ได้มีค่าพีเอชสูง มีกลิ่นด่างตกค้าง เกิดการสูญเสียน้ำได้ง่าย

(5.2) การใช้ไฮโดรคอลลอยด์เพื่อช่วยในการเกิดเจล

(5.2.1) การเกิดเจลเมื่อใช้ร่วมกับแคปปา-คาร์ราจีแนน (K-carragenan)

แคปปา-คาร์ราจีแนนทำให้บุกเกิดเป็นเจลได้ (Shelso, 1990; Williams *et al.*, 1992) โดยเจลที่ได้จะมีความยืดหยุ่นสูง มีความแข็งแรงของเจลมากกว่าเดิมถึง 4 เท่า และผันกลับได้โดยความร้อน (thermal reversible gel) อัตราส่วนของปริมาณการใช้ผงบุกร่วมกับแคปปา-คาร์ราจีแนนมีผลทำให้ได้เจลที่มีความแข็งแรงแตกต่างกัน โดยอัตราส่วนระหว่างแคปปา-คาร์ราจีแนน และกลูโคแมนแนนที่ให้เจลที่มีความแข็งแรงสูงอยู่ในช่วง 70:30 ถึง 50:50 (Tye, 1991)

(5.2.2) การเกิดเจลเมื่อใช้ร่วมกับแซนแทนกัม (xanthan gum)

โดยทั่วไปแล้วบุกไม่สามารถเกิดเจลเองได้ แต่เมื่อใช้ร่วมกับแซนแทนกัมจะสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ในลักษณะส่งผลเสริมกัน (Dickinson, 1991) จึงทำให้สารละลายผสมมีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมาก และสามารถเกิดเจลได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ เจลที่ได้เป็นเจลที่ไม่ผันกลับโดยความร้อน (thermal irreversible gel) มีความ

ยืดหยุ่นและความแข็งแรงของเจลแตกต่างกันไป ขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างกลูโคแมนแนนและแซนแทนกัมที่ใช้ โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมเป็น 70:30 ถึง 60:40 (Tye, 1991)

2.3.1.3 ผลต่อสุขภาพและความปลอดภัย

กลูโคแมนแนนเป็นสารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพในรูปของใยอาหาร (dietary fiber) (วันชัย, 2537) ซึ่งให้ประโยชน์ทางการแพทย์หลายประการ ที่สำคัญคือ

1) ผลต่อการลดระดับไขมันในเลือด

จากการศึกษาของ Sugiyama และ Shimahara (1976) พบว่าแป้งบุกบริสุทธิ์มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ โดยรับประทานแป้งบุกเป็นประจำในปริมาณ 0.1-1.0 กรัมต่อน้ำหนักตัวของผู้บริโภค 1 กิโลกรัม จะมีผลช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลและระดับไขมันในเส้นเลือด (อดิศักดิ์, 2538) โดยไม่พบผลข้างเคียงต่ออวัยวะอื่น เช่น กระเพาะอาหาร ตับหรือไต กลไกที่เส้นใยสามารถลดระดับไขมันในเส้นเลือดได้โดยการดูดซึมเอาน้ำดีออกจากระบบทางเดินอาหาร ทำให้มีการเร่งสร้างน้ำดีขึ้นทดแทนในตับ น้ำดีที่ออกมาทางลำไส้จะถูกจุลินทรีย์ทำลายเกิดเป็นสารพวกกรดไขมันสายสั้น ลดปริมาณคอเลสเทอรอลโดยร่างกายต้องเร่งการสลายคอเลสเทอรอลให้เป็นน้ำดีทดแทนส่วนที่ถูกดูดซึม

การทดลองให้อาหารที่มีคอเลสเทอรอลสูงแก่หนูทดลอง 3 กลุ่ม โดยหนูทดลองกลุ่มที่ 1 ให้อาหารคอเลสเทอรอลสูง ในหนูทดลองกลุ่มที่ 2 ให้อาหารคอเลสเทอรอลสูงพร้อมกับแป้งบุก (Konjac flour) 5 เปอร์เซ็นต์ และหนูกลุ่มที่ 3 ให้อาหารที่มีคอเลสเทอรอลสูงพร้อมผงบุกที่บริสุทธิ์ (กลูโคแมนแนน) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-4 เดือน จากนั้นตรวจปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือดของหนูทดลองเหล่านี้ พบว่าผงบุกสามารถลดปริมาณคอเลสเทอรอลในเลือดได้ และผงบุกที่บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการลดคอเลสเทอรอลได้ดีกว่าผงบุกธรรมดามาก

2) การใช้เส้นใยอาหารในการลดน้ำหนัก

พบว่าแป้งบุกมีส่วนอย่างมากในการลดน้ำหนักสำหรับผู้ที่เป็นโรคอ้วน เพราะสารกลูโคแมนแนนจะเกิดเจลที่สามารถเพิ่มปริมาตรได้ถึง 30-50 เท่าจึงให้ความรู้สึกอิ่ม ในญี่ปุ่นมีการผลิตแป้งบุกบริสุทธิ์บรรจุซอง (ซองละ 1.5 กรัม) ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Hi-Mannan® สำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักโดยรับประทานวันละ 1-3 ซอง ก่อนอาหารมื้อนั้นๆ เมื่อรับประทานแป้งบุกจะดูดซึมน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและเกิดการพองตัว ลดความอยากอาหารและทำให้เกิดความรู้สึกอิ่มโดยให้พลังงานต่ำเพียง 5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม (อดิศักดิ์, 2538)

3) ผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเส้นเลือด

ระดับของน้ำตาลในเส้นเลือดมีผลกระทบต่อการเป็นโรคเบาหวาน อาหารสำหรับผู้ป่วยนั้นควรมีเส้นใยเพิ่มขึ้น เพื่อวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ ช่วยควบคุมน้ำตาลเพื่อลดภาวะแทรกซ้อนโดยลดระดับไขมันในเลือด กลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดของเส้นใยสันนิษฐานว่าเนื่องมาจากความหนืดของเส้นใยจะช่วยชะลอการดูดซึมน้ำตาล เนื่องจากความสามารถในการเกิดเจล ซึ่งจะไปเคลือบชั้นผิวของลำไส้ เพิ่มความหนาของชั้นเมือกที่เคลือบผิวลำไส้ที่มีอยู่เดิมการเกิดเจลจึงเพิ่มความหนืดของอาหารทำให้อาหารเคลื่อนที่ได้ช้า ให้เวลาแก่ลำไส้ในการดูดซึมอาหารทั่วไป แต่เนื่องจากการเคลือบลำไส้ที่หนาขึ้นทำให้การดูดซึมอาหาร เช่น น้ำตาลและแป้งที่ย่อยแล้วช้าลงด้วย ระดับของน้ำตาลในเลือดจึงไม่สูงขึ้นอย่างฉับพลัน

4) ผลต่อการเพิ่มมวลอุจจาระ

Chen และคณะ (2006) กล่าวว่าการเสริมผงบุกในอาหารช่วยสนับสนุนการเพิ่มมวลอุจจาระ โดยตรวจสอบจากอุจจาระที่ขับถ่ายออกมา พบว่าในอุจจาระมีความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นเพิ่มขึ้นและอุจจาระมีค่าพีเอชต่ำลง ซึ่งผงบุกน่าจะมีผลดีต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกและกระบวนการหมักในลำไส้ใหญ่

2.3.1.4 การนำบุกไปใช้ประโยชน์

บุกจัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง ส่วนหัว ก้าน และใบของบุกสามารถนำมาใช้ประกอบอาหารได้ นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของต้นบุกยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น ส่วนหัวมีสรรพคุณเป็นยาแก้โรคบิด แก้โรคไขข้ออักเสบ ส่วนรากมีสรรพคุณใช้แก้โรคริดสีดวงทวาร เป็นต้น (หรรษา, 2527)

วุ้น หรือเจลที่ได้จากบุกมีสมบัติต่างจากวุ้นที่ได้จากพืชชนิดอื่น เช่น วุ้นที่ได้จากเมล็ดธัญพืช หรือวุ้นกาแลคโตเมนแนนที่ได้จากสาหร่ายทะเล คือมีความสามารถด้านการพองตัวในน้ำที่อุณหภูมิห้องแต่คงตัวได้ไม่นาน สามารถดูดน้ำได้มากไม่ถูกย่อยในร่างกายมนุษย์จึงไม่ให้พลังงานแก่ผู้บริโภค ผลงานวิจัยของจีนพบว่า โดยทั่วไปใยอาหารจากบุกไม่มีคุณค่าทางโภชนาการ แต่จะเข้าไปช่วยปรับสภาวะโภชนาการของร่างกายที่ไม่สมดุลอันเนื่องจากร่างกายได้รับคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันมากเกินไปเป็นระยะเวลานานให้เกิดความสมดุล วุ้นบุกสามารถถูกย่อยโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ เกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจน ก๊าซมีเทน และกรดไขมันที่มีโมเลกุลขนาดสั้น (สุวศรี, 2542) ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการผลิตแป้งบุกเพื่อใช้ในการทำอาหารมานานแล้ว ในประเทศสหรัฐอเมริกาก็มีการนำแป้งบุกมาใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร (food ingredient) ในสูตรอาหารหลายชนิด ในปี ค.ศ. 1990 FDA ได้มีการตรวจสอบแล้วว่า

มีความปลอดภัย สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ นอกจากนี้แป้งบุกยังถูกใช้เพื่อเป็นสารปรุงแต่งอาหารในประเทศอื่นๆ โดยมีข้อกำหนดดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดของการใช้แป้งบุก (Konjac flour/Konjac gum) ในอาหาร

Regulatory Agency	Classification
USA	
Food & Drug Administration	GRAS
US Dept of Agriculture	Label approval under consideration
Food Chemicals Codex	Allowed in meat products-label approval required
Italy	Specifications listed in FCC Third Supplement
Belgium	Food, Food ingredient (dietary fiber use)
Canada	Dietetic foods (health/dietetic foods)
Uruguay, Paraguay, Argentina, Brazil (MERCOSUR)	Food ingredient (3% maximum use level in unstandardized and approved)
Australia	Food additive (thickener, stabilizer, Emulsifier or gelling agent at GMP)
European Community (EC)	Non-standardized foods
Scientific Committee for Food (SCF)	Dossier for konjac gum submitted in 1995 for review as a general food additive
FAO/WHO	Temporary ADI not specified subsmitted for review by 1996

ที่มา : Thomas (1997)

ในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้บุกเป็นสารให้ความคงตัวในไอศกรีม และผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง และ นมเปรี้ยว เนื่องจากบุกมีความคงตัวสูงที่สภาวะพีเอชต่ำ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารให้ความข้นหนืดและเพิ่มบอดี้ให้กับผลิตภัณฑ์อาหารไขมันต่ำ เจลบุกมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเจลของโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ กล่าวคือ เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายบุกในสภาวะที่เป็นด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต และ โพแทสเซียมคาร์บอเนต จะได้เจลบุกที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงถึงระดับอุณหภูมิน้ำเดือด (Tye, 1991) และการให้ความร้อนซ้ำแก่เจลบุกมีส่วนทำให้เจลมีความแข็งแรงและเสถียรภาพเพิ่มขึ้น (Thomas, 1997)

Perols และคณะ (1997) ศึกษาการใช้บุกในการห่อหุ้มเอนไซม์เพื่อควบคุมปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนในระหว่างการบ่มเนยแข็ง แต่อย่างไรก็ตามผลได้ของการห่อหุ้ม (encapsulation yield) ของเอนไซม์โปรติเอสมีเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการสูญเสียลักษณะทางกายภาพของบุกในระหว่างสภาวะที่ใช้ด่างและความร้อนสูง (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในระหว่างขั้นตอนการโฮโมจีไนเซชั่น)

Wang และ He (2002) ได้ทดลองการใช้บุกเป็นส่วนผสมในไมโครแคปซูลร่วมกับอัลจีเนตและไคโตซานในการห่อหุ้มตัวยาเพื่อช่วยในการปลดปล่อยตัวยา (drug release) ในระบบทางเดินอาหาร พบว่าช่วยเพิ่มระยะเวลาในการปลดปล่อยตัวยาเป็น 3 ชั่วโมง ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารที่เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

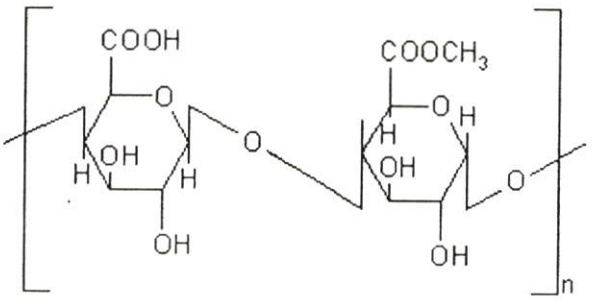
Nussinovitch (2004) ศึกษาการใช้บุกและเพคติน หรือ อัลจีเนตร่วมกับสารไฮโดรคอลลอยด์อื่นๆ เช่น โลคัสบีนกัม และไฮดรอกซีเมทิลซึ่งได้เยื่อหุ้ม (hydrocolloid membrane) ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ –20 ถึง 90 องศาเซลเซียส

2.3.2 เพคติน (Pectin)

เพคตินเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากธรรมชาติ สกัดได้จากพืชและผลไม้ส่วนใหญ่ เช่น พืชตระกูลส้มทุกชนิด แอปเปิ้ล องุ่น แครอท กล้วย ถั่วและบีท (beet) เป็นต้น โดยการทรีตด้วยกรดร้อน ซึ่งจะไฮโดรไลซ์โพรโตเพคติน (protopectin) ให้เป็นเพคติน เพคตินจัดเป็นเส้นใยอาหาร (soluble dietary fiber) ที่ละลายน้ำได้ แต่ก็ไม่สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหารได้ เพคตินเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อทำหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ เป็นสารทำให้เกิดเจล (gelling agent) เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด (thickening agent) และเป็นสารให้ความคงตัว (Rolin, 1993)

2.3.2.1 โครงสร้างทางเคมีของเพคติน

เพคติน ประกอบด้วย กรดกาแลกทูโรนิก (galacturonic acid) เป็นองค์ประกอบหลักต่อกันด้วยพันธะ α-1,4-D-galacturonic acid ดังแสดงในภาพที่ 2.5 และมีสายของโมเลกุลเชื่อมต่อกับน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น rhamnogalacturonan ซึ่งเกิดจากกรดกาแลกทูโรนิกเชื่อมด้วย L-rhamnopyranose โดยพันธะ 1,2-D-rhamnose (Schols and Voragen, 1996)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของเพคตินที่ประกอบด้วยกรดกาแลกทูโรนิกและ methoxy galacturonic ที่มา : Chourasia and Jain (2003)

กรดกาแลกทูโลนิกจะถูกเอสเทอริไฟด์บางส่วนด้วยหมู่เมทธิลได้ และจำนวนของเมทธิเลชั่นนี้จะเป็นตัวบอกสมบัติของเพคติน โดยดูจากค่า DM (degree of methylation) ซึ่งคือจำนวนหมู่เมทธ็อกซีเฉลี่ยต่อกาแลกทูโรนิก 100 หน่วย เพคตินแต่ละชนิดจะมี degree of methylation (DM) ซึ่งหมายถึง อัตราส่วนของหมู่ methoxylated galacturonic acid ต่อ หมู่ galacturonic acid ทั้งหมดที่มีอยู่ในโมเลกุลของเพคตินจะมีผลทำให้สมบัติของเพคตินต่างกัน ซึ่งโครงสร้างของเพคตินขึ้นอยู่กับแหล่งวัตถุดิบและกระบวนการสกัด

2.3.2.2 ประเภทและคุณสมบัติของเพคติน (Rolin, 1993)

1) เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธ็อกซีสูง

คือ เพคตินที่มีค่า DM มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับใช้ทำผลิตภัณฑ์ที่มีค่าพีเอชต่ำ เช่น เยลลี่ผลไม้ เพคตินชนิดนี้จะเซตตัวได้ค่อนข้างเร็ว ซึ่งยังแบ่งย่อยออกไปเป็นชนิดเซตตัวเร็ว (rapid set) ค่า DM 68-72 เปอร์เซ็นต์ ชนิดเซตตัวเร็วปานกลาง (medium rapid set) ค่า DM 59-64 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทางปฏิบัติแล้วจะใช้แต่ชนิดเซตตัวช้า เนื่องจากในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ค่อนข้างสูงแล้ว (เกิน 55 เปอร์เซ็นต์) เจลที่เซตตัวแล้วเมื่อหลอมอาจจะละลายได้ไม่หมด ดังนั้นการนำเศษเหลือกลับไปหลอมใช้อีกจะต้องระวังไม่ใช้เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยบดเศษที่จะใช้ให้ละเอียดก่อนเพคตินชนิดนี้ยังใช้ทำหน้าที่เป็นสารช่วยจับฟองอากาศได้อีกด้วย โดยใช้ปริมาณ 0.5-2.5 เปอร์เซ็นต์

2) เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธ็อกซีต่ำ (Low methoxy pectin)

จะมีค่า DM น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ปกติอยู่ระหว่าง 25-40 เปอร์เซ็นต์) โดยกำหนดค่า degree of amidation เป็น จำนวนหมู่ amide ต่อกาแลกทูโรนิก 100 หน่วย และส่วนมากจะบังคับไม่ให้เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธ็อกซีต่ำนี้สามารถใช้ใน

ผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างเป็นกลางได้ ซึ่งโดยปกติค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์จะอยู่ที่ประมาณ 5 ดังนั้นเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์จึงมักจะอ่อนกว่าและยืดหยุ่นน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำด้วยเพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธ็อกซีสูง นอกจากนี้การเซตตัวจะต้องมีไอออนของแคลเซียมอยู่ด้วยไม่ว่าในระบบจะมีของแข็งละลายอยู่มากหรือน้อยก็ตาม โดยจะเกิดเจลกับแคลเซียมที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.8-8.5 และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำตั้งแต่ 10-80 เปอร์เซ็นต์

2.3.2.3 คุณสมบัติการเกิดเจลของเพคติน

เพคตินที่มีระดับการแทนที่ด้วยหมู่เมทธิลต่ำ (LM pectin) จะเกิดเจลขึ้นได้เมื่อมีสารไดวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) โดยเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างอิเล็กตรอนคู่อิสระของกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) ของโมเลกุลเพคติน เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธิลต่ำจะมีลักษณะทางเคมีที่คงตัว จึงทนความชื้นและความร้อนมากกว่าเพคตินที่มีระดับการแทนที่ด้วยหมู่เมทธิลสูง เพราะมีแนวโน้มที่จะสูญเสียการถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ (deesterify) ได้ช้าในความชื้นบรรยากาศ เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธิลต่ำสามารถเกิดโครงสร้างเจลได้ที่ค่าพีเอชเฉลี่ย 2.5-6.5 (Meer *et al.*, 1975)

Rolin (1993) กล่าวว่าเมื่ออุณหภูมิลดลงและความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เพิ่มขึ้นเพคตินจะเกิดการสูญเสียโครงสร้างโพลีเมอร์ (depolymerization) น้อยที่สุดและกลุ่มเมทธิล (metoxyl group) จะเปลี่ยนเป็นกลุ่มเอไมด์ (amide groups) เกือบหมด นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของกลุ่มเอไมด์ในเพคตินที่มีระดับเอสเทอริไฟด์ต่ำจะทำให้เจลมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่น (elastic) สูงกว่าเพคตินที่มีกลุ่มเอไมด์ต่ำ

เพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธิลต่ำสามารถฟอร์มเจลที่แข็งแรงด้วยปฏิกิริยาของแคลเซียมไอออน หรือมัลติวาเลนท์แคทไอออน ซึ่งเชื่อมต่อกับสายของกรดกาแลกทูโรนิกเกิดเป็นแคลเซียมเพคติเนตไฮโดรเจล (calcium pectinate hydrogels) มีเสถียรภาพที่ดีในสารละลายที่เป็นกรด จากคุณสมบัติที่ดีในการเกิดเจลของเพคติน จึงมีการศึกษาเพื่อนำเพคตินมาใช้ประโยชน์ในการห่อหุ้มตัวยาเพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ดังนี้

Aydin และ Akbuga (1996) ได้ศึกษาการเตรียมเจลเพคตินเพื่อใช้ห่อหุ้มยา Atenolol และ Piroxicam ด้วยวิธีเอ็กซ์ทรูชั่นโดยใช้สารละลายเพคตินความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรทำการหยดสารผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เกิดการฟอร์มเม็ดเจลของเพคตินซึ่งห่อหุ้มตัวยาไว้ และประสบความสำเร็จในการใช้เพคตินห่อหุ้มตัวยาทั้งชนิดที่มีประจุบวกและยาที่มีประจุลบ เช่น ยา Atenolol และ Piroxicam ตามลำดับ

Sriamornsak และคณะ (1998) ศึกษาการเตรียมแคลเซียมเพคติเนตเจลที่ห่อหุ้มยา indomethacin โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของเพคติน ขนาดของเม็ดเจล ผลได้ของการกัก

เก็บตัวยา (drug loading) และ พฤติกรรมการปลดปล่อยตัวยา (drug release) ในสภาวะจำลอง (in vitro) เพื่อใช้ขนส่งยาไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย

Sriamornsak และคณะ (2004) ศึกษาการเคลือบน้ำมันบริโภค (edible oil) ด้วยสารละลายเพคตินซึ่งเตรียมโดยวิธีอิมัลชั่นเพื่อใช้ขนส่งตัวยาไปยังกระเพาะอาหาร เนื่องจากเพคตินมีความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างเฟสน้ำมันและเฟสน้ำ ซึ่งมีผลดีต่อการเกิดอิมัลชั่น

Sriamornsak และคณะ (2005) ปรับปรุงการห่อหุ้มตัวยาด้วยวิธีอิมัลชั่นเพื่อขนส่งตัวยา metronidazole ไปยังสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร พบว่าเม็ดเจลประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ มีการปลดปล่อยตัวยาอย่างรวดเร็วภายใน 20-80 นาที จึงควรเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดเจลโดยการเคลือบอีกชั้นด้วยกลีเซอริลโมโนสเตียเรต (glyceryl monostearate) และ eudragit® L เพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการปลดปล่อยตัวยาภายในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Desai (2005) ทดลองใช้ High amylose corn starch (HACS) และเพคติน เพื่อทำหน้าที่ปลดปล่อยตัวยาในลำไส้และใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray-drying) วิธีนี้ให้ขนาดของเม็ดเจลระหว่าง 5.8-7.3 ไมโครเมตร และประสิทธิภาพการเคลือบ 80.11-94.7 เปอร์เซ็นต์

2.4 โยเกิร์ตพร้อมดื่ม

โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวชนิดหนึ่ง มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid) ได้จากการหมักนมสด นมพร่องไขมันหรือนมคืนรูปจากนมผงที่มีปริมาณไขมัน 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยจุลินทรีย์แลคติก เช่น *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) และ *Streptococcus thermophilus* จนนมมีลักษณะเป็นลิ่ม (curd) โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีโปรตีนจากนมที่ถูกย่อยได้กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดในปริมาณที่ต่างกัน มีไขมันปริมาณต่ำ มีคาร์โบไฮเดรตซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปแลคโตส มีวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินบี 1 (thiamin) และวิตามินบี 2 (riboflavin) นอกจากนี้มีแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส และโซเดียม (Tamine and Robinson, 1999) โยเกิร์ตมีจุลินทรีย์แลคติกที่มีชีวิตอยู่ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อยู่ในลำไส้ ทำให้ผู้ที่บริโภคโยเกิร์ตเป็นประจำมีความผิดปกติเกี่ยวกับลำไส้และระบบทางเดินอาหารลดลง (Lankaputhra and Shah, 1998; Shah, 1999)

2.4.1 กระบวนการผลิตโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

โยเกิร์ตพร้อมดื่มเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปนมหมักพร้อมดื่มที่มีขั้นตอน และกระบวนการผลิตคล้ายโยเกิร์ต ในทางอุตสาหกรรมมักนิยมเติมน้ำผลไม้ แล้วผ่านการโฮโมจีไนซ์จนมีลักษณะเป็นของเหลวดื่มได้ทันที นอกจากนี้ยังมีการเติมสารให้ความหวานและกลิ่นรส เพื่อให้มีรสชาติดีขึ้นมีกระบวนการผลิตดังนี้

1. การเตรียมวัตถุดิบ (preparation)

โยเกิร์ตสามารถผลิตได้จากน้ำนมของสัตว์หลายชนิด เช่น โค แพะ แกะ และอูฐ เป็นต้น นมโคเป็นนมที่นิยมนำมาผลิตเป็นโยเกิร์ตมากที่สุด คุณภาพของโปรตีนในนมเป็นตัวบ่งชี้ว่านมนั้นเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นโยเกิร์ตหรือไม่ (Vernan and Sutherland, 1994) หากผลิตโยเกิร์ตจากนมสดต้องตรวจสอบคุณภาพของนมดิบก่อน โดยตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ปริมาณสารปฏิชีวนะ (antibiotics) และอุณหภูมิของนม (Law, 1997) นมโคที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ตต้องเป็นนมที่มีคุณภาพดี กลิ่นรสดี ไม่มีน้ำนมเหลืองปน แม่วัวที่ให้นมต้องไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และต้องเป็นนมที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ อาจใช้นมพร่องไขมันหรือนมผงคืนรูป (Tamine and Robinson, 1999)

2. การปรับปริมาณสัดส่วนไขมันและเนื้อนม (standardization)

การผลิตโยเกิร์ตโดยทั่วไปจะปรับปริมาณไขมันให้อยู่ในช่วง 0-3.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับชนิดของโยเกิร์ต มาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้โยเกิร์ตที่ผลิตจากหางนมผง (skim milk yoghurt) มีปริมาณไขมันน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ โยเกิร์ตไขมันปานกลาง (half-fat yoghurt) มีปริมาณไขมัน 0.5-2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโยเกิร์ตที่มีไขมันเต็ม (whole milk yoghurt) มีปริมาณไขมันมากกว่า 3.5 เปอร์เซ็นต์ (Vernan and Sutherland, 1994) และปรับปริมาณเนื้อนมไม่รวมมันเนย (milk solid non fat; MSNF) ไม่ให้ต่ำกว่า 8.2 เปอร์เซ็นต์โยเกิร์ตที่พบตามท้องตลาดมีเนื้อนมไม่รวมมันเนยประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 5 เปอร์เซ็นต์ และไขมันไม่ต่ำกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มปริมาณเนื้อนมในโยเกิร์ตให้มากขึ้นอาจทำได้โดยการเติมหางนมผงหรือโปรตีนเวย์เข้มข้น การให้ความร้อนกับนม การระเหยน้ำในนมภายใต้ระบบสูญญากาศ หรือการเติมน้ำตาล เป็นต้น (Law, 1997) จุดประสงค์ของการปรับปริมาณเนื้อนมให้เหมาะสมเพื่อเพิ่มเนื้อ (body) และปรับปรุงเนื้อสัมผัส (texture) ของโยเกิร์ตให้มีความแน่นเนื้อ (firmness) มากขึ้น และลดการเกิดการแยกส่วนของเหลวในโยเกิร์ต (syneresis) แต่หากเพิ่มปริมาณเนื้อนมมากเกินไปโยเกิร์ตจะจับตัวกันเป็นก้อนเล็กๆ (grittiness) ทำให้เนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตไม่เรียบเนียน (smoothness) (Vernan and Sutherland, 1994) นอกจากการปรับปริมาณไขมันและเนื้อนมแล้ว อาจมีการเติมสารให้ความคงตัว (stabilizer) ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มความสามารถในการจับน้ำ (water-holding

capacity) ทำให้โยเกิร์ตมีความแน่นเนื้อมากขึ้น (Gilliland, 1989) และช่วยลดการแยกส่วนของเหลวในโยเกิร์ต

3. การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization)

การทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยทั่วไปกำหนดสภาวะที่ความดัน 2,000-2,500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (20-25 เมกกะปาสคาล) อุณหภูมิ 60-75 องศาเซลเซียส (Tamine and Robinson, 1999) ขนาดของเม็ดไขมันที่ได้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ด้วย การทำให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นการลดขนาดลดการเกาะกัน (coalescense) และเพิ่มพื้นที่ผิวของเม็ดไขมันจึงสามารถจับกับองค์ประกอบอื่นได้ดีและไม่แยกตัวออกจากองค์ประกอบอื่นๆ โยเกิร์ตที่ผ่านขั้นตอนนี้จึงมีเนื้อสัมผัสที่ดีและมีการแยกส่วนของเหลวลดลง (Vernan and Sutherland, 1994) ขนาดของเม็ดไขมันที่เล็กลงทำให้โยเกิร์ตเกิดการกระจายแสงมากขึ้นโยเกิร์ตจึงมีสีขาวขึ้น (Law, 1997) นอกจากนี้การทำให้ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกันช่วยลดการจับตัวกันเป็นก้อนเล็กๆ ของโยเกิร์ต

4. การให้ความร้อน (heat treatment)

การให้ความร้อนโยเกิร์ตโดยปกติกำหนดสภาวะที่อุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เวลา 10-30 นาที (Gilliland, 1989; Law, 1997) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบ (Tamine and Robinson, 1999) และทำให้เกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างโปรตีนเวย์กับเคซีนส่งผลให้การจับน้ำเป็นไปได้ดีขึ้น เพิ่มความหนืด ปรับปรุงเนื้อสัมผัสให้ดีขึ้น (Vernan and Sutherland, 1994) โดยเจลโยเกิร์ตที่ได้มีลักษณะคล้ายเจลคัสตาร์ด (custard-like gel) และลดการแยกส่วนของเหลวในโยเกิร์ต ทำให้ลักษณะปรากฏของโยเกิร์ตดีขึ้น (Gilliland, 1989)

5. การเติมกล้าเชื้อโยเกิร์ต (inoculation)

ก่อนการเติมกล้าเชื้อโยเกิร์ตต้องลดอุณหภูมิของส่วนผสมให้มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อโยเกิร์ต ซึ่งอาจเติมได้หลายวิธี ได้แก่ การเติมโดยตรง หรือนำมาเพาะเชื้อลงในน้ำนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (mother culture) ก่อนการเติมลงในส่วนผสมโยเกิร์ต (Tamine and Robinson, 1999)

6. การบ่ม (fermentation)

การบ่มโยเกิร์ตต้องมีอุณหภูมิและสภาวะที่เหมาะสม โดยควบคุมอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส และบ่มในภาชนะปิด เพื่อส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อโยเกิร์ตให้เจริญได้ดี และบ่มไว้ประมาณ 4-5 ชั่วโมง หรือจนกว่าค่าพีเอชของโยเกิร์ตมีค่าประมาณ 4.5 อย่างไรก็ตามเวลาในการบ่มโยเกิร์ตนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้าเชื้อโยเกิร์ตที่ใช้ใน

การผลิตโยเกิร์ต และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตที่ดีควรเรียบเนียน ไม่เกาะกันเป็นก้อนเล็กๆและไม่เกิดฟอง กลิ่นรสของโยเกิร์ตที่ดีควรมีอัตราส่วนของสารให้กลิ่นรสต่างๆ ที่เหมาะสม เช่น ปริมาณอะซีตัลดีไฮด์ต่อไดอะซีติล เท่ากับ 1:1 ปริมาณอะซีตัลดีไฮด์ต่ออะซีโตน เท่ากับ 2:8:1 และปริมาณกรดแลคติก 0.85-1.20 เปอร์เซ็นต์ (Wood, 1998)

7. การทำให้เย็น (cooling)

หลังจากบ่มโยเกิร์ตจนครบเวลาที่กำหนดหรือจนได้ค่าพีเอชที่เหมาะสม แล้วทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส (Tamine and Robinson, 1999) เพื่อควบคุมการเจริญและยับยั้งกิจกรรมของกล้าเชื้อโยเกิร์ตไม่ให้มีการสร้างกรดแลคติกต่อไป (Law, 1997) ทำให้ปริมาณของกรดแลคติกที่ได้มีค่าคงที่ ซึ่งหากไม่มีการยับยั้งการสร้างกรดจะทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของกล้าเชื้อโยเกิร์ต

8. การผสมน้ำผลไม้หรือน้ำเชื่อม (mixing)

นำโยเกิร์ตที่ได้หลังจากการบ่มมาผสมกับน้ำเชื่อมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีการเติมกลิ่นรสตามต้องการในอัตราส่วนที่เหมาะสม หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (จารุวรรณ, 2547)

9. การเก็บรักษา (storage)

โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ได้จากการกระบวนการผลิตควรบรรจุลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภาชนะบรรจุสู่ผลิตภัณฑ์ และช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษาโยเกิร์ตควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1-2 สัปดาห์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานเกินไปค่าพีเอชของโยเกิร์ตจะค่อยๆ ลดลงจนถึงระดับหนึ่งที่ผู้บริโภคสามารถรับรู้ถึงความเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสได้ และในขณะเดียวกันอาจมีการเจริญของยีสต์และราด้วย (Tamine and Robinson, 1999)

2.4.2 บทบาทของจุลินทรีย์โยเกิร์ตในผลิตภัณฑ์นมหมัก

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต คือเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกหรือจุลินทรีย์กรดแลคติก โดยทั่วไปใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *S. thermophilus* แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) และ *Lb. bulgaricus* แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง (rods) ในอัตราส่วนของ *S. thermophilus* ต่อ *Lb. bulgaricus* เท่ากับ 1:1 หรือ 2:3 อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของกล้าเชื้อที่เหมาะสมนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของโยเกิร์ตที่ต้องการด้วย หากใช้ *Lb. bulgaricus* มากเกินไปจะให้กลิ่นรสที่รุนแรงไม่เป็นที่ต้องการของ

ผู้บริโภค (Gilliland, 1989) การใช้กล้าเชื้อผสมระหว่าง *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* จะช่วยส่งเสริมการทำงานของกันและกัน ทั้ง *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตสุดท้ายมีค่าประมาณ 4.2 - 4.3 ในระยะแรกของการหมัก *S. thermophilus* สามารถเจริญได้เร็วกว่า *Lb. bulgaricus* มีการสร้างกรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) อะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ไดอะซีติล (diacetyl) และกรดฟอร์มิก (formic acid) สะสมในโยเกิร์ตทำให้ศักย์ออกซิเดชั่นรีดักชั่น (oxidation-reduction potential) เปลี่ยนไป มีผลกระตุ้นให้เกิดการเจริญของ *Lb. bulgaricus* ซึ่งมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้มากกว่า *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* ย่อยโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก และกรดอะมิโนอิสระเป็นตัวกระตุ้นการเจริญของ *S. thermophilus* ถ้ามีกรดอะมิโนอิสระที่มากเกินความต้องการของ *S. thermophilus* จะสะสมอยู่ในโยเกิร์ต ทำให้โยเกิร์ตมีกรดอะมิโนอิสระ กรดกลูตามิก (glutamic acid) และโพรลีน (proline) สะสมอยู่ปริมาณมาก (Wood, 1998) ดังนั้นเมื่อบริโภคโยเกิร์ตร่างกายจึงสามารถดูดซึมส่วนของโปรตีนที่อยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระนี้มาใช้ได้ทันที

แม้ว่า *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* จะเป็นกล้าเชื้อที่ให้กลิ่นรสกับโยเกิร์ตและช่วยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (Mullan, 2001) ยังมีจุลินทรีย์โพรไบโอติกเช่น Bifidobacteria และ *Lb. acidophilus* ที่นิยมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อโยเกิร์ตกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากให้กลิ่นรสที่ดี ทั้งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เพิ่มความสามารถในการย่อยแลคโตสของผู้ที่ขาดความสามารถในการย่อยแลคโตส (Krasaekoopt *et al.*, 2003) ลดการเกิดเซลล์มะเร็ง (Reddy *et al.*, 1983) และลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด (Gilliland and Walker, 1990) เป็นต้น

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

ผงบุก (Nutricol® FMC Corporation, U.S.A.)

เพคติน (Food & Cosmetic System Co., LTD.)

น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด, ประเทศไทย)

นมสดพาสเจอไรส์ไขมันต่ำ (บริษัท โฟรโมสต์ อาหารนม จำกัด, ประเทศไทย)

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus* LA5 (DVS-Freeze dried, Chr.Hansen, Denmark)

เชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium lactis* BB12 (DVS-Freeze dried, Chr.Hansen, Denmark)

เชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC 380 (DVS-Freeze dried, Chr.Hansen, Denmark)

3.1.2 สารเคมี

โพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)

แคลเซียมคลอไรด์ (0.2 M $CaCl_2$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 N NaOH)

ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolpthalein) 1.0 เปอร์เซ็นต์

แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

เมทิลลีนบลู

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-IM และสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Homogenizer (IKA work, T-25 basic, Malaysia)

เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) (Stable Micro Systems, TA-XT2, England)

ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Kendo Laboratory Products, Germany)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan)

เครื่องวัด pH (LISTED 8F93 Laboratory Equipment, Germany)

เครื่องตีป่นอาหาร (AES Laboratory, France)

เครื่องผสม (Vortex mixer) (G-560E, U.S.A.)

โถสูญญากาศ (Anaerobic jar) (Oxoid, Australia)

แผ่นดูดซับออกซิเจน (Anaerocult A, Merck , Germany)

ตู้อบ (Hot Air Oven) (Memment 600 D06062)

อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนของบุกและเพคตินต่อความแข็งแรงของเจลผสม

3.2.1.1 การเตรียมสารละลายบุก

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส ใส่ผงบุกความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับลงไปคนให้ละลายจนสารละลายบุกใส (Perol *et al.*, 1997)

3.2.1.2 การเตรียมเพคตินความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ 250 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ใส่เพคตินความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ลงไปคนให้ละลาย (Aydin and Akbuga, 1996)

3.2.1.3 ศึกษาค่าความแข็งแรงของเจลบุกผสมเพคติน

เตรียมเจลผสมระหว่างบุกและเพคตินโดยแปรความเข้มข้นของบุกที่ 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับจากข้อ 3.2.1.1 แล้วเติมสารละลายเพคตินความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.2 ลงไปโดยแปรอัตราส่วนของบุกต่อเพคติน ที่ระดับ 1:0 1:0.7 1:1 และ 1:2 โดยปริมาตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสต่อไปจนสารละลายทั้งสองผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักของบุก) ละลายให้เข้ากันจึงเติมแคลเซียมคลอไรด์ 2.94 กรัมโดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารผสม (คิดเป็นความเข้มข้น 0.2 โมลลาร์) (Wang and He, 2002) และให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จนเกิดการฟอร์มเจลขึ้นในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส TA-XT2 จากค่าแรงกดที่ระยะทางคงที่ วัดตัวอย่างเมื่อหัววัดสัมผัสผิวหน้าของเจลเป็นระยะ 1 เซนติเมตร

โดยใช้หัววัด P 0.5R Dia Cylinder Ebonite probe (โหลดเซลล์รับน้ำหนักได้ 25 กิโลกรัม ความเร็วที่ใช้ในการวัดเนื้อสัมผัส ได้แก่ ความเร็วของหัววัดก่อนการทดสอบ (Pre-test speed) ความเร็วขณะทดสอบ (Test speed) และความเร็วหลังการทดสอบ (Post-test speed) ระดับความเร็วเท่ากันที่ 0.5 มิลลิเมตรต่อวินาที ตามลำดับ) วัดค่าแรงที่ระดับความลึกของเจลเท่ากับ 1 เซนติเมตร เป็นค่าความแข็งแรงของเจลมีหน่วยเป็นกรัมทดลองทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลผสมระหว่างบุกและเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติก

นำเชื้อโพรไบโอติกมาเลี้ยงในอาหาร Modified MRS-IM broth (สำหรับ *B. lactis* BB12) และ MRS-IM broth ที่มีการเติมสารละลายมอลโตส (สำหรับ *Lb. acidophilus* La5) ดังแสดงในภาคผนวก ข โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่สภาวะไร้อากาศ (บ่มใน Anaerobic jar) และมีอากาศเล็กน้อย (บ่มใน Modified candle jar) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้โพรไบโอติกที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/mL นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกเซลล์และล้างเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.2 ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเจลผสมและน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น

ในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่นใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันเป็นเฟสต่อเนื่อง (continuous phase) และสารละลายเจลผสมบุกและเพคตินเป็นเฟสไม่ต่อเนื่อง (discontinuous phase) โดยใช้อัตราส่วนของบุกและเพคตินที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1.3 แปรสัดส่วนของสารละลายเจลผสมที่ 20 25 และ 30 กรัม และเติมเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงได้จากข้อ 3.2.2.1 ลงในเจลผสม จากนั้นจึงค่อยๆ เติมของผสมนี้ลงในน้ำมันเมล็ดทานตะวัน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ และให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Adhikari *et al.*, 2003) ทำการกวนผสมด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และรอให้เม็ดเจลคงตัวเป็นเวลา 30

นาที จึงทำการแยกเม็ดเจลออกจากน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ทำการวิเคราะห์เม็ดเจลที่ได้ ดังนี้

ก) สุ่มตัวอย่างเม็ดเจลจำนวน 50 เม็ดมาวัดขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบลักษณะภายนอกของเม็ดเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Cryo-SEM (Cold-stage scanning electron microscope) แสดงในภาคผนวก ฉ

ข) ผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% encapsulation yield) โดยตรวจนับจำนวนเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตภายในเม็ดเจล โดยนำเม็ดเจล 1 กรัมใส่ลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 99 มิลลิลิตร ตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี spread plate ลงบนอาหาร Modified MRS-IM agar (สำหรับ Bifidobacteria) และ MRS-IM agar ที่มีการเติมสารละลายมอลโตส (สำหรับ *Lb. acidophilus* La5) ดังแสดงในภาคผนวก ข บ่มที่สภาวะไร้อากาศ (บ่มใน Anaerobic jar) และมีอากาศเล็กน้อย (บ่มใน Modified candle jar) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

$$\% \text{ encapsulation yield} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหลังการเคลือบ}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดก่อนการเคลือบ}} \times 100$$

3.2.2.3 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการกวนผสม (mixing time) ที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น

ทำการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชั่นโดยใช้สัดส่วนของสารละลายเจลผสมที่เหมาะสมเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2 และแปรผันระยะเวลาที่ใช้ในการกวนผสมเท่ากับ 30 60 90 และ 120 วินาที ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์เม็ดเจลเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2.3 ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

3.2.3.1 ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* LA5 และ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม (ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์)

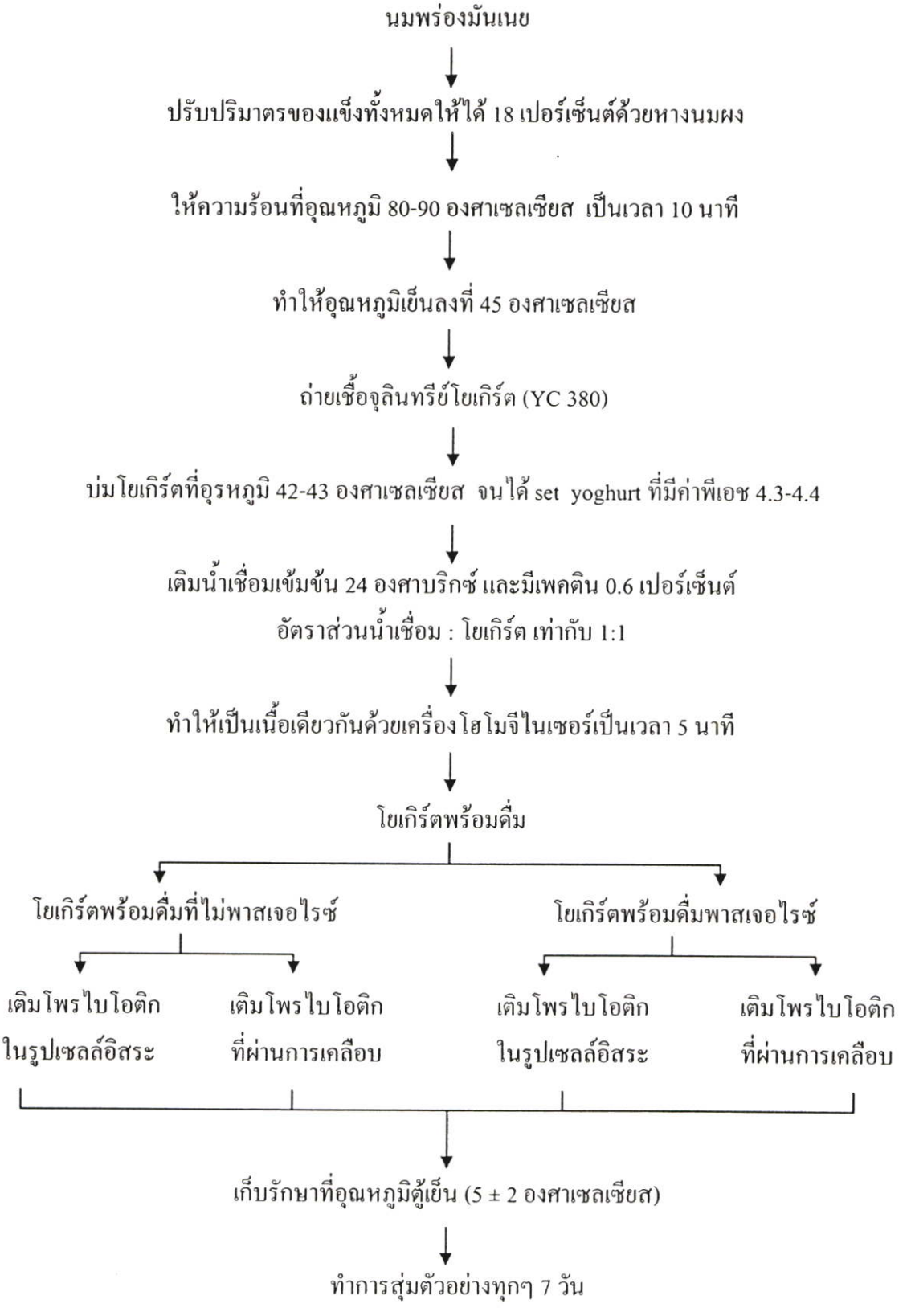
นำ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มาเติมลงในโยเกิร์ตพร้อมดื่มเพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตกับกรณีที่เติมโพรไบโอติกในรูปเซลล์อิสระ โดยเติม *Lb. acidophilus*

La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินประมาณ 15 กรัมต่อโยเกิร์ตพร้อมดื่มปริมาตร 250 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทุกๆ 7 วันโดยสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่มปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตรทำการตีป่นและนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 วิเคราะห์ค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม (ภาคผนวก ก) ขั้นตอนการเตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่มแสดงในภาพที่ 3.1 จากนั้นศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์เปรียบเทียบการรอดชีวิตกับเซลล์อิสระ (*B. lactis* BB12 เจริญในอาหาร Modified MRS-IM broth) ทำการเก็บรักษาและตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับ *Lb. acidophilus* La5

3.2.3.2 อัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* LA5 และ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ (72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที)

ทำการเตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่มปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติม *Lb. acidophilus* La5 หรือ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินประมาณ 15 กรัมต่อโยเกิร์ตพร้อมดื่มปริมาตร 250 มิลลิลิตรพร้อมกับคนโยเกิร์ตพร้อมดื่มอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงทันทีโดยนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งจนอุณหภูมิเท่ากับ 43 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่มปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการตีป่นและตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 วิเคราะห์ค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม (ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์กับโพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระหลังผ่านการพาสเจอไรซ์ จากนั้นนำโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่มทุกๆ 7 วัน มาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

3.2.4 ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน

3.2.4.1 ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Preference Test)

เตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ เก็บรักษาโยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เสิร์ฟตัวอย่างประมาณ 30 มิลลิลิตร โดยกำหนดรหัสแก่ตัวอย่างแบบสุ่มและให้ผู้ชิมบ้วนปากด้วยน้ำระหว่างการชิมแต่ละตัวอย่าง ทำการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ในปัจจัยด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมด้วยวิธี Hedonic scale ระดับคะแนน 1-7 (1 = ไม่ชอบมาก, 2 = ไม่ชอบปานกลาง, 3 = ไม่ชอบเล็กน้อย, 4 = เฉยๆ, 5 = ชอบเล็กน้อย, 6 = ชอบปานกลาง, 7 = ชอบมาก) และผู้ชิมจำนวน 30 คน (ดังแสดงในภาคผนวก ง)

3.2.4.2 ทดสอบความแตกต่างด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Difference Test)

เมื่อทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์จากข้อ 3.2.4.1 แล้วจึงทำการทดสอบความแตกต่างของลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย (Sandiness) ควบคู่กัน ทดสอบด้วยวิธี Scoring test ระดับคะแนน 1-7 (1 = ไม่มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย, 2 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายน้อยมาก, 3 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายน้อย, 4 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายปานกลาง, 5 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมาก, 6 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมากปานกลาง, 7 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมากที่สุด) ใช้ผู้ชิมชุดเดียวกันจากข้อ 3.2.4.2

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนของบุกและเพคตินต่อความแข็งแรงของเจลผสม

จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเจลผสมระหว่างบุกและเพคติน โดยแปรอัตราส่วนบุกต่อเพคตินเท่ากับ 1:0 1:0.7 1:1 และ 1:2 โดยปริมาตร ที่ความเข้มข้นของบุกเท่ากับ 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเพคติน 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายบุกเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าความแข็งแรงของเจลบุกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย กล่าวคือที่ความเข้มข้นของสารละลายบุก 2 เปอร์เซ็นต์ (อัตราส่วนบุกต่อเพคตินเท่ากับ 1:0 ไม่มีการเติมเพคติน) จะให้ค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากับ 20 กรัม ซึ่งสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (12.7 กรัม) และ 1 เปอร์เซ็นต์ (9.1 กรัม) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่ง

ตารางที่ 4.1 ค่าความแข็งแรงของเจลบุกกับเพคติน (gel strength) ที่ระดับความเข้มข้นของบุก 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และแปรอัตราส่วนต่างๆ

ความเข้มข้นของบุก	อัตราส่วนบุก : เพคติน	ค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength)* (กรัม)
1.0%	1 : 0	9.10 ± 0.70^{a}
	1 : 0.7	9.53 ± 1.45^{a}
	1 : 1	20.63 ± 5.08^{bc}
	1 : 2	22.87 ± 3.50^{c}
1.5%	1 : 0	12.70 ± 0.56^{a}
	1 : 0.7	10.83 ± 2.58^{a}
	1 : 1	14.60 ± 1.57^{ab}
	1 : 2	**34.00 ± 2.29^{d}**
2.0%	1 : 0	20.00 ± 3.83^{bc}
	1 : 0.7	10.47 ± 0.98^{a}
	1 : 1	14.30 ± 3.62^{ab}
	1 : 2	25.67 ± 7.60^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง มีค่าความแข็งแรงของเจลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

* ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

สอดคล้องกับการทดลองของ Huang และ Lin (2004) ที่ศึกษาค่าความแข็งแรงของเจลผสมระหว่างบุกและเจลแลนกัม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบุกค่าความแข็งแรงของเจลผสมเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการเติมสารละลายด่าง เช่น โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต หรือ ไตรโซเดียมฟอสเฟต เป็นต้น ช่วยให้โมเลกุลของบุกเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิทิล (Deacetylation) และทำให้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของบุกเพิ่มขึ้น และการที่โมเลกุลของบุกเกิดพันธะไฮโดรเจนมากขึ้นจึงอาจส่งผลต่อการเกิดการฟอร์มเจลผสมดีขึ้นและทำให้เจลมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

ที่ระดับความเข้มข้นของบุกเท่ากันเมื่อเพิ่มสัดส่วนของเพคตินเป็น 1:0.7 1:1 และ 1:2 พบว่าค่าความแข็งแรงของเจลผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของบุกเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนของบุกต่อเพคตินเท่ากับ 1:2 ได้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดคือ 34 กรัม ทั้งนี้เนื่องจากเพคตินชนิดที่มีหมู่เมทธ็อกซีต่ำสามารถฟอร์มเจลที่แข็งแรงด้วยปฏิกิริยาของแคลเซียมไอออนในรูปของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ โดยเกิดการเชื่อมข้าม (cross-linking) กับหมู่คาร์บอกซิลของกรดกาแลกทูโรนิก (negative charge) เกิดเป็นโครงสร้างของเจล (egg-box conformation) เรียกว่า แคลเซียมเพคติเนตไฮโดรเจล (calcium pectinate hydrogels) (Sriamornsak *et al.*, 2004) ขณะที่โมเลกุลของบุกเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิทิลออกไป ทำให้บุกเกิดการฟอร์มเจลได้ดีขึ้นและเจลบุกมีคุณสมบัติเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic polysaccharide) ดังนั้นเจลบุกจึงเกิดการฟอร์มเจลด้วยประจุบวกกับโมเลกุลของเพคตินซึ่งมีประจุลบจากกรดกาแลกทูโรนิกได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Kim และคณะ (2003) ที่ศึกษาการฟอร์มเจลของเพคตินร่วมกับไคโตซานซึ่งจัดเป็นเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุบวกเช่นเดียวกับบุก จึงทำให้เจลบุกผสมเพคตินมีค่าความแข็งแรงของเจลสูงกว่าการใช้บุกเพียงอย่างเดียว และการเพิ่มสัดส่วนของเพคตินส่งผลให้ค่าความแข็งแรงของเจลผสมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของบุก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วน 1:2 ให้ค่าความแข็งแรงของเจลผสมเท่ากับ 25.67 กรัม น้อยกว่าความเข้มข้นของบุก 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่อัตราส่วนเดียวกัน (34 กรัม) อาจเป็นผลจากเมื่อความเข้มข้นของบุกสูงขึ้นเกิดการฟอร์มเจลระหว่างโมเลกุลของบุกได้ดีและสามารถกักเก็บน้ำไว้ภายในโครงสร้างได้มาก จึงมีโอกาสเกิดการซึมของน้ำภายในโครงสร้างเจลออกมา (syneresis) มีผลทำให้ค่าความแข็งแรงของเจลลดลง (Morris, 1979)

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลผสมระหว่างบุกและเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น

4.2.1 ศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายเจลผสมและน้ำมันเมล็ดทานตะวันในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมของบุกและเพคตินจากข้อ 4.1 จึงนำอัตราส่วนดังกล่าวมาใช้ในการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยวิธีอิมัลชั่น โดยแปรสัดส่วนของสารละลายเจลผสมที่ 20 25 และ 30 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร และตรวจนับจำนวนเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ที่มีชีวิตภายในเม็ดเจลเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นแล้วคำนวณหาผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% Encapsulation yield) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าที่สัดส่วนของสารละลายเจลผสมเท่ากับ 20 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร ให้ผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 94.81 เปอร์เซ็นต์ และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดเจลเล็กที่สุดเท่ากับ 4.83 ไมโครเมตร และเม็ดเจลที่ได้มีรูปร่างค่อนข้างกลม ดังแสดงในภาพที่ 4.1ที่สัดส่วนของ

ตารางที่ 4.2 ผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% Encapsulation yield) และขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยวิธีอิมัลชั่น เมื่อใช้สัดส่วนของสารละลายเจลผสมเท่ากับ 20 25 และ 30 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร

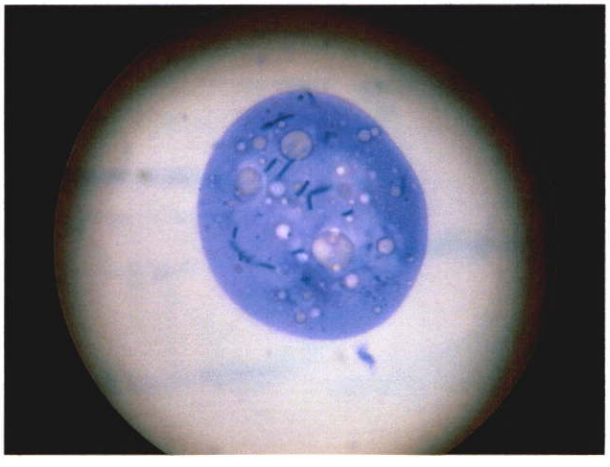
สารละลายผสม : น้ำมันพืช (กรัม : มิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น* (Log CFU/g)	จำนวนเซลล์ที่ถูกเคลือบภายในเม็ดเจล* (Log CFU/g)	Encapsulation yield* (%)	ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเจล** (μm)
20:100	**7.26 ± 0.22**	**6.88 ± 0.05**	**94.81 ± 2.28^{a}**	**4.83 ± 1.68^{a}**
25:100	6.84 ± 0.75	5.77 ± 0.51	84.39 ±1.85^{b}	5.23 ± 1.99^{ab}
30:100	7.03 ± 0.55	5.05 ± 0.34	71.94 ± 0.77^{c}	5.72 ± 2.33^{b}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

* ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ และ ** ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเจลจากตัวอย่าง 50 เม็ด

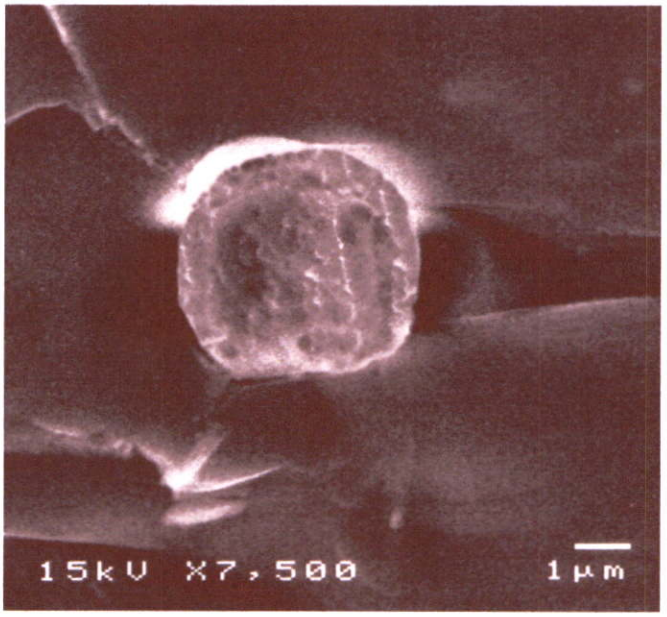
เจลผสม 25 และ 30 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร พบว่าให้ผลได้ของการเคลือบเซลล์ต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มสัดส่วนของเจลผสมทำให้ของผสมมีความหนืดเพิ่มขึ้นจึงอาจส่งผลให้เกิดอิมัลชั่นที่มีความเสถียรลดลงเมื่อใช้เวลากวนผสมเท่ากัน ดังนั้นเมื่อเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เพื่อแยกเม็ดเจลออกจึงได้เม็ดเจลตกตะกอนแยกจากเฟสน้ำมันออกมาได้น้อย ซึ่ง

สังเกตได้จากขนาดของเม็ดเจลที่ได้มีขนาดใหญ่กว่า Hansen และคณะ (2002) กล่าวว่า เม็ดเจลขนาดใหญ่ อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารในด้านเนื้อสัมผัสที่อาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้ ดังนั้นสัดส่วนระหว่างสารละลายเจลผสมบุกและเพคตินที่ 20 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร จึงเหมาะสมสำหรับการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการเคลือบเซลล์ที่ดีกว่าทั้งในแง่ของค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์ และขนาดของเม็ดเจลที่ได้ค่อนข้างเล็กที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยอาจไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารนั้น



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น ซึ่งใช้สัดส่วนของสารละลายเจลผสม 20 กรัม ต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า)

เมื่อศึกษาโครงสร้างภายนอกของเม็ดเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเม็ดเจลที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม และมีพื้นผิวภายนอกค่อนข้างขรุขระซึ่งเกิดจากรอยนูนของเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกเคลือบอยู่ภายในเม็ดเจล (Hansen *et al.*, 2002) ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบ *Lb. acidophilus* La5 ด้วยเจลบุกผสมเพคตินโดยวิธีอิมัลชั่น (ภาพจากกล้อง Cryo-SEM ที่กำลังขยาย 7,500 เท่า)

4.2.2 ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการกวนผสม (mixing time) ที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น

เนื่องจากการกวนผสมด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็วรอบสูง (11,000 รอบต่อนาที) อาจส่งผลให้เกิดแรงเฉือนที่ทำให้เซลล์บาดเจ็บได้ การทดลองนี้จึงศึกษาระยะเวลากวนผสมในขั้นตอนการเคลือบเซลล์โดยวิธีอิมัลชั่น โดยแปรระยะเวลากวนผสมเท่ากับ 30 60 90 และ 120 วินาที ที่สัดส่วนของสารละลายเจลผสมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวันเท่ากับ 20:100 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลากวนผสมเพิ่มขึ้นจาก 30 จนถึง 90 วินาที อย่างไรก็ตามค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลากวนผสมเป็น 120 วินาที ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลากวนผสมที่ 30 และ 60 วินาที ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดอิมัลชั่นที่คงตัวจึงมีจำนวนเซลล์ที่ถูกเคลือบน้อยกว่าเมื่อใช้ระยะเวลากวนผสม 90 วินาที ซึ่งให้ผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงที่สุดเท่ากับ 97.08 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลากวนผสมเป็น 120 วินาที เซลล์อาจได้รับบาดเจ็บเนื่องจากแรงเฉือน ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการเคลือบลดลง นอกจากนี้ระยะเวลากวนผสมมีผลต่อขนาดของเม็ดเจลที่ได้ กล่าวคือ เมื่อใช้เวลากวนผสมเพิ่มขึ้นขนาดของเม็ดเจลมีขนาดเล็กลงตามลำดับ โดยพบว่าที่เวลากวนผสม 120 วินาทีได้ขนาดของเม็ดเจลที่เล็กที่สุด อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Chandramouli และคณะ (2004) พบว่าขนาดของเม็ดเจลส่งผลต่อการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (ค่าพีเอชเท่ากับ 2) โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเม็ดเจลมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึง

เลือกใช้ระยะเวลากวนผสมที่ 90 วินาที ซึ่งให้ค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงที่สุดแม้ว่าจะมีขนาดเม็ดเจลใหญ่กว่าที่ 120 วินาที

ตารางที่ 4.3 ผลได้ของการเคลือบเซลล์ (% Encapsulation yield) และขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชั่นที่ระยะเวลากวนผสม (mixing time) 30 60 90 และ 120 วินาทีตามลำดับ

เวลา (วินาที)	จำนวนเซลล์เริ่มต้น* (Log CFU/g)	จำนวนเซลล์ที่ถูกเคลือบภายในเม็ดเจล* (Log CFU/g)	Encapsulation yield* (%)	ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเจล** (μm)
30	7.15 ± 0.03	6.77 ± 0.02	94.77 ± 0.13^{b}	6.03 ± 1.98^{a}
60	7.25 ± 0.24	6.94 ± 0.33	95.62 ± 1.34^{ab}	5.96 ± 1.75^{a}
90	**7.29 ± 0.02**	**7.08 ± 0.01**	**97.08 ± 0.11^{a}**	**4.97 ± 1.75^{b}**
120	7.99 ± 0.48	7.50 ± 0.07	93.74 ± 0.28^{b}	4.06 ± 1.89^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

* ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ และ ** ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเจลจากตัวอย่าง 50 เม็ด

4.3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

4.3.1 อัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม (ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์)

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* La5 ที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์ (เซลล์อิสระ) และ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากผลการทดลองพบว่าวันที่ 21 ของการเก็บรักษาจำนวนเซลล์อิสระของ *Lb. acidophilus* La5 เริ่มมีแนวโน้มลดลงจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ยังมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตไม่แตกต่างจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05) และเมื่อเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มต่อไปพบว่าเซลล์อิสระมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 56 ของการเก็บรักษา กล่าวคือ เซลล์อิสระมีจำนวนเท่ากับ 5.86 Log CFU/mL ลดลงจากวันแรก 1.7 Log CFU/mL คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 77.51 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีจำนวนรอดชีวิต

เท่ากับ 6.91 Log CFU/mL ลดลงจากวันแรกเพียง 0.7 Log CFU/mL ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 90.80 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 จำนวนเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

เวลา (วัน)	เซลล์อิสระ (Free cells) (Log CFU/mL)	เซลล์ที่ผ่านการเคลือบ (Encapsulated cells) (Log CFU/mL)
0	7.56 ± 0.01^{a}	7.61 ± 0.03^{a}
7	7.02 ± 0.13^{bcd}	7.40 ± 0.12^{ab}
14	7.31 ± 0.09^{ab}	7.04 ± 0.27^{cd}
21	7.05 ± 0.25^{bc}	7.51 ± 0.29^{a}
28	6.71 ± 0.02^{de}	7.29 ± 0.01^{abc}
35	6.81 ± 0.24^{cd}	7.13 ± 0.04^{bcd}
42	6.73 ± 0.14^{cde}	7.09 ± 0.04^{bcd}
49	6.43 ± 0.04^{e}	6.97 ± 0.01^{cd}
56	5.86 ± 0.04^{f}	6.91 ± 0.01^{d}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ

เมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า *B. lactis* BB12 ทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ที่ผ่านการเคลือบในวันที่ 7 และ 14 ของการเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มมีการเจริญเพิ่มขึ้น และตั้งแต่วันที่ 21 ของการเก็บรักษา *B. lactis* BB12 เริ่มมีการลดจำนวนลง ซึ่ง *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีปริมาณเซลล์รอดชีวิตตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่ม 56 วัน ไม่แตกต่างจากวันแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05) ในขณะที่เซลล์อิสระของ *B. lactis* BB12 มีจำนวนลดลงประมาณ 1 Log CFU/mL Larisch และคณะ (1994) กล่าวว่าขนาดของเม็ดเจลมีผลต่ออัตราการซึมผ่านเข้าออกของสารสารอาหารที่ใช้ในการเจริญ งานวิจัยนี้ขนาดของเม็ดเจลเจลบุกผสมเพคตินมีขนาดเล็กประมาณ 4-5 ไมโครเมตร ซึ่งเม็ดเจลขนาดเล็กทำให้มีการแพร่ผ่านของสารอาหารได้ใกล้เคียงกับเซลล์อิสระ จึงมีการเจริญในผลิตภัณฑ์ได้เช่นเดียวกับ *B. lactis* BB12 ในรูปเซลล์อิสระ นอกจากนี้การทดลองของ Hansen และคณะ (2002) ที่ศึกษาความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีของ Bifidobacteria จำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่า *B. lactis* BB12 มีความสามารถทนกรด (ค่าพีเอชระหว่าง 2-6) และเกลือน้ำดีได้ดีกว่าสาย

พันธุ์อื่น และเมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* และ *B. infantis* ในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ (ค่าพีเอชเท่ากับ 2-4) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า *Lb. acidophilus* ทนกรดได้น้อยกว่า *B. infantis* (Sultana *et al.*, 2000)

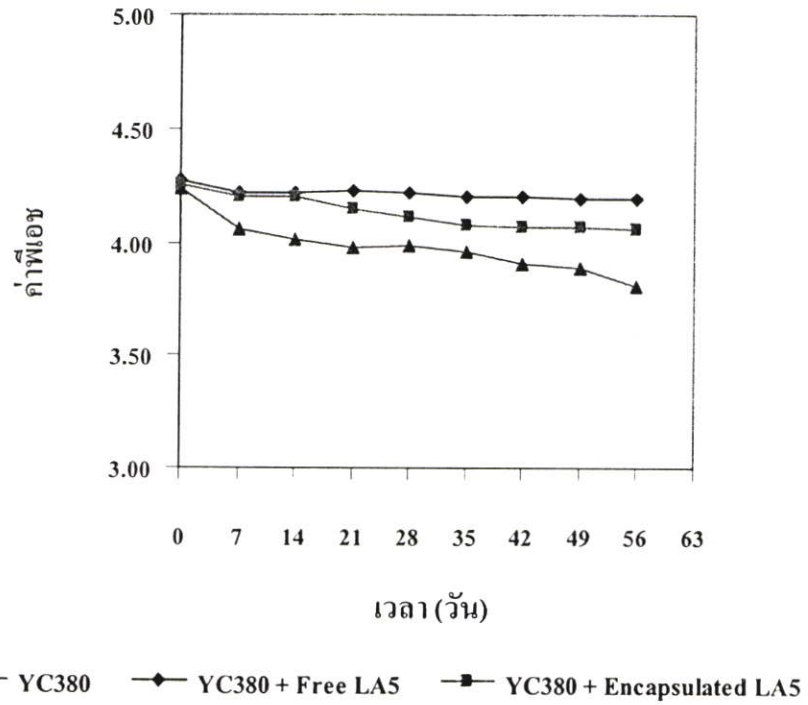
ตารางที่ 4.5 จำนวนเซลล์ *B. lactis* BB12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

เวลา (วัน)	เซลล์อิสระ (Free cells) (Log CFU/mL)	เซลล์ที่ผ่านการเคลือบ (Encapsulated cells) (Log CFU/mL)
0	8.12 ± 0.03^{ab}	8.37 ± 0.09^{a}
7	8.95 ± 0.40^{a}	9.11 ± 0.24^{a}
14	9.02 ± 0.18^{a}	9.12 ± 0.72^{a}
21	8.71 ± 0.09^{a}	8.84 ± 1.03^{a}
28	8.35 ± 1.36^{a}	8.39 ± 0.22^{a}
35	8.26 ± 0.31^{ab}	8.41 ± 0.15^{a}
42	8.12 ± 0.10^{ab}	8.29 ± 0.15^{a}
49	7.98 ± 0.13^{ab}	8.20 ± 0.12^{a}
56	7.11 ± 0.18^{b}	8.19 ± 0.12^{a}

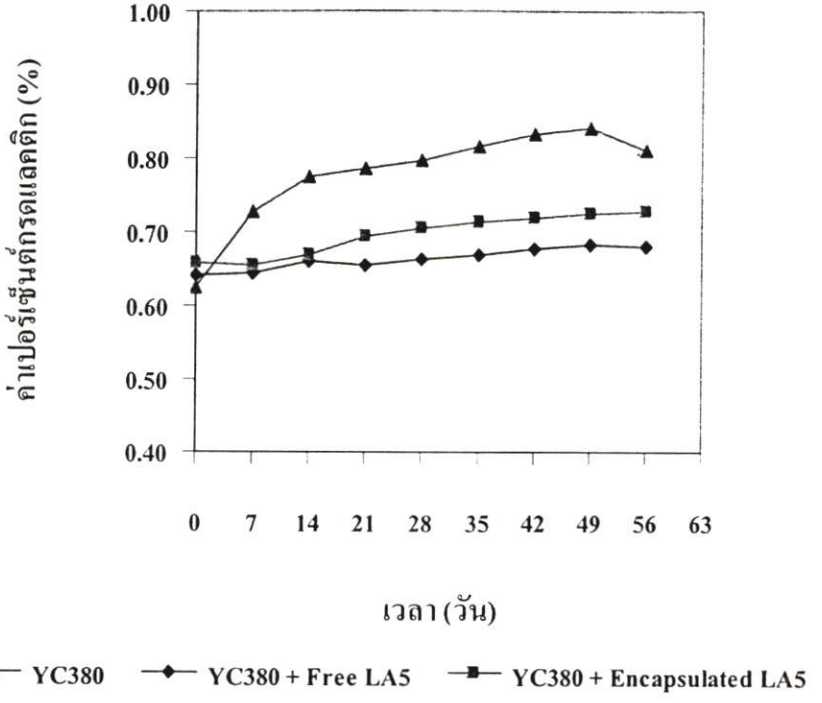
หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม ได้แก่ โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมเฉพาะจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC 380 (*Lb. bulgaricus* และ *S. thermophilus*) โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระ (YC380 + Free La5) โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ (YC380 + Encapsulated La5) พบว่าค่าพีเอชของโยเกิร์ตทั้ง 3 ชนิดมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.3 และ 4.4) โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระมีค่าพีเอชสูงกว่าและมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกน้อยกว่าโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ กล่าวคือ โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.27 และมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ 0.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 56 วันพบว่ามีค่าพีเอชเท่ากับ 4.19 และค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ 0.68 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีค่าพี

เอชลดลงจาก 4.26 เป็น 4.06 และมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.66 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.73 เปอร์เซ็นต์

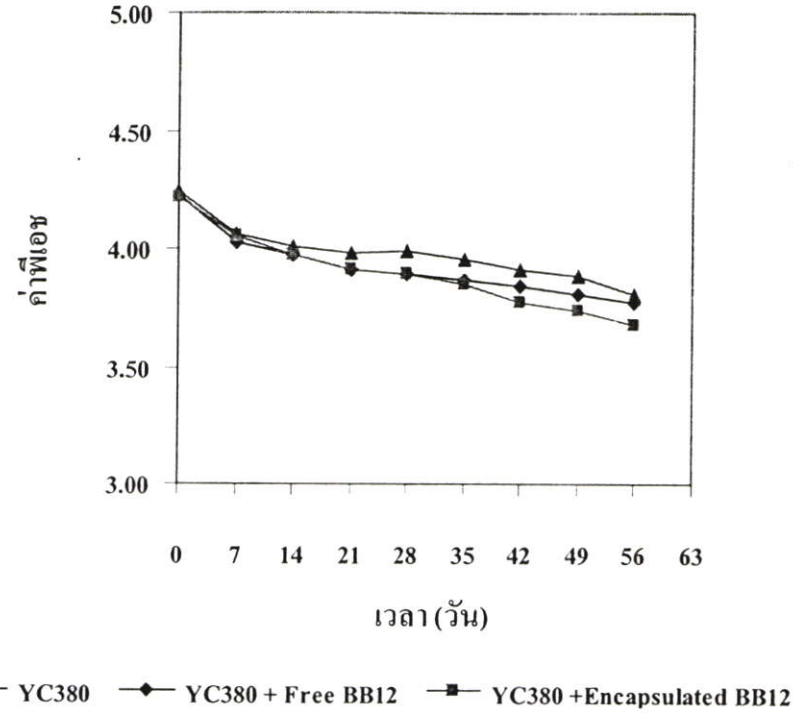


ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (-■-) ; *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระ (-◆-) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (-▲-) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

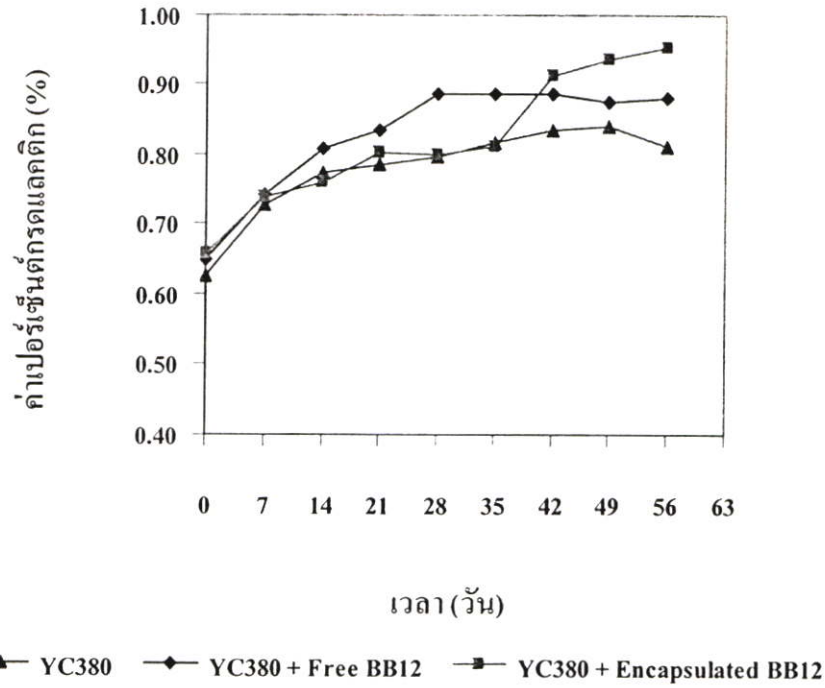
โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกแสดงในภาพที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ โดยโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระ (YC380 + Free BB12) มีค่าพีเอชลดลงจาก 4.23 เป็น 3.77 และมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.65 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.88 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ไว้ (YC380 + Encapsulated BB12) มีค่าพีเอชลดลงจาก 4.22 เป็น 3.68 และมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.66 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 56 วัน



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

การลดลงของค่าพีเอชและการเพิ่มขึ้นของค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มนี้น่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากแบคทีเรียแลคติกที่ยังมีชีวิตอยู่ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสยังคงเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส (Marshall and Tamine, 1997; Kailasapathy, 2006) โดยเอนไซม์นี้สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสที่มีในผลิตภัณฑ์ให้เป็นกรดแลคติกเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มี *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์โยเกิร์ตอาจส่งผลให้กิจกรรมของจุลินทรีย์โยเกิร์ตลดลง (Gilliland and Speck, 1977) เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ส่วนจุลินทรีย์โยเกิร์ตก็อาจผลิตสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เช่นกัน Dave และ Shah (1997) ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โยเกิร์ตและจุลินทรีย์โพรไบโอติกในระหว่างการผลิตโยเกิร์ต และการเก็บรักษาเป็นเวลา 35 วันในโยเกิร์ตที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทางการค้า (commercial starter cultures) ประกอบด้วย *Lb. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. acidophilus* และ Bifidobacteria พบว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษาโย

เกิร์ตที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มี *Lb. bulgaricus* เป็นส่วนประกอบและพบว่า Bifidobacteria สามารถทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตจาก *Lb. bulgaricus* ได้ดีกว่า *Lb. acidophilus* ดังนั้น การเจริญร่วมกันของแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์จึงอาจเป็นแบบต่อต้านกัน (antagonism) จึงทำให้โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระมีค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์และในตัวอย่างควบคุมซึ่งมีเพียงจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC 380 (ไม่เติมโพรไบโอติก)



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติม *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระพบว่ามีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ส่งผลให้มีค่าพีเอชลดลง และมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นมากกว่าในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) และ *B. lactis* BB12 ในรูปเซลล์อิสระสามารถสร้างกรดได้มากกว่าเซลล์ที่ถูกเคลือบไว้ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Kailasapathy (2006) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในโยเกิร์ตที่มี *Lb. acidophilus* DD910 และ *B. lactis* DD920 ในรูปเซลล์อิสระเปรียบเทียบกับการเติมโพรไบโอติกที่ถูกเคลือบด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดดัดแปร เพื่อเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์โยเกิร์ต พบว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งมีเพียงจุลินทรีย์โยเกิร์ต (ไม่เติมเซลล์โพรไบโอติก) มีค่าพีเอชต่ำที่สุด และโยเกิร์ตที่เติมโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีการสร้างกรดได้น้อยกว่าเซลล์อิสระ อาจเป็นไปได้ว่าโพรไบโอติกสามารถใช้สารอาหารบางชนิดหลังจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์โยเกิร์ตเพื่อการเจริญได้ (Dave and Shah, 1998) กล่าวคือ การอยู่ร่วมกันของ *B. lactis* BB12 และจุลินทรีย์โยเกิร์ตน่าจะส่งเสริมกัน (symbiosis) ซึ่งสังเกตได้จากอัตราการสร้างกรดที่สูงกว่าในตัวอย่างควบคุม ในขณะที่เซลล์ *B. lactis* BB12 ที่ถูกเคลือบไว้สามารถสร้างกรดในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้น้อยกว่าเซลล์อิสระ และมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่าเปอร์เซ็นต์กรดใกล้เคียงกับในตัวอย่างควบคุม (ที่มีเพียง YC 380) ผลการทดลองที่ได้นี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Sultana และคณะ (2000) ที่ศึกษาการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจีเนตและแป้งข้าวโพดดัดแปร พบว่าโพรไบโอติกที่ถูกเคลือบไว้มีอัตราการสร้างกรดต่ำกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ ซึ่งขนาดของเม็ดเจลมีผลต่ออัตราการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญและการสร้างกรดของโพรไบโอติก (Larisch *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 42 ถึง 56 ของการเก็บรักษา พบว่าโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โยเกิร์ตร่วมกับ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีแนวโน้มของค่าเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่เติมเซลล์อิสระ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเริ่มมีการรั่วไหลของเซลล์ *B. lactis* BB12 ออกจากเม็ดเจล (cell leakage) หรือเกิดจากการย่อยสลายของสารเคลือบบางส่วน เนื่องจากที่สภาวะดังกล่าวมีระดับพีเอชค่อนข้างต่ำ (ค่าพีเอชประมาณ 3.7-3.8) นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้เคลือบเซลล์คือเจลบุกผสมเพคตินอาจมีผลส่งเสริมกระบวนการหมักของ Lactobacilli และ Bifidobacteria (Chen *et al.*, 2006) กล่าวคือ บุกและเพคตินมีองค์ประกอบของใยอาหารที่อาจถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกเหล่านี้

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* La5 (ตารางที่ 4.4) และ *B. lactis* BB12 (ตารางที่ 4.5) ในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม แสดงให้เห็นว่าการเติมโพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระมีอัตราการรอดชีวิตลดลงมากกว่าโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ อาจเนื่องมาจากความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่มีผลโดยตรงต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเหล่านี้ Hussein และ Kebary (1999) กล่าวว่าชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์มีผลต่อความสามารถในการทนกรดในผลิตภัณฑ์ ซึ่งในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *B. lactis* BB12 สามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดได้ดีกว่า *Lb. acidophilus* La5 อย่างไรก็ตามการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินส่งผลให้เซลล์สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kailasapathy (2006) ที่ศึกษาการเคลือบเซลล์ *Lb. acidophilus*

DD910 และ *B. lactis* DD920 ด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดดัดแปร เมื่อเปรียบเทียบกับการรอดชีวิตของเซลล์อิสระ พบว่าการเคลือบเซลล์สามารถช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Adhikari และคณะ (2000) ที่พบว่า *B. longum* ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีการรอดชีวิตดีกว่าเซลล์อิสระในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แสดงว่าการเคลือบเซลล์สามารถช่วยปกป้องโพรไบโอติกจากค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ (post acidification) ได้

4.3.2 อัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* LA5 และ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ (72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที)

การพาสเจอไรซ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มมีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อน รวมถึงจุลินทรีย์โยเกิร์ตที่ยังมีชีวิตในผลิตภัณฑ์ เพื่อลดการสร้างกรดในระหว่างการเก็บรักษา (post acidification) ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิระดับพาสเจอไรซ์ (72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที) ต่ออัตราการรอดชีวิตของ *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม พบว่า *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตหลังจากผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาทีสูงกว่าเซลล์อิสระ กล่าวคือ มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 6.34 Log CFU/mL จากเริ่มต้น 7.52 Log CFU/mL ในขณะที่เซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 5.26 Log CFU/mL จากเริ่มต้น 7.68 Log CFU/mL ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และเมื่อเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 56 วัน พบว่าจำนวนเซลล์อิสระมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันแรกเหลือเพียง 3.36 Log CFU/mL ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 43.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ตามจำนวนเซลล์รอดชีวิตเริ่มลดลง (< 10^6 CFU/mL) ตั้งแต่วันที่ 42 ถึงวันที่ 56 ของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ซึ่งคิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 71.81 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ Mandal และคณะ (2006) ที่ศึกษาผลของความร้อนต่อการรอดชีวิตของ *Lb. casei* NCDC-298 ในรูปของเซลล์อิสระในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตลดลง เท่ากับ 59.78 53.59 และ 43.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 จำนวนเซลล์ *Lb. acidophilus* La5 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

เวลา (วัน)	เซลล์อิสระ (Free cells) (Log CFU/mL)	เซลล์ที่ผ่านการเคลือบ (Encapsulated cells) (Log CFU/mL)
0 (ก่อนพาสเจอไรซ์)	7.68 ± 0.34^{a}	7.52 ± 0.08^{a}
0 (หลังพาสเจอไรซ์)	5.26 ± 0.12^{b}	6.34 ± 0.13^{bc}
4	4.42 ± 1.02^{cb}	6.16 ± 0.68^{bcd}
8	4.12 ± 0.78^{cb}	6.45 ± 0.04^{b}
12	3.42 ± 0.59^{c}	6.32 ± 0.14^{bc}
16	3.27 ± 0.38^{c}	5.97 ± 0.43^{bcd}
20	2.90 ± 0.42^{c}	5.97 ± 0.58^{bcd}
24	2.90 ± 0.40^{c}	6.25 ± 0.05^{bc}
28	3.56 ± 0.34^{cb}	6.03 ± 0.32^{bcd}
35	3.99 ± 0.73^{cb}	6.30 ± 0.24^{bc}
42	3.93 ± 1.52^{cb}	5.76 ± 0.27^{bcd}
49	3.36 ± 0.76^{c}	5.59 ± 0.07^{cd}
56	3.36 ± 0.64^{c}	5.40 ± 0.14^{d}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ

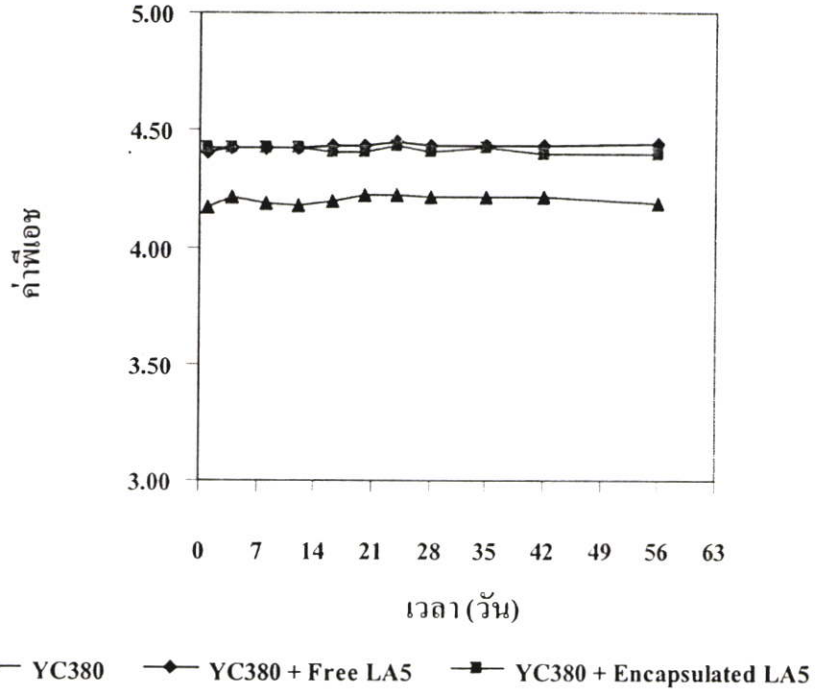
อัตราการรอดชีวิตของ *B. lactis* BB12 ในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตหลังจากพาสเจอไรซ์น้อยกว่า 1 Log CFU/mL จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.58 Log CFU/mL ในขณะที่ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตหลังจากผ่านการพาสเจอไรซ์เท่ากับ 5.00 Log CFU/mL จากจำนวนเซลล์เริ่มต้น 8.47 Log CFU/mL คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 59.03 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บรักษาโยเกิร์ตพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิตู้เย็น พบว่าเซลล์อิสระนั้นยังคงมีจำนวนน้อยกว่า 1 Log CFU/mL ส่วน *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาเก็บรักษา 20 วัน ซึ่งมีจำนวนที่รอดชีวิตเพียง 2.33 Log CFU/mL จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์อิสระถูกทำลายด้วยความร้อนจากการพาสเจอไรซ์ ในขณะที่ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์สามารถทนต่อความร้อนจากการพาสเจอไรซ์ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ที่

ยังรอดชีวิตเหล่านั้นได้รับบาดเจ็บและลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้เม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก (ประมาณ 5 ไมโครเมตร) อาจไม่เพียงพอที่จะปกป้องเซลล์ *B. lactis* BB12 จากความร้อนได้ Lee และ Heo (2000) พบว่า *B. longum* มีอัตราการตายลดลงเมื่อผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยอัลจีเนต และมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นโดยการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจีเนตและการเพิ่มขนาดของเม็ดเจล และจากผลการทดลองของ Mandal และคณะ (2006) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจีเนตเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ *Lb. casei* NCDC-298 ที่ถูกเคลือบไว้มีการรอดชีวิตสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนสามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเม็ดเจลได้น้อยกว่าเม็ดเจลของอัลจีเนตที่มีความเข้มข้นต่ำ

ตารางที่ 4.7 จำนวนเซลล์ *B. lactis* BB12 ที่รอดชีวิตในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน

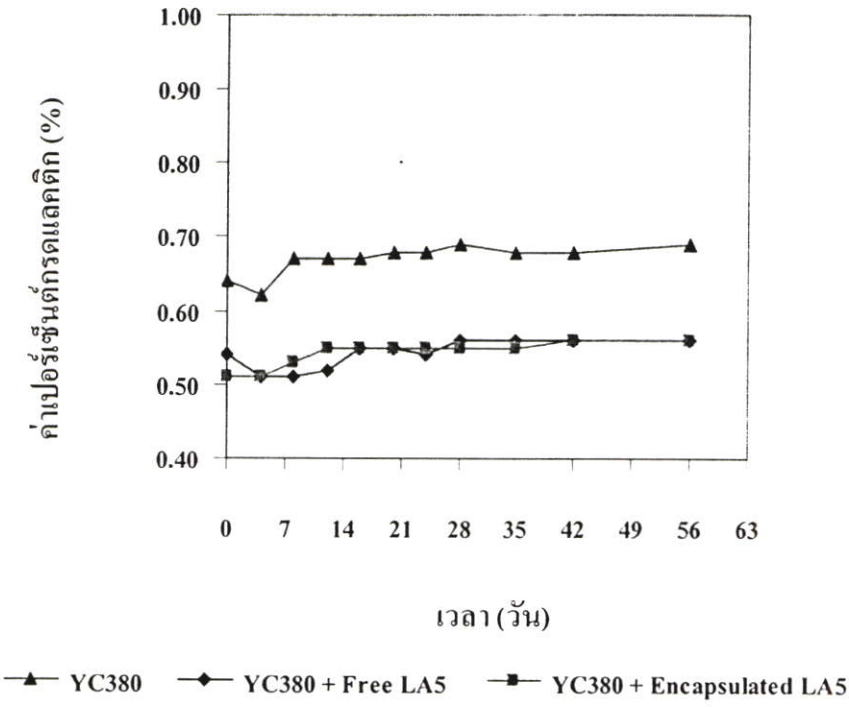
เวลา (วัน)		เซลล์อิสระ (Free cells) (Log CFU/mL)	เซลล์ที่ผ่านการเคลือบ (Encapsulated cells) (Log CFU/mL)
0	(ก่อนพาสเจอไรซ์)	8.58 ± 0.06^{a}	8.47 ± 0.21^{a}
0	(หลังพาสเจอไรซ์)	$< 1^{b}$	5.00 ± 1.41^{ab}
4		1.86 ± 1.22^{b}	4.74 ± 2.46^{ab}
8		$< 1^{b}$	3.90 ± 0.60^{b}
12		$< 1^{b}$	3.75 ± 0.80^{b}
16		$< 1^{b}$	3.58 ± 0.60^{b}
20		$< 1^{b}$	2.33 ± 1.89^{b}

หมายเหตุ : ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ

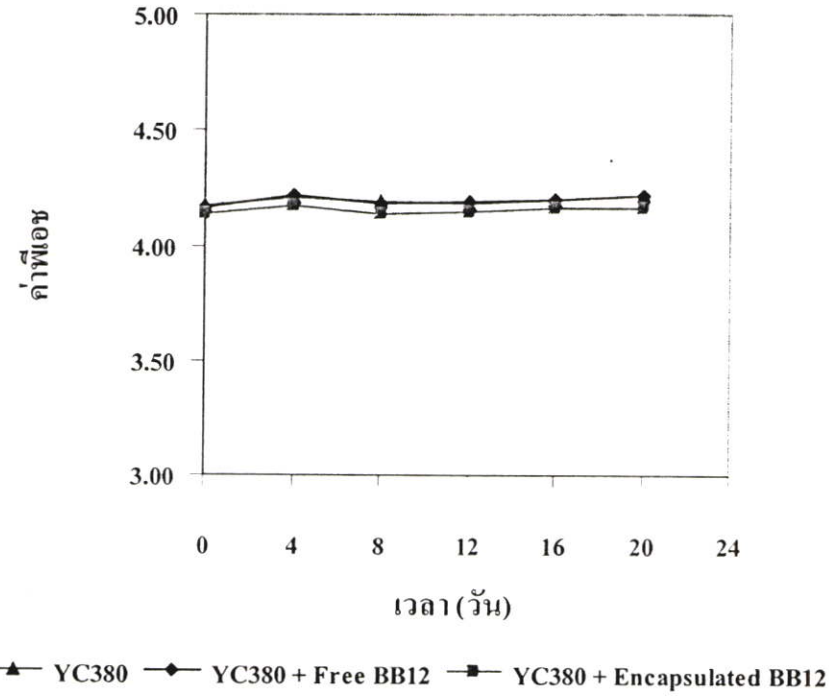


ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มหลังผ่านการพาสเจอไรซ์ที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน

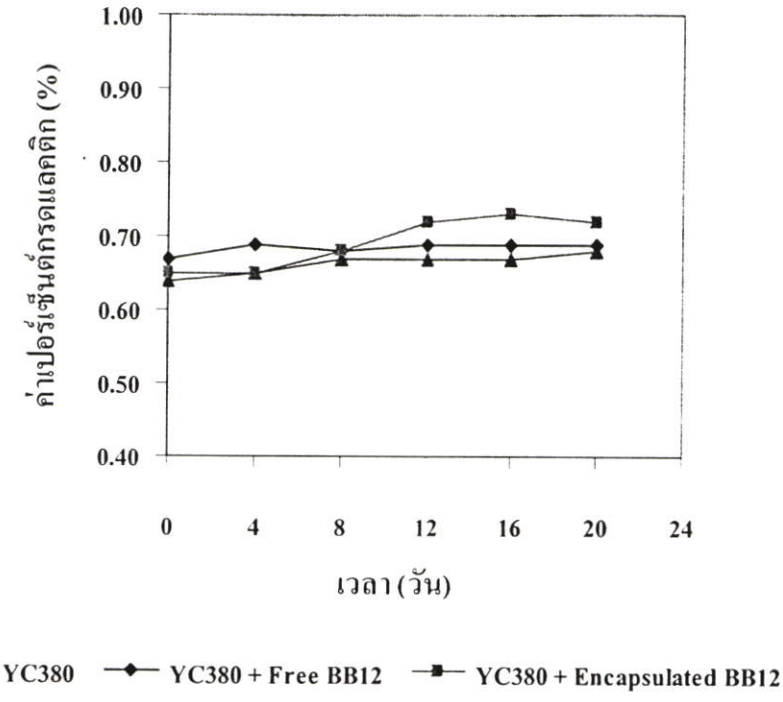
เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ พบว่าโยเกิร์ตพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ทั้งที่มี *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบเซลล์มีค่าพีเอช และค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกค่อนข้างคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา (ภาพที่ 4.7-4.10) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการพาสเจอไรซ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มส่งผลให้จุลินทรีย์โยเกิร์ตส่วนใหญ่ถูกทำลาย จึงสามารถลดการสร้างกรดในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์โยเกิร์ตที่ยังมีชีวิตรอดอยู่ในผลิตภัณฑ์อาจเจริญและสร้างกรดได้เล็กน้อย (Kailasapathy, 2006) รวมถึง *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์และรอดชีวิตหลังจากผ่านการพาสเจอไรซ์ (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มหลังผ่านการพาสเจอไรซ์ที่เติม *Lb. acidophilus* La5 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *Lb. acidophilus* La5 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 56 วัน



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มหลังผ่านการพาสเจอไรซ์ที่เติม *B. lactis* BB12ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *B. lactis* BB12ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มหลังผ่านการพาสเจอไรซ์ที่เติม *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยบุกผสมเพคติน (—■—) ; *B. lactis* BB12 ในรูปของเซลล์อิสระ (—◆—) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีจุลินทรีย์โยเกิร์ต YC380 เพียงอย่างเดียว (—▲—) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 20 วัน

4.4 ศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน

4.4.1 ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Preference Test)

ผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมโพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าผู้ชิมให้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ไม่แตกต่างจากการเติมโพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05) และมีคะแนนความชอบโดยรวมเท่ากับ 5.97 (ประมาณ 6) ซึ่งจัดอยู่ในระดับชอบปานกลาง แสดงว่าการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบเซลล์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนาดของเม็ดเจลที่เล็กมาก (ประมาณ 5 ไมโครเมตร)

และลักษณะเนื้อสัมผัสที่อ่อนนุ่มของเม็ดเจลบุกผสมเพคติน นอกจากนี้ทั้งบุกและเพคตินจัดเป็นสารที่ให้ความข้นหนืดและเพิ่มบอดี้ (body) ให้แก่ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มได้ Kailasapathy (2006) พบว่าการเติมเซลล์โพรไบโอติกที่ผ่านการเคลือบด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพดดัดแปร ในโยเกิร์ตมีลักษณะทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสไม่แตกต่างจากโยเกิร์ตที่เติมโพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระ เนื่องจากมีการสร้างสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide) ของจุลินทรีย์โยเกิร์ตและโพรไบโอติก จึงช่วยป้องกันการเกิดการซึมออกของน้ำภายในเคิร์ดโยเกิร์ต (syneresis) ช่วยปรับปรุงด้านความหนืดและเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีในปาก (mouthfeel) (Griffin *et al.*, 1996)

ตารางที่ 4.8 คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน

โยเกิร์ตพร้อมดื่ม	คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัส				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
Free cells	5.50 ± 1.11^{a}	5.43 ± 1.22^{a}	5.63 ± 1.10^{a}	5.67 ± 1.12^{a}	5.70 ± 0.88^{a}
Encapsulated cells	5.60 ± 1.04^{a}	5.70 ± 1.19^{a}	5.90 ± 1.13^{a}	5.73 ± 1.14^{a}	5.97 ± 1.03^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05)
ค่าเฉลี่ยจากจำนวนผู้ชิม 30 คน

4.4.2 ทดสอบความแตกต่างด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Difference Test)

เนื่องจากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสจากข้อ 4.4.1 เป็นการทดสอบความชอบของผู้ชิมที่มีต่อผลิตภัณฑ์ ซึ่งผู้ชิมให้การยอมรับไม่แตกต่างกันระหว่างผลิตภัณฑ์ที่เติมเซลล์ที่ไม่ผ่านการเคลือบเซลล์และเติมเซลล์ที่ผ่านการเคลือบด้วยเจลบุกผสมเพคตินแล้ว จึงทำการทดสอบความแตกต่างด้านเนื้อสัมผัสเป็นทราย (sandiness) ของผลิตภัณฑ์ควบคู่ไปด้วยโดยการให้ระดับคะแนน 1-7 (1 = ไม่มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย จนถึง 7 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมากที่สุด) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าผู้ชิมให้คะแนนเนื้อสัมผัสเป็นทรายของผลิตภัณฑ์ที่เติมโพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระ และที่ผ่านการเคลือบเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05) โดยมีระดับคะแนนประมาณ 2.5 ซึ่งหมายถึงมีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินให้เม็ดเจลที่มีขนาดเล็ก และอ่อนนุ่มจนทำให้ผู้ชิมไม่สามารถแยกความแตกต่างด้านเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตพร้อมดื่มทั้งสองได้

ตารางที่ 4.9 คะแนนความแตกต่างทางด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มที่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน

โยเกิร์ตพร้อมดื่ม	คะแนนเนื้อสัมผัสเป็นทราย (sandiness)
Free cells	2.47 ± 1.31^{a}
Encapsulated cells	2.53 ± 1.55^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05)
ค่าเฉลี่ยจากจำนวนผู้ชิม 30 คน

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากการศึกษาอัตราส่วนของบุกและเพคตินต่อความแข็งแรงของเจล เพื่อให้ได้เจลผสมที่มีความแข็งแรงที่เหมาะสมนำไปใช้เป็นสารเคลือบเซลล์โพรไบโอติก พบว่าระดับความเข้มข้นของสารละลายบุกที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเพคติน 6 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดเท่ากับ 34 กรัม

5.1.2 จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยวิธีอิมัลชั่น พบว่าสัดส่วนของสารละลายเจลผสมของบุกและเพคตินในปริมาณ 20 กรัมต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวัน 100 มิลลิลิตร ให้ค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงกว่าที่อัตราส่วน 25:100 และ 30:100 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อใช้ระยะเวลากวนผสม 90 วินาที ที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที ให้ค่าผลได้ของการเคลือบเซลล์สูงกว่าที่ระยะเวลากวนผสมที่ 30 60 และ 120 วินาที และให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดเจลประมาณ 5 ไมโครเมตร

5.1.3 การเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยเจลบุกผสมเพคติน สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในสภาวะที่เป็นกรดในโยเกิร์ตพร้อมดื่ม ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5 ± 2 องศาเซลเซียส) ได้ดีกว่ากรณีของเซลล์อิสระและเมื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ (อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที) พบว่า *Lb. acidophilus* La5 และ *B. lactis* BB12 ที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากผ่านการพาสเจอไรซ์ เท่ากับ 84.31 เปอร์เซ็นต์ และ 59.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์อิสระมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 68.49 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่า 11.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคตินสามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติกจากความร้อนระดับพาสเจอไรซ์ได้ระดับหนึ่ง

5.1.4 การพาสเจอไรซ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มสามารถลดการเกิด post acidification ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่มได้

5.1.5 จากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสที่มีต่อโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปของเซลล์อิสระและที่ผ่านการเคลือบเซลล์ด้วยเจลบุกผสมเพคติน พบว่าผู้ชิมให้การยอมรับด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบรวม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05) อีกทั้งไม่มีความแตกต่างกันในด้านของเนื้อสัมผัสเป็นทราย (sandiness) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p 0.05)

5.2 ข้อเสนอแนะ

- ควรมีการปรับปรุงวิธีการในการเคลือบเซลล์ให้มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ เพื่อให้สามารถปกป้องเซลล์ได้ดีขึ้น
- ควรศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร และศึกษาในผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกจากผลิตภัณฑ์นมเพื่อเป็นการพัฒนาอาหารโพรไบโอติก

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี ชาวนา. 2546. แยมแครอทจากกลูโคแมนแนน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

จารุวรรณ ธนธนานนท์. 2547. การเติมพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม.

บุปผา เตชะภัทรพร. 2535. การสกัดผงบุกจากหัวบุก และการเตรียมผลิตภัณฑ์เจล.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วันชัย จุลสุคนธ์. 2537. หัวบุกอาหารลดความอ้วนที่คนไทยไม่รู้จัก. Good Life. 2 (มีนาคม) : 42-46.

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด. 2549. เทคโนโลยีไมโครเอนแคปซูเลชั่นเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและควบคุมการปลดปล่อยจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารและระบบทางเดินอาหารของมนุษย์. วารสารในวาระครบรอบ 25 ปี คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 71-77.

สุวศรี เตชะภาส. 2542. บุก *Amorphophalus* sp. *[บทวิทยุออกอากาศทางสถานีวิทยุกระจายเสียงแห่งประเทศไทย]*. 23 มีนาคม 2542.

หรรษา จักรพันธ์ ณ อยุธยา. 2527. ความรู้เรื่องบุก. กรุงเทพมหานคร : กรมวิชาการเกษตร.

อดิศักดิ์ เอกโสวรรณ. 2538. แป้งบุก : การผลิต สมบัติบางประการและการนำไปใช้ประโยชน์. วารสารอาหาร, 25(4), 238-242.

Adhikari, K., Mustapha, A. and Grun, I.U. 2003. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yoghurt. *Journal of Food Science*, 68, 275-280.

Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I.U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal Dairy Science*, 83, 1946-1951.

Anon. 1994. Method of analysis for identification of *L. acidophilus* and Bifidobacteria (A medium for differentiating between *L. acidophilus*, Bifidobacteria and *S. thermophilus* in ABT products). Chr Hansen's Laboratorium, Copenhagen.

Aydin, G.M. and Akbuga, A.H. 1996. Preparation and evaluation of pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics*, 137, 133-136.

Ballongue, J., 1993, Bifidobacteria and probiotic action, *In Lactic acid bacteria*, Salminen, S. and Wright, A.V. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 357-432.

Baron, M., Roy, D. and Vuillemard, J.C. 2000. Biochemical characteristic of fermented milk produced by mixed cultures of lactic starters and bifidobacteria. Le Lait, 80, 465-478.

Birollo, G.A., Reinheimer, J.A. and Vinderola, C.G. 2000. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33, 799-805.

Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B. and Reinheimer, J.A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses : challenges and rewards. *International Dairy of Journal*, 14, 375-387.

Chourasia, M.K. and Jain, S.K. 2003. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Phamaceutical Science*, 6, 33-66.

Champagne, C.P. and Gardner, N.J. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Food Science*, 45, 61-84.

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, 27-35.

Chen, H.L., Cheng, H.C., Liu, Y.J., Liu, S.Y. and Wu, W.T. 2006. Konjac acts as a natural laxative by increasing stool bulk and improving colonic ecology in healthy adults. *Nutrition*, 22, 1112-1119.

Dale, H. 2001. Microbial threats Lactobacillus. *International Food Hygiene*. 13, 29.

Dave, R.I. and Shah, N.P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of Streptococcus, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79, 1529-1536.

Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter culture. *International Dairy of Journal*, 7, 31-41.

Dave, R.I. and Shah, N.P. 1998. Ingredients supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 2804-2816.

Davidson, R.H., Duncan, S.E., Hackney, C.R., Eigel, W.N. and Boling, J.W. 2000. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yoghurt characteristics. *Journal of Dairy Science*, 83, 666-673.

Desai, K.G.H. 2005. Preparation and characteristic of high-amylose corn starch/pectin blend microparticles : A Technical Note. *AAPS Pharmaceutics Technology*, 6(2), 202-208.

Dickinson, E. 1991. Food polymer, gels and colloids. United Kingdom : Dorset Press.

Dinaker, P. and Mistry, V.V. 1994. Growth and viability of *Bifidobacterium longum* in cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 77, 2854-2864.

Doleyres, Y. and Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy of Journal,* 15, 973-988.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-378.

Fuller, R. 1992. Probiotics : the scientific basis. Chapman & Hall, London.

Gilliland, S.E. 1989. Acidophilus milk products : A review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72, 2483-2494.

Gilliland, S.E., Reilly, S.S., Kim, G.B. and Kim, H.S. 2002. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yoghurt-like product. *Journal of Food Science*, 67, 3091-3095.

Gilliland, S.E and Speck, M.L. 1977. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *Journal of Dairy Science*, 60, 1394-1398.

Gilliland, S.E and Walker, D.E. 1990. Factors to consider when selecting a culture of *L. acidophilus* as a dietary adjunct to produce hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73, 905-911.

Godward, G. and Kailasapathy, K. 2003. Viability and survival of free, encapsulated and co-encapsulated probiotic bacteria in ice cream. *Milchwissenschaft*, 58, 161-164.

Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. 1984. The effect of oral administration of *Lactobacillus* sp. and antibiotics on intestinal bacteria activity and chemical induction of lage bowel tumor, 139-144.

Griffin, A. M., Morris, V. J. and Gasson, M. J. 1996. The cps ABCDE genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* strain NCBF 2393. *Gene*, 183, 23–27.

Hansen, L.T., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.L. and Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45.

Hekmat, S. and McMahon, D.J. 1992. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Food Science*, 75, 1415-1422.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J. and Schilinger, U. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of food Microbiology*, 41, 85-101.

Homma, N. 1988. Bifidobacteria as a resistance factor in human being Up, 35-43. Cited J. Ballongue. 1993. Bifidobacteria and probiotic action, 357-428. In Salminen, S. and Wright, A.V., eds. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York.

Hou, R.C.W., Lin, M.Y., Wang, M.M.C. and Tzen, J.T.C. 2003. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *Journal of Dairy Science*, 86, 424-428.

Huang, H.Y. and Lin, K.W. 2004. Influence of pH and added gums on the properties of konjac flour gels. *International Journal of food Science and Technology*, 39, 1009-1016.

Hussein, S.A. and Kebary, K.M.K. 1999. Improving viability of bifidobacteria by microentrapment and their effect on some pathogenic bacteria in stirred yoghurt. *Acta. Alimentaria*, 28, 113-131.

Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria : research and development in Japan. *Food Technology*, 47, 126-136.

Jasper, D.A., Massey, L.K. and Leudecke, L.O. 1984. Effect of consuming yoghurts prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. *Journal of Food Science*, 49, 1178-1181.

Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT* , 39, 1221-1227.

Kailasapathy, K. and Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immuno Cell Biology, 78, 80-88.

Kailasapathy, K. and Rybka, S. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Austraria Journal of Dairy Technology*, 52, 28-35.

Kim, T.H., Park, Y. H., Kim, K.J. and Cho, C.S. 2003. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 371-383.

Klaver, F. A. M., Kingma, F. and Weerkamp, A.H. 1993. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 151-164.

Klaver, F.A.M., and Meer, R.V.D. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol*, 59, 1120-1124.

Khalil, A.H. and Mansour, E.H. 1998. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, 63, 702-705.

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

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737-743.

Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. 1995. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. Cult. Dairy. Prod. J., 30, 2-7.

Lankaputhra, W.E.V. and Shah, N.P. 1998. Adherence of probiotic bacteria to human colonies cells. Biology Science Microflora, 17, 105-113.

Larisch, B.C., Poncelet, D., Champagne, C.P. and Neufeld, R.J. 1994. Microencapsulation of *L. lactis subsp. cremoris*. *Journal of Microencapsulation*, 11, 189-193.

Law, B.A. 1997. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London.

Lee, K.Y. and Heo, T.R. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate bead in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869-873.

Lian, W.C., Hsiao, H.C. and Chou, C.C. 2003. Viability of microencapsulated Bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food microbiology*, 86, 293-301.

Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotic : growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

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

Mann, G.V. and Spoerry, A. 1974. Studied of a surfactant and cholesterolemia in the Messai. *America Journal of Clinic Nutrional*, 27, 464-469.

Marshall, V.M. and Tamine, A.Y. 1997. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. *International Dairy Journal*, 50, 35-39.

Martin, J.H. and Chou, K.M. 1992. Selection of *Bifidobacterium ssp.* for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods I. Tolerance to pH of yoghurt. *Cultured Dairy Products*, 27, 21-26.

Medina, L.M. and Jordano, R. 1994. Survival of constitutive microflora in commercially

fermentated milk containing Bifidobacteria during refrigerated storage. *Journal of Food Protein*, 56, 731-733.

Meer, G., Meer, W.A. and Tinker, J. 1975. Water-soluble gums. *Food Technology*, 29. 22-30.

Modler, H.W., McKellar, R.C. and Yaguchii, M. 1990. Bifidobacteria and Bifidogenic factors, 29-41. Cited by Ballonge, J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action, 357-428. In Salminen, S. and Wright, A.V., eds. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York.

Morohashi, T. 2002. Dietary fructooligosaccharides prevent a reduction of cortical and trabecular bone following total gastrectomy in rats. *Journal of Pharmacology*. 82, 54-88.

Morris, E.R. 1979. Polysaccharides structure and conformation in solutions and gels. In J.M.V. Blanshard and Mitchell, J.R. (eds.), *Polysaccharide in Food*. London : Butterworths. 185-204.

Mullan, W.M.A. 2001. Probiotic bacteria. Available Source : http://www.dairyscience.info/probiotics.htm, November 30, 2003.

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.

Nozaki, H. and Sakurai, S. 1992. Jelly resembling the flesh of fruit. *United States Patent*, 5,089,285.

Nussinovitch, A. 2004. Encapsulating liquid with hydrocolloid membrane stable from about-20 to 90OC without bursting. *United States Patent*, 6,680,184.

Onwnlata, C.I., Ramkisham, R.D. and Vankineni, P. 1989. Relative efficiency of yoghurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk and a commercial tablet in alleviating lactose maldigestion. *America Journal of Clinic Nutrional*, 49, 1233-1237.

Orrhage, K., Sillerstrom, E., Gustafsson, J.A., Nord, C.E. and Rafters, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. Mutation Res, 311: 239-248.

Ouwehand, A.C. and Salminen, S. 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 380, 4-19.

Parker, R.B. 1974. Probiotic, the other helf of the antibiotic story. *Animal Nutrition and health*, 29, 4-8.

Perols, C., Piffaut, B., Scher, J., Ramet, J.P. and Poncelet, D. 1997. The potential of enzyme entrapment in konjac cold-melting gel beads. *Enzyme and Microbial Technology*,20, 57-60.

Picot , A. and Lacroix, C. 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy of Journal*, 14, 505-515.

Precott, L.M., Harley, J.P. and Donald, A.K. 2002. Microbiology. 5th ed. McGraw-Hill, New York.

Puupponen-Pimia, R., Aura, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Myllarinen, P., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. and Poutanen, K. 2002. Development of functional ingredienta for gut health. *Trend Food Science Technology*, 13, 3-11.

Rao, A.V., Shiwnarain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum*. in simulated gastric and intestinal juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22, 345-349.

Rao, D.R., Chawan, C.B. and Pulusani, S.R. 1981. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. *Journal of Food Science*, 49, 1339-1341.

Ravula, R.R. and Shah, N.P. 1998. Viability of probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Food Australia*n, 50, 136-139.

Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. 1983. Antitumer activity of yoghurt components. *Journal of Food Protein*, 46, 8-12.

Rolin, C. 1993. Pectin. In : Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), Industrail Gums : Polysaccharides and Their Derivatives.Acedemic Press, Newyork, 257-293.

Salminen, S. and Playne, M. 2001. Probiotics. *The world food ingredients*. January, 33-35.

Samona, A. and Robinson, R.K. 1994. Effect of yoghurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 47, 58-60.

Scardovi, V. 1986. Genus Bifidobacterium. In : Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed.). Baltimore : Williams and Wilkinson Publishing. 1418-1434.

Schiffrin, E.J., Rochat, H.Link-Amster., Aeschlimann, J.M. and Donnet-Hughes, A. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of LAB. *Journal of Dairy Science*, 78, 491-497.

Schol, H.A. and Voragen, A.G.J. 1996. Complex pectin structure elucidation using enzymes. In : visser,J., Voragen, A.G.J. (EDS.), progress in Biotechnology : Pectin and Pectinases. Elsevier Amsterdum, 14, 3-19.

Shah, N.P. 1999. Probiotic bacteria : antimicrobial and antimutagenic properties. *Probiotica*, 6, 1-3.

Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55, 46-53.

Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V., Britz, M. and Kyle, W.S. 1995. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5, 515-521.

Shah, N.P. and Ravula, R.R. 2000. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yoghurt and probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 127-131.

Shelso, G.J. 1990. Commercialization of new synergistic applications of carrageenan. In Phillips, G.O., Wedlock, P.I. and Williams, P.A. (eds.), *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, 5, 563-570. Oxford : P.A. IRL.

Sheu, T.Y., Marshall, R.T. and Heymann, H. 1993. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1902-1907.

Sriamornsak, P. and Nunthanid, J. 1998. Calcium pectinate gel beads for controlled drug delivery : in preparation and in-vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 160, 207-212.

Sriamornsak, P., Thirawong, N. and Puttipipatkhachorn, S. 2004. Morphology and buoyancy of oilentrapped calcium pectinate gel beads. *AAPP Pharmaceutics of Science Technology Journal*, 6(3), 1-7.

Sriamornsak, P., Thirawong, N. and Puttipipatkhachorn, S. 2005. Emulsion gel beads of calcium pectinate capable of floating on the gastric fluid : effect of some additives, hardening agent or coating on release behavior of methanizole. *European Journal of Phamaceutical Science*, 24, 363-373.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. 1998. Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8, 491-496.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B. and Ross, R.P. 2001. Market potential for probiotics. America Journal of Clinic Nutritional, 73, 476s-483s.

Sugiyama, N. and Shimahara, H. 1976. Konjac mannan. *United States Patent*, 3,973,008.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55.

Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. 1999. Yoghurt : Science and Technology. 2nd ed. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge.

Thomas, W.R. 1997. konjac gum. In : Thickening and gelling agents for food (edited by A.Imeson). *London : Blackie Acedemic and Professional*, 169-179.

Tye, R.J. 1991. Konjac flour : Properties and applications. *Food Technology*, 45, 82-92.

Vernan, A.H. and Sutherland, J.P. 1994. Milk and milk products technology, chemistry and microbiology. 1st ed. Chapman & Hall, London.

Wang, K. and He, Z. 2002. Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 244, 117-126.

Williams, P.A., Clegg, S.M., Langdon, M.J., Nishinari, K. and Phillips, G.O. 1992. Gums and Stabilisers for the Food Industry, 6. Oxford : P.A.IRL.

Wood, B.J.B. 1998. Microbiology of fermented foods V1. 2nd ed. International Thompson Publishing, London.

"ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *L. acidophilus*" {ออนไลน์วันที่ 26 กันยายน 2549}. เข้าถึงได้จาก : http://www.theralac.com/Images/acidophilus.gif

"ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Bifidobacteria" {ออนไลน์วันที่ 26 กันยายน 2549}. เข้าถึงได้จาก : http://www.csa.com/.../probiotic/images/bifido.jpg

"ลักษณะโครงสร้างของกลูโคแมนแนน" {ออนไลน์วันที่ 14 เมษายน 2550}. เข้าถึงได้จาก : http://www.glucomannan.com/index.htm

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรด (AOAC 947.05, 2000)

1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นที่แน่นอน (standardize) ด้วยสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมฟะทาเลต(potassium phthalate, $KHC_8H_4O_4$)

วิธีหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำโดย

1) ละลายโพแทสเซียมฟะทาเลตที่ผ่านการอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ปริมาณ 0.6000 – 0.7000 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และใส่ในขวดรูปชมพู่

2) หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolpthalein) 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโพแทสเซียมฟะทาเลตจำนวน 2 หยด

3) นำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่บรรจุอยู่ในบิวเรตจนกระทั่งสารละลายทำปฏิกิริยาเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูอ่อนที่คงตัวแสดงว่าถึงจุดยุติ (พีเอช 8.3) บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนดังสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)} = \frac{\text{จำนวนกรัมโพแทสเซียมฟะทาเลต} \times 1000}{\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มล.)} \times 204.229^*}$$

* มวลโมเลกุลของโพแทสเซียมฟะทาเลต เท่ากับ 204.229

1.2 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดของโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

ปิเปตตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่ม 5 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติ (พีเอช 8.3) บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

$$\text{ค่าความเป็นกรด (\%)} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล) x ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.) x 90.08**x 10}}{\text{(1000) x (ปริมาตรของสารละลายอาหารตัวอย่าง)}}$$

** มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแลคติก เท่ากับ 90.08

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. การวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Lb. acidophilus* La5

การเตรียม อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS – IM Agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-Potassium Hydrogen Phosphate	2.6	กรัม
Sodium acetate, $3H_2O$	5	กรัม
Di-Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Manganese (II) – sulphate.H_2O	0.05	กรัม
Magnesium sulphate.$7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	13	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มจนได้สารละลายใส ระวังอย่าให้วุ้นจับตัวเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

มอลโตส	20	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

นำสารละลายมอลโตสที่เตรียมได้มากรองด้วยฟิลเตอร์ (filter) 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Sterilize by filtration) เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร MRS – IM Agar ที่ประกอบด้วยสารละลายมอลโตส

นำอาหาร MRS – IM Agar 1000 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้มาทำให้ละลาย แล้วรอให้อุณหภูมิประมาณ 47 องศาเซลเซียส จึงเติมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ลงไปปริมาตร 100 มิลลิลิตร

การตรวจนับจำนวน *Lb. acidophilus* La5

เตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นผสม (stomacher) นาน 6 นาที เพื่อให้เซลล์ *Lb. acidophilus* ภายในเจลบีดส์ออกมาจึงทำให้เจือจาง (dilution) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}–10^{-6} ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS – IM Agar แล้ว spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะมีอากาศเพียงเล็กน้อย (บ่มด้วย Modified candle jar) และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อเฉพาะจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor x 1 mL}}{\text{0.1 mL}}$$

2. การวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *B. lactis* BB12

อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS-IM agar ที่ประกอบไปด้วยสารละลายกลูโคส สารละลาย Dichloxallin สารละลาย LiCl และสารละลาย Cysteine hydrochloride

การเตรียม MRS-IM agar

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-Potassium Hydrogen Phosphate	2.6	กรัม
Sodium acetate, $3H_2O$	5	กรัม
Di-Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Manganese (II) – sulphate.H_2O	0.05	กรัม
Magnesium sulphate.$7H_2O$	0.2	กรัม
Agar	13	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มจนได้สารละลายใส ระวังอย่าให้วุ้นจับตัวกันเป็นก้อน ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บใส่ภาชนะแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

กลูโคส	20	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมได้มากรองด้วยฟิลเตอร์ (filter) 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย A

Dichloxallin	10	มิลลิกรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A ที่เตรียมได้มากรองด้วยฟิลเตอร์ (filter) 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย B

LiCl	2	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

นำสารละลาย B ที่เตรียมได้มากรองด้วยฟิลเตอร์ (filter) 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย C

Cysteine hydrochloride	10	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

นำสารละลาย C ที่เตรียมได้มาทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 - 5 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Modified MRS-IM Agar ที่มีสารละลายกลูโคส และสารละลาย A, B และ C

นำอาหาร Modified MRS-IM 1000 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) มาทำให้ละลาย แล้วรอให้อุณหภูมิประมาณ 47 องศาเซลเซียส จึงจะเติมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย B ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

การตรวจนับจำนวน *B. lactis* BB12

เตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตพร้อมดื่มที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นผสม (stomacher) นาน 6 นาที เพื่อให้เซลล์ภายในเม็ดเจลออกมาจึงทำให้เจือจาง (dilution) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}–10^{-6} ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นเหมาะสม จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงบนจานเลี้ยงเชื้อก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS – IM Agar จากนั้นทำการ pour plate ทิ้งให้อาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ (บ่มด้วย Anaerobic jar) และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อเฉพาะจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor}}{\text{1 mL}}$$

3. สารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งนำเปปโตน 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกรอง 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

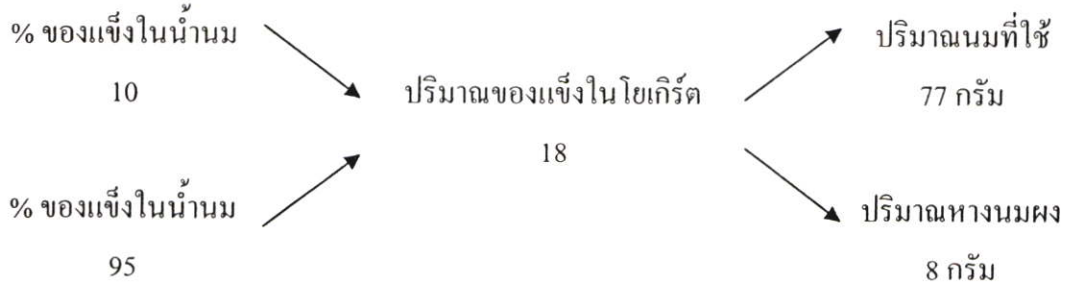
การคำนวณสูตรโยเกิร์ตและน้ำเชื่อม

การคำนวณสูตรโยเกิร์ตและน้ำเชื่อม

1. การคำนวณสัดส่วนของหางนมผงที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต

จากการหาปริมาณของแข็งทั้งหมดของนมพร่องมันเนย (ตราโฟรโมสต์) พบว่ามีปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ และหางนมผงมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ต้องการให้ปริมาณของแข็งในโยเกิร์ตเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาหาปริมาณสัดส่วนระหว่างน้ำนมและหางนมผงโดยใช้หลักการของ Pearson's squar ดังนี้

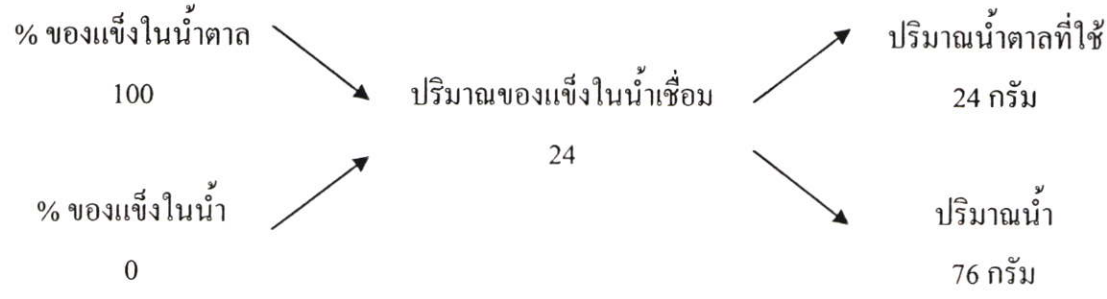
คำนวณสัดส่วนโยเกิร์ตดังนี้



ส่วนผสมทั้งหมด	77 + 8 = 85 กรัม	ต้องใช้นม	77 กรัม
ถ้าส่วนผสมทั้งหมด	1000 กรัม	ต้องใช้นม	$\frac{77 \times 1000}{85}$ = 905.88 กรัม

ดังนั้นเตรียมโยเกิร์ต 1,000 กรัม ใช้ปริมาณนม 905.88 กรัม และใช้ปริมาณหางนมผง
เท่ากับ 1000 – 905.88 = 94.12 กรัม

2. การเตรียมน้ำเชื่อมความเข้มข้น 24 องศาบริกซ์ (^{O}Brix)



ส่วนผสมทั้งหมด 24 + 76 = 100 กรัม ต้องใช้น้ำ 76 กรัม

ถ้าส่วนผสมทั้งหมด 1000 กรัม ต้องใช้น้ำ $\frac{76 \times 1000}{100} = 760$ กรัม

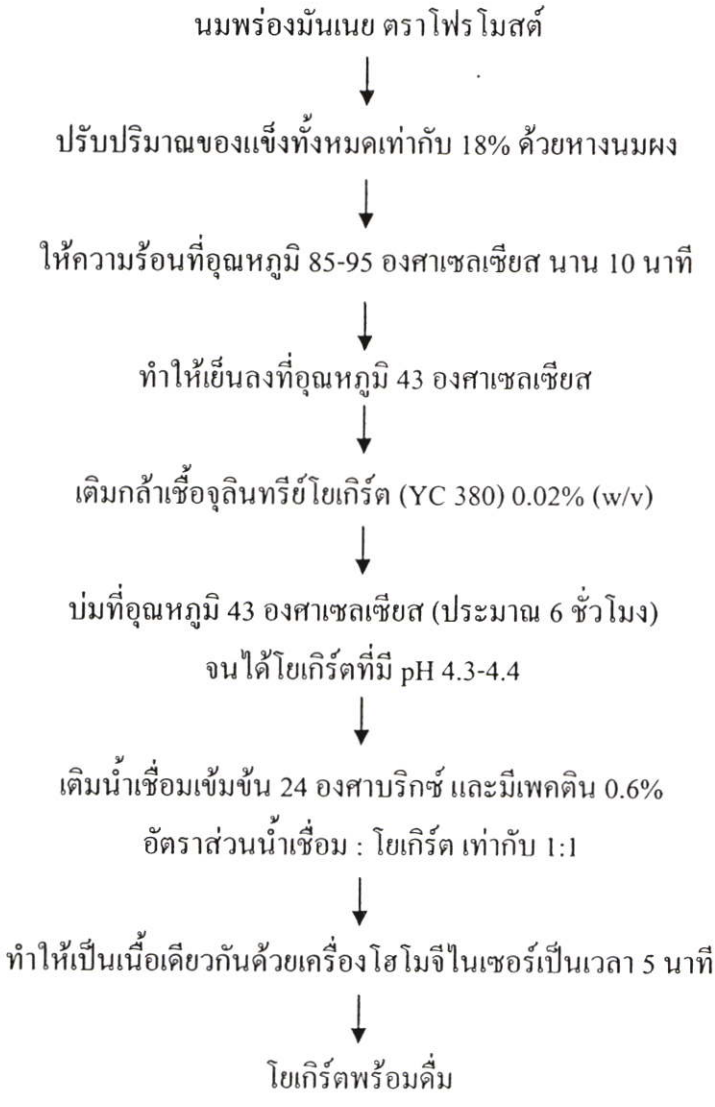
ดังนั้นเตรียมโยเกิร์ต 1,000 กรัม ใช้ปริมาณน้ำ 760 กรัม และใช้ปริมาณน้ำตาล เท่ากับ 1000 – 760 = 240 กรัม

3. เตรียมสารละลายเพคตินความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเพคติน 6 กรัม เติมลงในน้ำเชื่อม 1000 กรัม

หมายเหตุ : ควรผสมเพคตินพร้อมน้ำตาลทรายก่อน แล้วจึงค่อยเติมลงในน้ำ เพื่อป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเพคติน

4. ขั้นตอนการเตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่ม



ภาพที่ ค.1 แผนภาพขั้นตอนการเตรียมโยเกิร์ตพร้อมดื่ม

ภาคผนวก ง

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตพร้อมดื่ม (Drinking yoghurt)

ชื่อ.....วันที่.....

1. กรุณาทดสอบผลิตภัณฑ์จากซ้ายไปขวา โดยทดสอบลักษณะต่างๆ ตามที่กำหนด และให้คะแนนตามระดับความชอบ ดังนี้ :

7 = ชอบมาก
6 = ชอบปานกลาง
5 = ชอบเล็กน้อย
4 = เฉย ๆ
3 = ไม่ชอบเล็กน้อย
2 = ไม่ชอบปานกลาง
1 = ไม่ชอบมาก

* กรุณาบ้วนปากหลังชิม

รหัสตัวอย่าง	_____	_____
สี	_____	_____
กลิ่น	_____	_____
รส	_____	_____
เนื้อสัมผัส	_____	_____
ความชอบโดยรวม	_____	_____

2. ทดสอบลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย (Sandiness) ของผลิตภัณฑ์ และให้คะแนนดังนี้

7 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมากที่สุด
6 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมากปานกลาง
5 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายมาก
4 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายปานกลาง
3 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายน้อย
2 = มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทรายน้อยมาก
1 = ไม่มีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย

รหัสตัวอย่าง	_____	_____
ลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นทราย	_____	_____

ข้อเสนอแนะ.....

ภาคผนวก จ

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนมเปรี้ยว

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนมเปรี้ยว

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 3209 (พ.ศ. 2547)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

นมเปรี้ยว

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ ครอบคลุมนมเปรี้ยวทุกประเภท อาจมีการปรุงแต่ง กลิ่นรส สี และผ่านความร้อนหลังการหมักบ่มหรือไม่ก็ได้

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 นมเปรี้ยว (fermented milk) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมและ/หรือผลิตภัณฑ์นมซึ่งเกิดจากการหมักบ่มด้วยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกรดแล็กติกเป็นหลัก เช่น แล็กโตบาซิลลัส เดลบรูคิอิ ซับส์ บัลการิคัส *(Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus)* สเตรปโตค็อกคัส เทอร์โมฟิลัส *(Streptococcus thermophilus)* ไบฟิโดแบคทีเรียม *(Bifidobacterium)* แล็กโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส *(Lactobacillus acidophilus)* และ/หรือจุลินทรีย์อื่นที่ใช้ในการผลิตนมเปรี้ยว ทั้งนี้จะมีจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตคงเหลืออยู่หรือไม่ก็ได้

2.2 โยเกิร์ต (yoghurt) หมายถึง นมเปรี้ยวตามข้อ 2.1 ซึ่งมีจุลินทรีย์ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตคงเหลืออยู่

2.3 โยเกิร์ตปรุงแต่ง (flavoured yoghurt or composite fermented milk) หมายถึงโยเกิร์ตตามข้อ 2.2 ที่ผ่านการปรุงแต่งกลิ่นรส สี หรือวัตถุอื่นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น ผลไม้ แยม เป็นต้น ซึ่งอาจแยกชั้นในภาชนะบรรจุ (set yoghurt) หรือผสมรวมเข้าด้วยกัน (stirred yoghurt) และมีจุลินทรีย์ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตคงเหลืออยู่

2.4 นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (fermented milk drink or drinking yoghurt) หมายถึง นมเปรี้ยวตามข้อ 2.1 ที่ผ่านการเจือจางและปรุงแต่งกลิ่นรส สี หรือวัตถุอื่นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง เป็นต้นสำหรับดื่มโดยตรง และมีจุลินทรีย์ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตคงเหลืออยู่

2.5 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ (pasteurized fermented milk drink or pasteurized drinking yoghurt) หมายถึงนมเปรี้ยวพร้อมดื่มตามข้อ 2.4 ที่ผ่านการทำลายจุลินทรีย์ ด้วยความร้อนโดยกระบวนการพาสเจอไรซ์ และมีจุลินทรีย์ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตจำนวนหนึ่ง

2.6 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยู เอช ที (UHT fermented milk drink or UHT drinking yoghurt) หมายถึง นมเปรี้ยวพร้อมดื่มตามข้อ 2.4 ที่ผ่านการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนโดยกระบวนการยู เอช ที

3. ประเภท

3.1 นมเปรี้ยวแบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ

3.1.1 โยเกิร์ต

3.1.2 โยเกิร์ตปรุงแต่ง

3.1.3 นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม

3.1.4 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์

3.1.5 นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยู เอช ที

4. ส่วนประกอบ

4.1 ส่วนประกอบหลัก

4.1.1 นมและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนม เช่น นมสด นมผง

4.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนมเปรี้ยว เช่น แล็กโตบาซิลลัส เคลบรูคิอิ ซับส์ บัลการิคัส สเตรปโตค็อกคัสเทอร์โมฟิลัส ไบฟิโดแบคทีเรียม แล็กโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส เป็นต้น

4.2 ส่วนประกอบอื่น ๆ

4.2.1 สีผสมอาหาร

4.2.2 สิ่งปรุงแต่ง เช่น วัตถุแต่งกลิ่นรส ผลไม้ ธัญชาติ สารแต่งกลิ่น สารแต่งรส เป็นต้น

4.2.3 สเตบิไลเซอร์ เช่น เพกติน เจลาติน เป็นต้น

4.2.4 อื่น ๆ เช่น วิตามิน แร่ธาตุ

5. คุณลักษณะที่ต้องการ

5.1 คุณลักษณะทางเคมีและทางชีววิทยา

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีและทางจุลชีววิทยา

รายการ	โยเกิร์ต	โยเกิร์ตปรุงแต่ง	นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม	นมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอไรส์	นมเปรี้ยวพร้อมดื่มยูเอชที	วิธีวิเคราะห์ตาม
โปรตีน ไม่น้อยกว่า ร้อยละ	3	3	1.5	1.5	1.5	AOAC (2000) ข้อ 33.2.12
ความเป็นกรด ไม่น้อยกว่า ร้อยละ (คำนวณเป็นกรดแลกติก)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	AOAC (2000) ข้อ 33.2.06
จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทำให้เกิดกรด ไม่น้อยกว่า โคโลนีต่อกรัมหรือโคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร *	10^7	10^7	10^7	10^4	น้อยกว่า 10	Standard Methods for the Examination of Dairy Products (1992) หน้า 277-280

*หมายเหตุ * ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวให้ใช้ปริมาตร*

6. วัตถุเจือปนอาหาร

6.1 วัตถุกันเสีย

ห้ามใช้วัตถุกันเสีย ยกเว้นวัตถุกันเสียที่ติดมากับวัตถุดิบในกระบวนการผลิตยอมให้มีรวมกันได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 47.3.03 และข้อ 47.3.37

7. สุขลักษณะ

7.1 สุขลักษณะ ให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กำหนดสุขลักษณะของอาหาร มาตรฐานเลขที่ มอก.34

7.2 จุลินทรีย์ตรวจพบได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดต่อไปนี้

7.2.1 โคลิฟอร์ม (Coliform) โดยวิธีเอ็มพีเอ็น (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร ต้องน้อยกว่า 3 การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.2.01 ถึงข้อ 17.2.02

7.2.2 ซาลโมเนลลา (*Salmonella*) ในตัวอย่าง 25 กรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร ต้องไม่พบ

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.9.01 ถึงข้อ 17.9.03

7.2.3 *สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)* โดยวิธีเอ็มพีเอ็มต่อตัวอย่าง 1 กรัมหรือลูกบาศก์เซนติเมตร ต้องน้อยกว่า 3

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.5.01

8. การบรรจุ

8.1 ให้บรรจุนมเปรี้ยวในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ปิดได้สนิท

8.2 ปริมาณสุทธิของนมเปรี้ยวในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

9. เครื่องหมายและฉลาก

9.1 ที่ภาชนะบรรจุนมเปรี้ยวทุกหน่วยอย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดดังต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) ประเภท

(2) ชนิดและ/หรือปริมาณส่วนประกอบ

– นมและ/หรือผลิตภัณฑ์ของนมที่ใช้และปริมาณเป็นร้อยละ

– น้ำตาล แยม ผลไม้ น้ำผลไม้ ระบุปริมาณ เป็นร้อยละ

– สารแต่งรส ระบุชนิด หรือประเภท

– สารแต่งกลิ่น สี ระบุชนิดที่ใช้ ธรรมชาติ หรือสังเคราะห์

– เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

– อื่นๆ

(4) ข้อแนะนำในการเก็บรักษา และระบุอุณหภูมิในการเก็บรักษาซึ่งต้องไม่สูงกว่า 8 องศาเซลเซียส ยกเว้นนมเปรี้ยวยู เอช ที

(5) ปริมาตรสุทธิ เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร หรือน้ำหนักสุทธิเป็นกรัม

(6) วัน เดือน ปีที่หมดอายุ

(7) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำและสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

10. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

10.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง นมเปรี้ยวประเภทเดียวกัน บรรจุในภาชนะบรรจุชนิดและขนาดเดียวกัน ที่ทำหรือส่งมอบหรือซื้อขายในระยะเวลาเดียวกัน

10.2 นมเปรี้ยวประเภทโยเกิร์ต โยเกิร์ตปรุงแต่ง นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และนมเปรี้ยวพร้อมดื่มพาสเจอไรซ์ เมื่อชักตัวอย่างแล้วต้องเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 องสาเซลเซียสทันที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้นจนถึงเวลาวิเคราะห์ และต้องวิเคราะห์ตัวอย่างทางจุลชีววิทยาภายใน 36 ชั่วโมง หลังจากชักตัวอย่าง

10.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชัก
ตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

10.3.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบปริมาณสุทธิ และเครื่องหมายและฉลาก

10.3.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน ตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 2 นำตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจสอบภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากก่อน แล้วจึงเปิดภาชนะบรรจุออกตรวจปริมาณ

ตารางที่ 2 แผนการชักตัวอย่าง (ข้อ 10.3.1)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
น้อยกว่า 500	8	1
500 ถึง 35 000	13	2
มากกว่า 35 000	20	3

10.3.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 8. ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับในตารางที่ 2 จึงจะถือว่านมเปรี้ยวรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

10.3.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบคุณลักษณะที่ต้องการ และวัตถุเจือปนอาหาร

10.3.2.1 แบ่งตัวอย่างจากข้อ 10.3.1 ภาชนะบรรจุละเท่า ๆ กันทำเป็นตัวอย่างรวม ให้ได้ปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร เก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาด แห้ง และปิดได้สนิท

10.3.2.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 5. และข้อ 6. จึงจะถือว่านมเปรี้ยวรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

10.4 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างนมเปรี้ยวต้องเป็นไปตามข้อ 10.3.1.2 ข้อ 10.3.2.2 และข้อ 10.3.3.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่านมเปรี้ยวรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

เอกสารอ้างอิง

A.O.A.C. Method of analysis of the Assocition of Official Analytical Chemists, edition 2000

Standard Method for the Examination of Dairy Products (1992)

ภาคผนวก ฉ

ขั้นตอนการส่องกล้อง Cryo-SEM

(Cold-stage scanning electron microscope)

ขั้นตอนการส่องกล้อง Cryo-SEM

1. บรรจุเม็ดเจลที่ได้จากการเคลือบเซลล์ด้วยวิธีอิมัลชั่นลงในหลอดแคปปิลารี

2. ใส่หลอดแคปปิลารีลงใน holder เพื่อสัมผัสกับตัวอย่าง (เพื่อป้องกันการสัมผัสกับตัวอย่างโดยตรง)

3. จุ่มตัวอย่างลงในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -140 องศาเซลเซียส) รอจนตัวอย่างแข็งตัว

4. นำ holder มาต่อเข้ากับกล้อง Cryo-SEM

5. ลักษณะของการวางตัวอย่างในกล้อง Cryo-SEM เพื่อรอการหักตัวอย่าง (fructure) ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิ

6. ภาพที่ได้จากการส่องกล้องจะปรากฏบนหน้าจอคล้ายจอโทรทัศน์ เป็นภาพ 3 มิติ

ภาพที่ ฉ.1 แผนภาพขั้นตอนการส่องกล้อง Cryo-SEM

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสวรรยา เม้งเกร็ด
วันเกิด	วันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา	
2547- 2550	เข้าศึกษาและสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2543-2547	เข้าศึกษาและสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง