



การประยุกต์ใช้กากมะพร้าวสำหรับการผลิตเม็ดบีดส์ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

Application of Coconut Meal for Synbiotic Beads Production in Food Products

ณัฐริกา ศิลาฉาย¹, รัชนีญาภรณ์ ศิริเลิศ, จิรนาถ บุญคง, ปิยนุตร์ น้อยด่าง และ อำพรณ ชัยกุลเสวีวัฒน์

Nattiga Silalai¹, Tunyaporn Sirilert, Jiranart Boonkong, Piyanoote Noiduang and Ampun Chaikulsareewat

ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ประเทศไทย

Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Thailand

Received : 29 February 2024, Received in revised form : 24 July 2024, Accepted : 24 July 2024

Available online : 5 August 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ซินไบโอติก (Synbiotic) คือ การนำโพรไบโอติก (Probiotics) และพรีไบโอติก (Prebiotics) ผสมกันเข้าด้วยกัน ซึ่งโพรไบโอติกนั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดดีที่มีประโยชน์ต่อลำไส้ ส่วนพรีไบโอติกเป็นเส้นใยอาหารที่ร่างกายคนเราไม่สามารถย่อยหรือดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร แต่เป็นแหล่งอาหารของโพรไบโอติก ดังนั้นการรับประทานซินไบโอติกจึงอาจช่วยให้โพรไบโอติกทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น แหล่งของพรีไบโอติกที่สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรไทย เช่น มะพร้าว แก่นตะวัน กัลฉวย เป็นต้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรของชุมชนมาเป็นใช้เป็นพรีไบโอติกในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันต้นแบบ โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา คือ กากมะพร้าวพันธุ์สุนสีหม้อ (ชุมชนบ้านสวนน้ำส้ม อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม) เพื่อเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรให้กับชุมชน

วิธีดำเนินการวิจัย : โพรไบโอติกทางการค้า (*Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451) ถูกนำไปใช้ในทดลอง โดยกากมะพร้าวพันธุ์สุนสีหม้อถูกทดสอบความเป็นพรีไบโอติกโดยแปรผันปริมาณกากมะพร้าวผงที่ระดับร้อยละ 0, 1.0, 1.5 และ 2.0 ของปริมาตรทั้งหมดเพื่อคัดเลือกหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของโพรไบโอติก จากนั้นทำการประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ด้วยการนำโพรไบโอติกทางการค้าไปห่อหุ้มด้วยสารไบโอพอลิเมอร์ที่ต่างกัน 3 ชนิด คือ สารละลายอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก สารละลายคาราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และสารผสมของสารละลายอัลจินเตความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก และสารละลายคาราจีแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ในอัตราส่วน 1:1 โดยคัดเลือกจากค่าประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและอัตราการรอดของโพรไบโอติกสูงสุด จากนั้นนำโพรไบโอติกทางการค้าและพรีไบโอติกที่คัดเลือกได้มาผสมกันในสัดส่วนที่เหมาะสมแล้วทำการห่อหุ้มอีกครั้ง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของซินไบโอติกที่มีต่อการรอดของโพรไบโอติกโดยเปรียบเทียบกับเฉพาะโพรไบโอติกที่ห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) ในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน คือ ไอศกรีมและน้ำสลัด

ผลการวิจัย : กากมะพร้าวผงที่ระดับร้อยละ 1.5 ของปริมาตรทั้งหมด เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 9.88 เป็น 10.10 log CFU/mL ผลจากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มด้วยสารไบโอพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารละลายผสมระหว่างสารละลายอัลจินเตและคาราจีแนนให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงสุด คือ ร้อยละ 95.63±0.16 ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยสารละลายผสมระหว่างสารละลายอัลจินเตและคาราจีแนน

มีค่าสูงสุด เท่ากับ 8.79 log CFU/mL ภายหลังจากการบ่มในน้ำย่อยกระเพาะอาหารเทียมนาน 120 นาที จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายอัลจินเตและคาราจีแนนผสมกันในการห่อหุ้มจะช่วยรักษาการอยู่รอดของโพรไบโอติกได้ดี ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายผสมทั้ง 2 มาประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มโพรไบโอติกและพรีไบโอติกในการผลิตไอศกรีมและน้ำสลัด ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของซินไบโอติกที่มีต่อการอยู่รอดของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน พบว่า การเติมซินไบโอติกลงไปพร้อมกับโพรไบโอติกแล้วนำไปห่อหุ้ม ช่วยเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 เนื่องจากมีพรีไบโอติกที่เป็นแหล่งอาหารของโพรไบโอติกนั่นเอง

สรุปผลการวิจัย : การห่อหุ้มร่วมระหว่างพรีไบโอติกและโพรไบโอติกสามารถช่วยชะลอการตายและเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติกในสภาวะที่เลวร้ายหรือจากสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันดังกล่าวได้ ซึ่งเป็นที่ยอมรับและดีต่อระบบการย่อยของผู้บริโภค

คำสำคัญ : จุลินทรีย์โพรไบโอติก ; พรีไบโอติก ; ซินไบโอติก ; กากมะพร้าวขูดหั่นห่อผง ; กระบวนการห่อหุ้ม

Abstract

Background and Objectives : Synbiotics is the combination of probiotics and prebiotics. Probiotics are good microorganisms that are beneficial to the gut, while prebiotics are dietary fibers that cannot be digested or absorbed by the human body in the gastrointestinal tract. However, the prebiotics are food sources of probiotics. Therefore, synbiotics can support probiotics working more effectively. Sources of prebiotics can be found in agricultural products, such as coconuts, artichoke, bananas, etc. Therefore, objectives of this research were to utilize community agricultural waste as prebiotics for developing prototype functional food products. The raw material used in the study was “Khun Si Mo” coconut meal (Ban Suan Nam Som, Amphawa, Samut Songkhram) in order to add value waste raw materials of the community.

Methodology : In the present study, a commercial bacterium (*Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451) was used as probiotics for study, while coconut meal (Khun Si Mo) was tested for prebiotics. The coconut meal was varied as 0, 1.0, 1.5 and 2.0%(w/v) to select the appropriate amount for probiotic growth. Then, encapsulation efficiency was investigated by encapsulation of commercial probiotics with 3 different biopolymers, such as 4%(w/w) alginate, 0.5%(w/w) carrageenan, and the mixture of 4%(w/w) alginate and 0.5%(w/w) carrageenan in a ratio of 1:1. The highest encapsulation efficiency and survival rate of probiotics were determined. To study the role of synbiotics on the probiotics survival in functional food products, optimal content of probiotics and prebiotics were selected for encapsulation as compared to probiotics encapsulation (control) in functional products (ice cream and salad dressing).



Main Results: Coconut meal 1.5% was suitable for a growth of lactic acid bacteria, increasing from 9.88 to 10.10 log CFU/mL. According to analysis, the encapsulation efficiency of 3 different kinds of biopolymers was found that the mixture of alginate and carrageenan gave the highest encapsulation efficiency (95.63±0.16%) in correspondence with the highest of survival rate of probiotics encapsulated with the mixture of alginate and carrageenan (8.79 log CFU/mL) after incubation in simulated gastric juice for 120 min. It indicated that the mixture of alginate and carrageenan improved the survival rate of probiotics. Therefore, the mixture of 2 biopolymers was selected for probiotics and prebiotics encapsulation, and applied in ice cream and salad dressing. The results showed that synbiotics were able to maintain the survival rate of probiotics in both products due to the presence of prebiotics being food sources of probiotics.

Conclusions: Co-encapsulation of prebiotics and probiotics could retard the death and enhance survival of probiotics in severe conditions. It can also be applied in other functional food products, which were acceptable and good for the digestive system of consumers.

Key words : probiotics ; prebiotics ; synbiotics ; coconut meal powder ; encapsulation

*Corresponding author. E-mail : nattiga.sil@siam.edu

บทนำ

อาหารเพื่อสุขภาพมีบทบาทต่อชีวิตประจำวันมากขึ้น โดยเฉพาะบุคคลที่ไม่มีเวลาออกกำลังกาย และบุคคลที่ต้องการหลีกเลี่ยงอาหารที่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อโรค ซึ่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารส่วนใหญ่ มักจะทำออกมาในรูปแบบของแคปซูลยา ทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับประทานอย่างต่อเนื่อง เพราะมีความรู้สึกเหมือนการรับประทานยา จึงเกิดแนวคิดที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภคโดยใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ โพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ (Lactic acid bacteria) เช่น *Bifidobacterium bifidum* และ *Lactobacillus acidophilus* เป็นต้น เนื่องจากโพรไบโอติกจะช่วยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ช่วยให้เกิดการดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น (Misra *et al.*, 2019 ; Caoa *et al.*, 2020) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogen) อีกทั้งยังแสดงฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ และป้องกันการเกิดมะเร็ง (Rokka & Rantamäki, 2010 ; Song *et al.*, 2012) โดยทั่วไปจะมีการเติมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มหลายประเภท เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ผักหมัก และน้ำผลไม้ เป็นต้น (Anal & Stevens, 2005 ; Anal & Singh, 2007 ; Heidebach *et al.*, 2012) นอกจากนั้นการรับประทานอาหารที่มีพรีไบโอติก (prebiotics) เข้าไปจะไปกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกให้เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งพรีไบโอติกเป็นใยอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ด้วยระบบทางเดินอาหารส่วนต้น (Wang, 2009) เมื่อผ่านเข้าไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์ และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ โดยแหล่งของพรีไบโอติกที่สำคัญ ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide; FOS) แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (manno- oligosaccharide; MOS) รีซิสแตนต์สแตร์ช (resistant starch) อินูลิน

(inulin) เบต้ากลูแคน (beta-glucan) และน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) เป็นต้น (Brownawell *et al.*, 2012) ซึ่งสามารถพบในพืชผลทางการเกษตร ได้แก่ มะพร้าว แก่นตะวัน ถั่วฝักยาว เป็นต้น (Nualla-ong, 2014) ซึ่งประเทศไทยจัดเป็นแหล่งที่มีพืชผลทางการเกษตรที่มีความหลากหลายค่อนข้างมาก ดังนั้นหากสามารถนำผลผลิตทางการเกษตรและพืชท้องถิ่นเหล่านี้มาใช้เป็นพรีไบโอติกสำหรับไฟโรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารจะช่วยต่อยอดการใช้ประโยชน์และการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี

สภาวะทางเดินอาหาร รวมถึงในกระบวนการแปรรูปอาหารนั้น สภาวะแวดล้อมเหล่านี้สามารถทำลายไฟโรไบโอติกให้เหลือรอดน้อยลงได้ (Misra *et al.*, 2019) ดังนั้นไฟโรไบโอติกที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มควรเป็นไปตามเกณฑ์อย่างเหมาะสมที่สุด ได้แก่ จำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ในระหว่างกระบวนการทางอุตสาหกรรม การอยู่รอดระหว่างการเตรียมและการเก็บรักษาในอาหาร การอยู่รอดในสภาพแวดล้อมทางเดินอาหารของผู้บริโภค และมีความสามารถในการให้ประโยชน์ต่อสุขภาพโดยผ่านกระบวนการหมักในลำไส้เล็กส่วนล่างของผู้บริโภค (Fuller, 1989) ซึ่งไฟโรไบโอติกส่วนใหญ่ที่อยู่ในอาหารและเครื่องดื่ม มีความไวต่อการแปรรูปและปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม รวมถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความร้อนสูง (Song *et al.*, 2012) ดังนั้นการป้องกันและรักษาไฟโรไบโอติกจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มการอยู่รอดของไฟโรไบโอติกในระหว่างกระบวนการแปรรูป รวมทั้งกรดและน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค เพื่อให้ไปสู่กระบวนการหมักในลำไส้ส่วนล่างของผู้บริโภคได้อย่างสมบูรณ์ โดยวิธีที่นิยมเก็บรักษาและป้องกันไฟโรไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ การห่อหุ้มไฟโรไบโอติก หรือเรียกว่า “Encapsulation” (Reque & Brandelli, 2021) การห่อหุ้มเซลล์ด้วยการใช้สารไบโอพอลิเมอร์ในการห่อหุ้ม เป็นวิธีการป้องกันไฟโรไบโอติกจากสภาวะที่อันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้รับการนิยมเป็นอย่างมาก ซึ่งจะช่วยเพิ่มความเสถียรในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract; GIT) ซึ่งสารที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ไฟโรไบโอติก ได้แก่ อัลจิเนต คาราจีแนน เซลลูโลสอะซิเตตพลาเลต เจลาติน สตาร์ชและโปรตีนนม เป็นต้น (Guérin *et al.*, 2003; Krasaekoopt *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2006; Anal & Singh, 2007; Rajam *et al.*, 2012) โดยอัลจิเนตเป็นหนึ่งในโพลีเมอร์ชีวภาพที่ใช้อย่างมากในการห่อหุ้มเซลล์และสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากความเรียบง่าย ปลอดภัย พิษ ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ต้นทุนต่ำ และไวต่อค่า pH (Guérin *et al.*, 2003; Sheu & Marshall, 1993; Champagne *et al.*, 1994; Roberfroid, 2000; Burey *et al.*, 2008; Rokka & Rantamäki, 2010) นอกจากอัลจิเนตแล้ว คาราจีแนนเป็นอีกหนึ่งในโพลีเมอร์ชีวภาพที่นำมาใช้เป็นสารสร้างเจลในการห่อหุ้มที่มีประสิทธิภาพ โดยพบว่ากลีโคไซด์ได้น้อยลงหลังจากที่ถูกห่อหุ้มด้วยคาราจีแนน ขณะที่ไฟโรไบโอติกก็มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้นเมื่อห่อหุ้มด้วยคาราจีแนน (Tosa *et al.*, 1979) เนื่องจากคาราจีแนนมีสมบัติในการเกิดเจล คงทนต่อสภาวะกรดต่าง สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารชีวภาพต่างๆได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตฟิล์มชีวภาพและการห่อหุ้มสารสำคัญ เช่น สารให้กลิ่นรสไฟโรไบโอติก และเอนไซม์ (Chakraborty, 2017)

นอกจากนั้นพรีไบโอติกซึ่งเป็นอาหารของไฟโรไบโอติก จะช่วยการกระตุ้นการเจริญเติบโตของไฟโรไบโอติกให้สามารถทำงานได้ดี ส่งผลให้ระบบขับถ่ายของร่างกายดีขึ้นดีขึ้น โดยการทำงานร่วมกันของพรีไบโอติกและไฟโรไบโอติกนี้ เรียกว่า “ซินไบโอติก (synbiotics)” ซึ่งมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและการทำงานของไฟโรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์ให้ดีขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์เหลือทิ้งทางการเกษตร

(กากมะพร้าวจากชุมชนสวนน้ำส้ม) ศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มด้วยสารไบโอพอลิเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติก รวมทั้งการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีนไบโอติก เพื่อต่อยอดในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเชิงพาณิชย์ ซึ่งจะช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมกากมะพร้าวผง

นำกากมะพร้าวพันธุ์ขุนสีหม้อ (ชุมชนบ้านสวนน้ำส้ม อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม) ที่ผ่านการคั่นกะทิและอบแห้งแล้ว มาคัดแยกกากสีน้ำตาลออก จากนั้นเติม *n*-hexane (เกรดอาหาร) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (โดยน้ำหนักกาก/ปริมาตร) เพื่อกำจัดไขมันที่เหลือค้างอยู่ กวนผสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำกากที่กรองได้เติมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 80 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (โดยน้ำหนักกาก/ปริมาตร) เพื่อกำจัดน้ำตาลอิสระ กวนผสมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ (ดัดแปลงตามวิธีของ Yenyai & Pinsiroadom, 2014) เก็บในภาชนะปิดสนิทและนำไปใส่โถดูดความชื้น วิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ตามวิธี AOAC (2000) และคำนวณร้อยละผลิต

การศึกษาความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกของกากมะพร้าวผง

ศึกษาความเป็นไปได้ของกากมะพร้าวผงในการเป็นโพรไบโอติก ด้วยการตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกทางการค้า (*Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) และได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ให้มีชีวิตต่อไป โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS เหลว และเก็บรักษาบนอาหารแข็ง MRS ทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยทำการแปรผันปริมาณของโพรไบโอติก คือ กากมะพร้าวผงพันธุ์ขุนสีหม้อ (ชุมชนบ้านสวนน้ำส้ม อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม) จำนวน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 1.0, 1.5 และ 2.0 ของปริมาตรทั้งหมด จากนั้นเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว *Lactobacillus* MRS broth ตามสภาวะควบคุมดังนี้ ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นร้อยละ 20 ของปริมาตรทั้งหมด (ควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นให้เท่ากับทุกที่ที่ระดับ 10^9 CFU/mL) โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่น ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วย Visible Spectrophotometer (รุ่น Genesys 20 บริษัท Thermo Scientific ประเทศฝรั่งเศส) และตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ตามวิธี Prescott *et al.*, (1999) หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกส่วนตะกอนเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยวิธีการไตเตรต (AOAC, 2000) ซึ่งระบุค่าวิเคราะห์ในรูปแบบปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ) และค่าความเป็นกรดต่างด้วยเครื่องวัดพีเอช (รุ่น PONPE 519 Series ประเทศไทย)

การศึกษากระบวนการห่อหุ้มโพรไบโอติก

ในกระบวนการห่อหุ้มเพื่อเก็บรักษาเซลล์ที่มีชีวิตไว้ในเม็ดบีดส์เจล (Kailasapathy, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้สารประกอบไบโอพอลิเมอร์ (biopolymers) ที่ใช้ในการห่อหุ้มโพรไบโอติกส์ คือ โซเดียมอัลจิเนต และคาราจีแนน ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการทดลอง

ของ Krasaekoopt *et al.* (2003) โดยการศึกษาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มโพรไบโอติกในเม็ดบีดส์เจล แบ่งออกเป็น 3 ทรีตเมนต์ คือ 1) ห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก 2) ห่อหุ้มด้วยคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และ 3) ห่อหุ้มด้วยสารผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 และคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก

นำโพรไบโอติกผงทางการค้า (*Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451) จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ประมาณ 20 มิลลิลิตร โดยจะมีเชื้อเริ่มต้นอยู่ประมาณ 9-100 log CFU/mL เติลงในสารละลายแต่ละทรีตเมนต์ที่เตรียมไว้ (มี 3 ทรีตเมนต์ที่กล่าวข้างต้น) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วหยด suspension ที่ได้ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25±0.1 องศาเซลเซียส (Sheu *et al.*, 1993) ด้วยเครื่อง Peristaltic pump ที่อัตราเร็ว 13 rpm โดยใช้สายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0 มิลลิเมตร ซึ่งจะได้ลักษณะเป็นเม็ดบีดส์เจลที่มีลักษณะทรงกลม แข็งทึบไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ จากนั้นกรองเม็ดบีดส์ด้วยตะแกรง แล้วนำมาล้างด้วยด้วยสารละลายเบปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก นำเม็ดเจลที่ได้ไปทดสอบดังต่อไปนี้

1) ร้อยละของประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (%Encapsulation efficiency; %EE) ตามการคำนวณของ Capela *et al.* (2007) ดังสมการที่ (1):

$$\text{Efficiency (\%)} = \frac{y - z}{x} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ x คือ จำนวนของจุลินทรีย์เริ่มต้นก่อนกระบวนการห่อหุ้ม, y คือ จำนวนของจุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดบีดส์เจล และ z คือ จำนวนของจุลินทรีย์ที่ถูกอยู่ในของเหลวของเม็ดบีดส์เจล

2) ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก (%Survival) ในกระเพาะน้ำย่อยเทียม (Kim *et al.*, 2008)

การศึกษาร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในน้ำย่อยกระเพาะอาหารเทียม

- การเตรียมสารละลายน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร ด้วยการเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.084 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน แล้วตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 2.0 โดยสารละลายนี้มีลักษณะคล้ายน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารของมนุษย์ แต่ไม่มีส่วนประกอบของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ทริปซิน (Trypsin) และเพปซิน (Pepsin) (Stefaniak *et al.*, 2010) จากนั้นทำสารละลายให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave รุ่น LS-2D บริษัท Rexell Industrie ประเทศไต้หวัน) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

- การทดสอบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร ด้วยการเติมสารละลายน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร ปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ ลงให้ท่วมเม็ดบีดส์เป็นเวลานาน 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยในแต่ละช่วงเวลาจะมีเม็ดบีดส์ประมาณ 3 เม็ด ซึ่งในแต่ละเม็ดเจลจะมีปริมาณโพรไบโอติกเริ่มต้นเฉลี่ย 10^9 CFU/mL นำตัวอย่างเม็ดบีดส์

ในแต่ละช่วงเวลาที่เหมาะสม มาวิเคราะห์ปริมาณโพรไบโอติกด้วยการทำ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง *Lactobacillus* MRS Agar และคำนวณค่าการรอดชีวิต (%Survival) ตามสมการที่ (2)

$$\text{Survival (\%)} = \frac{\log\text{CFU of viable cells survived}}{\log\text{CFU of initial viable cells inoculated}} \times 100 \quad (2)$$

โดยการนำเม็ดบีดส์ที่มีแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาที่ข้างต้น มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วตีปั่นให้ละเอียดเป็นเวลา 10 นาที และทำเป็นสารละลายด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 (โดยน้ำหนัก) จากนั้นทำการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณโพรไบโอติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลในหน่วย log CFU/mL

การเตรียมซินไบโอติก

การผลิตซินไบโอติกทำได้โดยนำโพรไบโอติกผงทางการค้า (สายพันธุ์ *L. bulgaricus* TISTR 451) จำนวน 1 กรัม ผสมกับโพรไบโอติกผง 1.5 กรัม เข้ากัน จากนั้นนำไปทำการห่อหุ้มเป็นเม็ดบีดส์เจลด้วยกระบวนการห่อหุ้มดังที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อให้ได้เม็ดบีดส์ซินไบโอติก จากนั้นตัวอย่างที่ได้จะถูกนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำเข้าเครื่องทำแท่งแบบแช่เยือกแข็ง (ยี่ห้อ CHRIST รุ่น Alpha 1-4 LDplus ประเทศสหรัฐอเมริกา) ณ อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 1,000 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Champagne *et al.*, 2000) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาซินไบโอติกและให้สามารถนำไปใช้ต่อได้สะดวก เมื่อตัวอย่างแห้งให้เก็บรักษาในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ที่ปิดสนิทเพื่อรอใช้งานในขั้นตอนต่อไป

การประยุกต์ใช้ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดลองวิจัยการประยุกต์ใช้ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารนี้จะแบ่งสิ่งทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) ผลิตภัณฑ์ที่เติมเม็ดบีดส์เจลที่มีโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว เรียกว่า “กลุ่มโพรไบโอติก” และ 2) ผลิตภัณฑ์ที่เติมเม็ดบีดส์เจลที่มีโพรไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติก เรียกว่า “กลุ่มซินไบโอติก” ซึ่งในการวิจัยเลือกผลิตภัณฑ์อาหารต้นแบบที่จะประยุกต์ใช้ คือ ไอศกรีมกะทิและน้ำสลัดข้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ดังนี้

- ไอศกรีมกะทิ : การผลิตไอศกรีมสามารถทำได้โดยการผสมส่วนของกะทิ 700 กรัม และน้ำมะพร้าว 300 กรัม เข้าด้วยกัน นำส่วนผสมที่ได้แบ่งมาประมาณ 200 กรัม ผสมกับแป้งข้าวโพด 35 กรัม คนให้แบ่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมที่เหลือทั้งหมดมาผสมกันในหม้อ เติมน้ำตาลทราย 250 กรัม และเกลือ 4.5 กรัม คนให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ในระหว่างนี้ส่วนผสมตลอดจนส่วนผสมมีความหนืดเล็กน้อย เติมหั้วรี้กัม (guar gum) ปริมาณ 3 กรัม แล้วคนต่อให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นานประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ยกออกจากเตา พักไว้ให้เย็น (50 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำไปผ่านเครื่อง Homogenizer (IKA รุ่น T 25 DIGITAL, ประเทศเยอรมนี) ที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ทริตเมนต์ คือ ทริตเมนต์ที่ 1 กลุ่มที่เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้ม (กลุ่มโพรไบโอติก) และทริตเมนต์ที่ 2 กลุ่มที่เติมซินไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้ม (กลุ่มซินไบโอติก) นำไปบ่มในตู้เย็นนานประมาณ 2-4 ชั่วโมง

แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นไอศกรีม (FICE402 รุ่น Turn Pro2, บริษัทมาร์ช คูล อินดัสทรี, ประเทศไทย) จนได้เนื้อไอศกรีมที่เนียนและฟู ตักใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ แล้วนำไปทำให้แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกรวบรวมคุณภาพ ดังนี้

1) สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ความหนืดด้วยเครื่อง viscometer (Brookfield รุ่น LVDV-IT+PRO ประเทศอเมริกา และใช้หัวเข็ม (Spindle) เบอร์ 3 ที่ความเร็วรอบ 50 rpm), ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี HunterLab (ColorFlex EZ Spectrophotometer, Color Global Co., Ltd., ประเทศไทย), อัตราการขึ้นฟู (Arbuckle, 1986) และอัตราการละลายที่ 25 องศาเซลเซียส (Bolliger *et al.*, 2000)

2) การประเมินทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี 5-Point Hedonic Scale (1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด และ 5 หมายถึง ชอบมากที่สุด) ใช้ผู้ทดสอบชิมที่มีความชำนาญจำนวน 30 คน ในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

3) การตรวจสอบการเหลือรอดของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อาหารเหลว MRS

- น้ำสลัดชั้น : การผลิตน้ำสลัดชั้นสามารถทำได้โดยนำงาขาว 45 กรัม ไปคั่วในกระทะ เมื่อได้สีเข้มขึ้น เป็นสีเหลืองทองสวยงามแล้ว นำไปพักไว้ในถ้วย นำงาขาวที่ได้มาบดแต่ไม่ต้องละเอียดมากนัก จากนั้นเติมน้ำตาล 10 กรัม ลงไป คนให้ละลายเข้ากัน ตามด้วยมายองเนส 30 กรัม น้ำส้มสายชูขาว 30 กรัม โชยุ 22 กรัม มิรินประมาณ 2.5 กรัม และน้ำมันงา 5 กรัม คนผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งออกเป็น 2 ทริตเมนต์ คือ ทริตเมนต์ที่ 1 กลุ่มที่เติมโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้ม (กลุ่มโพรไบโอติก) และทริตเมนต์ที่ 2 กลุ่มที่เติม ชินไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้ม (กลุ่มชินไบโอติก) นำแต่ละทริตเมนต์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทบรรจุลงภาชนะที่เตรียมไว้ ปิดฝาให้สนิท เก็บรักษาในตู้เย็น (10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 14 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกรวบรวมคุณภาพ ดังนี้

1) สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ค่าสี HunterLab (ColorFlex EZ Spectrophotometer, Color Global Co., Ltd., ประเทศไทย), ความหนืด viscometer (Brookfield รุ่น LVDV-IT+PRO ประเทศอเมริกา และใช้หัวเข็ม (Spindle) เบอร์ 3 ที่ความเร็วรอบ 50 rpm), ความเป็นกรดด้วยเครื่อง pH meter (Eutech PH 1710 pH Bench Meter, Thermo Fisher Scientific Inc.), ค่าเพอร์ออกไซด์ และปริมาณไขมันทั้งหมด (AOAC, 2002)

2) การประเมินทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี 5-Point Hedonic Scale (1 หมายถึง ไม่ชอบมาก และ 5 หมายถึง ชอบมาก) ใช้ผู้ทดสอบชิมที่มีความชำนาญจำนวน 30 คน ในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

3) การตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน น้ำสลัด (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 672/2547)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบทางเคมี กายภาพและจุลินทรีย์ ใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองด้วย DMRT (Duncan's Multiple Range Test) และการทดสอบทางประสาทสัมผัส ใช้แผนการ

ทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน และหาความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS

ผลการวิจัย

ความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกของกากมะพร้าวผง

กากมะพร้าวผงที่ผ่านกระบวนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อกำจัดไขมันและน้ำตาลอิสระ มีปริมาณความชื้นอยู่เท่ากับร้อยละ 4.09 ± 0.21 มีปริมาณไขมันร้อยละ 2.87 ± 0.78 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้อยกว่า 3 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และร้อยละผลผลิตของการเตรียมวัตถุดิบเท่ากับร้อยละ 92.98 ± 1.28 ซึ่งมีความคุ้มค่าและเหมาะสมต่อการนำไปศึกษาวิจัยในขั้นตอนต่อไป

ผลของกากมะพร้าวผงจากกากมะพร้าวพันธุ์ขุนสีหม้อ ในการเป็นพรีไบโอติก โดยใช้จุลินทรีย์ *L. bulgaricus* TISTR 451 ในการทดสอบ พบว่า ของเหลวจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เติมกากมะพร้าวผงพันธุ์ขุนสีหม้อมีค่าความขุ่นมากกว่ากับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) โดยทรีตเมนต์ที่ใช้กากมะพร้าวผงที่ระดับร้อยละ 1.5 มีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.74 ± 0.004 แสดงให้เห็นว่า การเติมกากมะพร้าวผงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์นั้นช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์

ปริมาณกรดแลคติกของส่วนใสที่ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เติมสารพรีไบโอติกทุกทรีตเมนต์ มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) จากผลการทดลองทรีตเมนต์ที่ใช้กากมะพร้าวผงเป็นพรีไบโอติกทุกระดับ มีปริมาณกรดทั้งหมดมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) โดยทรีตเมนต์ที่ใช้กากมะพร้าวผงที่ระดับร้อยละ 1.5 มีปริมาณกรดสูงสุด คือ ร้อยละ 5.76 เมื่อพิจารณาค่า pH พบว่า ชุดควบคุมมีค่า pH สูงสุด ซึ่งแสดงถึงความเป็นกรดที่น้อยที่สุด ค่า pH มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดในเชิงผกผัน โดยอธิบายได้ว่า ปริมาณกรดแลคติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้วัดค่า pH ได้ลดลง

Table 1 Lactic acid, pH, and total microorganisms of MRS with and without coconut meal

Treatment	Lactic acid (%)	pH value	\log_{10} (CFU/mL)
Control	5.19 ± 0.00^d	3.837 ± 0.012^a	9.853 ± 0.019^d
T1 (Coconut Meal 1.0%)	5.51 ± 0.11^c	3.783 ± 0.006^b	10.097 ± 0.016^c
T2 (Coconut Meal 1.5%)	5.76 ± 0.00^a	3.760 ± 0.000^c	10.137 ± 0.003^a
T3 (Coconut Meal 2.0%)	5.64 ± 0.11^b	3.760 ± 0.000^c	10.126 ± 0.004^b

Note : ^{a,b,c} The vertically different superscripts refer to statistically different average ($p < 0.05$).

จากผลวิจัยพบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกในทรีตเมนต์ที่มีการเติมกากมะพร้าวมีค่าสูงกว่ากับกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ได้เติมกากมะพร้าว แสดงให้เห็นว่าการเติมกากมะพร้าวช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกได้ การเพิ่มปริมาณกากมะพร้าวส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณกากมะพร้าวผงจากระดับร้อยละ 1.5 เป็น

2.0 ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกทรีทเมนต์ที่ใช้กากมะพร้าวผงที่ร้อยละ 1.5 ของปริมาณอาหารเหลว โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตรวดแลกติกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ $10.14 \log$ CFU/mL (ดังแสดงใน Table 1) มาใช้เป็นพรีไบโอติกเพื่อศึกษาในลำดับต่อไป

ประสิทธิภาพของสารที่ใช้ในการห่อหุ้มพรีไบโอติก

สมบัติทางโครงสร้างของเม็ดบีดส์เจลและการปลดปล่อยสารสำคัญที่ต้องการในเม็ดบีดส์เจลนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นในร่างกายมนุษย์ เนื่องจากสารเหล่านี้ต้องผ่านระบบการย่อยอาหารในทางเดินอาหารของมนุษย์ซึ่งอาจเกิดการสูญเสียไปในระหว่างย่อยอาหาร ผลการทดลอง พบว่า การห่อหุ้มพรีไบโอติกด้วยสารละลายอัลจิเนตที่ได้จากสาหร่ายแล้วทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคลอไรด์เกิดโครงสร้างเม็ดบีดส์เจลที่มีลักษณะทรงกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเริ่มต้นเฉลี่ย 2.05 ± 0.10 มิลลิเมตร

ประสิทธิภาพของสารห่อหุ้มที่ใช้สารละลายคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 เพียงอย่างเดียว มีค่าเท่ากับร้อยละ 84.43 ± 2.05 โดยการใช้สารละลายอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 เพียงอย่างเดียวในการห่อหุ้ม มีค่าเท่ากับร้อยละ 91.89 ± 1.35 ส่วนการใช้สารละลายผสมระหว่างสารละลายอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 4 และคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในการห่อหุ้มมีค่าประสิทธิภาพของสารห่อหุ้มสูงสุด คือ ร้อยละ 95.63 ± 0.16 (Table 2) นอกจากนี้พรีไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยสารไบโอพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ถูกนำไปศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหารต่อไป

Table 2 Encapsulation efficiency of biopolymer for probiotic encapsulation

Treatment	% Encapsulation Efficiency (%EE)
0.5% (w/w) Carrageenan	84.43 ± 2.05^c
4.0% (w/w) Alginate	91.89 ± 1.35^b
4.0% (w/w) Alginate: 0.5% (w/w) Carrageenan (1 : 1)	95.63 ± 0.16^a

Note : ^{a,b,c} The vertically different superscripts refer to statistically different average ($p < 0.05$)

การรอดชีวิตของพรีไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร

เนื่องจากโดยทั่วไปหลังจากรับประทานอาหารจะมีการย่อยทางกายภาพด้วยการบดเคี้ยวจากฟันซึ่งจะได้ขนาดของอาหารแข็งที่ผ่านกระบวนการนี้น้อยกว่า 1-2 มิลลิเมตร (Lee & Mooney, 2012) โดยหลักการของกระบวนการย่อยอาหาร หลังจากการย่อยทางเคมีในกระเพาะอาหารที่มีค่าเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง อาหารที่ถูกย่อยบางส่วนจะเดินทางไปยังลำไส้เล็กที่มีค่าเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-7.5 ในบริเวณลำไส้นี้จะเกิดการดูดซึมน้ำและสารอาหาร กากที่เหลือจากดูดซึมน้ำจะเดินทางต่อไปยังส่วนลำไส้ใหญ่ที่มีค่ากรดต่าง 5.0-7.0 โดยจะเกิดการหมักของจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งมีการดูดซึมน้ำกลับเข้าสู่ร่างกายโดยส่วนใหญ่จะใช้เวลา 12-24 ชั่วโมง (Gibson & Roberfroid, 1995 ; Guerra *et al.*, 2012) ดังนั้นในการศึกษาการรอดชีวิตของพรีไบโอติกในระบบน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร จะทำโดยใช้ระบบน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดต่างประมาณ 2 เป็นเวลานาน 120 นาที

ผลการทดลองการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร (pH 2) เป็นเวลานาน 120 นาที พบว่า ปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายอัลจิเนตร้อยละ 4 จะลดลงเล็กน้อยในช่วง 30 นาทีแรก จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.89 log CFU/mL เหลือ 9.12 log CFU/mL และจะคงที่ไปจนถึงที่เวลา 120 นาที ซึ่งมีปริมาณเชื้อเหลือประมาณ 8.38 log CFU/mL ส่วนปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายคาราจีแนนร้อยละ 0.5 จะลดลงจาก 9.88 log CFU/mL เหลือ 8.89 log CFU/mL ในช่วง 30 นาทีแรก และคงที่ไปจนถึงที่เวลา 120 นาที ซึ่งมีปริมาณเชื้อเหลือเท่ากับ 7.48 log CFU/mL ในขณะที่ปริมาณเชื้อที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายผสมระหว่างอัลจิเนตและคาราจีแนนมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 9.85 log CFU/mL ลดลงเล็กน้อยในช่วง 30 นาทีแรก (9.32 log CFU/mL) และคงที่ไปจนถึงที่เวลา 120 นาที ซึ่งมีปริมาณเชื้อเหลือเท่ากับ 8.79 log CFU/mL ซึ่งเมื่อพิจารณาจากกราฟแสดงอัตราการรอดชีวิต (% Survival) ของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร แสดงให้เห็นว่า อัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายผสมจะค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาภายในระบบน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร รองลงมาคือโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายอัลจิเนตร้อยละ 4 ในขณะที่อัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายคาราจีแนนร้อยละ 0.5 เพียงอย่างเดียวนั้น มีการลดลงค่อนข้างเร็วในช่วง 60 นาทีแรก และเริ่มคงที่จนถึงนาที่ที่ 120 (Figure 2)

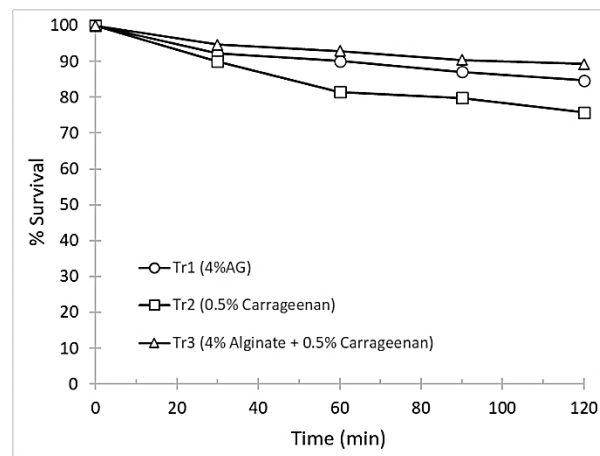


Figure 1 Survival rate of encapsulated probiotics in artificial gastric juice (in-Vitro study)

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การห่อหุ้มด้วยสารละลายโพรไบโอติกที่แตกต่างกันจะสามารถช่วยชะลอการลดลงของโพรไบโอติกที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นกรดสูงมาก (pH 2) อย่างในระบบย่อยอาหารได้แตกต่างกัน โดยการห่อหุ้มด้วยสารละลายผสมมีประสิทธิภาพดีที่สุดให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอด (% Survival) สูงที่สุดตลอดระยะเวลาในระบบน้ำย่อย ในขณะที่ใช้สารละลายคาราจีแนนเพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มน้อยสุด มีปริมาณการรอดของจุลินทรีย์เหลือที่น้อยที่สุด อีกทั้งชี้ให้เห็นว่า เม็ดบีคัสเจลที่ผลิตจากสารผสมระหว่างอัลจิเนตและคาราจีแนนยังมีความเสถียรที่ค่า pH ต่ำอย่างกระเพาะอาหาร

ได้ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองประสิทธิภาพของสารไบโอพอลิเมอร์ในการห่อหุ้มข้างต้น ดังนั้นจึงทำการเลือกสารห่อหุ้มผสม (อัลจิเนตและคาราจีแนน) มาใช้ในการผลิตเม็ดบีดส์ซินไบโอติกเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

การประยุกต์ใช้ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ไอศกรีม และน้ำสลัดซัน โดยในแต่ละผลิตภัณฑ์จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่เติมโพรไบโอติกผงที่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มเม็ดบีดส์เจล (กลุ่มโพรไบโอติก) กับ กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่เติมโพรไบโอติกผงและกากมะพร้าวพันธุ์ซุนสีหม้อผงที่ใช้เป็นพรีไบโอติกแล้วผ่านกระบวนการห่อหุ้มเม็ดบีดส์เจล (กลุ่มซินไบโอติก) โดยผลของการเติมโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียวและซินไบโอติกที่มีต่อสมบัติด้านกายภาพและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมแสดงใน Table 3 และ Table 4 ตามลำดับ

จากตารางจะเห็นได้ว่าการเติมโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียวและซินไบโอติกไม่มีผลต่อสมบัติด้านกายภาพของไอศกรีม ($p > 0.05$) แต่จะมีความแตกต่างกันในทางคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของไอศกรีม โดยผู้ทดสอบชิมให้คะแนนการยอมรับด้านเนื้อสัมผัสของไอศกรีมที่เติมซินไบโอติกสูงกว่าไอศกรีมที่เติมโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อัตราการขึ้นฟู (%Overrun) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกะทิ พบว่ามี %Overrun ประมาณร้อยละ 34.59 (Table 3) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่า %Overrun ของไอศกรีมทั่วไป คือร้อยละ 40-100 และอัตราการละลายของไอศกรีมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.75-0.77 ส่วนความหนืดของไอศกรีมทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน มีค่าอยู่ในช่วง 95-47-95.59 cP นอกจากนี้ค่าสีของไอศกรีมทั้งค่า L^* , a^* และ b^* ทั้ง 2 กลุ่ม ก็มีค่าใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 4

Table 3 Physicochemical properties of ice cream containing encapsulated probiotics and synbiotics

Ice cream	Viscosity ^{ns} (cP)	Melting ^{ns} (%)	Overrun ^{ns} (%)	Color ^{ns}		
				L^*	a^*	b^*
Probiotics	95.59 ± 2.20	0.75 ± 0.03	34.59 ± 0.97	89.92 ± 0.55	1.53 ± 0.22	3.43 ± 0.15
Synbiotics	95.47 ± 3.09	0.77 ± 0.03	34.59 ± 0.91	90.01 ± 0.53	1.50 ± 0.17	3.37 ± 0.18

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical ($p > 0.05$)

Table 4 Sensory evaluation of ice cream containing encapsulated probiotics and synbiotics

Ice cream	Sensory characteristics				
	Color ^{ns}	Odor ^{ns}	Flavor ^{ns}	Texture*	Overall acceptance ^{ns}
Probiotics	4.73±0.59	3.87±1.30	3.67±1.11	3.90±0.74	4.27±0.96
Synbiotics	4.80±0.41	4.30±0.96	4.10±0.74	4.60±0.63	4.50±0.64

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical ($p > 0.05$).; * There was significantly different in the vertical ($p < 0.05$)

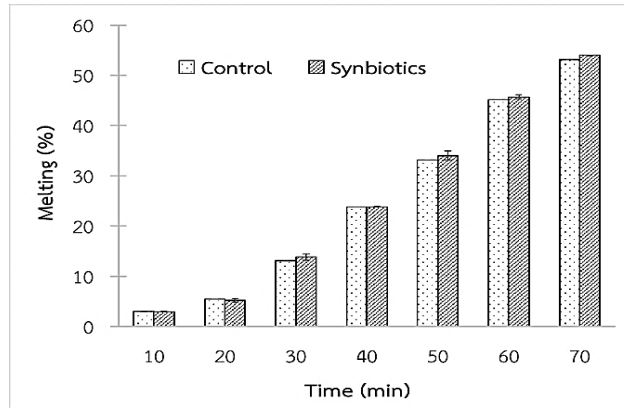


Figure 2 Melting rate of ice cream containing encapsulated probiotics and synbiotics at room temperature (25.0±1.0°C)

ในการวัดอัตราการละลาย โดยซึ่งไอศกรีมแต่ละสูตรมา 100 กรัม นำมาใส่ตะแกรงที่มีถ้วยรองด้านล่างแล้วชั่งน้ำหนักของไอศกรีมที่ละลายออกมาทุกๆ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25.0±1.0 องศาเซลเซียส) จนไอศกรีมละลายหมด (ดัดแปลงตามวิธีของ Geilman & Schmidt, 1992) ผลการทดลองพบว่า สมบัติด้านการละลายของไอศกรีมของกลุ่มซินไบโอติกดูเหมือนว่าจะมีการละลายเร็วกว่าในกลุ่มควบคุมเล็กน้อยในเวลาที่เท่าๆกัน (Figure 2) แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบทางสถิติพบว่า อัตราการละลายของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมทั้ง 2 กลุ่มมีความใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 70 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลค่าความหนืดและอัตราการขึ้นฟูของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 กลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงใน Table 3

ผลของขั้นตอนในกระบวนการผลิตไอศกรีมที่มีต่อการเหลือรอดเชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มและสมบัติของไอศกรีม ดังแสดงให้เห็นใน Table 5 ในการศึกษาผลของขั้นตอนในกระบวนการผลิตไอศกรีมที่มีต่อการเหลือรอดเชื้อโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มที่มีอยู่ในไอศกรีม

Table 5 Effect of ice cream processes on survivals of probiotics encapsulated

Ice cream	\log_{10} CFU/mL			
	Initial	After aging ^{ns}	After churning*	After freezing*
Probiotics	9.26 ± 0.15 ^a	9.26 ± 0.12 ^a	8.63 ± 0.44 ^b	7.07 ± 0.53 ^c
Synbiotics	9.81 ± 0.17 ^a	9.81 ± 0.15 ^a	9.10 ± 0.28 ^b	8.81 ± 0.22 ^b

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical ($p>0.05$).; * There was significantly different in the vertical ($p\leq 0.05$).

จากการวิเคราะห์สมบัติด้านจุลชีววิทยาใน Table 5 พบว่า กระบวนการแปรรูปไอศกรีมมีผลต่อปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่เหลือรอด ซึ่งไอศกรีมที่เติมเฉพาะโพรไบโอติก (กลุ่มโพรไบโอติก) มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดหลังผ่านแต่ละกระบวนการ คือ กระบวนการบ่ม กระบวนการปั่นไอศกรีม และกระบวนการทำให้แข็ง ลดลงในแต่ละขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดหลังผ่านการบ่ม การปั่นไอศกรีม และการทำให้แข็ง เท่ากับ 9.26, 8.63 และ 7.07 log CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่ไอศกรีมที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (กลุ่มซินไบโอติก) มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดหลังผ่านแต่ละกระบวนการ ลดลงในแต่ละขั้นตอนเช่นกัน โดยปริมาณจุลินทรีย์หลังผ่านการบ่มมีเหลือเท่ากับ 9.81 log CFU/mL หลังการปั่นไอศกรีมมีเหลือเท่ากับ 9.10 log CFU/mL ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่กระบวนการทำให้แข็ง ส่งผลให้มีปริมาณลดลงเหลือเท่ากับ 8.81 log CFU/mL แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ระหว่างกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มซินไบโอติกในแต่ละขั้นตอนการแปรรูป พบว่า หลังกระบวนการบ่ม จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ของกลุ่ม โพรไบโอติกและซินไบโอติกใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Table 5) และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ของกลุ่มซินไบโอติกมีปริมาณสูงกว่าในกลุ่มโพรไบโอติกแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่หลังกระบวนการปั่นและกระบวนการทำให้แข็ง จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ของกลุ่มซินไบโอติกมีปริมาณสูงกว่าในกลุ่มโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Table 6 Physicochemical properties of salad dressing containing encapsulated probiotics and synbiotics

Salad dressing	Viscosity ^{ns} (cP)	pH ^{ns}	Peroxide value ^{ns} (meq/kg)	fat ^{ns} (%)
Probiotics	79231 ± 5.20	3.85 ± 0.13	2.01 ± 0.03	32.41 ± 0.97
Synbiotics	79235 ± 6.09	3.79 ± 0.15	2.07 ± 0.01	33.09 ± 0.91

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical ($p > 0.05$).

นอกจากนี้ผลของการเติมเจลาตินโพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่มีต่อสมบัติด้านกายภาพของน้ำสลัด (Table 6 และ Table 7) และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัด (Table 8) พบว่า มีผลการทดลองเช่นเดียวกับในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม คือ การเติมเจลาตินโพรไบโอติกและพรีไบโอติกไม่มีผลต่อสมบัติด้านเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์น้ำสลัดขึ้น ($p > 0.05$) โดยความหนืดของน้ำสลัดทั้ง 2 กลุ่ม อยู่ในช่วง 79231-70235 cP ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) อยู่ในช่วง 3.85-3.79 ค่าเพอร์ออกไซด์ (PV) อยู่ในช่วง 2.01-2.07 meq/kg และปริมาณร้อยละไขมัน อยู่ในช่วง 32.41-33.09 (Table 6) ส่วนค่าสีของทั้ง 2 กลุ่ม ก็ไม่แตกต่างกัน คือ ค่า L^* มีค่าเท่ากับ 69.89-70.17 ค่า a^* มีค่าเท่ากับ 2.76-2.89 และค่า b^* มีค่าเท่ากับ 29.98-30.11 (Table 7)

Table 7 Color of salad dressing containing encapsulated probiotics and synbiotics

Salad dressing	Color ^{ns}		
	L*	a*	b*
Probiotics	70.17 ± 0.35	2.76 ± 0.42	29.98 ± 0.15
Synbiotics	69.89 ± 0.57	2.89 ± 0.29	30.11 ± 0.18

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical (p>0.05).

ในขณะที่ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำสลัด พบว่า คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น รสชาติ และ ความชอบโดยรวมของน้ำสลัดทั้ง 2 กลุ่มนั้น ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05) โดยส่วนใหญ่ให้คะแนนความชอบในทุกๆ ด้าน ของผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่เติมเจลปิดส์ซินไบโอติก มากกว่าผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่เติมเจลปิดส์โพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว ซึ่งผู้ทดสอบ ชิมให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 3.6-3.8 คะแนน ให้คะแนนความชอบด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 3.87-4.00 คะแนน และให้คะแนนความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 3.67-4.20 คะแนน แต่คะแนนความชอบด้านสีและ เนื้อสัมผัสของน้ำสลัดทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างทางสถิติ (p<0.05) โดยคะแนนความชอบด้านสีของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 3.87-4.53 คะแนน และคะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 3.33-4.27 คะแนน

Table 8 Sensory evaluation of salad dressing containing encapsulated probiotics and synbiotics

Salad dressing	Sensory characteristics				
	Color*	Odor ^{ns}	Flavor ^{ns}	Texture*	Overall acceptance ^{ns}
Probiotics	3.87±0.83	3.60±1.24	3.87±0.74	3.33±0.90	3.67±1.05
Synbiotics	4.53±0.74	3.80±0.77	4.00±1.00	4.27±0.70	4.20±0.86

Note : ^{ns} There was no significantly different in the vertical (p>0.05).; * There was significantly different in the vertical (p<0.05).

จากการวิเคราะห์ปริมาณโพรไบโอติกในน้ำสลัดทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มซินไบโอติกหลังจากเก็บรักษาใน ตู้เย็น (10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของทั้ง 2 กลุ่ม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยในวัน 7 แรก ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของกลุ่มโพรไบโอติกลดลงจาก 9.85 เหลือ 9.63 log CFU/mL ในขณะที่กลุ่มซินไบโอติกมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงจาก 9.86 เหลือ 9.73 log CFU/mL แต่ในวันที่ 14 ของการเก็บรักษา มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มซินไบโอติกลดลงเหลือ 9.01 และ 9.37 log CFU/mL ตามลำดับ

นอกจากนี้ในแต่ละวันของการเก็บรักษา พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของกลุ่มโพรไบโอติกมีค่าน้อยกว่ากลุ่มซินไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษา 7 วัน แรก มีค่าเท่ากับ 9.63 และ 9.73 log CFU/mL ตามลำดับ และในวันที่ 14 มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติกและกลุ่มซินไบโอติกเท่ากับ 9.01 และ 9.37 log CFU/mL ตามลำดับ (Table 9)

Table 9 Probiotics in salad dressings containing encapsulated probiotics and synbiotics during storage at 10°C for 14 days

Storage (day)	log ₁₀ CFU/mL	
	Probiotics	Synbiotics
Day-0 ^{ns}	9.85±0.04 ^a	9.86±0.03 ^a
Day-7 [*]	9.63±0.02 ^b	9.73±0.01 ^b
Day-14 [*]	9.01±0.03 ^c	9.37±0.04 ^c

Note : ^{a,b,c} The vertically different superscripts refer to statistically different average (p<0.05).

^{ns} The was no significantly different in the horizontal (p>0.05).

^{*} The was significantly different in the horizontal (p<0.05).

จากผลการตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ในน้ำสลัดชั้นที่ผลิตโดยผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็น (10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน และทำการตรวจสอบคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ตามมาตรฐาน มผช. 672/2547 เรื่อง มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน “น้ำสลัด” ตลอดระยะเวลา 14 วัน พบว่า จุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1×10³ CFU/g, *Escherichia coli* น้อยกว่า 3 CFU/g ส่วนยีสต์ และราน้อยกว่า 100 CFU/g นอกจากนั้นไม่พบทั้ง *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม และ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม

วิจารณ์ผลการวิจัย

ความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกของกากมะพร้าวผง

การเติมกากมะพร้าวผงพันธุ์ซุนสีหม้อผงมีปริมาณกรดแลคติกมากกว่ากับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เนื่องจากกากมะพร้าวเป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยแมนแนนพอลิเมอร์ ร้อยละ 61 และส่วนประกอบที่เหลือ ได้แก่ เซลลูโลส กาแลคโต-กลูโคแมนแนน กลูโคแมนแนน อะราบิโนแมนโนกาแลคแทน และอาราบินอกซีโลกาแลคแทน (Sunna *et al.*, 2000; Khuwijitjaru *et al.*, 2014) ดังนั้นกากมะพร้าวที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งคาร์บอน (พรีไบโอติก) ไปสนับสนุนการเจริญของโพรไบโอติก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Niljantuk *et al.* (2019) ที่ศึกษาการใช้สารพรีไบโอติกในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Lacobacillus acidophilus* TISTR 1338 โดยพบว่าส่วนใส่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกที่มีการเติมสารพรีไบโอติกลงไปมีค่าสูงขึ้นและมีค่าความเป็นกรดที่มากขึ้นด้วยเช่นกัน และยังสอดคล้องกับการวิจัยของ Abbasiliasi *et al.* (2019) ที่มีการใช้โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากกากมะพร้าว (CKC) สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนโพรไบโอติกและการผลิตกรดที่มองเห็นได้ชัด และมีศักยภาพจะถูกนำไปใช้เป็นพรีไบโอติกชนิดใหม่ได้ การเติมกากมะพร้าวผงส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในทุกที่ที่เทเมนต์ โดยที่ที่เทเมนต์ที่เติมกากมะพร้าวผงร้อยละ 1.5 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 10.14 log CFU/mL แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกากมะพร้าวผงเป็นร้อยละ 2.0 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกลดลงเล็กน้อย เท่ากับ 10.13 log CFU/mL ซึ่งอาจมีผลมาจากการที่จุลินทรีย์เจริญที่มีการเติมกากมะพร้าวผง

ร้อยละ 2.0 เข้าสู่ระยะหยุดนิ่ง (stationary phase) โดยเกิดขึ้นได้จากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยสารเคมีอื่นๆ หรือด้วยความเค้นทางกายภาพ (stress) จากนั้นจะเข้าสู่ระยะถดถอย (decline phase) และเซลล์มีการสลายตัว (autolysis) Mckane & Kandel (1996) ดังนั้นหากมะพร้าวผงที่นำไปใช้เป็นสารพรไบโอติกที่เหมาะสม คือ ระดับร้อยละ 1.5 ของปริมาณอาหารเหลว

ประสิทธิภาพของสารที่ใช้ในการห่อหุ้มโพรไบโอติก

การใช้สารละลายอัลจินเตเข้มข้นร้อยละ 4 เพียงชนิดเดียว และการใช้สารละลายโพลิเมอร์ผสมระหว่างสารละลายอัลจินเตเข้มข้นร้อยละ 4 และคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 ให้ค่าประสิทธิภาพในการห่อหุ้มโพรไบโอติกอยู่ในช่วงร้อยละ 91.89 - 95.63 ซึ่งงานสอดคล้องเช่นเดียวกับวิจัยอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า เม็ดบีดส์ที่ได้จากสารละลายอัลจินเตนั้นมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มได้มากกว่าร้อยละ 90 (Leong *et al.*, 2016; Naranjo-Durán *et al.*, 2021) โดย Muhardina *et al.* (2018) พบว่า เม็ดบีดส์เจลที่ผลิตจากไซโตเต็มอัลจินเตเข้มข้นร้อยละ 1-4 สามารถทนการกักตัวของกรดในขณะที่ผ่านระบบกระเพาะอาหารได้ (Allan-Wojtas *et al.*, 2008 ; Annan *et al.*, 2008) และยังเป็นโครงสร้างภายนอกที่ช่วยปกป้องแบคทีเรียไม่ให้ถูกทำลายจากภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี (Kong and Singh, 2008) อีกทั้งไม่สามารถย่อยได้ในมนุษย์ ซึ่งทำหน้าที่เหมือนเป็นใยอาหาร (Gacesa, 1992 ; Brownlee *et al.*, 2005) เนื่องจากอัลจินเตประกอบด้วย *D*-mannuronic acid และ *L*-guluronic acid ซึ่งมีผลต่อการเชื่อมไขว้กับแคลเซียมคลอไรด์ ถ้าความเข้มข้นของ *D*-mannuronic acid และ *L*-guluronic acid ที่สูง ก็จะส่งผลให้เม็ดเจลมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น โดยอัลจินเตเป็นนิยมในการทำเม็ดบีดส์เจลสำหรับอาหาร เนื่องจากความง่ายในเกิดเจล แม้ที่ความเข้มข้นต่ำประมาณร้อยละ 1 ก็ตาม (Sheu & Marshall, 1993; Champagne *et al.*, 1994 ; Roberfroid, 2000 ; Burey *et al.*, 2008)

ในขณะที่การใช้สารละลายโพลิเมอร์ผสมระหว่างสารละลายอัลจินเตและคาราจีแนนเข้มข้นให้ค่าประสิทธิภาพในการห่อหุ้มโพรไบโอติกสูงสุด (ร้อยละ 95.63±0.16) เนื่องจากคาราจีแนนมีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยการชีวภาพต่างๆ ได้ดี นิยมนำมาใช้ในการผลิตฟิล์มชีวภาพและห่อหุ้มสารสำคัญ เช่น สารให้กลิ่นรส โพรไบโอติก และเอนไซม์ (Tosa *et al.*, 1979; Chakraborty, 2017) โดยการเติมสารละลายคาราจีแนนลงไปผสมในสารละลายอัลจินเตจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของบีดส์เจลได้ด้วยการเชื่อมข้ามของหมู่ sulphate (S=O) ในโครงสร้างโมเลกุลของคาราจีแนนกับหมู่ carboxylic (COO⁻) ของโครงสร้างโมเลกุลอัลจินเตด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ทำให้โครงสร้างของบีดส์มีความแข็งแรงขึ้น ซึ่งยืนยันได้จากผลวิจัยของ Postolović *et al.* (2022) ที่พบว่าหมู่ sulphate (S=O) และหมู่ carboxylic (COO⁻) ของโมเลกุลอัลจินเตในสารละลายผสมทั้งสองชนิดรวมกันโดยใช้เครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) ในการตรวจสอบ

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายโพลิเมอร์ผสมในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหาร สอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพการห่อหุ้มโพรไบโอติกด้วยสารละลายผสมดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าโพรไบโอติกมีความสามารถในการรอดสูงขึ้นเมื่อถูกห่อหุ้มด้วยสารละลายผสมระหว่างอัลจินเตกับคาราจีแนน โดยเปรียบเทียบกับกรห่อหุ้มด้วยสารละลายโพลิเมอร์เพียงอย่างเดียว ซึ่งความแข็งแรงของบีดส์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารละลายผสมนี้ เป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ผ่านพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล (intermolecular hydrogen bonding) นั่นเอง

การประยุกต์ใช้ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

อัตราการขึ้นฟู (%Overrun) ของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกะทิ พบว่ามี %Overrun ต่ำกว่าค่า %Overrun ของไอศกรีมทั่วไปคือ ร้อยละ 40-100 อันเนื่องมาจากขนาดและประสิทธิภาพของเครื่องปั่นไอศกรีม การปั่นระหว่าง Churning อย่างช้าๆ จะทำให้มีอากาศถูกกักเข้าไปในเนื้อไอศกรีมได้น้อย ส่งผลให้มีไอศกรีมมีค่า %overrun ต่ำ และอัตราการแช่แข็ง (frozen rate) ของผลิตภัณฑ์ที่เร็วขึ้น ซึ่งไอศกรีมที่มีค่า %Overrun ต่ำ ความเป็นฉนวนของฟองอากาศจะน้อย จึงทำให้ไอศกรีมมีค่า k หรือสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนความร้อนที่สูงกว่า (Clarke, 2004) ดังนั้น ไอศกรีมจะแช่แข็งได้ไวขึ้น เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กกว่าและเนื้อสัมผัสเนียนกว่า แต่การละลายของไอศกรีมก็จะเร็วกว่าไอศกรีมที่มีค่า %Overrun สูงด้วย

ส่วนกระบวนการปั่นไอศกรีมและกระบวนการหลังการทำให้แข็งส่งผลต่อการลดลงของปริมาณโพรไบโอติก เนื่องจากกระบวนการปั่นไอศกรีม เซลล์ของเชื้อโพรไบโอติกจะได้รับบาดเจ็บที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จากผลึกน้ำแข็ง การบาดเจ็บที่เกิดจากความเย็นจึงเป็นสาเหตุของการลดจำนวนเชื้อโพรไบโอติก (Sheu & Marshall, 1991; Tamime, 2002; Mohammadi *et al.*, 2011) และยังคงสอดคล้องกับการศึกษาของ Hekmat & McMahon (1992) ที่ทำการศึกษากการเหลือรอดของแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกกลุ่ม *Lactobacillus* ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีม และพบว่าจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษา แต่การเติมโพรไบโอติกลงไปผสมกับโพรไบโอติกในการห่อหุ้ม ช่วยเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้เนื่องจากการห่อหุ้มระหว่างโพรไบโอติกและโพรไบโอติกช่วยปรับปรุงการมีชีวิตของโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากที่โพรไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ช่วยสนับสนุนกิจกรรมเมแทบอลิซึมของเซลล์โพรไบโอติก ดังนั้นจึงทำให้สามารถปรับปรุงการรอดของโพรไบโอติกที่มีในผลิตภัณฑ์ได้มากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังสามารถช่วยป้องกันอันตรายจากสภาพแวดล้อมที่รุนแรง อย่างเช่น สภาพกรดเข้มข้นในกระเพาะอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลอัตราการอยู่รอดของโพรไบโอติกในน้ำย่อยเทียมกระเพาะอาหารดังรายงานมาแล้วในข้างต้น

จากผลการตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์น้ำสลัดที่ผลิตมีความปลอดภัย โดยมีจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินมาตรฐานตามที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน น้ำสลัด (มผช. 672/2547) กำหนด และไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค *Salmonella*, *S. aureus* และ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์น้ำสลัดมีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 ซึ่งความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์และช่วยควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสม คือ 3.5-4.0 โดยที่ค่า pH น้อยกว่า 3.5 อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ และประกอบกับน้ำสลัดขึ้นผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อระดับพาสเจอร์ไรส์ด้วย

สรุปผลการวิจัย

กากมะพร้าวพันธุ์ขุนสีหม้อสามารถนำมาใช้ในการเป็นโพรไบโอติกได้ โดยปริมาณที่เหมาะสมของกากมะพร้าวผงที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติก คือ ร้อยละ 1.5 และยังมีความคุ้มค่าต่อการนำไปศึกษาวิจัยและต่อยอดงานวิจัย เนื่องจากร้อยละผลผลิตของกากมะพร้าวพันธุ์ขุนสีหม้อมีค่ามากกว่าร้อยละ 90 นอกจากนั้นการห่อหุ้มด้วยสารละลายโพรโพลิเมอร์ผสมระหว่างอัลจินเนตกับความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และคาราจีแนนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะเพิ่มความแข็งแรงของเมดปิดส์ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่ม

ประสิทธิภาพของการห่อหุ้มมากกว่าร้อยละ 95 และสามารถเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติกได้ในสภาวะทั่วไปหรือแม้แต่ในสภาวะรุนแรงอย่างในน้ำย่อยกระเพาะอาหาร โดยการห่อหุ้มด้วยสารละลายไบโอพอลิเมอร์ผสมนั้นส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของโพรไบโอติกลดลงจากเริ่มต้นน้อยกว่าการห่อหุ้มด้วยสารละลายไบโอพอลิเมอร์เพียงอย่างเดียว อีกทั้งการเพิ่มแหล่งคาร์บอนด้วยการเติมพรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติกในกระบวนการห่อหุ้ม ยังสามารถเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้อีกด้วย โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมพรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติกซินไบโอติก (กลุ่มซินไบโอติก) มีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกเหลือมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่เติมเพียงโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว (กลุ่มโพรไบโอติก) ในทุกๆกระบวนการแปรรูปและเก็บรักษา โดยไม่มีผลกระทบต่อสมบัติด้านกายภาพและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ทั้งสอง ดังนั้นการเติมพรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติกในการห่อหุ้มในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือเรียกว่า “ซินไบโอติก” สามารถช่วยเพิ่มการอยู่รอดของโพรไบโอติก ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆได้ ซึ่งจะเป็นผลดีต่อผู้บริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีซินไบโอติกอยู่

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในส่วนของงานมูลฐาน (Fundamental Fund) และขอขอบคุณสำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยสยาม ผู้ประสานงานระหว่างสำนักงานส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) กับคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยสยาม ในการดำเนินการต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการบริหารจัดการทุน

เอกสารอ้างอิง

- Abbasiliasi, S., Joo, S. T., Bashirat, B., Tengku, A. T. I., Yew, J. T., Arbakariya, A., & Shuhaimi, M. (2019). Prebiotic efficacy of coconut kernel cake's soluble crude polysaccharides on growth rates and acidifying property of probiotic lactic acid bacteria *in vitro*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1216-1227.
- Allan-Wojtas, P., Hansan, L.T., & Paulson, A.T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(1), 101-108.
- Anal, A.K., & Stevens, W. F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290(1-2), 45-54.
- Anal, A.K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.



- Annan, N.T., Borza, A.D., & Hansen, L.T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, 41, 184-193.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersberg, MD.
- Arbuckle, W.S. (1986). *Ice Cream*, 4thed. Van Nostrand Reinhold, New York City, U.S.
- Bolliger, S., Wildmoser, H., Goff, H.D., & Tharp, B.W. (2000). Relationships between ice cream mix viscoelasticity and ice crystal growth in ice cream. *International Dairy Journal*, 10, 791-797.
- Brownawell, A.M., Caers, W., Gibson, G.R., Kendall C.W.C., Lewis, K.D., Ringel, Y., & Slavin, J.L. (2012). Prebiotics and the health benefits of fiber: Current regulatory status, future research, and goals. *The Journal of Nutrition*, 142(5), 962-974.
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., & Onsoyen, E. (2005). Alginate as a source of dietary fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 497–510.
- Burey, P., Bhandari, B.R., Howes, T., & Gidley, M.J. (2008). Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 361–377.
- Cao, J., Yuc, Z., Liua, W., Zhaoa, J., Zhanga, H., Zhaia, Q., & Chen, W. (2020). Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, 64(103643), 1-11.
- Capela, P., Hay, T.K.C., & Shah, N.P. (2007). Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International*, 40, 1261–1269.
- Chakraborty, S. (2017). Carrageenan for encapsulation and immobilization of flavor, fragrance, probiotics, and enzymes: A review. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 36(2), 1-19.



- Champagne, C.P., Lacroix, C., & Sodinigallot, I. (1994). Immobilized cell technologies for the dairy-industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 109–134.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J., Soullignac, L., & Innocent, J.P. (2000). The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 124–131.
- Clarke, C. (2004). *The Science of Ice Cream*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Gacesa, P. (1992). Enzymatic degradation of alginates. *International Journal of Biochemistry*, 24, 545–552.
- Gibson, G.R., & Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: in traducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(1), 1401-1412.
- Geilman, W.G., & Schmidt, D. (1992). Physical characteristics of frozen desserts made from ultrafiltered milk and various carbohydrates. *Journal of Dairy Science*, 75(10), 2670-2675.
- Guérin, D., Vuilleumard, J.C., & Subirade, M. (2003). Protection of *Bifidobacteria* encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2076–2084.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), 291–311.
- Hekmat, S., & McMahon, D.J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1415-1422.
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39–48.



- Khuwijitjaru, P., Pokpong, A., & Klinchongkon, K. (2014). Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1946–1952.
- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, I.S., Cha, D.S., & Park, H.J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 493–500.
- Kong, F., & Singh, R.P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 7, 67-80.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3–13.
- Lee, K.Y., & Mooney, D.J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- Leong, J.Y., Lam, W.H., Ho, K.W., Voo, W.P., Lee, M.F.X., Lim, H.P., Lim, S.L., Tey, B.T., Poncelet, D., & Chan, E.S. (2016). Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*, 24, 44–60.
- Mandal, S., Puniya, A.K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16(10), 1190–1195.
- Mckane, L. & Kandel, J. (1996). *Microbiology: essentials and applications*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Misra, S., Mohanty, D., & Mohapatra, S. (2019). Applications of probiotics as a functional ingredient in food and gut health. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(3), 213-223.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R., & Cruz, A.G. (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, 61(3), 411–424.
- Muhardina, V., Sari, P.M., Aisyah, Y., Haryani, S., & Mega, F.A. (2018). Extrusion encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* coated by carrageenan – alginate with additional tofu waste flour prebiotic. *International Journal of Engineering and Technology*, 7(4), 5242-5244.



- Naranjo-Durán, A.M., Quintero-Quiroz, J., Rojas-Camargo, J., & Ciro-Gómez, G.L. (2021). Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques. *Scientific Report*, 11(1317), 1-10.
- Niljantuk, N., Chuekram, S., Kangkuntod, S., Oonmetta-aree, J., & Singthong, J. (2019). Prebiotic activities of Jerusalem artichoke. *Science and Technology Research Journal Nakhon Ratchasima Rajabhat University*, 4(2), 18-24. (in Thai)
- Nualla-ong, S. (2014). Extractions of prebiotics from agricultural plants. Songkla: Prince of Songkla University. (in Thai)
- Postolović, K.S., Antonijević, M.D., Ljujić, B., Kovačević, M.M., Janković, M.G., & Stanić, Z.D. (2022). pH-responsive hydrogel beads based on alginate, **K**-carrageenan and poloxamer for enhanced curcumin, natural bioactive compound, encapsulation and controlled release efficiency. *Molecules*, 27(4045), 1-22.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.N. (1999) *Microbiology*. (4th Edition). New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G.S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein-alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891–898.
- Reque, P.M., & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 1-10.
- Roberfroid, M.B. (2000). Prebiotics: are they functional food. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1682-1687.
- Rokka S., & Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1), 1–12.
- Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural science. *Probiotics*, 3–36.
- Sheu, T.Y., & Marshall, R.T. (1991). Improving culture viability in frozen dairy desserts by microencapsulation. *Journal of Dairy Science*, 74(supplement 1), 107.



- Sheu, T.Y., & Marshall, R.T. (1993). Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557–107561.
- Sheu, T.Y, Marshall, R.T, & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902-1907.
- Sunna, A., Gibbs, M. D., Chin, C. W. J., Nelson, P. J., & Bergquist, P. L. (2000). A gene encoding a novel multidomain β -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 664–670.
- Stefaniak, A.B., Virji, M.A., Harvey, C.J., Sbarra, D.C., Day, G.A., & Hoover, M.D. (2010). Influence of artificial gastric juice composition on bio-accessibility of cobalt- and tungsten-containing powders. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213, 107-15.
- Tamime, A.Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 2–15.
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y., & Chibata, I. (1979). Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(2), 1697–1700.
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42(1), 8-12.
- Yenyai, S., & Pinsiroadom, P. (2014). Optimal conditions to optimize mannan extraction from processed coconut pulp. Bangkok: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai)