

การพัฒนาฟิล์มบริโกลด์ที่มีสมบัติซินไบโอดีจากกลูโคแมนแนนของผงบูก



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC EDIBLE FILM FROM KONJAC GLUCOMANNAN

Miss Patthasarun Pruksarojanakul



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาฟิล์มบริโกลด์ที่มีสมบัติขึ้นโปอติคจากกลูโคส
	แมนแนนของผงบุก
โดย	นางสาวพัทธ์ศรัณย์ พุกษาโรจนกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา
	อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนาบุญวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.รริศรา อิมภาประเสริฐ)

พัทธ์ศรีธรมย์ พฤกษาโรจนกุล : การพัฒนาฟิล์มบรีโภาคได้ที่มีสมบัติซินไบโอติกจากกลูโคแมนแนนของผงบูก (DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC EDIBLE FILM FROM KONJAC GLUCOMANNAN) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชวลิตา บรมพิชัยชาติกุล, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, อ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล, 140 หน้า.

โพรไบโอติกและพรีไบโอติกเป็นองค์ประกอบของอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ อย่างไรก็ตามอาหารที่มีโพรไบโอติกและพรีไบโอติกปริมาณสูงมีเพียงบางกลุ่มเท่านั้น การรวมตัวกันของเทคโนโลยีทางฟิล์มและสารเคลือบบรีโภาคได้กับซินไบโอติกจะช่วยให้ผู้ผลิตประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติกในอาหารได้หลากหลายขึ้นและทำให้ผู้บริโภคนำเข้าถึงโพรไบโอติกและพรีไบโอติกได้ง่ายขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบูกที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาซินไบโอติก โดยคัดเลือกคู่ซินไบโอติกที่มีศักยภาพจากการจับคู่ระหว่างโพรไบโอติกทางการค้า 3 สายพันธุ์ (*Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus paracasei* และ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) กับพรีไบโอติกทางการค้า 4 ชนิด (Orafti®P95, Orafti®GR, Orafti®HSI, Oligomate®55N) และกลูโคแมนแนน พบว่าคู่ของ *L. casei*-01 กับ Orafti®GR ให้ค่า prebiotic activity score สูงที่สุด (0.29 ± 0.03) และกลูโคแมนแนนของผงบูกซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) สามารถสนับสนุนการเจริญของโพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบและให้ค่า prebiotic activity score สูงสุดเมื่อจับคู่กับ *L. paracasei* ดังนั้นจึงเลือกคู่ซินไบโอติกทั้งสองคู่นี้มาพัฒนาฟิล์ม หลังจากผ่านการขึ้นรูปฟิล์มที่อุณหภูมิ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ นาน 16 ชั่วโมง พบว่าฟิล์มที่เติมคู่ของ *L. casei*-01 กับ Orafti®GR มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงประมาณ 2 log CFU/mL สารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ให้การรอดชีวิตเท่ากับ $78.75 \pm 0.56\%$ เมื่อพิจารณาทั้งค่า prebiotic activity score และอัตราการรอดชีวิตร่วมกันจึงเลือกฟิล์มที่มีคู่ซินไบโอติก *L. casei*-01 และ Orafti®GR เพื่อศึกษาสมบัติและศึกษาการประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป ผลการวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มแสดงให้เห็นว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบูกที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti®GR ละลายในน้ำได้ดี ($97.22 \pm 0.66\%$) ไม่มีสี โปร่งแสง สามารถต้านทานแรงดึงได้ดี ($21.10 \pm 3.97\text{ MPa}$) มีการยืดตัวดี ($23.83 \pm 5.77\%$) มีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำดี ($0.0056 \pm 0.0001\text{ g mm h}^{-1}\text{ m}^{-2}\text{ kPa}^{-1}$) เมื่อเก็บรักษาฟิล์มในรูปแบบแผ่นที่อุณหภูมิห้องโดยมีระยะเวลาของการศึกษานาน 8 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตลดลงประมาณ 6 log CFU/g ตลอดการเก็บรักษา โดยหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีจำนวนต่ำกว่าที่ 6 log CFU/g ฟิล์ม ซึ่งเป็นปริมาณขั้นต่ำที่ยอมรับได้ การประยุกต์ใช้ฟิล์มในรูปแบบสารเคลือบบนผิวขนมปังพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะลดลงประมาณ 2 log CFU/ชิ้น หลังการเก็บรักษานาน 7 วัน ทำให้ปริมาณของ *L. casei*-01 ที่มีชีวิตยังคงมีค่ามากกว่า 6 log CFU/ชิ้น ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าฟิล์มบรีโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบูกที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti®GR สามารถเป็นทางเลือกในการขยายการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5772139523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: SYNBIOTIC EDIBLE FILM / KONJAC GLUCOMANNAN / PROBIOTICS / PREBIOTICS

PATTHASARUN PRUKSAROJANAKUL: DEVELOPMENT OF SYNBIOTIC EDIBLE FILM FROM KONJAC GLUCOMANNAN. ADVISOR: ASST. PROF. CHALEEDA BOROMPICHAICHARTKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., SARN SETTACHAIMONGKON, Ph.D., 140 pp.

Probiotics and prebiotics are considered as health-promoting food ingredients. However, their potential sources are limited to some foods. Integration of edible film and coating and synbiotic technologies is an innovative approach that will enhance the incorporation of probiotics and prebiotics into more variety of food products and increase the accessibility for consumers. This research aimed to develop konjac glucomannan (KGM) film as a synbiotic carrier. To identify the potential synbiotic combination, three probiotic strains (*Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Lpc-37 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) were paired with commercial prebiotics (Orafti®P95, Orafti®GR, Orafti®HSI and Oligomate®55N) and KGM. The results revealed that *L. casei*-01 and Orafti®GR was the potential combination with the highest score (0.29±0.03). Furthermore, KGM which serve as a synbiotic carrier could promote the growth of all probiotic strains and resulted in the highest score when paired with *L. paracasei*. Thus, these two synbiotic combination were selected for developing films. After undergoing a film-forming process at 40 °C for 16h, viable count in the film incorporated with *L. casei*-01 and Orafti®GR reduced approximately 2 log CFU/mL film-forming solution (FFS), allowing the survival of 78.75±0.56%. Taking both prebiotic activity score and the survival rate into account, this formulation was chosen for study on film properties and its application. Edible films from KGM incorporated with *L. casei*-01 and Orafti®GR was colorless, transparent, highly soluble in water (97.22 ± 0.66%), with good tensile strength (21.10 ± 3.97 MPa), % elongation at break (23.83 ± 5.77%) and water vapor permeability (0.0056 ± 0.0001g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹). When stored the film at room temperature up to 8 days, 6 log CFU/g reduction in active cells in the film throughout the storage period was observed. After 4 days of storage, viability decreased to less than 6 log CFU/g film which was the lowest acceptance limit. Application of the film as an edible coating on surface of bread buns demonstrated a loss of *L. casei*-01 viability of 2 log CFU/portion during a storage period of 7 days, resulting in active cells of *L. casei*-01 more than 6 log CFU/portion. The results from this research support the use of edible films from KGM formulated with *L. casei*-01 and Orafti®GR as an alternative approach to extend the application of probiotics and prebiotics in food products.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดีโดยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และอาจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาและอุปสรรค ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. สายวรุฬห์ ชัยวานิชศิริ (ประธานคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์) รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานวงค์ (ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์) รองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภากาศ และอาจารย์ ดร. รริศรา อิมภาประเสริฐ ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆอันเป็นประโยชน์เพื่อให้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช และรองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทรวารรณ สำหรับความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือเพื่อวิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม ขอขอบคุณบริษัท ดีพีโอ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด (ประเทศไทย) และบริษัท เคมฟ้อยท์ จำกัด (ประเทศไทย) สำหรับความอนุเคราะห์ตัวอย่างฟรีไปโอดีก ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณอำไพ เขตสาลี และคุณน้อย มิเอม ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คุณนพรัตน์ ลาภเย็น และคุณสุวารีย์ รัชชทิพย์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้องและเพื่อนนิสิตทั้งหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดมาทั้งด้านการเรียนและการทำวิจัย โดยเฉพาะอาจารย์ ดร. อรชร เมฆเกิดชู, ดร. ภัทรานิชฐ์ ตรีเพ็ชร, คุณรัชชิตา เดชอุดม, คุณบัณฑิตา จิตตประไพ, คุณอัชฌา เพชรสลักแก้ว, คุณธีรภัทร ตั้งสมบูรณ์, คุณสุเมธ วิสุทธีวรรณ, คุณจุฑามาศ ก่อกิจพูนผล, คุณนันทชพร กำหย่นนะ, คุณกมลชนก อาชายนะ, คุณนุติ หุตะสิงห์

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวและญาติ ขอขอบคุณเพื่อนสมาชิกชมรมนักร้องประสานเสียงสโมสรนิสิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและชมรมดนตรีไทยสโมสรนิสิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนมาตลอด และขอขอบคุณโครงการพัฒนาและส่งเสริมความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาตลอดหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมุติฐานงานวิจัย	1
1.3 วัตถุประสงค์	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 กลูโคแมนแนนของผงบูก (konjac glucomannan)	3
2.1.1 แหล่งสะสมกลูโคแมนแนนในบูกและการผลิตกลูโคแมนแนนจากบูก	3
2.1.2 เคมีของกลูโคแมนแนน	6
2.1.3 ผลเชิงสุขภาพและสมบัติฟิสิกส์ไปโอติกของกลูโคแมนแนน	8
2.1.4 สมบัติในการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบและการประยุกต์ใช้ฟิล์มจากกลูโคแมนแนน ของผงบูกเพื่อกักเก็บสาร	9
2.1.5 การประยุกต์ใช้กลูโคแมนแนนของผงบูกในอุตสาหกรรมอาหาร.....	11
2.2 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร (gut microbiota)	12
2.2.1 จำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร.....	13
2.2.2 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารกับสุขภาพ	14
2.2.3 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร	16

2.3 โพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติก.....	16
2.3.1 โพรไบโอติก (Probiotics).....	16
2.3.2 พรีไบโอติก (Prebiotics)	22
2.3.2.1 ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide หรือ FOS).....	24
2.3.2.2 กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharide หรือ GOS).....	26
2.3.2.3 อินูลิน (inulin).....	26
2.3.2.4 พรีไบโอติกในทางเดินอาหารและการใช้พรีไบโอติกเพื่อการเจริญของโพรไบโอติก.....	27
2.3.3 ซินไบโอติก (Synbiotics).....	29
2.4 ข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	30
2.5 การวิเคราะห์ศักยภาพของพรีไบโอติกเชิงปริมาณ	32
2.6 फिल्मและสารเคลือบบริโภคน้ำได้ที่เติมพรีไบโอติกและ/หรือโพรไบโอติก	35
2.6.1 फिल्मและสารเคลือบบริโภคน้ำได้.....	35
2.6.2 แรงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟิล์มและการขึ้นรูปฟิล์มและสารเคลือบบริโภคน้ำได้	36
2.6.3 การเติมพรีไบโอติกและโพรไบโอติกในฟิล์มและสารเคลือบ.....	38
2.6.4 สมบัติของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคน้ำได้เมื่อเติมโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติก	42
2.6.4.1 สมบัติของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบ	42
2.6.4.2 ความหนา.....	42
2.6.4.3 สมบัติเชิงกล.....	43
2.6.4.4 สภาพซึมผ่านไอน้ำของไอน้ำ (water vapor permeability หรือ WVP).....	43
2.6.4.5 สีและความโปร่งแสง.....	44
2.6.4.6 ความสามารถในการละลายน้ำ	44
2.6.4.7 โครงสร้างของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคน้ำได้.....	45

2.6.5 เสถียรภาพของจุลินทรีย์ในฟิล์มและสารเคลือบบริโภาคได้ระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มและการเก็บรักษา	46
2.7 การประยุกต์ใช้ฟิล์มที่เติมโพรไบโอติกและ/หรือพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร	48
2.8 สรุป	48
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	49
3.1 วัตถุประสงค์ จุลินทรีย์ อุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	49
3.1.1 วัตถุประสงค์	49
3.1.2 จุลินทรีย์	50
3.1.3 อุปกรณ์	50
3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	52
3.2 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย	53
3.2.1 จุลินทรีย์และการเก็บรักษา	53
3.2.2 การทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติก	54
3.2.2.1 การเตรียมจุลินทรีย์	54
3.2.2.2 การประเมินค่า prebiotic activity score	54
3.2.3 การพัฒนาฟิล์มบริโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกทางการค้า	56
3.2.3.1 การพัฒนาฟิล์ม	56
3.2.3.2 การตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม	57
3.2.4 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม	57
3.2.5 ตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในฟิล์มกลูโคแมนแนนระหว่างการเก็บรักษา ..	58
3.2.6 การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับขนมปัง	58
3.2.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับเคลือบขนมปัง	58

3.2.6.2 การเตรียมขนมปังเคลือบฟิล์ม	58
3.2.6.3 ศึกษาการรอดชีวิตโพรไบโอติกในฟิล์มเคลือบขนมปังระหว่างการเก็บรักษา .	59
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	61
4.1 การทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติก	61
4.2 การพัฒนาฟิล์มบริโกล์ได้จากผงบุกกลูโคแมนแทนที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกทาง การค้า	69
4.2.1 การตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม	69
4.3 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม	72
4.3.1 ความหนา ความโปร่งแสง และสี.....	72
4.3.2 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility).....	75
4.3.3 สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability; WVP)	76
4.3.4 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break).....	78
4.3.5 ลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางของฟิล์ม	79
4.3.6 Fourier transform infrared (FT-IR) spectra ของฟิล์ม.....	82
4.4 ตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในฟิล์มกลูโคแมนแทนที่ระหว่างการเก็บรักษา	87
4.5 การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร	89
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	94
5.1 สรุปผลการทดลอง	94
5.2 ข้อเสนอแนะ	95
รายการอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารสำหรับการวิเคราะห์ prebiotic activity score.....	115
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	121
ภาคผนวก ค การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต.....	126

ภาคผนวก ง ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลัง
กระบวนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์..... 130

ภาคผนวก จ วิธีวิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม..... 131

ภาคผนวก ฉ การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร 138

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 140



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	พันธุ์บุกที่พบในประเทศไทย.....	5
ตารางที่ 2.2	แมนแนนที่พบในพืช.....	7
ตารางที่ 2.3	ตัวอย่างแหล่งของกลูโคแมนแนน อัตราส่วนแมนโนสต่อกลูโคส และระดับการพอลิ เมอไรเซชัน (degree of polymerization)	8
ตารางที่ 2.4	ตัวอย่างการวิจัยฟิล์มจากกลูโคแมนแนน.....	10
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้กลูโคแมนแนนของผงบุกในอาหาร.....	12
ตารางที่ 2.6	จุลินทรีย์ anaerobic bacteria ที่พบมากในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์.....	12
ตารางที่ 2.7	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีสมบัติโพรไบโอติก	17
ตารางที่ 2.8	การใช้โพรไบโอติกเพื่อรักษาโรค.....	21
ตารางที่ 2.9	ตัวอย่างพรีไบโอติกและแหล่งที่พบ.....	23
ตารางที่ 2.10	ตัวอย่างค่า prebiotic activity score ของพรีไบโอติกทางการค้า.....	34
ตารางที่ 2.11	ตัวอย่างการศึกษาฟิล์มที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติก	40
ตารางที่ 4.1	ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (log CFU/mL) ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ.....	62
ตารางที่ 4.2	ปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (log CFU/mL) ในอาหารเหลวที่เติม คาร์โบไฮเดรตทดสอบ	63
ตารางที่ 4.3	ความหนา ความโปร่งแสง และสีของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก	73
ตารางที่ 4.4	ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) และสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability หรือ WVP) ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (ฟิล์มควบคุม) และฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม <i>L. casei</i> -01 หรือ Orafiti® GR หรือเติมทั้งสองอย่าง.....	75
ตารางที่ 4.5	ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (ฟิล์มควบคุม) และฟิล์มกลูโคแมน แนน ของผงบุกที่เติม <i>L. casei</i> -01 หรือ Orafiti® GR หรือเติมทั้งสองอย่าง	78

ตารางที่ 4.6 FT-IR characteristic absorption band ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกสูตร
ต่าง ๆ 84

ตารางที่ 4.7 *L. casei*-01 ที่มีชีวิตในฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติมและไม่เติม Orafti® GR ระหว่าง
การเก็บรักษานาน 8 วัน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต..... 88

ตารางที่ 4.8 น้ำหนักขนมปัง, water activity และการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บที่
อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน 90

ตารางที่ 4.9 สีของผิวขนมปังที่เคลือบด้วยสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่มีสูตรแตกต่างกันและขนม
ปังที่ไม่มีการเคลือบด้วยฟิล์ม 92

ตารางที่ 4.10 ผลการสำรวจเบื้องต้นของความพอใจของผู้บริโภคต่อลักษณะปรากฏและกลิ่น
ของขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR เปรียบเทียบกับ
ขนมปังที่ไม่มีสารเคลือบ 92

ตารางที่ ก5.1 Prebiotic activity score ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามสายพันธุ์ที่เจริญในอาหาร
เหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ..... 120

ตารางที่ ง1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลังกระบวนการ
ขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์..... 130

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1	โครงสร้างของต้นบุก (<i>Amorphophallus konjac</i> K. Koch).....	3
ภาพที่ 2.2	หัวบุกที่เก็บเกี่ยวจากไร่ในจังหวัดตาก ประเทศไทย เป็นบุกเนื้อทรายหรือบุกคนโท (<i>Amorphophallus muelleri</i> Blume).....	4
ภาพที่ 2.3	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์และแผนภาพแสดงเนื้อเยื่อของหัวบุก (<i>A. konjac</i> K. Koch) ย้อมด้วยสีย้อม toluidine blue แสดง glucomannan idioblast (GI).....	4
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของกลูโคแมนแนน.....	6
ภาพที่ 2.5	องค์ประกอบและจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นกลุ่มหลักที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์และปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและจำนวนจุลินทรีย์.....	13
ภาพที่ 2.6	แผนภาพการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารที่ส่งผลเชิงสรีรวิทยาของโฮสต์.....	15
ภาพที่ 2.7	กลไกการส่งผลเชิงสุขภาพของโพรไบโอติก.....	20
ภาพที่ 2.8	โครงสร้างของพรีไบโอติก (A) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (B) อินูลิน (C) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 4'-galactosyllactose ที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ Oligomate [®] 55....	25
ภาพที่ 2.9	การผลิตกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแลคโตส.....	26
ภาพที่ 2.10	บริเวณที่เกิดการย่อยพรีไบโอติกแต่ละชนิดในทางเดินอาหาร.....	28
ภาพที่ 2.11	แผนภาพแสดงข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติก และแนวทางในการแก้ปัญหาที่เสนอโดยงานวิจัยนี้.....	31
ภาพที่ 2.12	หน้าที่ของฟิล์มและสารเคลือบบริโอคได้.....	35
ภาพที่ 2.13	ส่วนประกอบของฟิล์มและสารเคลือบบริโอคได้.....	36
ภาพที่ 2.14	การเกิดฟิล์มจากพอลิเมอร์จากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม.....	38
ภาพที่ 3.1	สรุปขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติกด้วยการคำนวณค่า Prebiotic activity score.....	56
ภาพที่ 3.2	ขั้นตอนนำฟิล์มบริโอคได้ที่มีสมบัติขึ้นไบโอติกจากกลูโคแมนแนนของผงบุกไปใช้ในขนมปัง.....	59

ภาพที่ 4.1	Prebiotic activity score ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ	66
ภาพที่ 4.2	การมีชีวิตของ <i>L. casei</i> -01 และ <i>L. paracasei</i> ก่อนและหลังกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม.....	70
ภาพที่ 4.3	ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติก <i>L. casei</i> -01 และโพรไบโอติก Orafti®GR.....	72
ภาพที่ 4.4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM micrograph) แสดงภาคตัดขวางของฟิล์ม	80
ภาพที่ 4.5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM micrograph) แสดงพื้นผิวของฟิล์ม.....	81
ภาพที่ 4.6	FT-IR spectrum ของฟิล์มบริโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่มีสูตรแตกต่างกัน	85
ภาพที่ 4.7	สรุปโครงสร้างของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม <i>L. casei</i> -01 และ Orafti®GR ที่อาจเป็นไปได้โดยพิจารณาจากข้อมูลภาพถ่าย SEM และสเปกตรัม FT-IR	86
ภาพที่ ก2.1	การหาค่า prebiotic activity score ตัวอย่างการเจริญจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ <i>L. paracasei</i> ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง	116
ภาพที่ ก2.2	การหาค่า prebiotic activity score ตัวอย่างการเจริญจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง	116
ภาพที่ ก3.1	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ <i>L. casei</i> -01 ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง.....	117
ภาพที่ ก3.2	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ <i>L. paracasei</i> ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง	117
ภาพที่ ก3.3	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง.....	118

ภาพที่ ก3.4 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง	118
ภาพที่ ก4.1 กราฟการเจริญของ <i>L. casei</i> -01.....	119
ภาพที่ ก4.2 กราฟการเจริญของ <i>E. coli</i> ATCC25922.....	119
ภาพที่ ก4.1 กราฟสำหรับการประมาณจำนวนจุลินทรีย์สำหรับวิเคราะห์ prebiotic activity score.....	129
ภาพที่ จ5.1 วิธีการวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability).....	134
ภาพที่ จ5.2 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM).....	134
ภาพที่ จ5.3 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม <i>L. casei</i> -01 (KGM/LC).....	135
ภาพที่ จ5.4 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafti [®] GR (KGM/GR)	135
ภาพที่ จ5.5 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม <i>L. casei</i> -01 และ Orafti [®] GR (KGM/LC/GR).....	136
ภาพที่ ฉ1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ <i>L. casei</i> -01 ในขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม <i>L. casei</i> -01 (KGM/LC) ระหว่างการเก็บนาน 7 วัน.....	138
ภาพที่ ฉ1.2 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ <i>L. casei</i> -01 ในขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม <i>L. casei</i> -01 และ Orafti [®] GR (KGM/LC/GR) ระหว่างการเก็บนาน 7 วัน	138
ภาพที่ ฉ1.3 ตัวอย่างขนมปังที่ไม่เคลือบฟิล์มและเคลือบฟิล์ม ในภาพเป็นขนมปังวันที่ 7 พบว่าบางส่วนมีราขนมปังเจริญบนขนมปังแล้ว.....	139

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารคือจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์อยู่แล้ว ทั้งกลุ่มที่อาจก่อให้เกิดโรคและกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งโพรไบโอติกเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์กลุ่มหลัง สัดส่วนของจุลินทรีย์ที่มีความสมดุลจะช่วยให้บุคคลนั้นมีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามอายุที่มากขึ้น อาหารและรูปแบบการใช้ชีวิตมีผลทำให้รูปแบบของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารเปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อความเสี่ยงต่อโรคที่เกิดจากการเสียสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสูงขึ้น มีงานวิจัยทางการแพทย์จำนวนมากที่สนับสนุนประโยชน์เชิงสุขภาพของการบริโภคโพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติก (การบริโภคทั้งโพรไบโอติกและพรีไบโอติกพร้อมกัน) อย่างไรก็ตามอาหารที่มีปริมาณโพรไบโอติกและพรีไบโอติกสูงจำกัดอยู่ในกลุ่มผักและผลไม้บางชนิด อาหารหมัก นมและผลิตภัณฑ์จากนม ทำให้การได้รับโพรไบโอติกและพรีไบโอติกขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหารที่แต่ละบุคคลบริโภคซึ่งขึ้นอยู่กับภาวะทางสุขภาพและความชอบของแต่ละบุคคล เมื่อพิจารณาจากมุมมองผู้ผลิต การผลิตอาหารที่เสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ คือ การรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากสภาพแวดล้อมที่เป็นอันตรายในระบบอาหาร (ได้แก่ ความร้อน, ค่า pH, ระดับของรีดอกซ์ และออสโมติก) สมบัติข้อนี้ทำให้การเสริมโพรไบโอติกมีความยากกว่าการเสริมพรีไบโอติกในอาหาร

แนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดข้อจำกัดทั้งด้านผู้บริโภคและด้านผู้ผลิตได้ คือ การเตรียมโพรไบโอติกในรูปของฟิล์มและสารเคลือบ ซึ่งฟิล์มจะช่วยปกป้องโพรไบโอติกจากสภาพแวดล้อม และสามารถนำมารวมกับอาหารได้ในภายหลังในตอนท้ายของกระบวนการผลิต เพื่อลดการเผชิญสภาวะรุนแรงและความเครียดในกระบวนการผลิตอาหาร รูปแบบฟิล์มและสารเคลือบทำให้การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคมีทางเลือกมากขึ้นและผู้ผลิตก็มีแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบหลากหลายมากขึ้นเช่นกัน งานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนาฟิล์มบริโภคได้ที่มีสมบัติซินไบโอติกจากกลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหาร ไม่มีรสชาติ แคลอรีต่ำ มีสมบัติส่งเสริมสุขภาพ และมีสมบัติในการขึ้นรูปฟิล์ม เพื่อสร้างแนวทางในการประยุกต์ใช้ซินไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

1.2 สมมุติฐานงานวิจัย

สามารถสร้างฟิล์มบริโภคได้ที่มีสมบัติซินไบโอติกจากผงบุกกลูโคแมนแนนสามารถทำหน้าที่เป็นตัวพาโพรไบโอติกและพรีไบโอติกสำหรับประยุกต์ใช้ในอาหารได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความสามารถในการใช้ฟรีไบโอดีทของโพรไบโอดีท แล้วคัดเลือกคู่ฟรีไบโอดีท และโพรไบโอดีทที่เหมาะสมมาพัฒนาฟิล์มบรีโอดีท
2. เพื่อพัฒนาฟิล์มบรีโอดีทจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอดีทและฟรีไบโอดีททางการค้า
3. เพื่อวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มและปริมาณโพรไบโอดีทที่รอดชีวิต
4. เพื่อนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปทดลองใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. คัดเลือกคู่ฟรีไบโอดีทและโพรไบโอดีทที่เหมาะสม จากฟรีไบโอดีททางการค้า 4 ชนิดและกลูโคแมนแนนของผงบุก และโพรไบโอดีททางการค้า 3 ชนิด
2. ศึกษาสมบัติของฟิล์ม ประกอบด้วย สมบัติทางเคมีกายภาพ สมบัติเชิงกล และโครงสร้างจุลภาค
3. ติดตามการรอดชีวิตของโพรไบโอดีทก่อนขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบ หลังกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบ และระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิห้อง
4. ประยุกต์ใช้ฟิล์มที่พัฒนาได้ในรูปแบบสารเคลือบบนผิวขนมปังสูตรพื้นฐาน

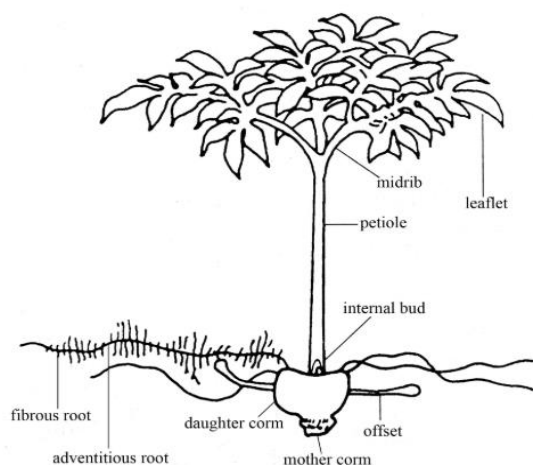
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กลูโคแมนแนนของผงบูก (konjac glucomannan)

2.1.1 แหล่งสะสมกลูโคแมนแนนในบุกและการผลิตกลูโคแมนแนนจากบุก

บุก (*Amorphophallus* spp.) (ภาพที่ 2.1-2.3) เป็นพืชล้มลุกในวงศ์บุก (Araceae) สกุลบุก (*Amorphophallus*) ปลูกทั่วไปในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับในประเทศไทยพบบุกตามธรรมชาติในทางภาคเหนือและภาคตะวันตกแถบกาญจนบุรี โดยขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ความสูงระดับต่ำ (Smitinand, 2014)



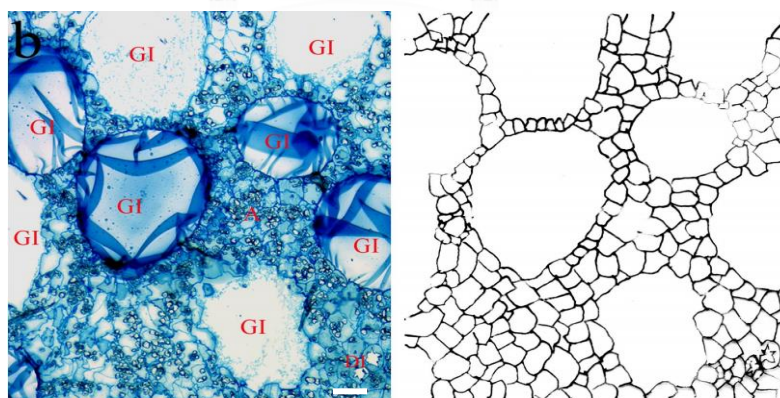
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของต้นบุก (*Amorphophallus konjac* K. Koch)
ที่มา: Yee (2011)

มีการรวบรวมบุกจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศไทยกว่า 500 ตัวอย่าง และนำมาจำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์และอนุกรมวิธานพบว่า มีพันธุ์บุกจำนวน 10 ชนิด (Sukumonnan, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 บุกมีวงจรชีวิตแตกต่างจากพืชทั่วไป เนื่องจากใช้เวลา 4-6 ปี จึงจะเจริญจนครบทั้งวงจรชีวิต มีช่วงการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ (vegetative growth) กับช่วงการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ (reproductive growth) ต่างปีกัน (Sukumonnan, 2005) หัวบุก (konjac tuber) หรือในทางพฤกษศาสตร์เรียกว่าลำต้นใต้ดิน เป็นแหล่งสะสมของเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่เรียกว่า กลูโคแมนแนน (ภาพที่ 2.1) อย่างไรก็ตาม หัวบุกมีแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) สะสมในปริมาณสูง (Prychid *et al.*, 2008) ซึ่งส่งผลให้เกิดรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ จึงมักถูกแปรรูปเป็นผงบูกก่อนนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (Takigami, 2009)

ประเทศจีน เกาหลีและญี่ปุ่นเป็นประเทศที่รู้จักการใช้และแปรรูปบุกเพื่อเป็นอาหารมานานหลายศตวรรษ ทั้งในรูปของก้อน เส้น และขนมขบเคี้ยว (Nishinari *et al.*, 1992) ประมาณสิบกว่าปีแล้วที่อุตสาหกรรมแปรรูปบุกในไทยได้นำบุกมาแปรรูปเพื่อบริโภคทั้งในประเทศและส่งออกไปยังตลาดผู้บริโภคที่รักสุขภาพในหลายประเทศทั่วโลก บุกจึงเป็นพืชที่มีอนาคตและควรได้รับการส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูก (Sukumonnan, 2005)



ภาพที่ 2.2 หัวบุกที่เก็บเกี่ยวจากไร่ในจังหวัดตาก ประเทศไทย เป็นบุกเนื้อทรายหรือบุกคนโท (*Amorphophallus muelleri* Blume)
ที่มา: Impaprasert (2017) ภาพถ่ายส่วนบุคคล



ภาพที่ 2.3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์และแผนภาพแสดงเนื้อเยื่อของหัวบุก (*A. konjac* K. Koch) ย้อมด้วยสีย้อม toluidine blue แสดง glucomannan idioblast (GI) แถบสเกลมีขนาด 100 μm
ที่มา: Yee (2011)

กลูโคแมนแนนพบได้ในพืช และจุลินทรีย์แบบคทีเรีย และยีสต์ แต่แหล่งที่นิยมนำมาผลิต กลูโคแมนแนนเพื่อการค้า คือ บุก (*A. konjac* K. Koch) (Ogaji *et al.*, 2012) โดยสกัดได้จาก เนื้อเยื่อของหัวบุกที่เรียกว่า พาเรงคิมาคอร์เทกซ์ (parenchyma cortex) ซึ่งภายในมีเซลล์ที่มีขนาดใหญ่รูปไข่ที่เรียกว่า ไอดิโอ بلاสต์ (idioblasts) (ภาพที่ 2.3) ภายในมีแกรนูลของกลูโคแมนแนน สะสมอยู่ พบเซลล์นี้กระจายทั่วไปในหัวบุก (Yanuriati *et al.*, 2017; Yee, 2011) ภายในหัวบุกยังเป็นแหล่งสะสมแป้งด้วยแต่แกรนูลของกลูโคแมนแนนมีขนาดใหญ่กว่าแป้งซึ่งเป็นสารเจือปน มีสมบัติ ละลายได้ในน้ำแต่ไม่ละลายในเอทานอล ทำให้สามารถแยกเฉพาะกลูโคแมนแนนออกจากหัวบุกได้

ตารางที่ 2.1 พันธุ์บุกที่พบในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	จังหวัดที่เป็นแหล่งที่พบ	ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล (เมตร)
<i>A. corrugatus</i> N.E.Br.	บุกเขา	แม่ฮ่องสอน	900 - 1,300
<i>A. kachinensis</i> Eng. & Gerhm.	บุกกาบโค้ง	เชียงใหม่	1,100 - 1,600
<i>A. krausei</i> Engl.	บุก	เชียงใหม่, ลำพูน, พะเยา	450 - 600
<i>A. longituberosus</i> (Engl.) Engl. & Gerhm.	บุกห้วยยาว	ลำปาง, เชียงใหม่, ลำพูน, พิชณุโลก	190 - 450
<i>A. macrorhizus</i> Craib	ก้านโคยจัว	ลำปาง, เชียงใหม่, พิชณุโลก	190 - 450
<i>A. muelleri</i> Blume	บุกคนโท, บุกไข่, บุกเนื้อทราย	ตาก, แม่ฮ่องสอน	300 - 750
<i>A. napiger</i> Gagnepain	บุก	ปราจีนบุรี	< 100
<i>A. paeoniifolius</i> (Dennst.) Nicolson	บุกคางคก, บุก, บุกคูก, เบี้ย, เปื่อ, มันซูรัน, หัวบุก	ทุกภาค	0 - 1,600
<i>A. tenuistylis</i> Hett.	บุก	ลำปาง	190 - 450
<i>A. yunnanensis</i> Engl.	บุก, บุกต่าง	เชียงราย	800 - 1,000

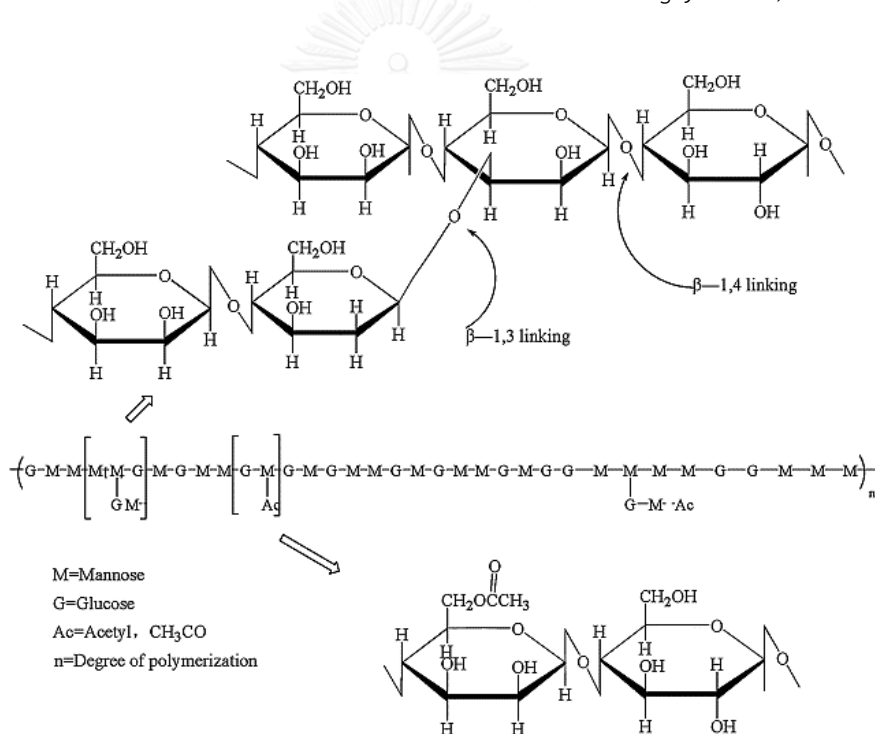
ที่มา: Sukumonnann (2005)

การผลิตกลูโคแมนแนนจากบุกในอุตสาหกรรมประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การเก็บเกี่ยวหัวบุกที่มีอายุ 2-3 ปี ซึ่งเป็นระยะที่มีปริมาณกลูโคแมนแนนสูงเพียงพอสำหรับการนำมาใช้ผลิตเพื่อการค้า ในระยะนั้นต้นบุกมีความสูงประมาณ 2-3 ฟุต และมีหัวบุกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

ประมาณ 8-15 เซนติเมตร (Thomas, 1997) ล้างหัวบุกเพื่อกำจัดเศษดินออก ฝานหัวบุกที่ล้างแล้ว เป็นแผ่นบางเพื่อให้แห้งง่ายขึ้น อบเพื่อทำให้แห้ง บดให้เป็นผง แล้วใช้การตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นการสกัดแบบเปียกหรือเป่าแยกด้วยลมซึ่งเป็นการสกัดแบบแห้งเพื่อกำจัดสิ่งเจือปน เช่น แป้ง โปรตีน เซลลูโลส และน้ำตาล

2.1.2 เคมีของกลูโคแมนแนน

พอลิแซ็กคาไรด์แมนแนนจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ แมนแนนบริสุทธี (mannan) กลูโคแมนแนน (glucomannan) กาแลคโตแมนแนน (galactomannan) และกาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 พอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้เป็นกลุ่มหลักของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช (Ogaji *et al.*, 2012)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของกลูโคแมนแนน

ที่มา: Zhang *et al.* (2014)

สำหรับกลูโคแมนแนนของผงบุกเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloidal polysaccharide) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200 ถึง 2,000 kDa มีค่าเฉลี่ยประมาณ 1,000 kDa ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งของกลูโคแมนแนน แหล่งที่ปลูก การผลิตและการเก็บรักษา โมเลกุลประกอบขึ้นจากสายโซ่หลักเป็นกลูโคส (D-glucose) และแมนโนส (D-mannose) เรียงต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic โดยทั่วไปกลูโคแมนแนนมีอัตราส่วนของแมนโนสและกลูโคสอยู่ในช่วง 1.5:1.0 ถึง

4.2:1.0 ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของพืชที่นำมาสกัดดังแสดงในตารางที่ 2.3 โดยทั่วไปมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.6:1.0 มีระดับการมีหมู่อะซีทิล (degree of acetylation) ต่ำ หมายความว่าภายในโครงสร้างพอลิเมอร์มีหมู่อะซีทิล CH_3CO^- (acetyl group) อยู่ในปริมาณต่ำประมาณ 5-10% (Gao and Nishinari, 2004) หมู่อะซีทิลนี้สร้างพันธะกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C-6) ของน้ำตาลในสายโซ่หลัก โดยพบเฉลี่ยทุกๆน้ำตาล 9-19 หน่วย หมู่อะซีทิล (acetyl group) มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการละลายน้ำของกลูโคแมนแนนจากผงบูก หากโมเลกุลมีระดับการกำจัดหมู่อะซีทิล (degree of deacetylation) สูงขึ้นจะส่งผลให้กลูโคแมนแนนจากผงบูกมีความสามารถละลายน้ำลดลง (Du *et al.*, 2012) หมู่อะซีทิลนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับสมบัติการขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ของกลูโคแมนแนนด้วย (Behera and Ray, 2016b) จากสายโซ่หลักนี้จะเชื่อมกับสามสายโซ่กิ่งทุกๆหน่วยย่อยของสายโซ่หลัก 32 หน่วย สายโซ่กิ่งนี้ประกอบจากน้ำตาล 3-4 หน่วยต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic โดยจะจับกันที่หมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) หรือตำแหน่งที่ 6 (C-6) ของน้ำตาลแมนโนสหรือกลูโคสในสายโซ่หลัก ทั้งระดับการมีหมู่อะซีทิลและระดับการแตกกิ่งมีผลต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีซึ่งมีผลสำคัญต่อการประยุกต์ใช้กลูโคแมนแนนของผงบูก

ตารางที่ 2.2 แมนแนนที่พบในพืช

พอลิแซ็กคาไรด์	แกนหลัก	การแทนที่ในแกนหลัก	หน้าที่	สมบัติ
แมนแนน	(1-4)- β -D-mannose residues	ไม่มี	1) พอลิแซ็กคาไรด์สะสมในสาหร่ายบางชนิด	1) พบในผนังเอนโดสเปิร์มที่หนาขึ้น 2) ละลายในน้ำเดือดและตกตะกอนเมื่อเย็นตัว 3) หนืด น้ำหนักโมเลกุล 40 ถึงมากกว่า 300 kDa
กาแลคโตแมนแนน	(1-4)- β -D-mannose residues	(1-6)- α -D-galactose residue หนึ่งหน่วย	1) พอลิแซ็กคาไรด์สะสมในเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว (legume)	1) พบในผนังเอนโดสเปิร์มของเมล็ดหรือจุลินทรีย์ 2) ละลายน้ำได้ 3) หนืด น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 kDa
กลูโคแมนแนน	(1-4)- β -D-mannose และ glucose residues โดยมีหมู่อะซีทิลแทนที่บางแห่ง	สามารถเกิดขึ้นได้	1) พอลิแซ็กคาไรด์สะสมในเมล็ดและหัวของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 2) พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้างในเนื้อไม้	1) พบในเมล็ดและหัว 2) ละลายน้ำได้ 3) หนืด น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 - 2,000 kDa
กาแลคโตกลูโคแมนแนน	(1-4)- β -D-mannose และ glucose residues	(1-6)- α -D-galactose residue หนึ่งหรือสองหน่วย	1) พอลิแซ็กคาไรด์สะสมเช่น เมล็ดของ <i>Asparagus</i> 2) พอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้างในผนังเซลล์ปมูมิและเนื้อไม้ของพืชใบเลี้ยงคู่	1) พบในเมล็ดและไม้เนื้ออ่อน 2) ละลายน้ำได้ 3) หนืดน้ำหนักโมเลกุล 16 - 24 kDa

ที่มา: Tester and Al-Ghazzewi (2013)

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างแหล่งของกลูโคแมนแนน อัตราส่วนแมนโนสต่อกลูโคส และระดับการพอลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization)

แหล่งของกลูโคแมนแนน	อัตราส่วนแมนโนส:กลูโคส	ระดับการพอลิเมอไรเซชัน
บุก (<i>Amorphophallus konjac</i>)	1.6:1	6200
ลิลลี่ (<i>Lilium auratum</i>)	2.7:1	220
ลิลลี่แมงมุมสีแดง (<i>Lycoris radiata</i>)	4.0:1	730
สนขาวตะวันออก (<i>Pinus strobes</i>)	3.8:1	90
กล้วยไม้ (<i>Tubera salep</i>)	3.2:1	600
ปานรามิ (<i>Boehmeria nivea</i>)	1.8:1	ไม่มีรายงาน
เรดวูด (<i>Sequoia sempervirens</i>)	4.2:1	60
ชุยเซน (<i>Narcissus tazetta</i>)	1.5:1	ไม่มีรายงาน

ที่มา: Khanna (2003)

2.1.3 ผลเชิงสุขภาพและสมบัติฟิโอบีโอดีคของกลูโคแมนแนน

กลูโคแมนแนนของพวงบุกมีแคลอรีต่ำเนื่องจากเป็นใยอาหาร (dietary fiber) ที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงส่งผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (hypocholesterolemic reagent) ช่วยรักษาระดับน้ำตาล (glycemic control) และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดให้อยู่ระดับปกติ ช่วยให้การทำงานของลำไส้เป็นปกติ และส่งเสริมภูมิคุ้มกัน (Gomez *et al.*, 2017)

งานวิจัยเบื้องต้นพบว่ากลูโคแมนแนนสามารถย่อยได้ภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยภายในลำไส้ใหญ่ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ละลายน้ำได้ที่มีสมบัติสลายพันธะ β -1,4 glycosidic ระหว่างแมนโนสและกลูโคสภายในโมเลกุลกลูโคแมนแนนได้เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ β -1,4-D-mannobiose, cellobiose, 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannopyranose, กลูโคส และแมนโนส สำหรับไดแซ็กคาไรด์จะถูกย่อยให้เป็นแมนโนสและกลูโคสต่อไปซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ โดยการหมักแมนโนสและกลูโคสของจุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids; SCFAs) เช่น acetic acid, 1-butyric acid, propionic acid และ formic acid (Chiu and Stewart, 2012; Matsuura, 1998)

เนื่องจากกลูโคแมนแนนเป็นใยอาหารที่เกิดการหมักได้ช้ากว่าใยอาหารกลุ่มอินูลินและฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จึงทำให้กรดไขมันสายสั้นซึ่งเป็นผลผลิตจากการหมักปล่อยออกมาในบริเวณตอน

ปลายของลำไส้ใหญ่ สมบัตินี้เป็นที่สนใจเนื่องจากโรคที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นกับลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (colorectal cancer; CRC) และโรคลำไส้ใหญ่อักเสบและเป็นแผลเรื้อรัง (ulcerative colitis; UC) (Chiu and Stewart, 2012) โดยพบว่าน้ำในกากอาหาร (fecal water) มีความเป็นพิษลดลงเมื่อบริโภคอาหารเสริมด้วยกลูโคแมนแนนของผงบุก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นที่เพิ่มขึ้นและค่า pH ที่ลดลงในกากอาหาร จึงช่วยลดการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดยน้ำในกากอาหาร (Yeh *et al.*, 2010)

กลูโคแมนแนนได้รับการยอมรับว่าเป็นส่วนผสมอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food ingredient) ที่มีสมบัติพรีไบโอติก (Al-Ghazzewi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005) โดยมีหลักฐานจากงานวิจัยที่บ่งชี้ว่ากลูโคแมนแนนของผงบุกมีสมบัติพรีไบโอติก (Chiu and Stewart, 2012; Harmayani *et al.*, 2014) เมื่อทดลองย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารพบว่ามีการฟื้นคืนการคืนกลับ (percentage recovery) สูงถึง 97.9% (Chiu and Stewart, 2012) แสดงให้เห็นว่ากลูโคแมนแนนส่วนใหญ่คงสภาพไม่ถูกย่อยไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้าย การเสริมกลูโคแมนแนนในอาหารช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacteria* spp. และยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringens* และ *Escherichia coli* ทั้งในซีรัมของหนูทดลองและมนุษย์ ส่งเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid; SCFA) และลดค่า pH ของกากอาหารที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ด้วย (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005; Harmayani *et al.*, 2014) กลูโคแมนแนนจากผงบุกสามารถเพิ่มจำนวน *Bifidobacteria* spp. ภายหลังจากหนูได้รับอาหารเสริมกลูโคแมนแนนจากผงบุกนาน 2-4 สัปดาห์ (Chen *et al.*, 2005) และในมนุษย์ที่บริโภคปริมาณ 4.5 กรัม/วัน นาน 3 สัปดาห์ (Chen *et al.*, 2008)

ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมาเบื้องต้นทำให้กลูโคแมนแนนของผงบุกได้รับความสนใจทั้งในอุตสาหกรรมอาหารรวมถึงการแพทย์และเภสัชกรรม (Chua *et al.*, 2010; Tester and Al-Ghazzewi, 2016; Tester and Al-Ghazzewi, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2005)

2.1.4 สมบัติในการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบและการประยุกต์ใช้ฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกเพื่อกักเก็บสาร

กลูโคแมนแนนของผงบุกเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มแมนแนนที่นิยมมาทำฟิล์มมากที่สุดดังแสดงในตารางที่ 2.4 กลูโคแมนแนนสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้หลากหลายแบบทั้งฟิล์มที่มีความเหนียวและมีความคงตัวสูง โปร่งแสง สมบัติเหล่านี้ขึ้นกับการปรับเปลี่ยนสมบัติของฟิล์มให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์การใช้งานด้วยการเติมพอลิเมอร์ชนิดอื่นเข้าไป (Mikkonen, 2009; Zhang *et al.*,

2005) เช่น พูลลูแลน (pullulan), เจลแลน (gellan), พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide), เจลาติน (gelatin) (Xiao *et al.*, 2001b), คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) (Xiao *et al.*, 2001c; Xiao *et al.*, 2002), ไคโตซาน (chitosan) (Tripetch *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2000a), โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) (Xiao *et al.*, 2000b; Xiao *et al.*, 2002), พอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone) (Xiao *et al.*, 2001a) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น และสารที่นิยมนำมาใช้เป็นพลาสติกไซเซอร์ (plasticizer) คือ กลีเซอรอล (glycerol) และซอร์บิทอล (sorbitol) ซึ่งกลีเซอรอลเป็นสารที่ช่วยอุ้มน้ำหรือฮิวเมกเตนต์ (humectant) (Zhang *et al.*, 2014) ทำให้ความเปราะบางของฟิล์มลดลงและฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ไม่มีการเติมพลาสติกไซเซอร์ก็สามารถขึ้นรูปฟิล์มจากกุกูโคแมนแนนของผงบุกได้ การขึ้นรูปฟิล์มทำโดยการละลายกุกูโคแมนแนนในน้ำแล้วทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหรือนำไปทำแห้ง การเติมต่างทำให้เกิดการกำจัดหมู่อะซีทิล (deacetylation) ภายในโครงสร้างทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลสูงขึ้น

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการวิจัยฟิล์มจากกุกูโคแมนแนน

พอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์ม	สูตรฟิล์ม		หัวข้อที่ศึกษา*											อ้างอิง**
	พลาสติกไซเซอร์	สารเติมอื่นๆ	MC	TR	C	TE	WS	WVP	FTIR	SEM	XRD	DS	App	
KGM+เจลาติน		-				✓			✓	✓	✓			(1)
KGM+ไคโตซาน	กลีเซอรอล	-				✓			✓	✓	✓	✓		(2)
KGM+ไคโตซาน +โปรตีนไฮโดรไลต์จากถั่วเหลือง						✓		✓						(3)
KGM+ไคโตซาน	กลีเซอรอล	5-ALA							✓	✓	✓		✓	(4)
KGM+โซเดียมอัลจิเนต	-		✓			✓			✓	✓	✓	✓	✓	(5)
KGM	กลีเซอรอล	น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา				✓		✓					✓	(6)
KGM	กลีเซอรอล	สารสกัดจากชา				✓		✓					✓	(7)
KGM+คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส		-				✓			✓	✓	✓			(8)
KGM+เจลแลน		-							✓		✓			(9)

* KGM = กุกูโคแมนแนนของผงบุก, WVP = อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ, WS = ความสามารถในการละลายน้ำ, TS = ความต้านทานแรงดึง, MC = ปริมาณความชื้น, DS = ระดับการพองตัว, TR = ค่าความโปร่งแสง, C = สี, FTIR = Fourier transformed infrared spectrometry, SEM = scanning electron microscopy, XRD = X-ray diffraction, App = การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร
 **(1) Xiao *et al.* (2001b), (2) Xiao *et al.* (2000a) (3) Jia *et al.* (2009), (4) Tripetch *et al.* (2016), (5) Xiao *et al.* (2000b), (6) Saeheng *et al.* (2016), (7) Rattananin (2011), (8) Xiao *et al.* (2001c), (9) Xu *et al.* (2007)

มีการประยุกต์ฟิล์มบริโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกเพื่อกักเก็บสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งสลายตัวได้ง่ายหลายชนิด เช่น สารสกัดจากข่า (Rattananin, 2011), 5-aminolevulinic acid (5-ALA) (Tripetch *et al.*, 2016) และน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพา (Saeheng *et al.*, 2016) เป็นต้น พบว่าฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่ผสมสารสกัดจากข่าช่วยลดการสูญเสียน้ำ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษามะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ได้เมื่อนำมาเคลือบผิวของผลมะม่วง โดยสารสกัดจากข่าที่ผสมในฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกสามารถคงฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรค และช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคในมะม่วงได้อย่างมีนัยสำคัญตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน (Rattananin, 2011) ฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่มีน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพา 4% (v/v) และ 6% (v/v) เมื่อนำมาทดสอบสมบัติในการต้านจุลินทรีย์พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ได้โดยมี clear zone ขนาด 9.5 - 10.1 mm (Saeheng *et al.*, 2016) ฟิล์มบริโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกสามารถกักเก็บ 5-aminolevulinic acid ได้และช่วยให้สารชนิดนี้มีความเสถียรมากขึ้น (Tripetch *et al.*, 2016) ตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่ากลูโคแมนแนนมีความสามารถในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารประกอบที่สลายตัวได้ง่ายได้ จากการค้นคว้าของผู้วิจัยพบว่ายังไม่มีการศึกษาการใช้ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกเพื่อตรึงเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการวิจัยครั้งแรกที่ศึกษาฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมเซลล์โพรไบโอติก

2.1.5 การประยุกต์ใช้กลูโคแมนแนนของผงบุกในอุตสาหกรรมอาหาร

กลูโคแมนแนนของผงบุกเป็นใยอาหารที่ละลายน้ำได้เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คาร์บอนิลจำนวนมากในโมเลกุล ไม่มีรสชาติ เป็นที่รู้จักกันในทางอุตสาหกรรมอาหารว่าเป็นสารจำพวกไฮโดรคอลลอยด์ที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับน้ำได้อย่างดี โมเลกุลกลูโคแมนแนนสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้และเกิดเป็นของเหลวที่มีความหนืด เนื่องจากกลูโคแมนแนนมีขนาดโมเลกุลสูงทำให้เมื่อละลายในน้ำที่ความเข้มข้น 1 % (w/w) สารละลายที่ได้จะมีค่าความหนืดสูงประมาณ 30,000 cP (centipoise) มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 7.0 สหภาพยุโรป (European Union หรือ EU) ได้รับรองว่ากลูโคแมนแนนเป็นสารเติมในอาหารในชื่อ E425 สามารถใช้เพิ่มความข้นหนืด ก่อเจล เพิ่มความเสถียร อิมัลซิไฟเออร์ ปรับปรุงเนื้อสัมผัส และขึ้นรูปฟิล์ม (Behera and Ray, 2016b) ดังตัวอย่างการประยุกต์ใช้ที่แสดงในตารางที่ 2.5

นอกจากอุตสาหกรรมอาหารแล้วกลูโคแมนแนนของผงบุกยังนำไปประยุกต์ใช้อีกในหลายด้าน (Zhang *et al.*, 2005) เช่น การขนส่งยา (drug delivery), การรักษาเซลล์ (cellular therapy), การปลูกถ่ายอวัยวะเทียม (prosthetic implants), การผลิตเครื่องสำอาง (cosmetics), การผลิตวัสดุดูดซับเสียง (sound absorption) เป็นต้น

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้กลูโคแมนแนนของผงบุกในอาหาร

ผลิตภัณฑ์	หน้าที่				
	เพิ่มความข้น/ก่ोजล	เนื้อสัมผัส	เส้นใย	ลดน้ำหนัก	จับคอเลสเตอรอล
เส้นก๋วยเตี๋ยว/พาสต้า	✓	✓	✓	✓	
เนื้อสัตว์	✓	✓			
ขนมปัง/บิสกิต	✓	✓	✓	✓	✓
ไอศกรีม	✓				
แยม/มาร์มาเลด	✓				
เครื่องดื่ม(น้ำผลไม้)	✓		✓		
ซอส/เกรวี่	✓	✓			
เยลลี่แบบถ้วย	✓	✓			
พุดดิ้ง/มูส	✓	✓			
แคปซูล			✓	✓	✓

ที่มา: Tester and Al-Ghazzewi (2017)

2.2 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร (gut microbiota)

จุลินทรีย์ประจำถิ่นทั้งหมดในทางเดินอาหาร เรียกว่า จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร (gut microbiota) ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 จุลินทรีย์ anaerobic bacteria ที่พบมากในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

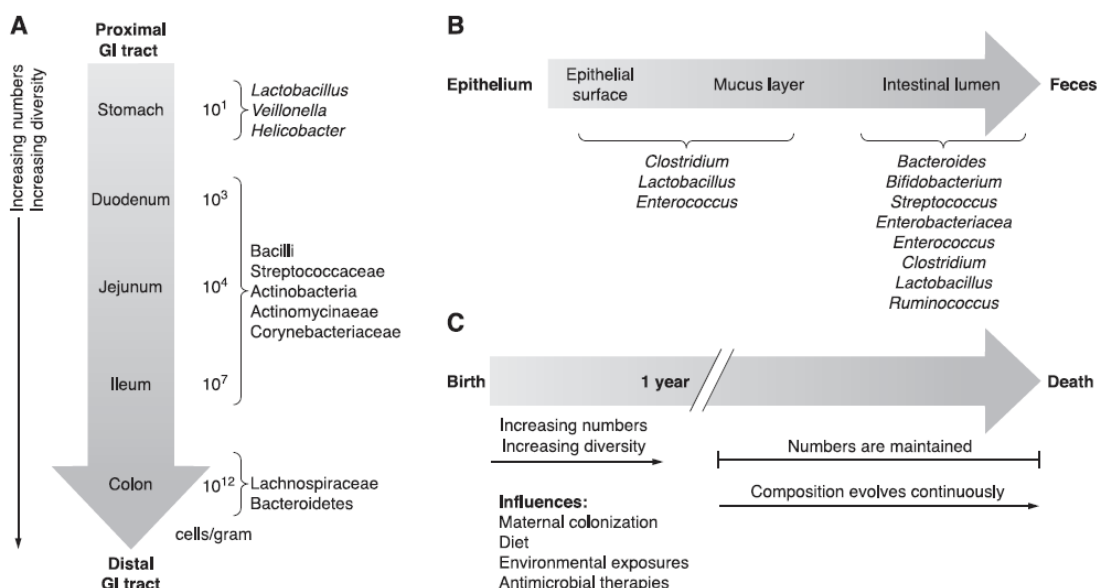
กลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่น	จำนวนที่พบ log CFU ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
<i>Bacteroides</i>	9.2-13.5
<i>Eubacteria</i>	5.0-13.3
<i>Bifidobacteria</i>	4.9-13.4
<i>Clostridia</i>	3.3-13.1
<i>Lactobacilli</i>	3.6-12.5
<i>Ruminococci</i>	4.6-12.8
<i>Peptostreptococci</i>	3.8-12.6
<i>Peptococci</i>	5.1-12.9
<i>Streptococci (anaerobic)</i>	7.0-12.3
<i>Methanobrevibacter</i>	7.0-10.3
<i>Desulfovibrios</i>	5.2-10.9

ที่มา: Ziemer and Gibson (1998)

สังคมจุลินทรีย์ประจำถิ่นประกอบด้วยจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ที่ดีต่อสุขภาพและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย หากความหลากหลายทางชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารอยู่ในสมดุลที่ดีจะส่งผลให้บุคคลนั้นมีสุขภาพดี อย่างไรก็ตามสมดุลนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ หนทางหนึ่งในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นคือการรับประทานโพรไบโอติกและพรีไบโอติกเพื่อให้โพรไบโอติกเข้าไปเจริญภายในทางเดินอาหารและเพื่อให้พรีไบโอติกไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Chaluvadi *et al.*, 2016; Clemente *et al.*, 2012; Conlon and Bird, 2014)

2.2.1 จำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร

จำนวนและความหลากหลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญมากต่อชีวิตตั้งแต่แรกเกิด (Sekirov *et al.*, 2010) ทางเดินอาหารของมนุษย์เริ่มต้นจากช่องปากจนถึงทวารหนักเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด 500 – 1,000 สปีชีส์ (Nopchinda, 2014; Xu and Gordon, 2003) หากเปรียบเทียบความหนาแน่นของจุลินทรีย์ที่ในอวัยวะต่างๆตลอดทางเดินอาหาร ช่องปากมีจุลินทรีย์ 10^5 - 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทางเดินอาหารส่วนต้นตั้งแต่หลอดอาหารไปจนถึงลำไส้เล็กซึ่งมีการหลั่งกรดและน้ำดีมีจุลินทรีย์เหลือเพียง 10^3 - 10^4 เซลล์ต่อกรัมของอาหารที่ถูกย่อย



ภาพที่ 2.5 องค์ประกอบและจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นกลุ่มหลักที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์และปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและจำนวนจุลินทรีย์
ที่มา: Sekirov *et al.* (2010)

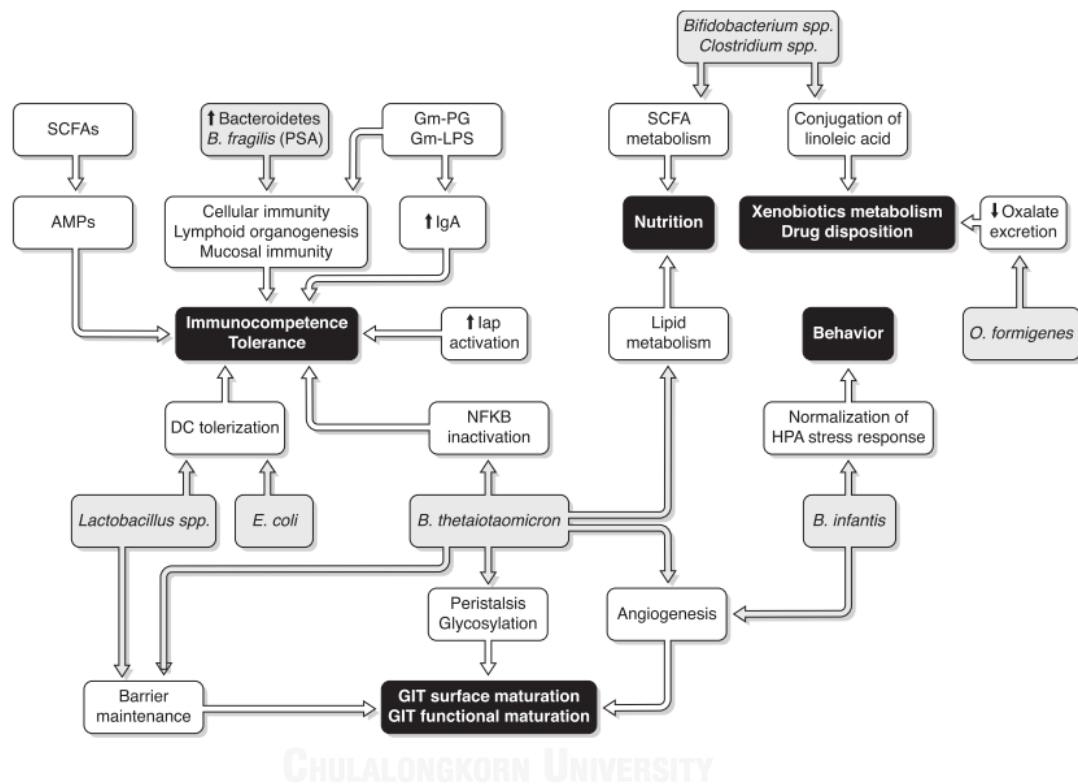
บริเวณลำไส้เล็กตอนปลายจำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเป็น 10^7 - 10^8 เซลล์ต่อกรัมอาหารที่ย่อย ในลำไส้ใหญ่กากอาหารจะค้างอยู่นาน 48-70 ชั่วโมง ซึ่งนับว่าเป็นเวลาที่ยาวนาน ประกอบกับสถานะในลำไส้ใหญ่ที่มีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลางและมีอัตราการดูดซึมต่ำทำให้บริเวณนี้มีแบคทีเรียหนาแน่นมากที่สุด แบคทีเรียเหล่านี้อาศัยพึ่งพากันอย่างซับซ้อนและมีความคงตัวสูง โดยมีความหนาแน่นเซลล์ถึง 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ 10^{12} เซลล์ต่อกรัมของกากอาหารในลำไส้ใหญ่ (Gibson and Roberfroid, 1995; Rastall and Gibson, 2004) มีจำนวนมากกว่า 70% ของจุลินทรีย์ประจำถิ่นทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหาร มีจำนวนมากกว่าเซลล์ทั้งหมดในร่างกายของมนุษย์ถึง 10 เท่า หรือมีน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม (Flint, 2012; Jandhyala *et al.*, 2015) จุลินทรีย์ประจำถิ่นเหล่านี้จึงมีอิทธิพลต่อสุขภาพของโฮสต์เปรียบเสมือนเป็นอวัยวะหนึ่งของร่างกาย ในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดแบคทีเรียในทางเดินอาหารของผู้ใหญ่พบว่ากลุ่ม *Bacteroidetes* (แกรมลบ) และ *Firmicutes* (ส่วนใหญ่เป็นแกรมบวกและเป็นกลุ่มของ *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. และ *Leuconostoc* spp.) เป็นกลุ่มที่พบจำนวนมากที่สุด โดยพบถึง 60% ของแบคทีเรียที่พบทั้งหมดในลำไส้ใหญ่ ตามด้วย *Proteobacteria* และ *Actinobacteria* (กลุ่มของ *Bifidobacterium* spp.) โครงสร้างของความหลากหลายภายในสังคมจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารของมนุษย์แสดงในภาพที่ 2.5 A-B พิจารณาตามขวางและตามยาวของทางเดินอาหาร ส่วนที่เป็นช่องของลำไส้ใหญ่ที่มีทั้งกากอาหารและส่วนที่เป็นของเหลวมีความหลากหลายในสังคมจุลินทรีย์มากที่สุด (Flint *et al.*, 2012)

2.2.2 จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารกับสุขภาพ

กลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญมากในการควบคุมการทำงานของระบบย่อยอาหารและสุขภาพของบุคคลนั้นให้เป็นปกติ (Sekirov *et al.*, 2010) ดังแสดงให้โดยรวมในภาพที่ 2.6

จุลินทรีย์เหล่านี้ให้สารอาหารแก่ร่างกายโดยย่อยสารประกอบที่ทางเดินอาหารของมนุษย์ย่อยไม่ได้ ป้องกันร่างกายจากเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) และพัฒนาและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของมนุษย์ (Sekirov *et al.*, 2010) กลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์และเป็นเป้าหมายหลักของพรีไบโอติก เรียกว่า โพรไบโอติก (Shokrvash *et al.*, 2016; Tripathi and Marathe, 2016; Weichselbaum, 2009; WHO/FAO, 2006; Williams, 2010) โดยเฉพาะกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งช่วยย่อยและหมักกากอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ให้กลายเป็นพลังงานในรูปของกรดไขมันสายสั้น โดยเฉพาะกรดไขมันสายสั้นที่ชื่อว่าบิวไทเรต (butyrate) ซึ่งเป็น

แหล่งพลังงานที่สำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่และยับยั้งภาวะอักเสบที่จะนำไปสู่การเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ไฟโรไบโอติกยังช่วยควบคุมสมดุลพลังงานของร่างกาย ช่วยร่างกายในการสร้างและดูดซึมวิตามินและเกลือแร่ กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน และเป็นเกราะป้องกันเชื้อโรคที่เข้าทำลายร่างกายผ่านทางผนังลำไส้ ทำให้สามารถรักษาสภาพสมดุลของสุขภาพร่างกายให้เป็นปกติ (Amara and Shibl, 2015; Kumar and Salminen, 2016; Nopchinda, 2014; Shokrvash *et al.*, 2016)



ภาพที่ 2.6 แผนภาพการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารที่ส่งผลเชิงสรีรวิทยาของโฮสต์ โดยกรอบสีดำเป็นฟีโนไทป์ของโฮสต์ กรอบสีเทาแสดงชื่อจุลินทรีย์ กรอบสีขาวแสดงผลการทำงานของจุลินทรีย์ในระดับเซลล์และระดับอวัยวะ (AMP = antimicrobial peptides, DC = dendritic cells, Gm- = Gram negative, HPA = hypothalamus-pituitary-adrenal, lap = intestinal alkaline phosphatase, PG = peptidoglycan, PSA = polysaccharide A)

ที่มา: Sekirov *et al.* (2010)

2.2.3 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร

ปัจจัยหลายประการส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความหลากหลายของจุลินทรีย์ประจำถิ่นภายในทางเดินอาหาร (ภาพที่ 2.5 C) ได้แก่ วัย พันธุกรรม อาหารที่บริโภค ความถี่และความยาวนานในการใช้ยาปฏิชีวนะ และรูปแบบการใช้ชีวิต (Conlon and Bird, 2014; Flint, 2012) เช่น การสูบบุหรี่และการไม่ออกกำลังกายล้วนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ทั้งสิ้น มีงานวิจัยยืนยันว่าอาหารที่รับประทานจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสังคมจุลินทรีย์ในลำไส้ในระดับไฟลัม จากการตรวจสอบกากอาหารพบว่าคนที่รับประทานอาหารกลุ่มโปรตีนและไขมันสัตว์เป็นเวลานานจะมี *Bacteroides* ซึ่งอยู่ในไฟลัม *Bacteroidetes* มากกว่า *Prevotella* ซึ่งอยู่ในไฟลัม *Firmicutes* (Wu *et al.*, 2011) ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการหาความสัมพันธ์ระหว่างอาหารที่บริโภคกับจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยเปรียบเทียบกันระหว่างเด็กในยุโรปที่มีรับประทานอาหารที่มีโปรตีนจากสัตว์และไขมันสูงกับเด็กในประเทศบราซิลซึ่งบริโภคอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นหลักและมีโปรตีนจากสัตว์ในปริมาณต่ำ (De Filippo *et al.*, 2010) อาหารที่มีเนื้อและไขมันสัตว์เป็นหลักส่งผลให้เพิ่มจุลินทรีย์ที่ทนน้ำดีซึ่งอยู่ในจีนัส *Bacteroides* และลดจุลินทรีย์ที่ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากพืชเป็นอาหาร เช่น *Roseburia* sp., *Eubacterium rectale* และ *Ruminococcus bromii* เป็นต้น

2.3 โพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติก

2.3.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอในฐานะส่วนหนึ่งของอาหารจะให้ผลดีเชิงสุขภาพต่อผู้บริโภค (FAO/WHO, 2001) (ตารางที่ 2.7) แหล่งของโพรไบโอติก ได้แก่ อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์จากนมและโยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งแบบผง แคปซูล หรืออัดเม็ด และโพรไบโอติกจำหน่ายในรูปของเกล็ดจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried pellets) สำหรับใช้เติมในอาหารทั้งในอุตสาหกรรมและในครัวเรือน ด้วยสมบัตินี้จึงทำให้โพรไบโอติกได้รับความสนใจและนำมาเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด (De Prisco and Mauriello, 2016; Tripathi and Giri, 2014) เช่น ผลิตภัณฑ์นม (ไอศกรีม ชีส อาหารสำหรับทารก นมผง ซาวร์ครีม) ขนมปัง (Soukoulis *et al.*, 2014b) บิสกิต (Reid *et al.*, 2007) น้ำผักผลไม้ (Pimentel *et al.*, 2015) ซ็อกโกแลต (Yonejima *et al.*, 2015) เป็นต้น

ปริมาณผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโพรไบโอติกคิดเป็น 60 - 70% ของตลาดอาหารเพื่อสุขภาพ (Tripathi and Giri, 2014) ปัจจุบันผู้บริโภคใส่ใจสุขภาพและอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้นจึงทำให้ยอดขายการบริโภคโพรไบโอติกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พิจารณาได้จากมูลค่าการบริโภคในปี 2014 ซึ่งมีมูลค่าการ

บริโภคอยู่ที่ 62.6 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐฯ ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับมูลค่าการบริโภคในปี 2008 ซึ่งมีมูลค่าเพียง 16.0 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐฯ และคาดว่าในปี 2020 อาจมีมูลค่าการบริโภคเพิ่มขึ้นไปถึง 96.0 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐฯ (Espitia *et al.*, 2016) ความสนใจในโพรไบโอติกไม่ได้จำกัดเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้น แต่โพรไบโอติกยังเป็นที่สนใจในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ด้วย (González-Forte *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2012; Yirga, 2015)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่มีสมบัติโพรไบโอติก

กลุ่ม	สายพันธุ์โพรไบโอติก
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. salivarius</i> , <i>L. bifidus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. vitulinus</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. faecium</i> , <i>L. paracasei</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. essensis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> (GanedenBC30), <i>B. lactis</i> DR10, <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> R0179, <i>B. subtilis</i> (natto) OUV23481, <i>B. cereus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. halophilus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>paramesenteroides</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. equinus</i>
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>
ยีสต์	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida pintolopesii</i>
รา	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Scytalidium acidophilum</i>

ที่มา: ดัดแปลงจาก Amara and Shibl (2015), Williams (2010) และ Bultosa (2016)

ข้อกำหนดของการเป็นโพรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ในมนุษย์ได้ (Kolida and Gibson, 2011) มีดังนี้

- สามารถรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะในทางเดินอาหาร

- สามารถอาศัยและเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้
- ไม่มีการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันต่อสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก
- เซลล์ ผลิตภัณฑ์จากเซลล์ และองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องไม่ก่อโรค ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และมะเร็ง
- สารพันธุกรรมมีความเสถียร ไม่เกิดการถ่ายโอนพลาสมิด
- ผลิตได้ในปริมาณมาก
- มีชีวิตระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา
- ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร

โพรไบโอติกที่ใช้เป็นอาหารและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอาจเป็นแบคทีเรีย ยีสต์หรือรา การบริโภคโพรไบโอติกอาจเป็นจุลินทรีย์เพียงสปีชีส์เดียวหรือผสมรวมกันหลายสปีชีส์ก็ได้ จุลินทรีย์หลายชนิดมีสมบัติโพรไบโอติกดังแสดงในตารางที่ 2.6 แต่กลุ่มจีโนสโพรไบโอติกที่ได้รับการยอมรับว่ามีความสามารถในการใช้โพรไบโอติกสูงและส่งผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภคมากที่สุดมี 2 กลุ่ม คือ *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. (Bielecka et al., 2002) ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มนี้มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภคเนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบอยู่ภายในลำไส้ของมนุษย์อยู่แล้วและเป็นจุลินทรีย์ที่พบในอาหารหมักและใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมาเป็นเวลานาน

2.3.1.1 *Bifidobacterium* spp.

Bifidobacterium spp. ค้นพบครั้งแรกในปี 1899 จากอุจจาระของทารกที่เลี้ยงด้วยนมแม่ เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบได้ตามธรรมชาติในลำไส้ของมนุษย์ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก แกรมบวก เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีความกว้าง 0.5-1.3 μm และมีความยาว 1.5-8.0 μm รูปร่างเป็นท่อนหรือกลมในระยะการเจริญช่วง exponential และในช่วง early stationery รูปร่างจะเป็นแบบแตกกิ่งและเป็นเส้นใยที่มีเยื่อพันกันเมื่อเข้าสู่ช่วง late stationery และ death phase ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส คือ กรดอะซิติก และกรดแลคติก ปกติแล้วไม่ทนสภาวะที่เป็นกรด แต่สามารถปรับตัวได้ สามารถทนกรดได้ในช่วง pH 4.0 – 4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 37- 41 °C *Bifidobacterium* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้เมื่อสภาวะแวดล้อมเป็นสภาวะไร้อากาศเท่านั้น ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่เป็น microaerophilic เช่น *B. animalis* subsp. *lactis* และ *B. thermophilum* ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp.

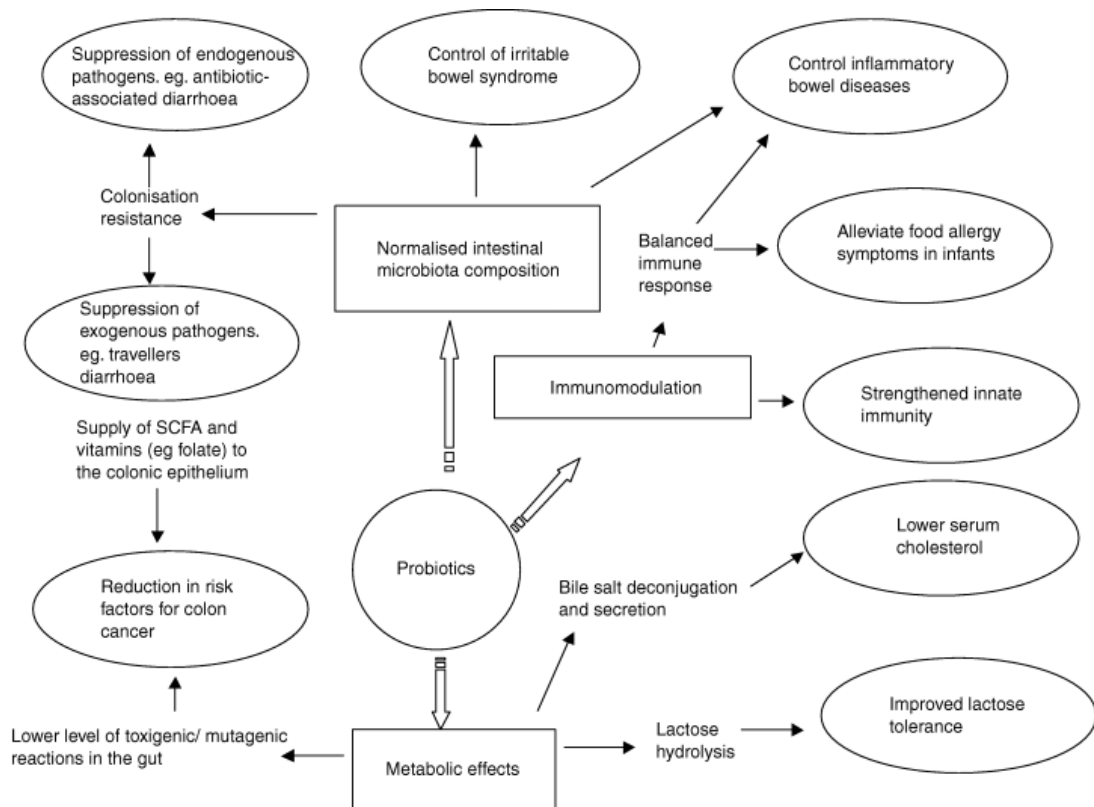
มากกว่า 30 สปีชีส์ที่แยกได้จากมนุษย์หรือสัตว์ หนึ่งในนั้น คือ *B. animalis* ซึ่งเป็นจีโนมที่มีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดได้ดี

สำหรับจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในการวิจัยนี้คือ *B. animalis* supsp. *lactis* BB-12[®] หรือเรียกแบบย่อว่า BB-12[®] ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่ได้รับการค้นคว้าวิจัยจนทราบข้อมูลมากที่สุดในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. โดยมีงานวิจัยตีพิมพ์มากกว่า 300 ฉบับ และมีมากกว่า 130 ฉบับที่เป็นการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ (Jungersen *et al.*, 2014) เป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดย Chr. Hansen เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากนมที่เสริมโพรไบโอติกและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร มีความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือแร่ได้ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. ทั้งการทดสอบ *in vitro* และ *in vivo* ในลำไส้ของมนุษย์ (Laparra and Sanz, 2009; Matsumoto *et al.*, 2004; Vernazza *et al.*, 2006; Vinderola and Reinheimer, 2003) โดย BB-12[®] มีเอนไซม์ bile salt hydrolase ช่วยให้เซลล์สามารถมีชีวิตได้ในสภาพที่มีเกลือแร่เข้มข้นในลำไส้เล็ก (Garrigues *et al.*, 2005) มีความสามารถในการยึดกับเซลล์เยื่อลำไส้ได้ดี และงานวิจัยทางคลินิกยังแสดงให้เห็นว่า BB-12[®] สามารถรอดชีวิตได้เมื่อผ่านระบบทางเดินอาหารและยังส่งเสริมสุขภาพและการทำงานของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ป้องกันไม่ให้เกิดท้องร่วง ลดผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะ ช่วยให้อุณหภูมิของร่างกายดีขึ้น เพิ่มภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจและลดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน

2.3.1.2 *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. เป็นโพรไบโอติกที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นของมนุษย์ สัตว์และพืช จัดอยู่ในกลุ่ม generally recognized as safe (Pimentel *et al.*) (Pimentel *et al.*) รูปร่างท่อน แกรมบวก พบเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเรียงเป็นสายสั้น เซลล์มีความกว้าง 0.6-0.9 μm และยาว 1.5-6.0 μm เป็นกลุ่มหลักของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria หรือ LAB) เจริญได้ทั้งภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อยหรือภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) การเจริญในช่วง 24 ชั่วโมงแรกอยู่ในช่วง exponential phase และหลังจากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ซึ่งจะสิ้นสุดหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง (Rezvani *et al.*, 2017) เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มี pH 4.0 - 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยทั่วไป คือ 30-40 $^{\circ}\text{C}$ *Lactobacillus* spp. ปรับตัวให้สามารถทนต่อกรดในกระเพาะและเกลือแร่เข้มข้นสูงได้ โดยความสามารถในการทนต่อสภาวะดังกล่าวแตกต่างกันไปตามสปีชีส์และสายพันธุ์ สำหรับจุลินทรีย์ที่งานวิจัยนี้เลือกใช้ ได้แก่ *L. paracasei* และ *L. casei*-01 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้าของ Danon และ Chr. Hansen ตามลำดับ

มีหลักฐานจากงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกดีต่อสุขภาพ (Weichselbaum, 2009) ผลเชิงสุขภาพที่ได้จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ดังแสดงให้เห็นจากการใช้ประโยชน์โพรไบโอติกเพื่อการรักษาโรคต่างๆในตารางที่ 2.8 จุลินทรีย์สายพันธุ์หนึ่งอาจไม่ได้ให้ผลเชิงสุขภาพเหมือนจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่งก็ได้ แม้แต่จุลินทรีย์ที่เป็นสปีชีส์เดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ก็อาจให้ผลเชิงสุขภาพต่างกันได้ จึงไม่มีสายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้ผลเชิงสุขภาพได้ครบถ้วน โพรไบโอติกมีกลไกในการส่งผลดีต่อสุขภาพหลายกลไก เช่น การสร้างสารต้านจุลินทรีย์ การปรับภูมิคุ้มกัน การส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของร่างกาย การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการส่งผลเชิงสุขภาพของโพรไบโอติก

ที่มา: Parvez *et al.* (2006)

ตารางที่ 2.8 การใช้โพรไบโอติกเพื่อรักษาโรค

ชื่อโรค	สายพันธุ์โพรไบโอติก
โรคผิวหนังอักเสบ (eczema)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
ภูมิแพ้อาหาร	<i>Escherichia coli</i>
ภูมิคุ้มกัน	<i>Bacillus circulans</i> PB7, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ12028
ภาวะลำไส้รั่ว (intestinal hyperpermeability)	<i>Lactobacillus plantarum</i> spp., <i>Lactobacillus plantarum</i> 299
กระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis)	<i>Lactobacillus casei</i>
ผลกระทบจากการใช้ยาปฏิชีวนะ	<i>Enterococcus mundtii</i> ST4SA, <i>Lactobacillus plantarum</i> 423, <i>Lactobacillus brevis</i> KB290, <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.
เชื้อราในช่องคลอด (vaginal candidiasis)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1, <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14
การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1, <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14
ภาวะที่ร่างกายไม่สามารถย่อยน้ำตาลในน้ำนมได้ (lactose intolerance)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
ยาต้านอักเสบชนิดไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs)	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
อาการเสียสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ (intestinal dysbiosis)	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1, <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> GG
ลำไส้แปรปรวน (irritable bowel syndrome หรือ IBS)	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624, <i>Escherichia coli</i> DSM17252
ท้องร่วงในนักท่องเที่ยว (traveler's diarrhea)	<i>Lactobacillus</i> GG, <i>Lactobacillus plantarum</i>
ท้องร่วงจากรังสีรักษา (Radiation-induced diarrhea)	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001
โรคโครห์น (Crohn's disease)	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer)	<i>Enterococcus faecium</i> M-74, จุลินทรีย์กรดแลคติก

ที่มา: (Amara and Shibl, 2015)

คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับความมีชีวิต (viability) จึงมีการกำหนดปริมาณโพรไบโอติกขั้นต่ำที่ควรมีในผลิตภัณฑ์และปริมาณที่ควรได้รับต่อวัน เพื่อให้มั่นใจว่าหลังบริโภคแล้วแบคทีเรียที่เหลืออยู่ยังมีปริมาณเพียงพอที่จะทำหน้าที่ส่งเสริมสุขภาพภายในร่างกายได้ ปริมาณขั้นต่ำที่แนะนำโดยทั่วไปคือไม่น้อยกว่า 10^6 CFU (colony-forming units)/g (Ashraf and Shah, 2011) เกณฑ์ปริมาณขั้นต่ำนี้ยังมีความหลากหลาย เช่น International Dairy Federation (IDF) ระบุว่าผลิตภัณฑ์อาหารต้องมีโพรไบโอติกอย่างน้อย 10^7 CFU/g (IDF, 1999) ส่วนในประเทศไทย บราซิลผลิตภัณฑ์ถูกกำหนดว่าต้องมีโพรไบโอติกอยู่ในช่วง 10^8 - 10^9 CFU/หน่วยบริโภคตลอดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น แม้ว่าจะยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์ที่เป็นหนึ่งเดียวกันแต่งานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าปริมาณขั้นต่ำเพื่อให้ได้ผลเชิงสุขภาพจากการบริโภคโพรไบโอติกควรอยู่ในช่วง 10^6 - 10^9 CFU ต่อวัน (do Espírito Santo *et al.*, 2011) ดังนั้นการรักษาปริมาณโพรไบโอติกที่มีชีวิตระหว่างกระบวนการผลิต การเก็บรักษา การขนส่งผลิตภัณฑ์อาหารจากสถานที่ผลิตไปยังผู้บริโภค ไปจนถึงการมีชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเมื่อผ่านทางเดินอาหารจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก อย่างไรก็ตามพบว่าผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกในท้องตลาดบางครั้งมีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกต่ำทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำกว่าที่ระบุในฉลาก (Ibrahim and Carr, 2006)

2.3.2 พรีไบโอติก (Prebiotics)

พรีไบโอติก หมายถึง องค์ประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยการส่งเสริมการเจริญหรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ชนิดหนึ่งหรือกลุ่มหนึ่งโดยจำเพาะส่งผลให้สุขภาพดีขึ้น (Gibson *et al.*, 2004) ส่งเสริมการเจริญและกิจกรรมของโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้อย่างจำเพาะ (Al-Sheraji *et al.*, 2013; Bultosa, 2016) และช่วยเพิ่มอัตราการรอดของโพรไบโอติกด้วย พรีไบโอติกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสร้างสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นภายในลำไส้เพื่อสุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เนื่องจากพรีไบโอติกไม่มีข้อจำกัดเรื่องความมีชีวิตอย่างที่พบในการเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติก การเพิ่มจำนวนและยึดเกาะของจุลินทรีย์กับเยื่อภายในลำไส้ ผลของพรีไบโอติกต่อร่างกายเป็นผลทางอ้อม คือ เมื่อรับประทานแล้วไม่ได้ส่งผลต่อร่างกายโดยตรง แต่ไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ซึ่งจะให้ผลเชิงสุขภาพต่อไป นอกจากนี้พรีไบโอติกหนึ่งชนิดสามารถช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกประจำถิ่นหลายสายพันธุ์ซึ่งมีอยู่แล้วตามธรรมชาติภายในลำไส้ใหญ่ให้เจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Manning and Gibson, 2004; Wang, 2009) พรีไบโอติกจึงนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ง่ายและหลากหลาย และมีประสิทธิภาพดีกว่าโพรไบโอติก อย่างไรก็ตามหากในลำไส้ใหญ่ไม่มีจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ดีต่อร่างกายประโยชน์ที่จะได้รับการบริโภคพรีไบโอติกก็จะได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ

พรีไบโอติกเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ย่อยไม่ได้ (non-digestible oligosaccharides หรือ NDOs) เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของอาหารที่เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ โดยจากการวิจัยคำนวณทางชีวเคมีผ่านวิธีเมแทบอลิซึมพบว่าให้พลังงานต่ำประมาณ 1.5-2.0 กิโลแคลอรีต่อกรัม (Roberfroid *et al.*, 1993; Roberfroid, 1999; Sako *et al.*, 1999) สารที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกมีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างพรีไบโอติกและแหล่งที่พบ

ชนิดของพรีไบโอติก	แหล่งที่พบ
ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharides)	แอสพาราแกัส น้ำตาลบีท กระเทียม ซีโครี หอม แขนตะวัน ข้าวสาลี น้ำผึ้ง กล้วย ข้าวบาร์เลย์ มะเขือเทศ ข้าวไรย์
ไอโซมอลทูลอส (isomaltulose)	น้ำผึ้ง น้ำอ้อย
ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xyloligosaccharides)	หน่อไม้ ผลไม้ ผัก นม น้ำผึ้ง รำข้าวสาลี
กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharides)	น้ำนมมนุษย์ น้ำนมวัว
ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrins)	กลูแคนละลายน้ำได้
ราฟฟิโนส โอลิโกแซ็กคาไรด์ (raffinose oligosaccharides)	เมล็ดพืชตระกูลถั่ว ถั่วฝัก/เมล็ดกลม/ เมล็ดแบน ถั่วลูกไก่ แมลโลว์ มีสตาร์ด
โอลิโกแซ็กคาไรด์จากถั่วเหลือง (soybean oligosaccharides)	ถั่วเหลือง
แลคทูโลส (lactulose)	แลคโตส (น้ำนม)
แลคโตซูโครส (lactosucrose)	แลคโตส
ไอโซมอลทูลอส (isomaltulose)	ซูโครส
พาลาทิโนส (palatinose)	ซูโครส
มอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (maltooligosaccharides)	สตาร์ช
ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharides)	สตาร์ช
อะราบิโนไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (arabinoxyloligosaccharides)	รำข้าวสาลี
เดกซ์ทรินทนเอนไซม์ (enzyme-resistant dextrin)	สตาร์ชมันฝรั่ง

ที่มา: Al-Sheraji *et al.* (2013)

แลคทูโลส (lactulose), กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharides หรือ GOS), ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharides หรือFOS) และอินูลิน (inulin) เป็นพรีไบโอติกที่เป็นที่ยอมรับและนิยมใช้เสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร (Al-Sheraji *et al.*, 2013; Dominguez *et al.*, 2013; Gomez *et al.*, 2017) พรีไบโอติกต้องมีสมบัติตามที่กำหนดไว้ (Gibson *et al.*, 2004) ดังนี้

- ไม่สามารถถูกย่อยหรือดูดซึมได้โดยทางเดินอาหารตอนต้น (upper gastrointestinal tract)
- สามารถเกิดการหมักได้โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ที่มีประโยชน์ กระตุ้นการเจริญกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านั้น เช่น *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacilli* spp.
- สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดผลเชิงสรีรวิทยาที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ (โดยต้องมีการวิจัยในมนุษย์รับรอง)

2.3.2.1 ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide หรือ FOS)

ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์พบทั่วไปในพืช ได้แก่ กล้วย แก้วมังกร ถั่วเหลือง ข้าวไรย์ มันฝรั่ง หอม มะเขือเทศ แก่นตะวัน แอสพาราแกส ชิโครี กระเทียม ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต เป็นต้น เป็นพรีไบโอติกที่มีการวิจัยมากที่สุด มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ดูดความชื้นจากบรรยากาศได้ดี (hygroscopic) โครงสร้างมีฟรุคโตสเรียงต่อกันเป็นสายโซ่และปิดท้ายด้วยกลูโคสเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(2-1) glycosidic จึงไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ที่มีความจำเพาะในการย่อยคาร์โบไฮเดรตที่มีพันธะ α -glycosidic เท่านั้น ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบ่งเป็น 3 กลุ่ม (Sabater-Molina *et al.*, 2009) คือ

1) อินูลิน (inulin) ภายในโมเลกุลประกอบด้วยฟรุคโตสจำนวน 2-60 หน่วย โดยเฉลี่ยประมาณ 12 หน่วย

2) โอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) ได้จากย่อยอินูลินด้วยเอนไซม์ เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีระดับการพอลิเมอไรเซชันน้อยกว่า 20 โดยเฉลี่ยประมาณ 9

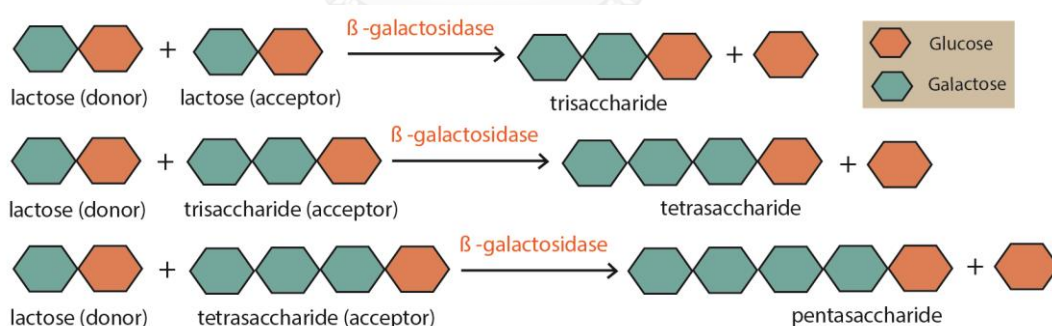
3) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น (short-chain fructooligosaccharides) ประกอบด้วยน้ำตาลภายในโมเลกุล 5 หน่วย ได้จากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติ ได้แก่ 1-ketose (GF2), nistose (GF3), และ 1-fructosyl-nystose (GF4) หรือเรียกทั่วไปว่าเป็น FOS แบบ GF_n (โดยที่ G = กลูโคส, F = ฟรุคโตส และ n = จำนวนหน่วยย่อยของฟรุคโตส) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์ fructosyl transferase (Antosova and Polakovic, 2001) โดยจะได้ FOS แบบที่เป็น FF_n

ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีสมบัติละลายน้ำได้ โครงสร้างของฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แสดงในภาพที่ 2.8 A ละลายได้ในอาหารที่มีค่า pH ในช่วง 4.0-7.0 (Mussatto and Mancilha, 2007) ไม่หนืด ให้ความหวานเป็น 0.3 – 0.6 เท่าของน้ำตาลทราย ให้พลังงานเพียง 1-1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็กจึงถูกส่งต่อมายังลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ ฟรุคโตโอ

2.3.2.2 กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharide หรือ GOS)

ในทางอุตสาหกรรมสามารถผลิตกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้จากปฏิกิริยาทรานส์กาแลคโตซิเลชัน (transgalactosylation) โดยอาศัยเอนไซม์ β -galactosidase (EC 3.2.1.23) โดยใช้แลคโตสที่แยกจากเวย์ (whey) ของน้ำนมวัวเป็นวัตถุดิบ (Sangwan *et al.*, 2014) (ภาพที่ 2.9) เอนไซม์ β -galactosidase สามารถทำหน้าที่ 2 ประการ คือ การสลายพันธะระหว่างกลูโคสและแลคโตส (hydrolytic activity) และการเปลี่ยนแลคโตสให้เป็นกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (transgalactosylic activity) ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ ไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharide) ได้แก่ 4'-galactosyllactose, 6'-galactosyllactose และโอลิโกแซ็กคาไรด์สายยาวที่มีหน่วยย่อยเป็นมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 4 หน่วยหรือมากกว่านั้น (Al-Sheraji *et al.*, 2013; Sako *et al.*, 1999)

กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า ชื่อ Oligomate[®] 55N (Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd., Japan) เป็นไซรัป (syrup) สี ไม่มีสี ผลิตภัณฑ์มีส่วนที่เป็นของแข็ง 75% (w/v) ประกอบด้วยกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มากกว่าหรือเท่ากับ 55% ของส่วนประกอบที่เป็นของแข็ง Oligomate[®] 55N ประกอบด้วยโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากน้ำนม คือ 4'-galactosyllactose กระบวนการผลิตใช้เอนไซม์ β -galactosidase จาก 2 แหล่ง คือ *Sporobolomyces singularis* (YC-Y) สำหรับสร้างโอลิโกแซ็กคาไรด์และ *Kluyveromyces lactis* (GODO-YNL) สำหรับย่อยแลคโตสที่เหลือจากปฏิกิริยา



ภาพที่ 2.9 การผลิตกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแลคโตสโดยการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase

ที่มา: ดัดแปลงจาก Spherix Consulting Inc. (2010)

2.3.2.3 อินูลิน (inulin)

จัดเป็นพรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ประเภทหนึ่ง เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สะสมที่พบในพืช เช่น หอม กระเทียม อาร์ติโชค (artichoke) และชิโครี (chicory) จัดเป็นพรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ประเภทหนึ่ง

ประกอบด้วยโอลิโกเมอร์และพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยฟรุกโตส (D-fructose) จำนวน 2-60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -2-1 และมีกลูโคส (D-glucose) เชื่อมที่ปลายสายโซ่ โดยทั่วไปมีระดับของการพอลิเมอไรเซชันอยู่ระหว่าง 10 -12 (Greg Kelly, 2008; Ninness, 1999) (ภาพที่ 2.8) เนื่องจากอินูลินเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายหน่วยเรียงต่อกันจึงมีความหวานเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับความหวานของน้ำตาลทราย ในกรณีของอินูลินตามธรรมชาตินั้นมีความหวานเพียง 10% ของความหวานของน้ำตาลทราย กรณีของอินูลิน high performance (HP inulin) จะไม่มีความหวานเลย สำหรับอินูลินที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ Orafti[®]GR (Beneo GmbH, Germany) และ Orafti[®]HSI (Beneo GmbH, Germany) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อินูลินทางการค้า

Orafti[®]GR (Beneo GmbH, Germany) เป็นอินูลินจากชิโครี มีอินูลินมากกว่าหรือเท่ากับ 90 % (w/w) โดยส่วนที่เหลือเป็นกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ประกอบด้วยโอลิโกแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีระดับการพอลิเมอไรเซชันอยู่ในช่วง 2-60 ให้พลังงาน 166 กิโลแคลอรีต่อผลิตภัณฑ์ 100 กรัม เมื่อคำนวณจากพลังงานที่ได้จากอินูลินเท่ากับ 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม มีรสชาติหวานเล็กน้อย ไม่มีความรู้สึกหลังจากการรับรส (aftertaste) ละลายน้ำได้ 120 กรัมต่อลิตร

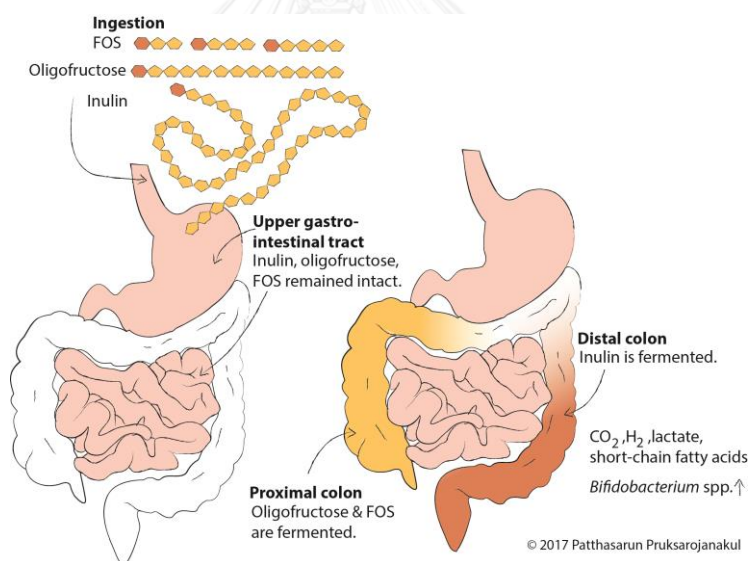
Orafti[®]HSI (Beneo GmbH, Germany) เป็นอินูลินจากชิโครีที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เล็กน้อย มีอินูลินมากกว่าหรือเท่ากับ 86 % (w/w) โดยส่วนที่เหลือเป็นกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ประกอบด้วยโอลิโกแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีระดับการพอลิเมอไรเซชันอยู่ในช่วง 2-70 ให้พลังงาน 168 กิโลแคลอรีต่อผลิตภัณฑ์ 100 กรัม เมื่อคำนวณจากพลังงานที่ได้จากอินูลินและโอลิโกฟรุกโตสเท่ากับ 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม มีรสชาติหวานเล็กน้อย ไม่มีความรู้สึกหลังจากการรับรส (aftertaste) ละลายน้ำได้มากกว่า 200 กรัมต่อลิตร

2.3.2.4 พรีไบโอติกในทางเดินอาหารและการใช้พรีไบโอติกเพื่อการเจริญของโพรไบโอติก

หนึ่งในเป้าหมายหลักของการบริโภคพรีไบโอติก คือ การกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกภายในทางเดินอาหารของผู้บริโภค นำไปสู่การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ (gut microbiota) ช่วยให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายดีขึ้น และส่งผลเชิงสุขภาพด้านอื่นๆ พรีไบโอติกเมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารจะผ่านทางเดินอาหารส่วนต้นโดยไม่ถูกย่อยจนกระทั่งเข้าสู่ลำไส้ใหญ่

การหมักของโอลิโกแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างพรีไบโอติก พรีไบโอติกที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมีองค์ประกอบของน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อยเหมือนกัน เช่น ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โอลิโกฟรุกโตส และอินูลิน ไม่ได้ส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกในบริเวณเดียวกันเนื่องจากโครงสร้างของพรีไบโอติกเหล่านี้มีระดับการพอลิเมอไรเซชันที่แตกต่างกันที่เป็นตัวกำหนดว่าพรีไบโอติกจะถูกหมักใน

บริเวณใดของลำไส้ใหญ่ (Roberfroid, 2007) ดังแสดงในภาพที่ 2.10 ดังนั้นฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และโอลิโกฟรุคโตสซึ่งโครงสร้างของสายโซ่มีขนาดสั้นกว่าอินูลินจะถูกหมักในลำไส้ใหญ่ตอนต้น ในขณะที่อินูลินมักจะยังไม่ถูกย่อยและถูกส่งต่อไปยังลำไส้ใหญ่ตอนท้ายและเกิดการหมักที่นั่น อย่างไรก็ตามพรีไบโอติกที่ผ่านเข้าไปในลำไส้จะถูกหมักทั้งหมดและไม่ตรวจพบในอุจจาระ (Alles *et al.*, 2007; Molis *et al.*, 1996) ระหว่างการหมักยังเกิดแก๊ส แลคเตท กรดไขมันสายสั้น ทำให้กากอาหารภายในลำไส้ใหญ่มีความเป็นกรด จุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่เพิ่มจำนวน และเกิดการปรับเปลี่ยนสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่น ส่งผลดีต่อสุขภาพหลายประการ (Al-Sheraji *et al.*, 2013) โดยพรีไบโอติกแต่ละชนิดให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันและไม่มีพรีไบโอติกชนิดใดที่ให้ผลเชิงสุขภาพครบถ้วนที่สุด กลุ่มของพรีไบโอติกที่ให้ผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกรวมว่า *Bifidobacterium* spp. (bifidogenic effect) ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โอลิโกฟรุคโตส และอินูลิน สำหรับพรีไบโอติกที่นิยมใช้ส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกทั้งกลุ่ม *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. คือ อินูลิน



ภาพที่ 2.10 บริเวณที่เกิดการย่อยพรีไบโอติกแต่ละชนิดในทางเดินอาหาร

ที่มา: ดัดแปลงจาก Greg Kelly (2008)

โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้พรีไบโอติกแตกต่างกัน งานวิจัยของ Cruz-Guerrero *et al.* (2014) ศึกษาการใช้พรีไบโอติกทางการค้าของพรีไบโอติกทางการค้า ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus casei* Shirota พบว่าโพรไบโอติกทั้งหมดสามารถใช้พรีไบโอติกที่ทดสอบได้ทุกชนิด ได้แก่ แลคโตส, Frutafit[®] (อินูลิน), Regulact[®] (แลคทูโลส) และ Oligomate[®] 55 (กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์)

โดยโพรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เหมือนกัน *L. rhamnosus* GG และ *L. rhamnosus* KLDS เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี Oligomate[®] 55 แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม Regulact[®] จะเจริญได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแลคโตส ในขณะที่จุลินทรีย์ *L. casei* Shirota สามารถเจริญในอาหารที่มี Regulact[®] กับ Oligomate[®] 55 ได้ดีกว่า Frutafit[®] แต่โพรไบโอติกทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้ *L. casei* Shirota เจริญได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์พบว่า *L. casei* Shirota มีการเจริญดีที่สุด (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014) ในการศึกษาอัตราการนำโพรไบโอติกไปใช้ (uptake rate) ของโพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ก็แตกต่างกันด้วย พบว่าโพรไบโอติกบางชนิดมีอัตราการนำไปใช้สูงกว่าคาร์โบไฮเดรตควบคุม โดย *L. casei* Shirota สามารถดึง Regulact[®] ไปใช้ได้มากที่สุด *L. rhamnosus* KLDS สามารถดึง Frutafit[®] ไปใช้ได้สูงที่สุด และ *L. rhamnosus* GG ดึง Oligomate[®] 55 ไปใช้ในการเจริญได้สูงที่สุด แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกมีความชอบโพรไบโอติกแต่ละชนิดแตกต่างกันไป (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014) เพราะฉะนั้นการวิเคราะห์ศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติกเชิงปริมาณจึงเป็นแนวทางที่ทำให้สามารถทราบความสามารถของซบสเตรตทดสอบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกได้มากน้อยเพียงใด และสามารถนำไปเปรียบเทียบกันได้ โดยหลักในการวิเคราะห์กล่าวในข้อที่ 2.5

จากศักยภาพของโพรไบโอติกในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกตามที่กล่าวมาข้างต้น ปัจจุบันจึงมีความสนใจการประยุกต์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารควบคู่กับโพรไบโอติกเพื่อให้ได้ประโยชน์มากขึ้นจากการมีผลเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) เรียกว่า ซินไบโอติก (synbiotics)

2.3.3 ซินไบโอติก (Synbiotics)

ซินไบโอติกได้ถูกนิยามครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 ว่าเป็นการรวมกันของโพรไบโอติกและโพรไบโอติก (Gibson and Roberfroid, 1995) หากพิจารณาถึงคำจำกัดความของโพรไบโอติกและโพรไบโอติกด้วยแล้ว ซินไบโอติกประกอบด้วยส่วนแรกคือโพรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีปริมาณมากเพียงพอที่ให้ผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์และส่วนที่สองคือโพรไบโอติกซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารที่ย่อยไม่ได้ซึ่งสามารถปรับสังคมจุลินทรีย์ภายในลำไส้โดยการอยู่รอดและกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ 2 แนวทาง คือ complementary synbiotics และ synergistic synbiotics (Kolida and Gibson, 2011)

- complementary synbiotics คือ โพรไบโอติกเป็นสายพันธุ์ที่พิจารณาเลือกจากความสามารถของโพรไบโอติกในส่งผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์ในรูปแบบที่ต้องการ ส่วนการเลือกโพรไบโอติกเป็นไปอย่างอิสระโดยมีเป้าหมายเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ โพร

ไบโอดีทที่ใช้ อาจจะกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอดีทที่เลือกแต่เป็นเพียงส่วนหนึ่งของเป้าหมายของพรีไบโอดีทเท่านั้น ไม่ได้เป็นเป้าหมายตรง เพราะฉะนั้นซินไบโอดีทในรูปแบบนี้จึงมองเป็นผลิตภัณฑ์แยกส่วน โดยแต่ละส่วนต้องมีขนาดที่เพียงพอต่อการส่งผลเชิงสุขภาพ

- synergistic synbiotics คือ โพรไบโอดีทถูกเลือกเช่นเดียวกับกรณีของ complementary synbiotics แต่ในกรณีนี้พรีไบโอดีทจะถูกเลือกเพื่อให้กระตุ้นการเจริญของโพรไบโอดีทที่เลือก โดยเฉพาะ ดังนั้นพรีไบโอดีทจึงไปช่วยเพิ่มการอยู่รอดและส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอดีทที่เลือกไว้เป็นหลัก อาจจะช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่มีอยู่แล้วในลำไส้ได้แต่เป้าหมายหลักคือโพรไบโอดีทที่รับประทานเข้าไป ซินไบโอดีทในรูปแบบนี้จึงเสมือนว่าเป็นผลิตภัณฑ์เดี่ยว เนื่องจากพรีไบโอดีทมีเป้าหมายเดียวคือ ส่งเสริมการมีชีวิตและการเจริญของโพรไบโอดีทที่เลือกเพื่อให้ได้ผลเชิงสุขภาพตามต้องการ ปริมาณโพรไบโอดีทที่ใช้ในผลิตภัณฑ์จึงน้อยลงเนื่องจากมีพรีไบโอดีทที่เสริมคู่กันไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนได้อีกในภายหลัง

แม้ว่าปัจจุบันงานวิจัยจำนวนมากสนับสนุนประสิทธิภาพการป้องกันโรคและประโยชน์ทางโภชนเภสัชของโพรไบโอดีทและพรีไบโอดีท แต่ความรู้ความเข้าใจในส่วนของซินไบโอดีทยังคงขาดแคลน (Shokrvash *et al.*, 2016) งานวิจัยเบื้องต้นสนับสนุนว่าผลิตภัณฑ์อาหารแบบซินไบโอดีทที่มีการเสริมทั้งพรีไบโอดีทและโพรไบโอดีทพร้อมกันเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพดีกว่าการบริโภคโพรไบโอดีทหรือพรีไบโอดีทอย่างเดียวในการกระตุ้นและส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและสุขภาพโดยรวมของผู้บริโภค โดยมีสมมุติฐานว่าเกิดจากการมีผลเสริมฤทธิ์กันขององค์ประกอบทั้งสอง (Finamore *et al.*, 2016) Burns and Rowland (2004) พบว่าการให้โพรไบโอดีทมีผลป้องกันการถูกทำลายของดีเอ็นเอในเซลล์ HT-29 และพบว่าพรีไบโอดีทไม่มีผลป้องกันแต่อย่างใด ในขณะที่การได้รับซินไบโอดีทกลับให้ประสิทธิภาพป้องกันการถูกทำลายเพิ่มขึ้นในลักษณะ synergistic ซึ่งงานวิจัยของ Stein *et al.* (2012) ก็ให้ผลที่สอดคล้องกัน

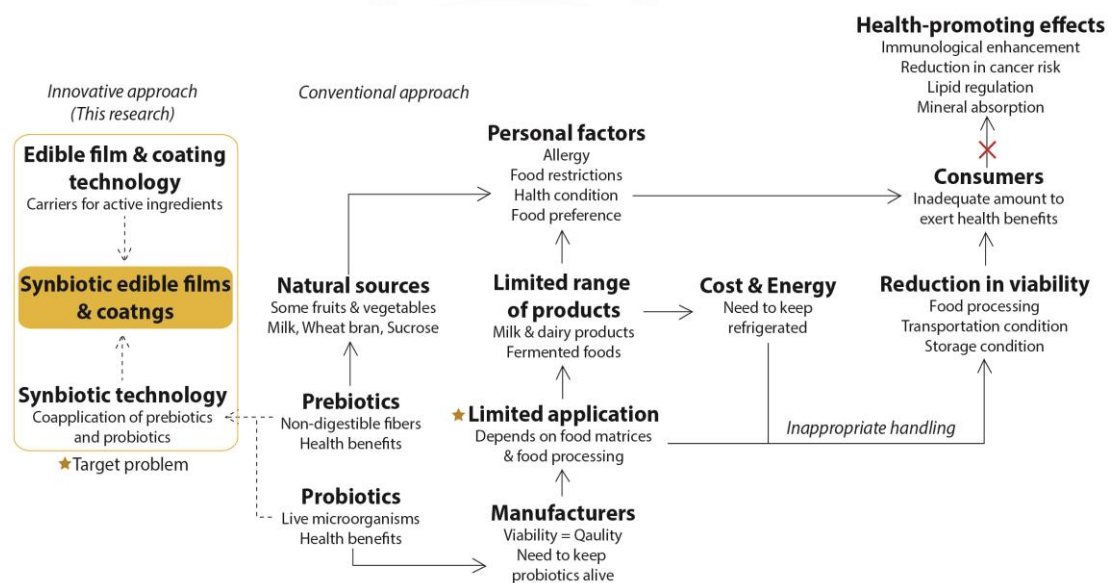
ผลิตภัณฑ์อาหารซินไบโอดีทที่ประสบความสำเร็จส่วนใหญ่เป็นกลุ่มผลิตภัณฑ์จากนมและน้ำผักผลไม้ (Scourboutakos, 2010) การผลิตฟิล์มบริโภคได้ที่มีสมบัติซินไบโอดีทเพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคยังคงเป็นงานวิจัยส่วนน้อย โดยสูตรซินไบโอดีทที่มีในปัจจุบันเป็นการรวมตัวกันของ *Bifidobacterium* spp. กับฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์, *Lactobacillus rhamnosus* GG กับอินูลิน, *Bifidobacterium* spp. กับ *Lactobacillus* spp. กับฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์หรืออินูลิน (Bultosa, 2016)

2.4 ข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้โพรไบโอดีทและพรีไบโอดีทในผลิตภัณฑ์อาหาร

ข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้โพรไบโอดีทและพรีไบโอดีทในอาหาร (ภาพที่ 2.11) ได้แก่

- การมีชีวิตของโพรไบโอติก โดยข้อจำกัดหลักของการรอดชีวิตโพรไบโอติกในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิต ได้แก่ สภาวะของกระบวนการผลิตและส่วนประกอบบางชนิดในอาหาร (เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิต ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง) ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ลดลงและค่าใช้จ่ายการผลิตสูงขึ้น (Iaconelli *et al.*, 2015) และความเป็นกรดและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร จึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีที่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกให้อยู่ในปริมาณที่เพียงพอทั้งในอาหารและในโฮสต์ หนึ่งในวิธีการที่นิยมใช้คือ การตรึงเซลล์ (cell immobilization) ซึ่งเป็นการปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการเคลือบด้วยวัสดุที่ปลอดภัยและสามารถบริโภคได้ เช่น เอนแคปซูลชัน (encapsulation) (Corona-Hernandez *et al.*, 2013; de Vos *et al.*, 2010) และการทำฟิล์ม (Romano *et al.*, 2014) ซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าวช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกได้ ช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สัมผัสกับเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารหรือสภาพแวดล้อมของอาหารโดยตรง (Soukoulis *et al.*, 2014a; Soukoulis *et al.*, 2014b)

- ต้องเก็บรักษาในที่เย็น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่มีโพรไบโอติกในท้องตลาดส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปที่ต้องแช่เย็นตลอดเวลาเพื่อให้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์อยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการส่งผลเชิงสุขภาพต่อผู้บริโภค การเก็บรักษาต้องเก็บไว้ในที่เย็นภายใต้อุณหภูมิที่กำหนดจึงยุ่งยาก ต้องหาอุปกรณ์ทำความเย็นเพื่อเก็บรักษา ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาทั้งระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสถานที่จำหน่าย (Tripathi and Giri, 2014) การเปลี่ยนรูปแบบผลิตภัณฑ์เป็นฟิล์มจะช่วยลดค่าใช้จ่ายได้



ภาพที่ 2.11 แผนภาพแสดงข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้โพรไบโอติกและพรีไบโอติก และแนวทางในการแก้ปัญหาที่เสนอโดยงานวิจัยนี้

- ผู้บริโภคที่มีข้อจำกัดทางอาหารมีทางเลือกน้อย ผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นแหล่งของโพรไบโอติกโดยทั่วไปมักเป็นผลิตภัณฑ์จากนมและผลิตภัณฑ์หมักจากนม ทำให้การได้รับโพรไบโอติกในชีวิตประจำวันถูกจำกัดในกลุ่มผู้บริโภคที่มีความต้องการอาหารเฉพาะด้วยสาเหตุต่างๆ เช่น มีภาวะการย่อยแลคโตสผิดปกติ (lactose intolerance), เป็นผู้ทานมังสวิรัต, ไม่ชอบอาหารหมักหรือผลิตภัณฑ์จากนม, ต้องควบคุมน้ำตาลหรือคอเลสเตอรอล หรือแพ้โปรตีนในผลิตภัณฑ์จากนม เป็นต้น

- อาหารที่สามารถเสริมโพรไบโอติกได้ต้องมีความเหมาะสม ถือเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาเมื่อต้องการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร (Ranadheera *et al.*, 2010; Senaka Ranadheera *et al.*, 2012) การเติมเซลล์โพรไบโอติกลงในอาหารโดยตรงทำให้จุลินทรีย์ต้องสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีในอาหารและกระบวนการผลิตอาหาร โดยตรง ทำให้ตัวกลางอาหารที่มีสภาวะไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ไม่สามารถถูกพัฒนาเป็นอาหารที่เสริมโพรไบโอติกได้ ความหลากหลายของอาหารที่เสริมโพรไบโอติกจึงมีน้อย เพื่อหลีกเลี่ยงการเผชิญสภาวะรุนแรงดังกล่าวและช่วยให้การประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลายชนิดขึ้น

2.5 การวิเคราะห์ศักยภาพของโพรไบโอติกเชิงปริมาณ

เนื่องจากความสามารถในการใช้โพรไบโอติกของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีความจำเพาะขึ้นกับความซับซ้อนของโครงสร้างของโพรไบโอติกและสายพันธุ์โพรไบโอติก จึงมีความจำเป็นต้องวิเคราะห์ศักยภาพของโพรไบโอติกเชิงปริมาณเพื่อเปรียบเทียบและคัดเลือกโพรไบโอติกสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชีโนโพรไบโอติก (Marotti *et al.*, 2012; Piermaria *et al.*, 2015)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญอย่างจำเพาะของโพรไบโอติก โดยใช้หลักการคือ ศักยภาพของโพรไบโอติกมีค่าสูงเมื่อโพรไบโอติกชนิดนั้นสามารถเพิ่มจำนวนโพรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bifidobacterium spp.* และ *Lactobacillus spp.* ได้ดี ขณะที่การเพิ่มจำนวน enteric bacteria จะทำให้ศักยภาพของโพรไบโอติกลดลง ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ช่วยให้สามารถทราบศักยภาพของโพรไบโอติกของซัสเตรตชนิดต่างๆและนำมาเปรียบเทียบกันได้ และยังช่วยให้ทราบความเสถียรของโพรไบโอติกได้อีกด้วย การวิเคราะห์เชิงปริมาณมีหลายวิธี (Moore, 2011) ได้แก่

2.5.1 Prebiotic index (PI) พิจารณาการเจริญของแบคทีเรียหลายกลุ่มในสมการ (Palframan *et al.*, 2003) ดังนี้

$$PI = (Bif/Total) + (Lac/Total) - (Bac/Total) - (Clos/Total) \quad (2.1)$$

โดย ค่านำมาคำนวณในสมการ คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้หารด้วยจำนวนเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง, Bif คือ Bifidobacteria, Bac คือ Bacteroides, Lac คือ Lactobacilli, Clos คือ Clostridia และ Total คือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดทุกชนิด

2.5.2 Measure of prebiotic effect (MPE) เป็นวิธีการที่ปรับจากสมการ PI โดยสนใจที่การเจริญของแบคทีเรียภายในลำไส้และการสร้างกรดไขมันสายสั้น ใช้สมการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สมการอัตราการใช้ซับสเตรตของแบคทีเรีย (rate of assimilation หรือ A_r), สมการอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (rate of growth) และสมการการสร้างกรดไขมันสายสั้น (total short chain fatty acids) ปรับเข้าด้วยกัน (Vulevic *et al.*, 2004) จะได้สมการดังนี้

$$MPE = 0.5 \times (X^2Y^2 + X^2Z^2 + Y^2Z^2)^{1/2} \quad (2.2)$$

โดย X คือ อัตราการใช้ซับสเตรตของแบคทีเรีย (rate of assimilation หรือ A_r)

Y คือ ค่า adjusted PI

Z คือ สัดส่วนของแลคเตทต่อกรดไขมันสายสั้นทั้งหมด

2.5.3 Prebiotic activity score เป็นวิธีวิเคราะห์ที่พิจารณาความสามารถของซับสเตรตในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเทียบกับจุลินทรีย์อื่นและเปรียบเทียบกับสับสเตรตที่ไม่ใช่โพรไบโอติก เช่น กลูโคส (Huebner *et al.*, 2007) ดังสมการที่ 2.3

$$\text{Prebiotic activity score} = (\Delta P_x / \Delta P_g) - (\Delta E_x / \Delta E_g) \quad (2.3)$$

โดย ΔP_x และ ΔP_g เป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์โพรไบโอติก (CFU/mL) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบและเติมกลูโคสตามลำดับ ΔE_x และ ΔE_g เป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์ enteric mixture (CFU/mL) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบและเติมกลูโคสตามลำดับ

ตัวอย่างค่า prebiotic activity score ของโพรไบโอติกแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2.10 ค่าที่ได้จากสมการจะเป็นบวกเมื่อมีเฉพาะจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกเท่านั้นที่นำไปใช้ในการเจริญได้ดีเท่ากับกลูโคส จำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจึงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นในลำไส้ หากเปรียบเทียบค่า prebiotic activity score ที่ของซับสเตรตต่างชนิดกัน ซับสเตรตที่มีค่า prebiotic activity score สูงกว่าหมายความว่าซับสเตรตนั้นมีศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติกสูงกว่าซับสเตรตอื่นที่ถูกนำมาเปรียบเทียบกัน งานวิจัยหลายงานที่พิจารณาศักยภาพของโพรไบโอติกด้วยวิธีนี้ เนื่องจากทำได้ง่ายและให้ผลรวดเร็ว (Huebner *et al.*, 2007; Marotti *et al.*, 2012; Mazzola *et al.*, 2015; Palframan *et al.*, 2003; Sangwan *et al.*, 2014; Srisuvor *et al.*, 2013; Thitiratsakul and Anprung, 2014)

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างค่า prebiotic activity score ของพรีไบโอติกทางการค้า

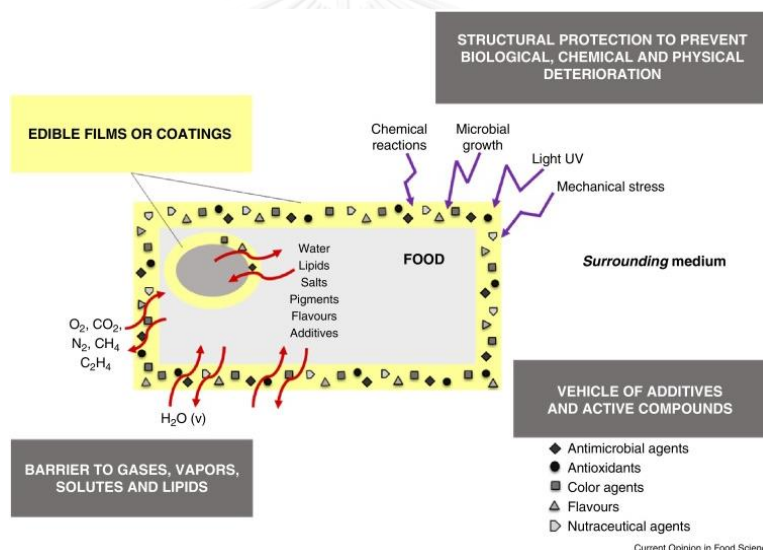
พรีไบโอติก	โพรไบโอติก	Prebiotic activity score	อ้างอิง*
Inulin-S	<i>L. paracasei</i> 1195	1.17	(1)
	<i>B. bifidum</i> NCI	-1.17	(1)
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0.00	(1)
	<i>L. acidophilus</i> 33200	0.17	(1)
Inulin	<i>L. rhamnosus</i> GG	0.56	(2)
	<i>L. acidophilus</i> La5	1.20	(3)
	<i>B. animalis</i> BB-12	1.69	(3)
Raftiline HP	<i>L. paracasei</i> 1195	1.10	(1)
	<i>B. bifidum</i> NCI	-0.67	(1)
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0.07	(1)
	<i>L. acidophilus</i> 33200	0.20	(1)
Raftilose P95	<i>L. paracasei</i> 1195	0.99	(1)
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0.58	(1)
	<i>L. acidophilus</i> 33200	-0.70	(1)
	<i>B. bifidum</i> NCI	0.65	(1)
purified GOS	<i>L. plantarum</i> 4008	0.82	(1)
	<i>L. acidophilus</i> 33200	0.70	(1)
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0.66	(1)
	<i>B. bifidum</i> NCI	-1.24	(1)
	<i>L. rhamnosus</i> GG	0.54	(2)
Orafti® P95	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Lpc-37	0.03	(4)
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0.07	(4)
	<i>L. acidophilus</i> La-14	0.05	(4)
	<i>L. acidophilus</i> LA-5	-0.07	(4)
	<i>B. animalis</i> BB-12	-0.004	(4)

*(1) Huebner *et al.* (2007), (2) Sangwan *et al.* (2014), (3) Thitiratsakul and Anprung (2014), (4) Srisuvor *et al.* (2013)

2.6 फिल्मและสารเคลือบบริโภคได้ที่เติมพรีไบโอติกและ/หรือโพรไบโอติก

2.6.1 फिल्मและสารเคลือบบริโภคได้

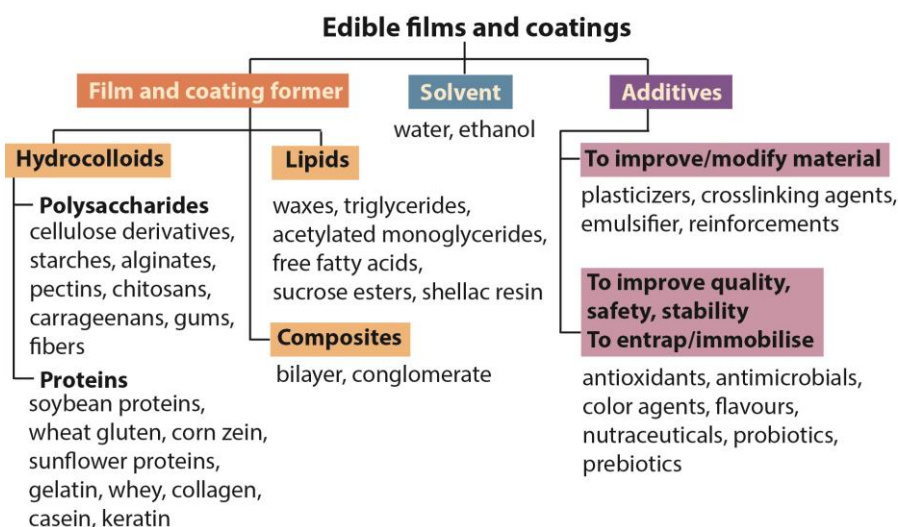
ฟิล์มบริโภคได้ (edible films) หมายถึง วัสดุที่เป็นแผ่นบางซึ่งสามารถบริโภคได้ สามารถนำมาวางบนอาหารหรือแทรกระหว่างชั้นอาหารได้ (McHugh, 2000) สารเคลือบบริโภคได้ (edible coatings) หมายถึง ชั้นบางที่สามารถบริโภคได้ซึ่งสามารถเคลือบบนผิวของผลิตภัณฑ์อาหารด้วยการจุ่ม การทา หรือการพ่น เป็นต้น (Suput *et al.*, 2015) เพื่อช่วยป้องกันอาหารจากสิ่งแวดล้อม สามารถทำหน้าที่ช่วยยืดอายุการเก็บและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื่องจากสามารถควบคุมการซึมผ่านของความชื้นและออกซิเจน และควบคุมการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) และลดการสูญเสียสารประกอบที่ระเหยได้และกลิ่นรส นอกจากนี้ฟิล์มบริโภคได้และสารเคลือบอาหารยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเสริมคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นอาหารเพื่อสุขภาพรวมถึงเซลล์โพรไบโอติกด้วยดังแสดงในภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 หน้าที่ของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้

ที่มา: Salgado *et al.* (2015)

ฟิล์มบริโภคได้อาจอยู่ในรูปแผ่นฟิล์ม (free-standing film) หรือเป็นสารเคลือบบนผิวอาหาร วัสดุที่มีสมบัติในการเกิดฟิล์มที่นิยมนำมาพัฒนาเป็นฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้มี 3 กลุ่ม คือ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และลิพิด (Dhanapal *et al.*, 2012; Suput *et al.*, 2015) ประเภทของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้แสดงในภาพที่ 2.13 วัสดุที่นำมาใช้ผลิตฟิล์มแตกต่างกันส่งผลให้ได้ฟิล์มที่มีสมบัติทางเคมีและกายภาพและสมบัติเชิงกลที่แตกต่างกันด้วย (Bourtoom, 2008)



ภาพที่ 2.13 ส่วนประกอบของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้

ที่มา: ดัดแปลงจาก Dhanapal *et al.* (2012), Salgado *et al.* (2015) และ Suput *et al.* (2015)

สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมนำมาใช้พัฒนาฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้ ได้แก่ เซลลูโลส อนุพันธ์ของสตาร์ช อนุพันธ์ของเพคติน สารสกัดจากสาหร่าย กัม ไคโตซาน เป็นต้น ธรรมชาติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความหลากหลายเชิงโครงสร้าง (ได้แก่ ชนิดของน้ำตาลที่เป็นมอนอเมอร์ ชนิดและรูปแบบของพันธะ รูปร่างของสายโซ่ และระดับการพอลิเมอไรเซชัน เป็นต้น) ล้วนมีอิทธิพลต่อสมบัติทางกายภาพของฟิล์มทั้งสิ้น การใช้สารประกอบในกลุ่มแมนแนนเพื่อพัฒนาฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้ยังคงพบได้น้อย โดยกลูโคแมนแนนของผงบุกถือเป็นสารประกอบในกลุ่มแมนแนนที่นิยมใช้ผลิตฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้มากที่สุด (Mikkonen, 2009) ข้อดีของการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาผลิตฟิล์มและสารเคลือบ คือ ได้ฟิล์มที่โปร่งใสหรือโปร่งแสง ไม่มีกลิ่นรส ไม่มีรสชาติ และไม่มีสี เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ฟิล์มที่ผลิตได้จึงมีสมบัติในการขวางกั้นการซึมผ่านของแก๊สและไอน้ำต่ำแต่ขัดขวางการซึมผ่านของลิพิดและน้ำมันได้ดี (Bourtoom, 2008; Dhanapal *et al.*, 2012) ตรงกันข้ามกับฟิล์มหรือสารเคลือบจากลิพิด (เช่น acetylated monoglycerides, ชีผึ้ง, พาราฟิน และสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น) ที่มีสมบัติในการขัดขวางการซึมผ่านของความชื้นจากอาหารเนื่องจากเป็นวัสดุที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Bourtoom, 2008)

2.6.2 แรงที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟิล์มและการขึ้นรูปฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้

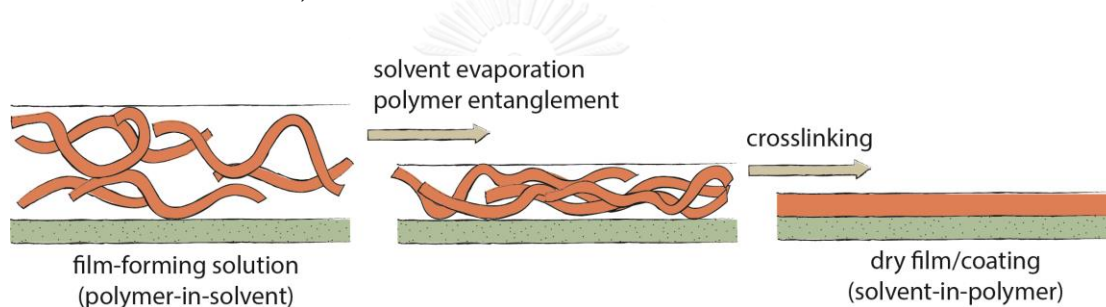
แรงที่เกี่ยวข้องกับการขึ้นรูปของฟิล์มประกอบด้วย แรงเชื่อมแน่น (cohesive force) ซึ่งเป็นแรงระหว่างโมเลกุลของวัสดุชนิดเดียวกันและแรงยึดติด (adhesive force) ซึ่งเป็นแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของวัสดุต่างชนิดกัน โดยการเชื่อมแน่น (cohesion) เป็นความสามารถของพื้นผิววัสดุ

เดียวกันที่จะยึดเหนี่ยวกันทำให้ด้านการแยกออกจากกัน เป็นตัวกำหนดสมบัติของฟิล์ม การเชื่อมแน่นจึงขึ้นอยู่กับโครงสร้างของพอลิเมอร์และการเข้ากันได้ของวัสดุสำหรับเตรียมฟิล์ม ฟิล์มที่มีความแข็งแรงเกิดจากการเชื่อมแน่นสูงซึ่งต้องมีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลและการรวมตัวกันของอนุภาคของวัสดุที่ใช้ผลิตฟิล์มสูง ยิ่งมีการเชื่อมแน่นของพอลิเมอร์สูงก็จะได้ฟิล์มที่มีความหนาแน่นสูง มีโครงสร้างรวมตัวกันแน่น ความสามารถในการซึมผ่านและความยืดหยุ่นลดลง ฟิล์มจะมีความเปราะมากขึ้น การเติมพลาสติกไซเซอร์ (เช่น ซอร์บิทอล กลีเซอรอล) จะลดการเชื่อมแน่นลงได้เนื่องจากไปลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของวัสดุที่ใช้ผลิตฟิล์ม จึงช่วยให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น (Felton, 2013) สำหรับแรงยึดติดเป็นแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มกับพื้นผิวสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ใช้ในการออกแบบการผลิตฟิล์มเนื่องจากแรงยึดติดเกี่ยวข้องกับการแผ่หรือเคลือบของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มบนพื้นผิวและความยากง่ายในการลอกแผ่นฟิล์มที่แห้งแล้วออกจากพื้นผิวที่ใช้ขึ้นรูป หากมีความแตกต่างของพลังงานพื้นผิว (surface energy) ระหว่างสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและวัสดุที่ใช้เป็นพื้นผิวสำหรับขึ้นรูปหรือเคลือบฟิล์มจะทำให้การยึดติดลดลง ทำให้การแผ่หรือเคลือบของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ หรือได้ฟิล์มที่ลอกหลุดออกจากพื้นผิวง่ายเมื่อใช้เป็นสารเคลือบ

การขึ้นรูปฟิล์มเป็นการเปลี่ยนพอลิเมอร์ซึ่งอยู่ในสถานะของเหลว (อาจเป็นพอลิเมอร์ที่หลอมเหลวหรือสารละลายพอลิเมอร์) ให้กลายเป็นฟิล์มซึ่งอยู่ในสถานะของแข็ง การเปลี่ยนแปลงเชิงเคมีและกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนนี้ล้วนส่งผลต่อสมบัติของฟิล์มที่ผลิตได้ทั้งสิ้น การขึ้นรูปฟิล์มมี 2 รูปแบบ คือ (1) การหล่อขึ้นรูป (casting) หรือกระบวนการแบบเปียก (wet process) โดยใช้สารละลายหรือสารแขวนลอยของพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มเทขึ้นรูปแล้วดึงตัวทำละลายออกภายหลัง และ (2) กระบวนการแบบแห้ง (dry process) เป็นการอัดรีดวัสดุสำหรับขึ้นรูปฟิล์มโดยอาศัยสมบัติเทอร์โมพลาสติกของพอลิเมอร์ภายใต้อุณหภูมิและแรงดันสูง สำหรับงานวิจัยนี้การขึ้นรูปฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของพวงบุกเป็นแบบการหล่อขึ้นรูป ตัวทำละลายที่ใช้คือ น้ำ ดังนั้นเมื่อระเหยออกในขั้นตอนการขึ้นรูปจึงไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม สำหรับการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบบริโภคได้ที่เติมโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติกใช้วิธีการขึ้นหล่อรูปหรือกระบวนการแบบเปียก (Espitia *et al.*, 2016; Kanmani and Lim, 2013; López de Lacey *et al.*, 2012b; Odila Pereira *et al.*, 2016; Piermaria *et al.*, 2015; Rattananin, 2011; Romano *et al.*, 2014; Soukoulis *et al.*, 2014a; Soukoulis *et al.*, 2014b; Tapia *et al.*, 2007)

การหล่อขึ้นรูปโดยทั่วไปเริ่มจากขั้นแรก คือ การละลายพอลิเมอร์มีสมบัติในการเกิดฟิล์มในตัวทำละลายที่เหมาะสม (solvation) เช่น น้ำ เอทานอล หรือตัวทำละลายอื่นๆ อาจมีการเติมสารประกอบอื่นเพิ่มเติมลงในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มที่เตรียมได้ เช่น พลาสติกไซเซอร์ น้ำมันหอมระเหย สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ กรดอินทรีย์ เอนไซม์ แบคทีริโอซิน เป็นต้น ในขั้นตอนนี้

แรงเชื่อมแน่นระหว่างโมเลกุลตัวถูกละลายหรือสายพอลิเมอร์จะถูกทำลาย พอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มที่มีความเป็นผลึก (crystallinity) สูงกว่าจะมีแรงเชื่อมแน่นระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์มาก การละลายจะเกิดขึ้นได้ยากกว่า จากนั้นเศษสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มบนพื้นผิวที่เรียบ กรณีของฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกวัสดุที่นิยมใช้สำหรับขึ้นรูปฟิล์มได้แก่ เทพลอน (Kurt and Kahyaoglu, 2014) อะคริลิก (Tripetch *et al.*, 2016) สเตนเลส (Wiset *et al.*, 2014) แก้ว (Xiao *et al.*, 2000a; Xiao *et al.*, 2000b) เป็นต้น จากนั้นทำให้แห้งภายใต้สภาวะที่กำหนดเพื่อให้ได้แผ่นฟิล์ม (free-standing films) หรือเคลือบแล้วเกิดเป็นฟิล์มบนผิวของอาหาร กรณีแรกฟิล์มเกิดจากตัวทำละลายระเหยออกจากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มแล้วเข้าสู่สภาวะเจล สุดท้ายกลายเป็นแผ่นฟิล์ม เกิดการสร้างแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลและพันธะไฮโดรเจนขึ้นใหม่ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกไป (Felton, 2013) ดังแสดงในภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.14 การเกิดฟิล์มจากพอลิเมอร์จากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tavassoli-Kafrani *et al.* (2016)

2.6.3 การเติมพรีไบโอติกและโพรไบโอติกในฟิล์มและสารเคลือบ

แม้จะมีการวิจัยและพัฒนาฟิล์มบรีโภาคได้และสารเคลือบบรีโภาคได้เพื่อเป็นบรรจุภัณฑ์และเป็นตัวกลางของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมานานแล้ว (Bourtoom, 2008; Dhanapal *et al.*, 2012) แต่งานวิจัยศึกษาการเสริมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกลงในฟิล์มและสารเคลือบบรีโภาคได้ยังคงมีอยู่น้อย การเติมโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติกเป็นนวัตกรรมที่ยังแปลกใหม่สำหรับวงการอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตามสภาพสังคมปัจจุบันที่ผู้คนสามารถเข้าถึงข่าวสารข้อมูลด้านสุขภาพและการแพทย์ได้ง่ายจึงทำให้ผู้คนหันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้น การพัฒนาและการประยุกต์ใช้ฟิล์มและสารเคลือบจากพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีโพรไบโอติกและพรีไบโอติกจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่แปลกใหม่ในยุคการแข่งขันทางการตลาดสูง นวัตกรรมนี้ยังช่วยควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารและช่วยเสริมคุณค่าทางสุขภาพให้อาหาร (Espitia *et al.*, 2016) สำหรับการเติมโพรไบโอติกลงในฟิล์มหรือสารเคลือบบรีโภาคได้ครั้งแรกคิดค้นโดย Tapia *et al.* (2007) ซึ่งเป็นการเติม *Bifidobacterium animalis*

subsp. *lactis* BB-12 ลงในสารเคลือบจากเจลแลน (gellan) และอัลจิเนต (alginate) เพื่อนำไปเคลือบแอปเปิ้ลและมะละกอสด (Tapia *et al.*, 2007) หลังจากนั้นมิงงานวิจัยอื่นที่พัฒนาฟิล์มหรือสารเคลือบบริโภคได้โดยมีโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติกเป็นส่วนประกอบและมีการทดลองประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ และขนมอบ ดังแสดงในตารางที่ 2.11



ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างการศึกษาฟิล์มที่เติมโปรไบโอติกและพรีไบโอติก

พอลิเมอร์ที่ใช้ในรูปแบบฟิล์ม	โปรไบโอติก	สารอื่นที่เติม	การประยุกต์ใช้	การขึ้นยั้งจุลินทรีย์อื่น	อ้างอิง*
อัลจิเนต (alginate) 2%(w/v) หรือเจลแลน (gellan) 0.5%(w/v)	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB-12	กลีเซอรอล (0.6 – 2.0%)	สารเคลือบบนผิวมะระกือ (<i>Carica papaya</i> L.) และผิวแอปเปิ้ล (<i>Malus domestica</i> Borkh)	> 6 log cycles CFU/g นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 2 °C	(1)
เคซีน (caseinate)	<i>L. sakei</i>	-	ฟิล์มบนเนื้อวัวสด	> 6 log cycles CFU/cm ² นาน 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	(2)
อัลจิเนต (alginate) 4%(w/v)/สตาร์ช(starch) 16%(w/v)	<i>Camobacterium maltaromaticum</i>	กลีเซอรอล 20%(w/v)	ฟิล์มบนแซลมอนรมควัน	> 7 log cycles CFU/cm ² นาน 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	(3)
เจลาติน (gelatin)	<i>L. acidophilus</i>	-	ฟิล์มและสารเคลือบบนปลาแฮด	> 8 log cycles CFU/g นาน 6 วัน ที่อุณหภูมิ 2 °C	(4)
เจลาติน (gelatin)	<i>B. bifidum</i> <i>L. rhamnosus</i> GG	กลีเซอรอล 1.6%(w/w) พรีไบโอติก: อินูลิน, พอลิเดกซ์โตรส, กลูโคโกลิโคแซ็กคาไรด์, เดกซ์ทรินข้าวสาลี	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	ระยะเวลาที่ทำให้โปรไบโอติกลดลง 1 log (อุณหภูมิ 4 °C): นาน 63 วัน สำหรับฟิล์มที่เติมกลูโคโกลิโคแซ็กคาไรด์ และ 100 วัน สำหรับฟิล์มที่เติมอินูลิน	(5)
วุ้น (agar)	<i>L. paracasei</i> <i>B. lactis</i>	สารสกัดจากชาเขียว	ฟิล์มบนเนื้อปลาแฮด	> 6 log cycles CFU/cm ² นาน 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	(6)
เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose)	<i>L. delbrueckii</i> <i>L. plantarum</i>	พรีไบโอติก: ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	ระยะเวลาที่ทำให้โปรไบโอติกลดลง 1 log (ความชื้นสัมพัทธ์ 11%, อุณหภูมิ 4 °C): <i>L. delbrueckii</i> นาน 45 วัน; <i>L. plantarum</i> นาน 90 วัน	(7)

* (1) Tapia et al. (2007), (2) Giatamas et al. (2010), (3) Concha-Meyer et al. (2011), (4) López de Lacey et al. (2012a), (5) Soukoulis et al. (2014a), (6) López de Lacey et al. (2014), (7) Romano et al. (2014)

ตารางที่ 2.11 ตัวอย่างการศึกษาฟิล์มที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (ต่อ)

พอลิเมอร์ที่ใช้ในรูปฟิล์ม	โพรไบโอติก	สารอื่นที่เติม	การประยุกต์ใช้	การมีชีวิต	การยับยั้งจุลินทรีย์อื่น	อ้างอิง*
พุลูลาน (pullulan)	<i>L. rhamnosus</i>	-	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์ม พุลูลาน/สตาร์ช (75:25): มีชีวิตสูงเกือบถึง 90% นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	-	(8)
พุลูลานผสมสตาร์ชมันฝรั่ง	<i>L. reuteri</i>	-	อาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์ม พุลูลาน/สตาร์ช (75:25): มีชีวิตสูงเกือบถึง 90% นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C	-	(9)
อัลจิเนต 1%(w/w)	<i>L. acidophilus</i>	กลีเซอรอล 50% ของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด	สารเคลือบขนมปัง	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด	-	(9)
อัลจิเนต 0.5%(w/w)ผสมโพรตีนเวย์ 2%(w/w)	<i>L. rhamnosus</i>	กลีเซอรอล 50% ของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด	สารเคลือบขนมปัง	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด	-	(9)
ไฮดรอกซีพริลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose)	<i>L. plantarum</i>	กลีเซอรอล	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มไฮเดียมเคซีเนท: > 10 ⁵ CFU/cm ² นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C	<i>L. innocua</i>	(10)
โพรตีนถั่ว (isolate pea protein)						
เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose)						
ไฮเดียมเคซีเนท (sodium caseinate)						
เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose)	<i>L. reuteri</i>	กลีเซอรอล	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มที่เติม <i>L. acidophilus</i> : > 10 ⁴ ในฟิล์มไฮเดียมเคซีเนท และ > 10 ³ CFU/cm ² นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C	<i>L. innocua</i>	(11)
ไฮเดียมเคซีเนท (sodium caseinate)	<i>L. plantarum</i>	กลีเซอรอล 10%(w/w)	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มที่เติม <i>L. plantarum</i> ลดน้อยกว่า 1.3 และ <i>K. marxianus</i> ลดน้อยกว่า 0.7 log cycles	-	(12)
คีฟิแรน (kefiran)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	กลีเซอรอล 10%(w/w)	ฟิล์ม, ไม่มีการประยุกต์ใช้ในอาหาร	การมีชีวิตสูงสุดในฟิล์มที่เติม <i>L. plantarum</i> ลดน้อยกว่า 1.3 และ <i>K. marxianus</i> ลดน้อยกว่า 0.7 log cycles	-	(12)
	CIDCA 8154					

* (8) Kanmani and Lim (2013), (9) Soukoulis et al. (2014b), (10) Sánchez-González et al. (2013), (11) Sánchez-González et al. (2014), (12) Piermaria et al. (2015)

2.6.4 สมบัติของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคน้ำได้เมื่อเติมโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติก

2.6.4.1 สมบัติของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบ

การเติมเซลล์โพรไบโอติกลงในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มอาจทำให้ค่า pH และความหนืดของสารละลายที่เตรียมได้ก่อนและหลังการเติมโพรไบโอเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ตัวอย่างการพัฒนาฟิล์มบริโภคน้ำได้จากพุลลูแลน/สตาร์ช เมื่อผสมโพรไบโอติกปริมาตร 1 mL ลงในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 100 mL ค่า pH ลดลงจาก 7.0 เป็น 6.0 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกรดที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกสร้าง นอกจากนี้เซลล์โพรไบโอติกยังส่งผลให้ความหนืดของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มยังลดลงด้วย จาก 3828 cP กลายเป็น 3568 cP (Kanmani and Lim, 2013) อย่างไรก็ตามบางกรณีการเติมเซลล์โพรไบโอติกก็ไม่ทำให้ค่า pH และความหนืดของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มเปลี่ยนไป (Piermaria *et al.*, 2015)

2.6.4.2 ความหนา

ความหนาของฟิล์มบริโภคน้ำได้และสารเคลือบเป็นสมบัติที่มีความสำคัญเนื่องจากความหนาที่มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อสมบัติทางชีววิทยาและอายุการเก็บของอาหารที่เคลือบฟิล์ม ส่งผลต่อสมบัติเชิงกายภาพ ได้แก่ ความโปร่งแสง อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ รวมทั้งสมบัติเชิงกลของฟิล์มด้วย ดังนั้นในกรณีของการทำสารเคลือบผิวอาหาร ประสิทธิภาพในการปกป้องอาหารขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์มที่เคลือบบนผิวหน้าของอาหารซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีผลความหนาของฟิล์ม ความหนาของฟิล์มที่เคลือบบนผิวอาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ สมบัติทางกายภาพของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม (เช่น ความหนาแน่น ความหนืด แรงตึงผิว เป็นต้น) วิธีการในการเคลือบ (เช่น การพ่น การทา การจุ่ม เป็นต้น) สูตรของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม และปริมาณของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มที่ใช้ต่อพื้นที่การขึ้นรูปฟิล์มด้วย การเติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกอาจทำให้ความหนาเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เปลี่ยนแปลงก็ได้ บางงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเติมโพรไบโอติกลงในฟิล์มไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนาของฟิล์ม นอกจากนี้การเก็บรักษาฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลต (whey protein isolate) ทั้งแบบที่มีและไม่มีโพรไบโอติกเป็นเวลานาน 60 วัน ไม่มีผลให้ความหนาของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปทั้งกรณีของฟิล์มที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (23 °C) และฟิล์มที่เก็บในอุณหภูมิแช่เย็น (4 °C) (Odila Pereira *et al.*, 2016)

2.6.4.3 สมบัติเชิงกล

เป็นพฤติกรรมของฟิล์มที่แสดงออกเมื่อมีแรงจากภายนอกมากระทำ มักแสดงในรูปของพารามิเตอร์ ได้แก่ ความต้านทานแรงดึง (tensile strength) การยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) และมอดุลัสของยัง (Young's modulus) ซึ่งค่าเหล่านี้คำนวณได้จากกราฟความเครียดและความเค้นตามวิธีของ American Society for Testing and Materials (ASTM) การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบภายในสูตรฟิล์ม เช่น เซลล์จุลินทรีย์ โปรไบโอติก อาจส่งผลให้ค่าของพารามิเตอร์เหล่านี้เปลี่ยนแปลงได้ ค่าความต้านทานแรงดึง คือ ความสามารถในการรับแรงที่อยู่ในลักษณะการดึง (tensile) โดยแนวแรงนั้นตั้งฉากกับพื้นที่หน้าตัดของฟิล์ม ทำให้ฟิล์มออกแรงต้านเพื่อไม่ให้ฟิล์มขาดออกจากกัน การเติมโปรไบโอติกทำให้สมบัติเชิงกลของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไป ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลต (whey protein isolate) ที่เติมเซลล์โปรไบโอติก *B. animalis* BB-12 และ *L. casei*-01 มีค่าความต้านทานแรงดึงต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมโปรไบโอติก (Odila Pereira *et al.*, 2016) การลดลงของค่าความต้านทานแรงดึงพบได้เช่นเดียวกันในฟิล์มพุลลูแลนผสมสตาร์ช (ค่าลดลงจาก 15.2 MPa เป็น 3.76 MPa) และฟิล์มคีเฟอแรนที่เติมโปรไบโอติก (ค่าลดลงมากที่สุดจาก 14.4 MPa เป็น 8.2 MPa) (Kanmani and Lim, 2013; Piermaria *et al.*, 2015) แต่ในบางกรณีการเติมโปรไบโอติกไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความต้านทานแรงดึง (Gialamas *et al.*, 2010) ค่าการยืดตัวถึงจุดขาด คือ ความยาวของฟิล์มที่เพิ่มขึ้น ณ จุดที่ฟิล์มถูกยืดจนขาด ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความยืดหยุ่นของฟิล์ม พบว่าการเติมโปรไบโอติกในฟิล์มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าเปอร์เซ็นต์การยืดตัวถึงจุดขาด พบได้ในกรณีที่เติมโปรไบโอติก *B. animalis* BB-12 และ *L. casei*-01 ในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลต (Odila Pereira *et al.*, 2016) ในขณะที่การพัฒนาฟิล์มบางชนิดเมื่อเติมเซลล์โปรไบโอติกแล้วไม่มีความแตกต่างของค่าการยืดตัวถึงจุดขาดเมื่อเทียบกับฟิล์มควบคุม เช่น ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลต (Sánchez-González *et al.*, 2013; Soukoulis *et al.*, 2014a)

2.6.4.4 สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability หรือ WVP)

สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเป็นปริมาณของไอน้ำที่ถ่ายโอนผ่านฟิล์มในช่วงเวลาหนึ่ง เป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ สัมประสิทธิ์การละลาย, ความทนทานของฟิล์ม (integrity), ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity), อัตราการแพร่ (diffusion rate), สัดส่วนของฟิล์มที่เป็นผลึกและอสัณฐาน, ความหนา, ความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ (polymeric chain mobility) และอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างพอลิเมอร์ ในการเปรียบเทียบค่าสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำระหว่างฟิล์มต่างชนิดต้องพิจารณาถึงความแตกต่างกันของสภาวะ เช่น พลาสติกไซเซอร์ที่ใช้, อุณหภูมิ, ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของ

ฟิล์มที่มีส่วนประกอบอื่นเพิ่มไปจากสูตรเดิมจะเปลี่ยนแปลงไปโดยขึ้นอยู่กับธรรมชาติทางเคมีของส่วนประกอบเหล่านั้น สารประกอบที่ชอบน้ำหรือมีขี้จะทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าสูงขึ้น การเติมโพรไบโอติกลงในฟิล์มทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มลดลง (Kanmani and Lim, 2013; Sánchez-González *et al.*, 2013) เช่น ฟิล์มพอลิแลนมีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเท่ากับ $0.724 \pm 0.012 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ แต่เมื่อเติมเซลล์แล้วมีค่าลดลงเป็น $0.485 \pm 0.016 \text{ g mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ เนื่องจากเซลล์โพรไบโอติกถูกกักไว้ในฟิล์มในรูปของอนุภาคและอาจไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของพอลิเมอร์ในโครงสร้างฟิล์ม (Kanmani and Lim, 2013)

2.6.4.5 สีและความโปร่งแสง

สีและความโปร่งแสงเป็นสิ่งที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าและมีผลต่อลักษณะปรากฏของอาหารซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการยอมรับฟิล์มหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารเคลือบโครงสร้างภายในและพื้นผิวของฟิล์มเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสีและความโปร่งแสง ในกรณีของการเคลือบฟิล์มบนพื้นผิวของอาหาร ความเข้มของแสงที่สะท้อนออกมาจากอาหารที่มีฟิล์มเคลือบขึ้นอยู่กับแสงที่สะท้อนจากผิวของอาหารโดยตรง (specular reflection) และขึ้นอยู่กับแสงที่ถูกคายออกมากสู่ภายนอกฟิล์มในทุกทิศทางหลังจากที่แสงได้ผ่านไปยังชั้นของสารเคลือบและมีการกระเจิงของแสงภายในชั้นเคลือบ (indirect reflection)

การเติมสารเพิ่มลงในสูตรฟิล์มเดิมมีผลต่อสีและความโปร่งแสงของฟิล์ม กรณีของการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกเซลล์จุลินทรีย์จะขวางการเดินทางของแสงผ่านแผ่นฟิล์มส่งผลให้ฟิล์มที่เตรียมได้มีความโปร่งแสงลดลง การเติมพอลิเมอร์บางชนิดทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงลดลง เช่น ฟิล์มพอลิแลนที่เติมสตาร์ชจะมีความโปร่งแสงลดลง และค่าความโปร่งแสงจะลดลงมากขึ้นตามสัดส่วนของสตาร์ชที่เพิ่มมากขึ้น (Kanmani and Lim, 2013) กรณีของการเติมโพรไบโอติกพบว่าเซลล์ที่เติมลงในฟิล์มทำให้ฟิล์มที่เตรียมได้มีความขุ่นกว่าฟิล์มควบคุม แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญ (Kanmani and Lim, 2013; Soukoulis *et al.*, 2014a) งานวิจัยหลายงานพบว่า การเติมโพรไบโอติกทำให้สีของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปจากฟิล์มที่ไม่เติมโพรไบโอติกแต่ความแตกต่างนี้ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าของมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถแยกความต่างของสีสองสีออกได้หากมีค่าความแตกต่างของสี (color difference) น้อยกว่า 3 (Soukoulis *et al.*, 2014a; Soukoulis *et al.*, 2014b)

2.6.4.6 ความสามารถในการละลายน้ำ

ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มหรือสารเคลือบขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของวัสดุที่ใช้เตรียมฟิล์มซึ่งสมบัตินี้เป็นตัวกำหนดความเสถียรของฟิล์มในน้ำ ความสามารถในการละลายสูง

หมายถึงฟิล์มมีความเสถียรต่ำเมื่ออยู่ในน้ำ เป็นหนึ่งในสมบัติที่กำหนดการประยุกต์ใช้ฟิล์มหรือสารเคลือบบริโภคได้ หากต้องการนำไปห่อหรือเคลือบอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น ผักผลไม้ตัดแต่ง ฟิล์มที่จะนำไปประยุกต์ได้กับอาหารกลุ่มนี้ต้องมีความสามารถต้านทานการละลายในน้ำได้ดี ความมีขั้ว (polarity) ของฟิล์มมีผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโดยฟิล์มที่มีขั้วสูงกว่าดึงน้ำเข้ามาละลายได้ดีและทำให้เกิดการละลายได้สูง การละลายน้ำมีความเกี่ยวข้องกับการแตกตัวของหมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอกซิลในโครงสร้างฟิล์ม การแพร่ของน้ำ การทำลายไฮโดรเจนและพันธะไอออนิก นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับความชื้น (moisture content) ในฟิล์มหรือสารเคลือบด้วย หากฟิล์มหรือสารเคลือบมีความชื้นสูงก็จะมีสามารถในการละลายน้ำได้สูง

ความสามารถในการละลายน้ำของพอลิเมอร์ที่นำมาใช้เตรียมฟิล์มแต่ละชนิดให้ฟิล์มที่มีสมบัติในการละลายน้ำแตกต่างกัน เช่น ฟิล์มอัลจินเตมมีความสามารถในการละลายน้ำในช่วง 74-79%, ฟิล์มเจลแลนมีความสามารถในการละลายน้ำ 47-59% (Tapia *et al.*, 2007) ฟิล์มกลูโคแมนแนนมีความสามารถในการละลายน้ำในช่วง 51.01-92.98% (Kurt and Kahyaoglu, 2014; Wiset *et al.*, 2014), ฟิล์มกัมจากถั่วโลคัสต์มีความสามารถในการละลายน้ำ 57.87% (Kurt and Kahyaoglu, 2014), ฟิล์มกัวร์กัมมีความสามารถในการละลายน้ำ 75.94% (Kurt and Kahyaoglu, 2014)

2.6.4.7 โครงสร้างของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้

ในการศึกษาโครงสร้างฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้ที่มีการเติมโพรไบโอติกและสารอื่นลงในฟิล์ม สามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของฟิล์มโดยดูอันตรกิริยาระหว่างองค์ประกอบต่างๆภายในแผ่นฟิล์มหรือสารเคลือบโดยใช้เทคนิค fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy ผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการเติมเซลล์ลงในฟิล์มไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างฟิล์มระดับโมเลกุล (Odila Pereira *et al.*, 2016) สิ่งที่พบเหมือนกันในฟิล์มที่เติมและไม่เติมโพรไบโอติกคือ การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ ของพันธะ glycosidic ของพอลิเมอร์ที่ใช้ขึ้นรูปฟิล์ม (เมทิลเซลลูโลส) และพีโรไบโอติก (ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์) พีคที่ปรากฏเฉพาะกรณีที่โพรไบโอติกถูกตรึงอยู่ในแผ่นฟิล์ม คือ พีคการดูดกลืนแสงโดยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จากโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย, พีคการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1651 และ 1547 cm^{-1} เกิดจาก amide I และ II จากโปรตีน และพีคจากการดูดกลืนแสงของพันธะ P-O-P ในดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid หรือ DNA) (Romano *et al.*, 2014)

สำหรับการศึกษาภาพโครงสร้างภายในของฟิล์มจากภาคตัดขวางและภาพของพื้นผิวฟิล์มที่เติมโพรไบโอติกนิยมศึกษาด้วยเทคนิค scanning electron microscopy (SEM) โดยใช้กล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การตรึงโปรตีนโอบิตไว้ในฟิล์มไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สันฐานของจุลินทรีย์และโครงสร้างของฟิล์ม มีเพียงเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ภายในแผ่นฟิล์มซึ่งสามารถมองเห็นเซลล์ได้จากภาคตัดขวางของฟิล์ม (Odila Pereira *et al.*, 2016; Romano *et al.*, 2014; Soukoulis *et al.*, 2014a) ส่วนการเติมพรีไบโอติกมีผลต่อโครงสร้างของฟิล์ม จากการทดลองเตรียมฟิล์มเจลาตินเสริมโปรไบโอติกแบบที่มีพรีไบโอติกและไม่มีพรีไบโอติก ฟิล์มจะมีโครงสร้างที่แน่นและเรียบขึ้นเมื่อเติมพรีไบโอติก โดยมีสมมติฐานว่าอาจเป็นเพราะโมเลกุลพรีไบโอติก เช่น อินูลิน พอลิเดกซ์โตรส เดกซ์ทรินจากข้าวสาลี และกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์จะไปเติมเต็มบริเวณผิวขรุขระหรือ รูพรุน (Soukoulis *et al.*, 2014a)

2.6.5 เสถียรภาพของจุลินทรีย์ในฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้ระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มและการเก็บรักษา

การมีชีวิตของจุลินทรีย์ในฟิล์มและสารเคลือบเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มและระหว่างการเก็บรักษาเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตฟิล์มบริโภคได้หรือสารเคลือบที่จะใช้เป็นตัวพาโปรไบโอติกไปยังผู้บริโภค เป็นข้อมูลที่ใช้ในการพิจารณาเพื่อกำหนดการประยุกต์ใช้ฟิล์มในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้สอดคล้องกันกับอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร กำหนดสถานะการเก็บรักษาและระยะเวลาการเก็บของฟิล์ม โดยพิจารณาควบคู่กับเกณฑ์ทั่วไปที่กำหนดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตขั้นต่ำที่ควรมีในผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมโปรไบโอติกเพื่อให้เพียงพอต่อการส่งผลเชิงสุขภาพต่อผู้บริโภค

กระบวนการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบที่เติมโปรไบโอติกเกี่ยวข้องกับการทำแห้งเพื่อเปลี่ยนสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มในสถานะของเหลวให้กลายเป็นแผ่นฟิล์มหรือสารเคลือบที่แห้งติดบนผิวของผลิตภัณฑ์อาหารโดยระเหยตัวทำละลายออก อาจเป็นการทำแห้งโดยทิ้งสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (Kanmani and Lim, 2013; Odila Pereira *et al.*, 2016) หรือใช้ความร้อนเพื่อทำให้แห้ง (Soukoulis *et al.*, 2014b) ซึ่งเป็นการทำแห้งด้วยการพาด้วยอากาศ (air convective drying) ในการขึ้นรูปฟิล์มเพื่อเตรียมฟิล์มเจลาตินและฟิล์มเจลาตินที่เติมพรีไบโอติกที่เติมเซลล์โปรไบโอติก *L. rhamnosus* GG ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 ชั่วโมง พบว่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสูญเสียไปในระหว่างการทำแห้งไม่ถึง 1 log cycle ซึ่งถือว่ามีความต่ำเนื่องจากใช้อุณหภูมิในการทำแห้งไม่สูงมาก (Soukoulis *et al.*, 2014a) จุลินทรีย์ที่มีชีวิตบางส่วนซึ่งสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มแบบใช้ความร้อนเกิดขึ้นจากอิทธิพลของปัจจัยทั้งภายในเซลล์จุลินทรีย์และภายนอกจากสิ่งแวดล้อม เช่น ความสามารถของจุลินทรีย์ที่สามารถปรับตัวและความสามารถในการทนต่อความเครียดจากความร้อน, ความเครียดจากออสโมติกและความเครียดทางกล ความเสียหายของโครงสร้างเซลล์ สภาวะที่ใช้ในการทำแห้ง ส่วนประกอบและโครงสร้างของสารที่อยู่ในสารละลาย

สำหรับชั้นรูปฟิล์ม การเติมสารกลุ่มที่ช่วยป้องกันความร้อน (thermoprotectant) (Dong *et al.*, 2013; Fu and Chen, 2011) กรณีของการเติมพรีไบโอติกในสารละลายสำหรับชั้นรูปฟิล์ม งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าฟิล์มเจลาตินที่เติมกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์และพอลิเดกซ์โตรสช่วยป้องกันเซลล์โพโรไบโอติกในระหว่างการทำแห้งได้ โดยช่วยให้มีการรอดชีวิตสูงถึง 60.68% และ 26.36% ของปริมาณจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* GG ที่มีชีวิต ซึ่งมีความมากกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นฟิล์มเจลาตินสูตรปกติ ในขณะที่การเติมเดกซ์ทรินจากข้าวสาลีและอินูลินกลับให้ผลตรงข้าม ทำให้การรอดชีวิตของจุลินทรีย์หลังจากการขึ้นรูปฟิล์มต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (Soukoulis *et al.*, 2014a) สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงไว้ในฟิล์มมีผลต่อการรอดชีวิตที่ต่างกันด้วย จากการทดลองเติมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพื่อศึกษาศักยภาพของพรีไบโอติกในการปกป้องเซลล์ระหว่างการขึ้นรูปฟิล์ม พบว่า *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 ให้การตอบสนองต่อฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เติมในสารละลายสำหรับชั้นรูปฟิล์มที่ความเข้มข้น 1-5% (w/v) ยังมีความเข้มข้นของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงขึ้นการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ชนิดนี้ที่สูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่การเติมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้ผลป้องกันใดๆ หากเป็น *L. plantarum* CIDCA 83114 (Romano *et al.*, 2014)

หลังจากผ่านการขึ้นรูปฟิล์มแล้ว การมีชีวิตของจุลินทรีย์ยังเป็นตัวแปรสำคัญที่ต้องติดตามในระหว่างการศึกษาการเก็บรักษาฟิล์มหรือสารเคลือบที่อยู่บนผลิตภัณฑ์อาหาร ปัจจัยภายนอก เช่น ค่า water activity (a_w), อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา และปริมาณออกซิเจน ล้วนมีอิทธิพลต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในฟิล์มหรือสารเคลือบทั้งสิ้น (Soukoulis *et al.*, 2014a)

โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ศึกษาการเก็บรักษาฟิล์มและสารเคลือบมีสองกลุ่มคือ อุณหภูมิแช่เย็น (2-5 °C) และอุณหภูมิห้อง (25-27 °C) การเก็บรักษาฟิล์มที่อุณหภูมิแช่เย็นช่วยเพิ่มเสถียรภาพของจุลินทรีย์ในฟิล์มได้พบว่าอัตราการลดจำนวนจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อเก็บรักษาฟิล์มไว้ที่อุณหภูมิที่เย็นกว่า (Odila Pereira *et al.*, 2016; Soukoulis *et al.*, 2014a) การศึกษาฟิล์มบริโกลด์ได้จากพุลลูแลน (pullulan) และฟิล์มพุลลูแลนที่ผสมสตาร์ชจากมันฝรั่ง มันสำปะหลัง และข้าวโพด โดยเติมโพโรไบโอติกสามชนิด *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, และ *L. acidophilus* DSM 20079 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น $12.9 \log \text{CFU mL}^{-1}$ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 25 และ 4 °C พบว่าฟิล์มพุลลูแลนที่ไม่ผสมสตาร์ชมีค่าการรอดชีวิตของโพโรไบโอติกสูงถึง 80% หลังจากเก็บรักษานาน 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และลดลงถึง 35% หลังจากเก็บไว้นาน 20 วัน และหากเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น (4 °C) พบว่าช่วยให้จุลินทรีย์มีชีวิตคงอยู่ในฟิล์มพุลลูแลนได้ยาวนานกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยหลังจากเก็บรักษานาน 20 วัน ยังคงมีการรอดชีวิตของโพโรไบโอติกสูงกว่า 80% (Kanmani and Lim, 2013)

องค์ประกอบสูตรของฟิล์ม ได้แก่ พอลิเมอร์ที่ใช้ควบคุมกันน้ำในกรณีที่เป็นฟิล์มจากพอลิเมอร์มากกว่าหนึ่งชนิด พรีไบโอติก สารดักจับอนุมูลอิสระ เป็นต้น ล้วนมีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์

ทั้งในระหว่างการทำแห้ง (หรือการขึ้นรูปฟิล์ม) และระหว่างการเก็บรักษา (Dong *et al.*, 2013) ในพัฒนาฟิล์มพอลิแลนและฟิล์มพอลิแลนผสมสตาร์ชที่เติมโพรไบโอติก พบว่าการเติมสตาร์ชลงในฟิล์มส่งผลให้การมีชีวิตของจุลินทรีย์ลดลงและยังพบว่าสูตรที่มีเฉพาะสตาร์ช (ไม่ผสมพอลิแลน) จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหลังจากเก็บรักษานาน 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ลดลงเหลือประมาณ 20-25% ของจำนวนเริ่มต้นเท่านั้น (Kanmani and Lim, 2013) กรณีของการเติมโพรไบโอติกในฟิล์มบริโอคได้ มีรายงานว่า การเติมโพรไบโอติกสามารถช่วยยืดอายุการเก็บของฟิล์มเจลาตินที่เติม *L. rhamnosus* GG ได้ โดยพบว่าอินูลินช่วยให้อัตราการลดจำนวนโพรไบโอติกในฟิล์มมีค่าน้อยมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโพรไบโอติกชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นการเติมกลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ในฟิล์มเจลาตินที่ทำให้โพรไบโอติกที่มีชีวิตลดจำนวนลงในอัตราที่เร็วกว่าฟิล์มควบคุมซึ่งเป็นฟิล์มเจลาตินที่ไม่เติมโพรไบโอติก (Soukoulis *et al.*, 2014a)

2.7 การประยุกต์ใช้ฟิล์มที่เติมโพรไบโอติกและ/หรือโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

ฟิล์มหรือสารเคลือบบริโอคได้ที่เติมโพรไบโอติกและ/หรือโพรไบโอติกเป็นนวัตกรรมที่ยังใหม่สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร จากตารางที่ 2.11 จะเห็นว่างานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการพัฒนาฟิล์มแล้วศึกษาสมบัติของฟิล์มและศึกษาอายุการเก็บของฟิล์ม หากเปรียบเทียบกับ การขยายตัวของตลาดอาหารเพื่อสุขภาพที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆแล้วปริมาณงานวิจัยที่มีการทดลองนำฟิล์มหรือสารเคลือบที่เติมโพรไบโอติกและโพรไบโอติกไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมีจำนวนค่อนข้างน้อย

2.8 สรุป

เมื่อพิจารณาจากสมบัติของกลูโคแมนแนนของผงบุกหลายประการที่กล่าวมา (ทั้งสมบัติในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มโปร่งแสงได้ สมบัติของฟิล์มในการกักเก็บสาร มีความปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหาร ไม่มีสีและรส แคลอรีต่ำ มีประโยชน์เชิงสุขภาพ และสมบัติทางเคมีของกลูโคแมนแนนที่ไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์) ข้อจำกัดของการเสริมโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร ประกอบกับตลาดของอาหารเพื่อสุขภาพเสริมโพรไบโอติกและโพรไบโอติกซึ่งกำลังขยายตัว และปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาผลิตฟิล์มบริโอคได้ที่มีสมบัติขึ้นโพรไบโอติกจากพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดนี้ กลูโคแมนแนนของผงบุกจึงมีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกลางของโพรไบโอติกและโพรไบโอติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหาร และทำหน้าที่เป็นอาหารให้กับทั้งโพรไบโอติกที่ถูกตรึงไว้ในแผ่นฟิล์มและโพรไบโอติกประจำถิ่นภายในลำไส้

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ อุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 วัตถุดิบ

รายการ	ที่มา
Oligomate [®] 55N	Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd., Japan ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก บริษัท เคมพ์ออยท์ จำกัด (ประเทศไทย)
Orafti [®] P95, Orafti [®] HSI และ Orafti [®] GR	Beneo GmbH, Germany ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากบริษัท ดีพีโอ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด (ประเทศไทย)
กลูโคแมนแนนของผงบุก (น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-2000 kDa)	Yunnan Gengyun Konjac Resources Developing Co. Ltd., People's Republic of China
D (+)-glucose anhydrous แป้งสาลีโปรตีนสูง	Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia ตราหงส์ขาว, บริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน) (ประเทศไทย)
น้ำตาลทรายละลายเร็ว	ตราลิน, บริษัท ไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม จำกัด (ประเทศไทย)
เกลือบริโกลเสริมไอโอดีน	ตราปรุngthipy, บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด (ประเทศไทย)
แพ็คโก้ 3	บริษัท ซี.เจ.แพทเตอร์สัน (ประเทศสหรัฐอเมริกา)
เนยสดชนิดจืด	ตราอลาวรี, บริษัท เคซีจี คอร์ปอเรชั่น จำกัด (ประเทศไทย)
ยีสต์สำเร็จรูป	ตราเพอร์เฟค, บริษัท เกรทฮิลล์ จำกัด (ประเทศไทย)

3.1.2 จุลินทรีย์

รายการ	ที่มา
<i>Lactobacillus paracasei</i> (FD-DVS)	Danisco [®] , DuPont Nutrition & Health, USA
<i>Lactobacillus casei</i> -01 (FD-DVS) และ <i>Bifidobacterium animalis</i> BB-12 (FD-DVS)	Chr Hansen, Horsholm, Denmark
<i>Escherichia coli</i> TISTR 073 และ <i>Escherichia coli</i> TISTR 074	ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหารและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3 อุปกรณ์

รายการ	ที่มา
Anaerobic chamber ขนาด 2.5 L	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
AnaeroGen [®] สำหรับ anaerobic chamber ขนาด 2.5 L	Thermo Scientific, USA
Anaerobic indicator	Thermo Scientific, USA
UV-Visible spectrophotometer	Thermo Spectronic, GENESYS 10UV, Rochester, New York, USA
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง	Sartorius, BA4100S, Bradford, Germany
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Scaltec Instrument GmbH, SBC 31, Goettingen, Germany
เข็มฉีดยาปราศจากเชื้อแบบไม่มีเข็ม	Nipro Co., Ltd., Phra Nokhon Si Ayutthaya, Thailand

3.1.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

รายการ	ที่มา
แผ่นกรองปราศจากเชื้อ (Puradisc™ 25mm, pore size = 0.22 µm)	Whatman®, UK
Parafilm®	Bemis Flexible Packaging, Wisconsin, USA
refrigerated centrifuge	Hermle, Z36HK, Merck, Germany
autoclave	Autoclave SX-700, Tomy Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan
ตู้บ่มเชื้อ	Heraeus, model D-63450, Heraeus Group, Hanau, Germany
ตู้ฆ่าเชื้อด้วยแสง UV Bioultra 4 (55-08227)	Telstar technologies, Terrassa, Spain
ตู้แช่เยือกแข็ง Sanyo MIR-153	Sanyo, Sakata Oizumi-Machi, Japan
ตู้เย็น Sanyo SF-C95,	Sanyo, Tokyo, Japan
เครื่องผสมของเหลวแบบเขย่า (vortex mixer) Genie2, G-560E	Genie2, G-560E, USA
เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette)	Pipetman®, Starter-kit, Gilson Co., Ltd., Middletown, USA
กระดาษกรอง หมายเลข 4 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 90mm)	Whatman®, UK
เครื่องกวน (magnetic stirrer)	OkWell, Progress Technical Co., Ltd., Thailand
ถาดอะคริลิก ขนาด 5 cm x 10 cm	
ตู้อบลมร้อน Binder ED/FD	Binder GmbH, Tuttlingen, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง Rotanta 460R Benchtop Centrifuge	Hettich, Massachusettes, USA
ขวดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 250 mL	Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, USA
ดิจิตอลไมโครมิเตอร์ (Absolute Digimatic Thickness Gauge)	Mitutoyo Co., Ltd., Japan
เครื่องปั๊มสุญญากาศ	Gast Manufacturing Inc., Michigan, USA

3.1.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

รายการ	ที่มา
เครื่องเยาะ Innova™ 2000	New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, USA
เครื่อง chroma meter CR-400	Minolta Co., Ltd., Japan
เครื่อง Instron® 5560 Series Table Model Testing System	Instron, USA
Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM-EDS 7610F)	JEOL, Japan
Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer (PerkinElmer-Spectrum One)	PerkinElmer, USA
เตาอบอาหารรุ่น PL-6 Infrared food oven	บริษัท กล้วยน้ำไท เทรตติ้ง กรุ๊ป จำกัด, ประเทศไทย
เครื่องผสมอาหาร รุ่น OF5K5SSWH	KitchenAid, Cambridgeshire, UK

3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

รายการ	ที่มา
De Man Rogosa Sharpe (MRS) broth	Difco™, USA
De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar	Difco™, USA
Tryptic soy broth (TSB)	Difco™, USA
Tryptic soy agar (TSA)	Difco™, USA
L-Cysteine hydrochloride monohydrate	Himedia®, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India
Bacteriological peptone	BD Biosciences, Singapore
Sodium chloride (NaCl)	Carlo Erba Reagents SAS, Val de Reuil, France
Magnesium sulphate pentahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia

3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

รายการ

Thiamine-HCl
 Disodium phosphate (Na_2HPO_4)
 (anhydrous)
 Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)
 Ammonium chloride (NH_4Cl)
 Calcium chloride (CaCl_2)

ที่มา

Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia

3.2 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.2.1 จุลินทรีย์และการเก็บรักษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นจุลินทรีย์ทางการค้าทั้งหมด ประกอบด้วย *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*-01 และ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 นำจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปของเกล็ดแห้ง (freeze dried) มาเพาะเลี้ยงในหลอดบรรจุอาหารเหลว Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe broth (Lactobacilli MRS broth) ปริมาตร 10 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ในบรรยากาศปกติ (ยกเว้น *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ที่ต้องเติม cysteine HCl ในอาหารเหลว MRS ที่ความเข้มข้น 0.05% (w/v) แล้วบ่มใน anaerobic jar ขนาด 2.5L ที่มีของ AnaeroGen® สำหรับปริมาตร 2.5 L และ anaerobic indicator) แล้วเตรียมจุลินทรีย์สำหรับเก็บรักษาด้วยวิธีแช่เยือกแข็งโดยเติมกลีเซอรอลที่ปราศจากเชื้อ 30% ลงในหลอดอาหาร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วแบ่งบรรจุในหลอดขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1.0 mL ต่อหลอด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25 °C จนกว่าจะใช้งาน

จุลินทรีย์ *E. coli* ทั้งสามสายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 10 mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้ว streak บนอาหาร tryptic soy agar (TSA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

สำหรับวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมดแสดงในภาคผนวก ข

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติก

3.2.2.1 การเตรียมจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงโพรไบโอติกที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เยือกแข็งในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้ววัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm เทียบกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาคผนวก ค4 เพื่อประเมินจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นสำหรับการทดลอง ปรับให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 8 log CFU/mL ด้วยการเจือจางในอาหาร MRS broth ที่ปราศจากเชื้อ

สำหรับ *E. coli* ทั้งสามสายพันธุ์ที่เก็บรักษาด้วยวิธีแช่เย็น นำมา streak ลงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศปกติ นาน 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยโคลนเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหาร TSB 10 mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1% (v/v) จากอาหาร TSB ลงในหลอดอาหาร M9 minimal medium ปริมาตร 10 mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง วัดค่า OD เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาคผนวก ค4 เพื่อประเมินจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นสำหรับการทดลอง ปรับให้มีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นที่ 8 logCFU/mL ด้วยการเจือจางในอาหาร TSB broth ที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำจุลินทรีย์ *E. coli* ทั้งสามสายพันธุ์มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 เรียกว่า enteric mixture

3.2.2.2 การประเมินค่า prebiotic activity score

การประเมินค่า prebiotic activity score ทำตามวิธีการของ Huebner *et al.* (2007) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS และ M9 หลอดละ 10 mL ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบทั้ง 6 ชนิด ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% (w/v) โดยคิดจากน้ำหนักของกลูโคสหรือน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Huebner *et al.*, 2007; Srisuvor *et al.*, 2013; Thitiratsakul and Anprung, 2014) เพื่อประเมินศักยภาพของคู่พรีไบโอติกและโพรไบโอติกของผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกทางการค้าโดยตรง เนื่องจากในงานวิจัยนี้เมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสูตรฟิล์มจะใช้พรีไบโอติกในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ทางการค้าโดยตรงโดยไม่นำไปทำบริสุทธิ์ก่อน ซึ่งวิธีการทำก็สอดคล้องกันกับวิธีของงานวิจัยที่ศึกษาโดย (Huebner *et al.*, 2007; Srisuvor *et al.*, 2013; Thitiratsakul and Anprung, 2014) ทั้งนี้หากงานวิจัยในอนาคตต้องการหาคู่พรีไบโอติกที่บริสุทธิ์กับโพรไบโอติกก็สามารถนำผลิตภัณฑ์ทางการค้าทุกชนิดไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อนและคัดเลือกคู่พรีไบโอติกและโพรไบโอติก ชับเสตรตที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วยกลูโคส, Orafti[®] P95, Orafti[®] HIS, Orafti[®] GR, Oligomate 55 และ KGM แล้วเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกปริมาตร 0.1 mL หรือ 1% (v/v) ลงในหลอดอาหาร MRS และจุลินทรีย์ M9 ปริมาตร 10 mL สำหรับการทดสอบที่เตรียมไว้

ข้างต้น โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น $6.0 \log \text{CFU/mL}$ ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยการทำ serial dilution และใช้เทคนิค pour plate จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic condition) แล้วนับจำนวนจุลินทรีย์ คำนวณค่า prebiotic activity score (de Vos *et al.*) จากสมการที่ 3.1

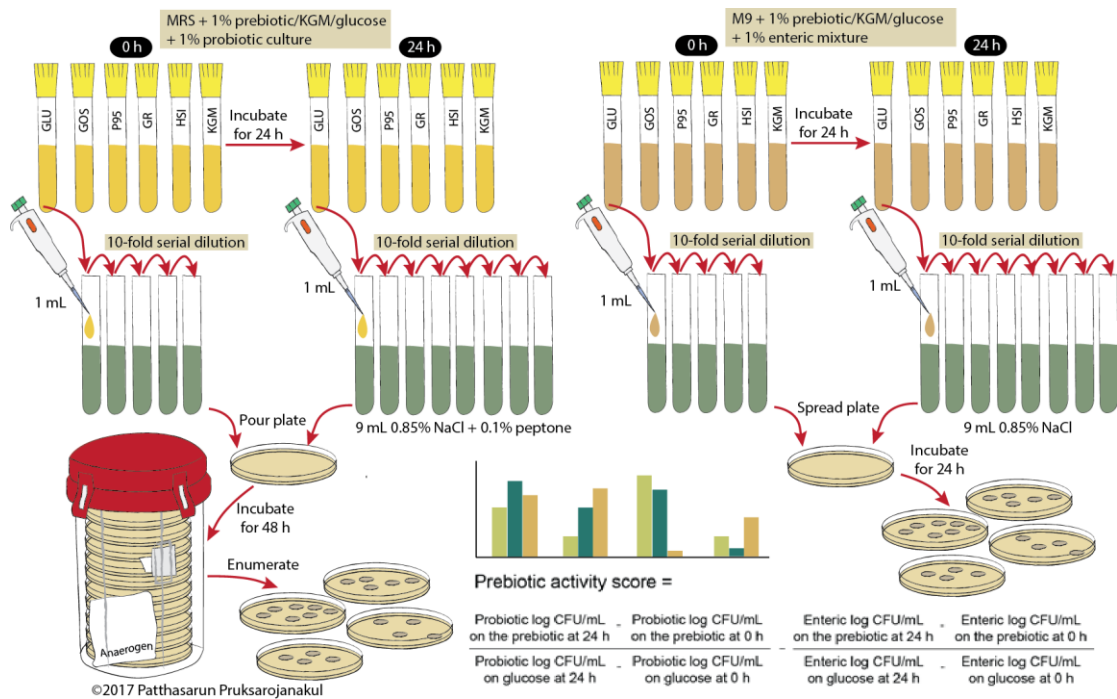
$$\text{PAS} = \left(\frac{\log P_x^{24} - \log P_x^0}{\log P_g^{24} - \log P_g^0} \right) - \left(\frac{\log E_x^{24} - \log E_x^0}{\log E_g^{24} - \log E_g^0} \right) \quad (3.1)$$

โดย P_x และ P_g เป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์โพรไบโอติก (CFU/mL) ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบชนิดต่างๆ และอาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส ตามลำดับ

E_x and E_g เป็นค่าความหนาแน่นของเซลล์ enteric mixture (CFU/mL) ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบชนิดต่างๆ และอาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส ตามลำดับ

ตัวเลขที่เป็นอักษรยก (superscript number) แสดงจุดเวลาที่เพาะเลี้ยงคือ ที่ 0 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง

นำข้อมูล prebiotic activity score ที่คำนวณได้ มาสร้างกราฟแท่ง โดยมีแกนตั้งเป็นค่า prebiotic activity score และแกนนอนเป็นชนิดคาร์โบไฮเดรตทดสอบ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการทดลองเป็นแบบแฟคทอเรียล (factorial design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ General Linear Model (GLM) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$) คัดเลือกคูโพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่มีค่า prebiotic activity score สูงที่สุดเพื่อใช้พัฒนาฟิล์มบริโภาคได้ที่มีสมบัติเป็นซินไบโอติกต่อไป สรุปขั้นตอนการทดสอบได้ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติกด้วยการคำนวณค่า Probiotic activity score

3.2.3 การพัฒนาฟิล์มบริโภาคได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกทางการค้า

3.2.3.1 การพัฒนาฟิล์ม

เตรียมเซลล์โพรไบโอติกตามวิธีดัดแปลงจากงานวิจัยของ Odila Pereira *et al.* (2016) เลี้ยงโพรไบโอติกที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.2 โดยปีเปตจุลินทรีย์โพรไบโอติก 1% (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 mL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เทจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงได้ลงในขวดปั่นเหวี่ยงปราศจากเชื้อ (sterile centrifuge bottle) แยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ 3200xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้น 0.85% (w/v)

เตรียมสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 100 mL ตามวิธีของ Tripetch *et al.* (2016) กรณีที่มีการเติมพรีไบโอติกให้เติมพรีไบโอติกที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.2 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเท่ากับ 1% (w/v) แล้วเติมโพรไบโอติกให้ได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ในสารละลายขึ้นรูปฟิล์มสุดท้ายเท่ากับ 9.0 logCFU/mL (ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นที่อ้างอิงจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (López de Lacey *et al.*, 2012b; Odila Pereira *et al.*, 2016; Romano *et al.*, 2014) และจากการทดลองเบื้องต้นทำให้ทราบว่า การเตรียมสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 100 mL ที่มี

ค่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับที่ระบุไว้ ต้องใช้เซลล์โพรไบโอติกที่แยกจากคัลเจอร์ปริมาตรประมาณ 100 - 150 mL แล้วเทสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม (film forming solution หรือ FFS) ปริมาตร 20 mL บนภาชนะครีติกที่มีพื้นที่ 50 cm² (5 cm x 10 cm) แล้วอบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 16 ชั่วโมง เมื่อฟิล์มแห้งแล้วลอกแผ่นฟิล์มเก็บในตู้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 55 ± 2% ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.3.2 การตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม

เพื่อเปรียบเทียบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกหลังจากผ่านการขึ้นรูปฟิล์มในข้อ 3.2.3.1 โดยวิเคราะห์ตามวิธีการดังนี้

ก่อนขึ้นรูปฟิล์ม ปิเปตตัวอย่างจากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มที่เตรียมได้ปริมาตร 1 mL เพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี serial dilution และเทคนิค pour plate ในอาหารแข็ง MRS ตามวิธีของ Romano และคณะ (2014)

หลังขึ้นรูปฟิล์ม ตัดแผ่นฟิล์มตัวอย่างพื้นที่ 2.5 cm² (เทียบเท่ากับสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 1 mL) นำมาละลายในสารละลาย 0.85% NaCl + 0.1% peptone ปริมาตร 10 mL จากนั้นนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี serial dilution และเทคนิค pour plate บนอาหารแข็ง MRS

ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณโพรไบโอติกที่มีชีวิตก่อนและหลังการขึ้นรูปฟิล์ม รายงานเป็นค่า log CFU/mL FFS และคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$) แล้วคัดเลือกสูตรฟิล์มที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงและมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นฟิล์มซินไบโอติกเพื่อนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป

3.2.4 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม

นำฟิล์มที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงและมีความเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นฟิล์มซินไบโอติกที่คัดเลือกจากข้อที่ 3.2.3.2 มาวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก จ ประกอบด้วย ความหนา สี ความโปร่งแสง ความต้านทานแรงดึงขาด การยืดตัวถึงจุดขาด สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ ความสามารถในการละลายน้ำ ลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวาง และ Fourier transform infrared (FT-IR) spectra

3.2.5 ตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในฟิล์มกุกโคแมนระหว่างการเก็บรักษา

ตรวจวัดการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในฟิล์มระหว่างการเก็บรักษาในรูปแบบแผ่นที่อุณหภูมิห้องนาน 8 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Soukoulis *et al.* (2014b) โดยนำฟิล์มขนาด 50 cm^2 (เทียบเท่ากับสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ปริมาตร 20 mL) ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85% (w/v) ที่มีเปปโทน 0.1% (w/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่เตรียมได้ไปเจือจางแบบ serial dilution และนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค pour plate โดยใช้อาหารแข็ง MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง คำนวณจำนวนจุลินทรีย์และรายงานผลในหน่วย log CFU/g ฟิล์ม

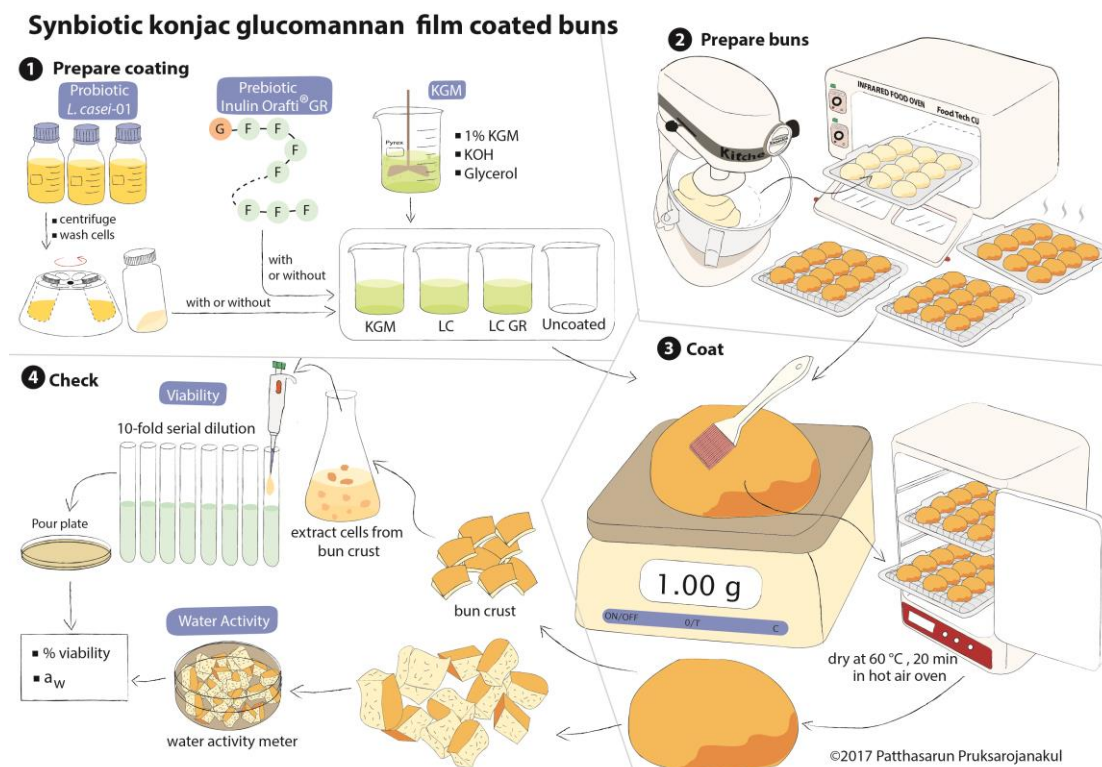
3.2.6 การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับขนมปัง

3.2.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับเคลือบขนมปัง

เตรียมสารละลายสำหรับเคลือบขนมปังตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.3.1 แต่เติมเซลล์โพรไบโอติกให้ได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ในสารละลายขึ้นรูปฟิล์มสุดท้ายประมาณ $10 \log \text{CFU/mL}$

3.2.6.2 การเตรียมขนมปังเคลือบฟิล์ม

เตรียมขนมปังตามสูตรพื้นฐานตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Soukoulis *et al.* (2014b) โดยซึ่งส่วนประกอบดังนิตตาม % (w/w) ของแป้งสาลี แป้งสาลี (100%), น้ำ (62%), เกลือ (1.5%), ซูโครส (5%), ยีสต์ผงสำเร็จรูป (2%), เนยชนิดจืด (3%), แป้งโกโก้ (0.5%) ผสมให้เข้ากันแล้วใช้เครื่องผสมเพื่อผสมและนวดโดนาน 10 นาที วางโดในภาชนะที่คลุมด้วยผ้าขาวบางที่ขึ้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งโดขยายตัวขึ้นเป็น 2 เท่า ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งโดให้มีขนาด 50 g ต่อชิ้น ทำให้เป็นทรงกลมแล้ววางบนถาดอะลูมิเนียม นำเข้าเตาอบอาหารอินฟราเรดที่อุณหภูมิ 180 °C อบนาน 15 นาที ยกออกจากเตาอบแล้วพักให้เย็นลงบนตะแกรง ใช้แปรงซิลิโคนทาสารละลายฟิล์มเคลือบผิวขนมปังปริมาณ $1.00 \pm 0.07 \text{ g}$ ต่อชิ้น แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 25 นาที หลังจากอบแล้วปล่อยให้ขนมปังเย็นลงบนตะแกรง ซึ่งน้ำหนักของขนมปังที่เตรียมได้ แล้วบรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงด้วยความร้อน เก็บขนมปังที่อุณหภูมิห้องในตู้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 55% ขั้นตอนการนำฟิล์มบริโภาคได้ที่มีสมบัติขึ้นโอบิติกไปใช้ในขนมปังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนนำฟิล์มบริโภาคได้ที่มีสมบัติซินไบโอติกจากกลูโคแมนแนนของผงบุกไปใช้ในขนมปัง

3.2.6.3 ศึกษาการรอดชีวิตโพรไบโอติกในฟิล์มเคลือบขนมปังระหว่างการเก็บรักษา

การตรวจจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม โดยละลายสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ที่มีเปปโตน เข้มข้น 0.1% (w/v) ปริมาตร 9 mL แล้วผสมให้เข้ากัน สำหรับการตรวจวัดการรอดชีวิตโพรไบโอติกในฟิล์มที่เคลือบขนมปังระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 5 และ 7 ตามวิธีของ Soukoulis *et al.* (2014) (Soukoulis *et al.*, 2014b) ที่มีการเปลี่ยนแปลงวิธีเล็กน้อย โดยนำผิวขนมปังที่มีฟิล์มเคลือบใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85% (w/v) ที่มีเปปโตน 0.1% (w/v) ปริมาตร 90 mL แล้วละลายด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายไปเจือจางแบบ serial dilution และนับจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค pour plate โดยใช้อาหารแข็ง MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง คำนวณจำนวนจุลินทรีย์และรายงานผลในหน่วย log CFU/ชิ้น

เก็บข้อมูลสีของผิวขนมปังที่เคลือบด้วยสารละลายฟิล์มสูตรต่างๆเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นผิวขนมปังที่ไม่ได้เคลือบด้วยฟิล์มในวันที่ 0 และเก็บข้อมูล water activity (a_w) ของขนมปังโดยใช้ water activity meter และประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคเบื้องต้นต่อลักษณะปรากฏ

และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ 9-point hedonic scale มีบุคคลร่วมทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนจำนวน 14 คน



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถในการใช้พรีไบโอติกของโพรไบโอติก

การวิจัยขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกคู่โพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตฟิล์มที่มีสมบัติซินไบโอติกต่อไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ศักยภาพการเป็นพรีไบโอติกของคาร์โบไฮเดรตเพื่อทดสอบการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์เชิงปริมาณ โดยนำมาเปรียบเทียบและคัดเลือกคู่โพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตฟิล์มที่มีสมบัติซินไบโอติก ในงานวิจัยนี้ใช้การเปรียบเทียบค่า prebiotic activity score โดยตรวจสอบการใช้พรีไบโอติกทางการค้าและกลูโคแมนแนนจากผงบุกของจุลินทรีย์โพรไบโอติก เปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์โดยทั่วไป และเปรียบเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ enteric mixture ด้วยการติดตามการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จากค่าความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารทดสอบที่เวลา 0 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณค่า prebiotic activity score

เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของโพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์และจุลินทรีย์ enteric mixture หลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) ซึ่งโพรไบโอติกและ enteric mixture อยู่ในภาวะเจริญระยะ stationary phase ของกราฟการเจริญ (ตัวอย่างกราฟแสดงในภาคผนวก ก) ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีจำนวนสูงที่สุดและนำมาเปรียบเทียบการเจริญระหว่างกันได้พบว่าโพรไบโอติกมีอัตราการเจริญมากกว่าจุลินทรีย์ enteric mixture จำนวนเซลล์เริ่มต้นของโพรไบโอติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.31 \pm 0.16 \log \text{CFU/mL}$ หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมงโพรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนได้จนมีความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ย $9.35 \pm 0.19 \log \text{CFU/mL}$ หรือกล่าวได้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ $3.04 \pm 0.20 \log \text{CFU/mL}$ สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมงในอาหารทดสอบแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $6.60 \pm 0.07 \log \text{CFU/mL}$ แล้วเพิ่มจำนวนได้จนมีความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเหลวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $8.52 \pm 0.26 \log \text{CFU/mL}$ มีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์ enteric mixture เฉลี่ยเท่ากับ $1.92 \pm 0.26 \log \text{CFU/mL}$ หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (log CFU/mL) ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ

คาร์โบไฮเดรตทดสอบ	ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (log CFU/mL)			
	<i>L. casei</i> -01	<i>L. paracasei</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Enteric mixture
0 ชั่วโมง				
1% กลูโคส	6.33 ± 0.13	6.22 ± 0.17	6.42 ± 0.16	6.68 ± 0.02
1% Konjac glucomannan (KGM)	6.26 ± 0.26	6.15 ± 0.14	6.44 ± 0.13	6.54 ± 0.05
1% Orafti [®] HSI (HSI)	6.28 ± 0.15	6.20 ± 0.20	6.40 ± 0.17	6.57 ± 0.06
1% Orafti [®] P95 (P95)	6.35 ± 0.14	6.25 ± 0.22	6.40 ± 0.15	6.56 ± 0.02
1% Orafti [®] GR (GR)	6.49 ± 0.22	6.27 ± 0.14	6.35 ± 0.07	6.66 ± 0.11
1% Oligomate [®] 55N (GOS)	6.26 ± 0.14	6.21 ± 0.15	6.37 ± 0.11	6.61 ± 0.04
24 ชั่วโมง				
1% กลูโคส	9.36 ± 0.09	9.35 ± 0.07	9.36 ± 0.08	8.72 ± 0.21
1% Konjac glucomannan (KGM)	9.33 ± 0.13	9.40 ± 0.08	9.35 ± 0.11	8.28 ± 0.14
1% Orafti [®] HSI (HSI)	9.40 ± 0.12	9.32 ± 0.10	9.15 ± 0.34	8.43 ± 0.11
1% Orafti [®] P95 (P95)	9.65 ± 0.13	9.30 ± 0.06	9.20 ± 0.12	8.76 ± 0.19
1% Orafti [®] GR (GR)	9.70 ± 0.15	9.18 ± 0.04	9.14 ± 0.01	8.24 ± 0.10
1% Oligomate [®] 55N (GOS)	9.60 ± 0.13	9.27 ± 0.07	9.29 ± 0.09	8.70 ± 0.15

ตารางที่ 4.2 ปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (log CFU/mL) ในอาหารเหลวที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ

คาร์โบไฮเดรตทดสอบ	ปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (log CFU/mL)		
	<i>L. casei</i> -01	<i>L. paracasei</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12
1% กลูโคส	3.04 ± 0.07 ^{Ab}	3.14 ± 0.10 ^{Aab}	2.94 ± 0.10 ^A
1% Konjac glucomannan (KGM)	3.06 ± 0.12 ^{ABbb}	3.25 ± 0.07 ^{Aa}	2.92 ± 0.20 ^B
1% Oraffi [®] HSI (HSI)	3.12 ± 0.17 ^{Aab}	3.12 ± 0.10 ^{Aab}	2.75 ± 0.19 ^B
1% Oraffi [®] P95 (P95)	3.30 ± 0.03 ^{Aa}	3.04 ± 0.15 ^{Bab}	2.80 ± 0.06 ^B
1% Oraffi [®] GR (GR)	3.21 ± 0.07 ^{Aab}	2.92 ± 0.10 ^{Bb}	2.79 ± 0.06 ^B
1% Oligomate [®] 55N (GOS)	3.33 ± 0.17 ^{Aa}	3.06 ± 0.09 ^{Bab}	2.92 ± 0.04 ^B
Enteric mixture			2.04 ± 0.19 ^{Bab}
			1.74 ± 0.14 ^{Cc}
			1.86 ± 0.15 ^{Cbc}
			2.21 ± 0.21 ^{Ca}
			1.58 ± 0.14 ^{Cc}
			2.09 ± 0.15 ^{Cab}

a-c อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ ความหนาแน่นเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารที่เติมคาร์โบไฮเดรตต่างชนิดกันมี

ความแตกต่างกันในแนบคที่เรียงสายพันธุ์เดียวกัน ($p < 0.05$)

A-C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความหนาแน่นเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารที่มีโปรไบโอติกต่างสายพันธุ์กันมีความแตกต่างกันภายในอาหารชนิดเดียวกัน ($p < 0.05$)

ข้อมูลความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าฟรีไบโอติกทางการค้า ทั้ง 3 ชนิดและกลูโคแมนแนนของผงบุกมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกได้ เทียบเท่ากับกลูโคส และในบางกรณีให้ผลดีกว่ากลูโคสดังสองตัวอย่างต่อไปนี้ ตัวอย่างแรก Oligomate[®] 55N ที่ทำให้ *L. casei*-01 มีจำนวนเพิ่มขึ้น $3.33 \pm 0.17 \log \text{CFU/mL}$ อีกตัวอย่างคือ กลูโคแมนแนนของผงบุกที่ทำให้ความหนาแน่นของ *L. paracasei* เพิ่มขึ้นเท่ากับ $3.25 \pm 0.07 \log \text{CFU/mL}$ ซึ่งความสามารถของคาร์โบไฮเดรตทดสอบในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกได้ดี เทียบเท่าหรือดีกว่ากลูโคสเป็นหนึ่งในสมบัติที่ฟรีไบโอติกต้องมี จุลินทรีย์โดยทั่วไปสามารถใช้กลูโคส เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญได้เนื่องจากมีเอนไซม์แต่สำหรับฟรีไบโอติกนั้นมีเฉพาะโพรไบโอติก เท่านั้นที่สามารถหมักเพื่อใช้เป็นพลังงานจากฟรีไบโอติกในการเจริญได้

เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์โพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงแยกตามสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ปรากฏว่ามี 2 สายพันธุ์ที่ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มขึ้นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ได้แก่ *L. casei*-01 และ *L. paracasei* ในขณะที่สายพันธุ์ *B. animalis* subsp. *lactis*-BB12 ไม่ให้ผลการเจริญที่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคส

เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์โพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงแยกตามชนิดคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงในอาหารเหลว MRS (ตารางที่ 4.2) พบว่า *L. casei* มีความสามารถในการใช้ฟรีไบโอติกทางการค้าได้ดีหลายชนิด เห็นได้จากการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้สูงกว่า *L. paracasei* และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมคาร์โบไฮเดรตทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นอาหารเหลวที่เติมอินูลิน (Orafti[®] HSI) ที่ส่งเสริมการเจริญของ *L. casei*-01 และ *L. paracasei* ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยช่วยให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ $3.12 \pm 0.17 \log \text{CFU/mL}$ และ $3.12 \pm 0.10 \log \text{CFU/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากรณีของอาหารเหลวที่เติมกลูโคแมนแนนจากผงบุกสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. paracasei* ได้ดีกว่า *L. casei*-01 โดยทำให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ $3.25 \pm 0.07 \log \text{CFU/mL}$ และ $3.06 \pm 0.12 \log \text{CFU/mL}$ ตามลำดับ ($p < 0.05$)

ผลการเจริญของโพรไบโอติกที่กล่าวมาข้างต้นสนับสนุนงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกมีกลไกในการนำฟรีไบโอติกเข้าสู่เซลล์และมียื่นสร้างเอนไซม์สำหรับใช้ในแคแทบอลิซึมของฟรีไบโอติก (Andersen *et al.*, 2017; Pokusaeva *et al.*, 2011; Saulnier *et al.*, 2007; Thongaram *et al.*, 2017) ความแตกต่างกันทั้งในแง่ของชนิดฟรีไบโอติกและความสามารถในการใช้ฟรีไบโอติกของโพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์อาจมาจากการมีระบบการใช้และควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้คาร์โบไฮเดรตในรูปแบบเฉพาะของเซลล์แต่ละสาย

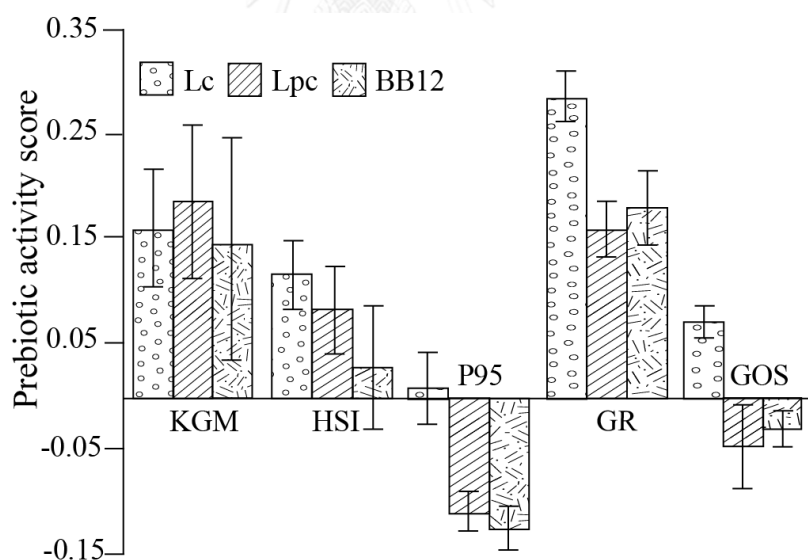
พันธ์ุ Thongaram *et al.* (2017) พบว่ากาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นพรีไบโอติกที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* spp. (lactogenic prebiotics) และ *Bifidobacterium* spp. (bifidogenic prebiotics) แต่การใช้กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับสายพันธ์ุ

นอกจากนี้การศึกษากลไกการขนส่งและเมแทบอลิซึมของพรีไบโอติกในระดับเซลล์และโมเลกุลก็ยืนยันเช่นเดียวกัน (Andersen *et al.*, 2017) โดยพบว่า *L. acidophilus* NCFM มีการแสดงออกมากขึ้น (up-regulation) ของยีนสร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ใน phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system (PTS) เพื่อขนส่งไดแซ็กคาไรด์ ยีนสร้าง galactoside-pentoside-hexuronide permeases (GPH) กับ ATP-binding cassette (ABC) transporter เพื่อขนส่งโอลิโกแซ็กคาไรด์ และยีนสร้างเอนไซม์ glycoside hydrolase (GH) หลายชนิดเพื่อทำงานร่วมกับโปรตีนขนส่งพรีไบโอติกเข้าสู่เซลล์ เช่น GH1, GH2, GH4, GH13, GH32, GH36, GH42 และ GH65 ในขณะที่ *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04 มีระบบที่แตกต่างไป โดยใช้ major facilitator superfamily (MFS) permeases และ GPH สำหรับการขนส่งไดแซ็กคาไรด์ ส่วน ABC transporter ทำหน้าที่หลักในการขนส่งโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้าสู่เซลล์ โดยโปรตีนขนส่งเหล่านี้ทำงานร่วมกับ GH หลายกลุ่ม ได้แก่ 1, 2, 13, 36, 42, 43 และ 77 โดย GH2 และ GH42 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งใช้ในเมแทบอลิซึมกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และ GH32 เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในเมแทบอลิซึมของฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Andersen *et al.*, 2017) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าพรีไบโอติกทั้งสามสายพันธ์ุที่ใช้ในการทดลองนี้มียีนสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้พรีไบโอติกทางการค้าที่ใช้ทดสอบ

สำหรับข้อมูลการเจริญของจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกลูโคสให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.04 ± 0.19 log CFU/mL ซึ่งมีค่าน้อยกว่าความหนาแน่นของเซลล์พรีไบโอติกที่เพิ่มขึ้นในอาหารทุกชนิด ($p < 0.05$) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งได้รายงานว่าความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรีย enteric mixture มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.94 ± 0.11 log CFU/mL ในอาหาร M9 ที่เติมกลูโคส ผลการวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับสายพันธ์ุ จุลินทรีย์ enteric bacteria อาจมีความสามารถในการใช้กลูโคสได้ต่ำกว่าพรีไบโอติกบางชนิด หรือพรีไบโอติกบางชนิดอาจใช้กลูโคสเพื่อการเจริญได้ไม่ดีเท่า enteric bacteria นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าความหนาแน่นของเซลล์ enteric mixture ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร M9 ที่เติมอินูลิน Orafti[®] GR, อินูลิน Orafti[®] HSI และกลูโคแมนแนนของผงบุก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.58 ± 0.14 log CFU/mL, 1.86 ± 0.15 log CFU/mL และ 1.74 ± 0.14 log CFU/mL ตามลำดับ มีค่าน้อยกว่าการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารที่เติมกลูโคส แสดงว่าพรีไบโอติกสามชนิดนี้มีความจำเพาะต่อ

โพรไบโอติกมากกว่าคาร์โบไฮเดรตทดสอบชนิดอื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ความจำเพาะแสดงถึงสมบัติของโพรไบโอติกที่ไม่สามารถเกิดการหมักได้โดยจุลินทรีย์อื่นซึ่งเป็นอีกหนึ่งสมบัติที่โพรไบโอติกต้องมี

ดังนั้น ศักยภาพของโพรไบโอติกจึงไม่สามารถพิจารณาได้จากข้อมูลความสามารถของคาร์โบไฮเดรตทดสอบแต่ละชนิดในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว แต่จะต้องพิจารณาข้อมูลการเจริญของ enteric mixture ซึ่งเป็นข้อมูลแสดงความจำเพาะควบคู่ไปด้วย ความเป็นไปได้ที่คาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งจะมีศักยภาพในการเป็นโพรไบโอติกสูงเมื่อคาร์โบไฮเดรตนั้นช่วยให้โพรไบโอติกเจริญได้ดีกว่ากลูโคสและไม่สามารถถูกนำไปใช้ในการเจริญได้ดีเท่ากลูโคสโดยจุลินทรีย์ enteric mixture งานวิจัยนี้จึงใช้ค่า prebiotic activity score ซึ่งใช้ข้อมูลทั้งสองด้านพิจารณาร่วมกัน วิธีนี้สะดวกและใช้เวลาน้อย สามารถเปรียบเทียบสมบัติการเป็นโพรไบโอติกโดยผ่านการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในโพรไบโอติกเทียบกับในกลูโคสและเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ enteric mixture ในโพรไบโอติกและกลูโคสผ่านการทดลอง *in vitro* โดยไม่จำเป็นต้องตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์ผ่านตัวอย่างกากอาหารในลำไส้ ทำให้ทราบสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของสารทดสอบและนำไปใช้กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ต้องการได้อย่างรวดเร็วเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสมบัติซินไบโอติก (Huebner *et al.*, 2007)



ภาพที่ 4.1 Prebiotic activity score ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ

จากค่า prebiotic activity score ของโพรไบโอติกและโพรไบโอติกทั้งหมดที่แสดงในภาพที่ 4.1 และตารางที่ ก5.1 (ภาคผนวก ก5) แสดงให้เห็นว่าค่าของ prebiotic activity score ของคาร์โบไฮเดรตทดสอบแต่ละชนิดที่คำนวณได้ทั้งหมดมีความผันแปรแตกต่างกัน และยังคงแสดงให้เห็นว่า

โพรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้พรีไบโอติกมากกว่าหนึ่งชนิด เนื่องจากความสามารถในการใช้พรีไบโอติกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ แม้เป็นจุลินทรีย์สปีชีส์เดียวกัน เพราะเลี้ยงในอาหารที่เสริมพรีไบโอติกชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็ให้ค่า prebiotic activity score ที่แตกต่างกันด้วย (Huebner *et al.*, 2007) ส่วนค่า prebiotic activity score ของ *L. casei*-01 และ *L. paracasei* แตกต่างกันนั้นเนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* spp. มีเมแทบอลิซึมหลากหลายแม้จะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มเดียวกันหรือสปีชีส์เดียวกันก็ตามซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากระบบขนส่งและไฮโดรไลซิสของพรีไบโอติกที่ต่างกันเนื่องมาจากยีนที่เกี่ยวข้องที่อาจปรากฏหรือไม่ปรากฏในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในตอนต้น

สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าคู่ของโพรไบโอติก *L. casei* กับพรีไบโอติก Orafti® GR เป็นคู่ซินไบโอติกที่มีศักยภาพสูงที่สุด และพรีไบโอติกทดสอบทุกชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. casei*-01 ได้อย่างจำเพาะด้วย โดยค่าเฉลี่ย prebiotic activity score ของคู่ *L. casei* กับ Orafti® GR มีค่าเท่ากับ 0.29 ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดและแตกต่างจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากคู่โพรไบโอติกและพรีไบโอติกอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีค่าสูงเกือบสองเท่าของกลุ่ม prebiotic activity score ที่มีอันดับรองลงมาเป็นที่สอง ได้แก่ คู่ของ *L. casei* กับกลูโคแมนแนนของผงบุก, *L. paracasei* กับกลูโคแมนแนนของผงบุก, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 กับกลูโคแมนแนนของผงบุก, *L. casei* กับ Orafti® HSI, *L. paracasei* กับ Orafti® GR และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 กับ Orafti® GR (0.16, 0.18, 0.14, 0.12, 0.16, 0.18 ตามลำดับ) และยังพบว่าโพรไบโอติกทางการค้าทุกชนิดรวมทั้งกลูโคแมนแนนจากผงบุกที่ใช้ในการทดสอบให้ค่า prebiotic activity score เป็นบวกทั้งหมดเมื่อเข้าคู่กับ *L. casei*-01 แสดงว่าโพรไบโอติกชนิดนี้สามารถใช้พรีไบโอติกได้หลายชนิดรวมทั้งกลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งเป็นพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์ม

งานวิจัยนี้ยังพบว่ากลูโคแมนแนนของผงบุกมีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกต่อโพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์ เนื่องจากให้ค่า prebiotic activity score ที่เป็นบวกและจัดอยู่ในกลุ่มคู่โพรไบโอติก-พรีไบโอติกที่ให้ค่าสูงเป็นอันดับสอง โดยเมื่อจับคู่กับ *L. casei*-01, *L. paracasei* และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ให้ค่า prebiotic activity score เท่ากับ 0.16, 0.18 และ 0.14 ตามลำดับ ให้ผลสนับสนุนงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่ากลูโคแมนแนนของผงบุกมีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก จากโครงสร้างของกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เป็น β -mannan (Behera and Ray, 2016a) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่มีแคแทบอลิซึมที่ช่วยให้สามารถย่อยพอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มนี้ได้ เช่น *Bifidobacterium* spp. โดยการทำงานของเอนไซม์ β -mannanases ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม glycoside hydrolase (GH) families 5, 26 และ 113 งานวิจัยของ Morrill *et al.* (2015) พบ GH5 mannanase (*BMan5_8*) ใน

B. animalis subsp. *lactis* BL-04 ซึ่ง conserved ในสายพันธุ์จุลินทรีย์ในกลุ่ม *B. animalis* subsp. *lactis* จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการทดลองนี้ซึ่งประกอบด้วย *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. casei*-01 และ *L. paracasei* สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยกลูโคแมนแนนได้เช่นเดียวกับกับ *B. animalis* subsp. *lactis* BL-04

โพรไบโอติก-โพรไบโอติกที่ให้ค่า prebiotic activity score ที่เป็นลบ พบในกรณีของการจับคู่ระหว่างโพรไบโอติก *L. paracasei* หรือ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 กับโพรไบโอติก Orafiti® P95 หรือ Oligomate® 55N ค่า prebiotic activity score ที่มีค่าน้อยหรือติดลบเนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ทดสอบเจริญได้ดีน้อยกว่าในอาหารที่เติมโพรไบโอติกทุกเมื่อเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารที่เติมกลูโคส หรือจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการเจริญได้น้อยกว่าในอาหารที่เติมโพรไบโอติกเมื่อเทียบกับการเจริญของจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารที่เติมโพรไบโอติก กรณีที่ enteric mixture สามารถเจริญในอาหารที่เติม Oligomate® 55N และ Orafiti® P95 ซึ่งเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์จากผลิตภัณฑ์ทางการค้าได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ของโอลิโกแซ็กคาไรด์เท่ากับ 55% และ 93.2% ส่วนที่เหลือมีน้ำตาลชนิดอื่นที่เจือปนอยู่ เช่น กลูโคส แลคโตส ซูโครส ซึ่งถูกหมักได้โดย enteric mixture และนำไปใช้ในการเจริญได้

อย่างไรก็ตามค่า prebiotic activity score ที่คำนวณตามวิธีการของ Huebner *et al.* (2007) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้และงานวิจัยอื่นๆ (Sangwan *et al.*, 2014; Srisuvor *et al.*, 2013; Thitiratsakul and Anprung, 2014) เป็นค่าที่คำนวณได้จากการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและ enteric mixture ที่เพาะเลี้ยงแยกกันในหลอดทดลอง สภาวะเช่นนี้มีความแตกต่างจากสภาวะภายในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ที่มีจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเจริญร่วมกันซึ่งอาจมีการยับยั้งการเจริญของ enteric mixture เนื่องจากระหว่างการหมักโพรไบโอติกโดยโพรไบโอติก จะเกิดการสร้างกรดอินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งกรดแลคติก Ahn *et al.* (2002) รายงานว่าการเพาะเลี้ยง *L. acidophilus* PF01 ร่วมกับ *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อค่า pH ของอาหารเหลว MRS ลดลงจากค่าเริ่มต้นประมาณ 6.5 เป็นประมาณ 4.5 กรณีเช่นนี้ยกตัวอย่างนี้อาจมีผลให้ค่า prebiotic activity score เปลี่ยนไปและได้ค่าที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากขึ้น

จากผลการวิจัยในขั้นตอนนี้ หากพิจารณาถึงการนำไปพัฒนาเป็นฟิล์มซึ่งต้องมีส่วนที่เป็นพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มและส่วนที่เป็นคู่ซินไบโอติก ในการเลือกคู่ซินไบโอติกที่จะนำไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไปจึงพิจารณาดังนี้

พิจารณาคู่ซินไบโอติกเป็นเกณฑ์ สามารถสรุปได้ว่าคู่ของโพรไบโอติก *L. casei*-01 กับโพรไบโอติก Orafiti® GR เป็นคู่ซินไบโอติกที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในขั้นตอนนี้เพื่อพัฒนาเป็นฟิล์มบริโอบคได้ เป็นไปได้ว่าหากบริโอบคฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 กับ

Orafti® GR ซึ่งเป็นคู่ชินไบโอติกที่มีศักยภาพสูงจะช่วยให้โพรไบโอติกชนิดนี้อยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้ใหญ่ เพราะนอกจากจะมีความสามารถในการใช้กลูโคแมนแนนของผงบุกและ Orafti® GR ที่มาพร้อมกับฟิล์มได้ดีแล้ว ยังมีความสามารถให้โพรไบโอติกชนิดอื่นๆที่อาจเป็นส่วนประกอบของอาหารตามธรรมชาติด้วย

พิจารณากลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งเป็นพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปฟิล์มเป็นเกณฑ์ พบว่าคู่ของโพรไบโอติก *L. paracasei* กับกลูโคแมนแนนของผงบุกมีความน่าสนใจในการนำไปใช้พัฒนาเป็นฟิล์มบริโคมได้เช่นกัน เนื่องจาก *L. paracasei* สามารถใช้กลูโคแมนแนนของผงบุกเพื่อการเจริญได้ดีกว่าโพรไบโอติกอีกสองสายพันธุ์ที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยให้ค่า prebiotic activity score เท่ากับ 0.18 ซึ่งมีค่าสูงสุดในกลุ่มของอาหารที่เสริมกลูโคแมนแนนของผงบุก นอกจากนี้ *L. paracasei* ยังสามารถใช้โพรไบโอติกชนิดอื่นเพื่อการเจริญได้ด้วย ความสามารถเหล่านี้อาจช่วยให้ *L. paracasei* มีการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ดีเช่นเดียวกับกรณีของ *L. casei-01*

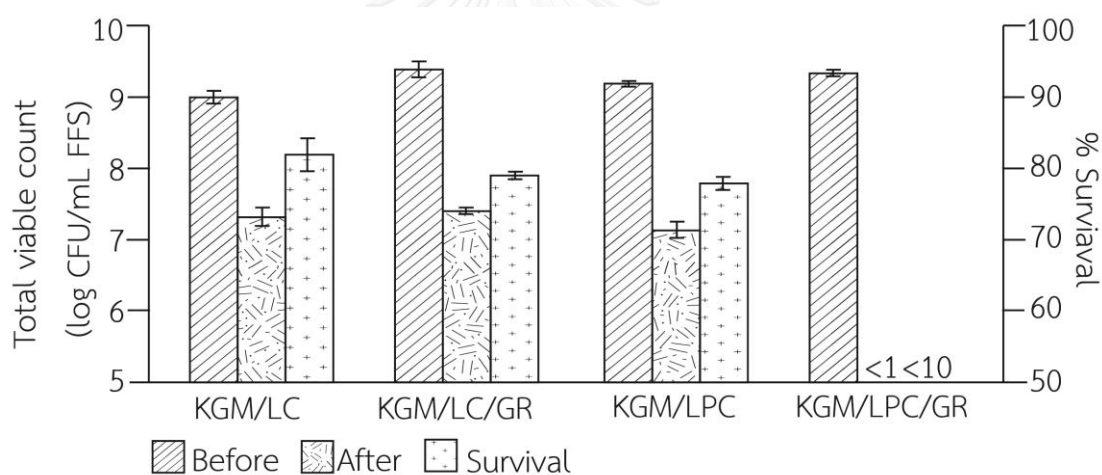
ดังนั้น โพรไบโอติกที่คัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปมี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei-01* และ *L. paracasei* และคาร์โบไฮเดรตมี 2 ชนิด ได้แก่ Orafti® GR และกลูโคแมนแนนของผงบุก

4.2 การพัฒนาฟิล์มบริโคมได้จากผงบุกกลูโคแมนแนนที่เติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกทางการค้า

4.2.1 การตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม

เนื่องจากกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มในงานวิจัยนี้อาศัยการระเหยของน้ำออกจากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มภายใต้อุณหภูมิ 40 °C เป็นระยะเวลาสั้น สภาวะดังกล่าวอาจก่อให้เกิดความเครียดและส่งผลให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลง ขั้นตอนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของโพรไบโอติกก่อนและหลังกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มด้วยการทำแห้งและตรวจสอบผลของการเติมพรีไบโอติกต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม โดยใช้จุลินทรีย์และคาร์โบไฮเดรตที่คัดเลือกจากข้อที่ 4.1 เตรียมฟิล์มทั้งหมด 4 สูตร ผลการวิจัยแสดงในภาพที่ 4.2 และตารางที่ 1.1 (ภาคผนวก ง) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการขึ้นรูปฟิล์มและการเติมพรีไบโอติกมีผลให้การมีชีวิตของจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยสูตรฟิล์มที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลืออยู่หลังผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มมากที่สุด คือ ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมเฉพาะ *L. casei-01* ($p < 0.05$)

ภาพที่ 4.2 และตารางที่ ง1.1 (ภาคผนวก ง) แสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลาย สำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลังกระบวนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ โพรไบโอติกในฟิล์มทั้ง 4 สูตร พบว่ากระบวนการขึ้นรูปฟิล์มที่ใช้ในการทดลองนี้ทำให้การรอดชีวิตของฟิล์มลดลงประมาณ 1.7-2.0 log CFU/mL (ยกเว้นฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมทั้ง *L. paracasei* และ Orafiti® GR (KGM/LPC/GR)) โดยฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei-01* (KGM/LC) มีการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด (ประมาณ 1.7 log CFU/mL) และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด (81.38%) เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มสูตรอื่น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *L. casei-01* ในฟิล์มที่เติม Orafiti® GR (KGM/LC/GR) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *L. paracasei* ในฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมเฉพาะ *L. paracasei* (KGM/LPC) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมทั้ง *L. paracasei* และ Orafiti® GR (KGM/LPC/GR) มีการรอดชีวิตต่ำที่สุด



ภาพที่ 4.2 การมีชีวิตของ *L. casei-01* และ *L. paracasei* ก่อนและหลังกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มด้วยการทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 16 ชั่วโมง ในฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่มีสูตรแตกต่างกัน (KGM/LC = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei-01* (LC), KGM/LC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei-01* และ Orafiti® GR, KGM/LP = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. paracasei*, KGM/LPC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. paracasei* และ Orafiti® GR)

เมื่อพิจารณาผลของการเติมพรีไบโอติกต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกพบว่า Orafiti® GR ไม่ช่วยปกป้องเซลล์จากความร้อนในระหว่างกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ ง1.1) กรณีของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติก *L. casei-01* พบว่าการเติม Orafiti® GR ทำ

ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยกว่าฟิล์มที่ไม่เติม Orafti® GR ($p < 0.05$) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเล็กน้อยจาก 81.38% เป็น 78.75% หลังจากผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม ส่วนการเติม Orafti® GR ลงในสูตรฟิล์มทำให้ *L. paracasei* จำนวนมากตายในระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มและเหลือเซลล์ที่มีชีวิตไม่ถึง 1 log CFU/mL ของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม ผลจากการทดลองนี้ขัดกับงานวิจัยของ Romano *et al.* (2014) ที่พบว่า การเติมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 1-3% (w/v) ลงในฟิล์มเมทิลเซลลูโลสช่วยให้ *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 333 รอดชีวิตได้จากการสูญเสียน้ำในระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มได้ แต่ผลการทดลองในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับนี้สอดคล้องกันกรณีของ *L. plantarum* CIDCA 83114 ซึ่ง Romano *et al.* (2014) รายงานว่าการเติมฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดได้ดีขึ้น

การลดลงของเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตในระหว่างการทำแห้งในกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มนั้นมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์โพรไบโอติก ความร้อน ความเครียดจากออสโมติก (osmotic stress) การสูญเสียน้ำ (dehydration) เป็นต้น (Paéz *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2014; Tripathi and Giri, 2014) การทำแห้งด้วยเทคนิค hot-air drying มีความร้อนซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างและพันธะของสารชีวโมเลกุล และการสูญเสียน้ำ (dehydration) ส่งผลต่อโครงสร้างเมมเบรนของเซลล์โพรไบโอติกและเกิดออกซิเดชันของลิพิด (Fu and Chen, 2011) กรณีของฟิล์มที่เติม Orafti® GR ยังมีอิทธิพลของความเครียดจากออสโมติก (osmotic stress) ที่เกิดจากการระเหยน้ำออกจากสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มในระหว่างการทำแห้งปริมาณของสารละลายลดลงในขณะที่ตัวถูกละลายมีปริมาณคงที่จึงทำให้ความเข้มข้นของ Orafti® GR สูงขึ้น (การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Orafti® GR จากเริ่มต้นที่มีในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มปริมาตร 20 mL เท่ากับ 1% (w/v) เมื่อปริมาตรของสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มลดลงเป็น 10 mL และ 5 mL จะมีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 2% (w/v) และ 4% (w/v) ตามลำดับ) นอกจากนี้สาเหตุที่การขึ้นรูปฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. paracasei* และ Orafti® GR (KGM/LPC/GR) พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่า *L. casei*-01 อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะความเครียดดังกล่าวต่ำกว่า ประกอบกับปัจจัยทางเคมีกายภาพอื่นที่ส่งผลต่อการมีชีวิตของโพรไบโอติก เช่น ออกซิเจน, ค่า pH, อุณหภูมิ และองค์ประกอบของฟิล์ม (Tripathi and Giri, 2014)

แม้ว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมทั้งโพรไบโอติก *L. casei*-01 และโพรไบโอติก Orafti® GR จะไม่ได้ให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงที่สุด แต่เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *L. casei*-01 ในฟิล์มสูตรนี้มีค่าสูงเกือบ 80% และยังมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในฟิล์มหลังการขึ้นรูปฟิล์มมากถึง 9.02 ± 0.04 log CFU/g ฟิล์ม ซึ่งผ่านเกณฑ์ของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่กำหนดให้มีในผลิตภัณฑ์ คือ ต้องมีค่ามากกว่า 6 ถึง 7 log CFU/g โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มสูตรนี้ยังมีโพรไบโอติกทางการค้าและ

โพรไบโอติกอยู่ด้วยกัน ซึ่งเป็นคู่ชินไบโอติกที่มีศักยภาพสูงที่สุดจากการผลการทดลองในข้อที่ 4.1 ดังนั้นเมื่อพิจารณาทั้งค่า prebiotic activity score ร่วมกับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม ฟิล์มสูตรนี้จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปพัฒนาและศึกษาสมบัติของฟิล์มต่อไป

4.3 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม

4.3.1 ความหนา ความโปร่งแสง และสี

เมื่อนำคู่โพรไบโอติก *L. casei*-01 และพรีไบโอติก Orafti®GR ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 4.2 มาเตรียมฟิล์มกลูโคแมนแนนที่มีสมบัติชินไบโอติก ลักษณะของฟิล์มที่สังเกตได้มีดังนี้ เป็นฟิล์มที่ไม่มีสี บางและโปร่งแสง เป็นฟิล์มอ่อนและเหนียว สามารถม้วนหรือพับได้โดยไม่หัก หากสัมผัสด้วยมือเปล่า พบว่าฟิล์มดูดความชื้นจากมือเล็กน้อย (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติก *L. casei*-01 และพรีไบโอติก Orafti®GR

ความหนาของฟิล์มบริโภาคได้มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส (sensory attributes) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการยอมรับจากผู้บริโภค (Longares *et al.*, 2004) นอกจากนี้ความหนาของฟิล์มมีผลต่อสมบัติทางกายภาพอื่นๆของฟิล์มด้วย ได้แก่ ค่าความโปร่งแสง สมบัติเชิงกล และสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำด้วย เพราะฉะนั้นความหนาจึงเป็นสมบัติของฟิล์มที่จำเป็นต่อการพัฒนาฟิล์มบริโภาคได้ จากตารางที่ 4.3 รายงานความหนาของฟิล์มทั้ง 4 สูตร แสดงให้เห็นว่าการเติมจุลินทรีย์ *L. casei*-01 และ/หรือการเติมพรีไบโอติก Orafti®GR ทำให้ความหนาของฟิล์มที่เตรียมได้เปลี่ยนไปจากความหนาของฟิล์มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยฟิล์มควบคุมซึ่งเป็นฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกมีความหนาท่ำที่สุด (0.046 ± 0.001 mm) เมื่อเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกหรือการเติมพรีไบโอติกความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น และเมื่อเติมทั้ง *L. casei*-01 และพรีไบโอติกทำให้ฟิล์มมีความหนาสูงที่สุด (0.083 ± 0.001 mm)

ตารางที่ 4.3 ความหนา ความโปร่งแสง และสีของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก

ตัวแปรที่ศึกษา	สูตรฟิล์ม**			
	KGM (ควบคุม)	KGM/GR	KGM/LC	KGM/LC/GR
ความหนา (mm)	0.046 ± 0.001 ^a	0.077 ± 0.003 ^c	0.056 ± 0.004 ^b	0.083 ± 0.001 ^d
ความโปร่งแสง	3.295 ± 0.048 ^a	3.800 ± 0.715 ^a	3.476 ± 0.051 ^a	6.587 ± 0.192 ^b
สี				
L*	96.22 ± 0.15 ^a	96.60 ± 0.21 ^{ab}	96.62 ± 0.11 ^b	96.60 ± 0.29 ^{ab}
a*	-0.51 ± 0.01 ^c	-0.41 ± 0.06 ^a	-0.20 ± 0.03 ^c	-0.31 ± 0.02 ^b
b*	3.81 ± 0.05 ^a	3.52 ± 0.13 ^a	3.72 ± 0.22 ^a	4.86 ± 0.13 ^b
ΔE	-	0.25 ± 0.09 ^a	0.46 ± 0.11 ^b	1.16 ± 0.11 ^c

**KGM = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก, KGM/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafiti® GR (GR), KGM/LC = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC), KGM/LC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafiti® GR (GR)

ความหนาของฟิล์มขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น วิธีการขึ้นรูปฟิล์ม สูตรฟิล์ม พอลิเมอร์ที่ใช้ขึ้นรูปฟิล์ม เป็นต้น ดังนั้นความหนาของฟิล์มบริโภคได้ระหว่างงานวิจัยจึงมีความหลากหลาย เช่น ฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลตมีความหนาประมาณ 0.395-0.410 mm และไม่มีความแตกต่างของความหนา ระหว่างฟิล์มที่เติมและไม่เติมโพรไบโอติก (Odila Pereira *et al.*, 2016) ฟิล์มเจลาตินที่เติม *L. rhamnosus* GG มีความหนาประมาณ 0.140-0.145 mm และเมื่อเติมอินูลินหรือพรีไบโอติกชนิดอื่นๆไม่ทำให้ความหนาเปลี่ยนแปลงไป (Soukoulis *et al.*, 2014a) ในขณะที่ผลของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kanmani and Lim (2013) ที่พบว่าการเติมเซลล์โพรไบโอติกลงในฟิล์มทำให้ความหนาเปลี่ยนแปลงไป

ฟิล์มที่มีความหนามากกว่ามีแนวโน้มที่ผู้บริโภคจะรับรู้ถึงความแตกต่างได้ Longares *et al.* (2004) พบว่าผู้บริโภคไม่สามารถแยกความแตกต่างของแครกเกอร์ที่มีและไม่มีฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลตได้ในกรณีที่ฟิล์มบางกว่า (0.022 mm) แต่สามารถแยกความแตกต่างได้หากฟิล์มมีความหนา 0.079 mm ดังนั้นฟิล์มซินไบโอติกที่เตรียมได้ในการทดลองนี้อาจมีความหนาในระดับที่ผู้บริโภคสามารถแยกแยะได้ อย่างไรก็ตามการยอมรับขึ้นอยู่กับอาหารที่นำฟิล์มในรูปแบบแผ่นไปประยุกต์ใช้ด้วย

ความโปร่งแสงของฟิล์มแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาประกอบกับสูตรที่ใช้คำนวณความโปร่งแสงในงานวิจัยนี้ ค่าความโปร่งแสงที่คำนวณได้หากมีค่าน้อยแสดงว่าฟิล์มมีความโปร่งแสงสูง

พบว่า การเติมพรไบโอติกหรือโพรไบโอติกอย่างใดอย่างหนึ่งลงในฟิล์มกลูโคแมนแนนไม่มีผลต่อความโปร่งแสงของฟิล์ม จากตารางพบว่าฟิล์มควบคุม (KGM) และฟิล์มที่มีการเติมจุลินทรีย์ *L. casei*-01 หรือพรไบโอติก Orafti® GR อย่างใดอย่างหนึ่งมีความโปร่งแสงไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากกรณีของการเติมพรไบโอติก (อินูลิน เดกซ์ทริน ข้าวสาลี กลูโคโอลิโกแซ็กคาไรด์ พอลิเดกซ์โทรส) ในฟิล์มเจลาตินที่ส่งผลให้ค่าความโปร่งแสงของฟิล์มลดลงจากฟิล์มเจลาตินควบคุม และการเติม *L. rhamnosus* GG ทำให้ความโปร่งแสงเปลี่ยนแปลงไปแต่ไม่มีนัยสำคัญ (Soukoulis *et al.*, 2014a) นอกจากนี้การเติมทั้งพรไบโอติกและโพรไบโอติกพร้อมกันส่งผลทำให้ฟิล์มกลูโคแมนแนนมีความโปร่งแสงแตกต่างไปจากฟิล์มควบคุม โดยค่าความโปร่งแสงลดลงไปจากฟิล์มควบคุมประมาณสองเท่า (6.587 ± 0.192) อย่างไรก็ตามฟิล์มซินไบโอติกที่เตรียมได้ยังมีความโปร่งแสงเพียงพอที่จะใช้เป็นสารเคลือบหรือฟิล์มที่มองเห็นทะลุเห็นอาหารได้ (see-through)

สีของฟิล์มเป็นอีกหนึ่งสมบัติที่สำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้ฟิล์มบริโภคได้หรือสารเคลือบในผลิตภัณฑ์อาหารเพราะเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า จากตารางที่ 4.3 แสดงค่า L^* , a^* , b^* และ ΔE การเติมโพรไบโอติกและ/หรือพรไบโอติกในฟิล์มมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของฟิล์มที่ผลิตได้ โดยค่า L^* ซึ่งเป็นพารามิเตอร์แสดงความสว่างของฟิล์มทั้งสามสูตรมีค่าแตกต่างจากฟิล์มควบคุม ($p < 0.05$) สำหรับค่า a^* ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่แสดงความแดง-เขียวของฟิล์มพบว่าฟิล์มที่เติมจุลินทรีย์ *L. casei*-01 เท่านั้นที่มีค่า a^* ไม่แตกต่างจากฟิล์มควบคุม ส่วนฟิล์มที่เติมพรไบโอติกทั้งสองชนิด คือ ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafti® GR (KGM/GR) และฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR (KGM/LC/GR) มีค่า a^* ตีลบมากกว่าฟิล์มควบคุม ($p < 0.05$) ซึ่งให้เห็นว่าการเติม Orafti® GR ทำให้สีของฟิล์มมีความเขียวมากขึ้น ส่วนค่า b^* ซึ่งแสดงถึงความเหลือง-น้ำเงิน พบว่าเฉพาะฟิล์มที่เติมทั้งโพรไบโอติก *L. casei*-01 และพรไบโอติก Orafti® GR พร้อมกันมีค่า b^* ที่แตกต่างจากฟิล์มควบคุม โดยมีค่า 4.86 ± 0.13 ซึ่งสูงกว่าฟิล์มควบคุม แสดงว่าฟิล์มที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR พร้อมกันมีความเหลืองมากกว่าฟิล์มควบคุมและฟิล์มที่เติม *L. casei*-01 หรือ Orafti® GR อย่างใดอย่างหนึ่ง เมื่อพิจารณาค่า ΔE ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความแตกต่างของสีเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มควบคุม พบว่าการเติมโพรไบโอติกและ/หรือพรไบโอติกส่งผลให้สีของฟิล์มเปลี่ยนไปจากสีของฟิล์มควบคุม ($p < 0.05$) โดยการเติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR พร้อมกันทั้งสองอย่างทำให้สีของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากที่สุด เมื่อเทียบกับการเติม *L. casei*-01 หรือ Orafti® GR อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งมีค่าความแตกต่างของสีเมื่อเทียบกับการเติม *L. casei*-01 หรือ Orafti® GR เพียงอย่างเดียวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีไปจากฟิล์มควบคุมน้อยที่สุด โดยมีค่าความแตกต่างของสีเท่ากับ 0.25 ± 0.09 อย่างไรก็ตามค่าความแตกต่างของสี (ΔE) ของฟิล์มทุกสูตรมีค่าน้อยกว่า 3 ซึ่งเป็นค่าความแตกต่างของสีต่ำที่สุดที่มนุษย์สามารถรับรู้ได้ด้วยตาเปล่า (Martínez-Cervera *et al.*, 2011)

4.3.2 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility)

ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มเป็นอีกหนึ่งข้อมูลที่สำคัญที่กำหนดการประยุกต์ใช้ฟิล์มในผลิตภัณฑ์อาหาร (Pitak and Rakshit, 2011) จากตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การละลายน้ำของฟิล์มควบคุม ฟิล์มที่เติม *L. casei*-01 หรือ Orafti® GR อย่างใดอย่างหนึ่ง และฟิล์มที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ทั้งสองอย่าง โดยฟิล์มทุกชนิดละลายในน้ำได้โดยมีการพองตัวของฟิล์มและค่อยๆละลายในน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลาย จากข้อมูลการละลายของฟิล์มภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเติมพรีไบโอติก Orafti® GR และพรีไบโอติก *L. casei*-01 ทำให้ความสามารถในการละลายของฟิล์มเพิ่มขึ้นจากฟิล์มควบคุมซึ่งเป็นฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยฟิล์มกลูโคแมนแนนมีความสามารถในการละลายน้ำ 83.21% ในขณะที่เมื่อเติม Orafti® GR และ/หรือ *L. casei*-01 ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มบริโภคน้ำได้สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก Orafti® GR เป็นอิทธิพลที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) จึงช่วยให้ฟิล์มละลายน้ำได้ดีขึ้น (Erothu and Kumar, 2017) ความสามารถในการละลายของฟิล์มมีความเกี่ยวข้องกับแรงเชื่อมแน่นภายในโครงสร้างฟิล์ม โดยภายในฟิล์มมีทั้งหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะไฮโดรเจนระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งกลูโคแมนแนนของผงบุกและ Orafti® GR ซึ่งการแตกตัวของหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะไฮโดรเจนส่งผลให้ฟิล์มมีความสามารถในการละลายน้ำสูงขึ้น (Mathew *et al.*, 2006)

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) และสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability หรือ WVP) ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (ฟิล์มควบคุม) และฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 หรือ Orafti® GR หรือเติมทั้งสองอย่าง

สูตรฟิล์ม*	ความสามารถในการละลายน้ำ (%)	สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (g mm h ⁻¹ m ⁻² kPa ⁻¹)**
KGM	83.21 ± 1.40 ^a	0.0050 ± 0.0003 ^b
KGM/GR	97.98 ± 0.42 ^b	0.0066 ± 0.0005 ^c
KGM/LC	96.92 ± 0.81 ^b	0.0035 ± 0.0002 ^a
KGM/LC/GR	97.22 ± 0.66 ^b	0.0056 ± 0.0001 ^b

*KGM = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก, KGM/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafti® GR (GR), KGM/LC = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC), KGM/LC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafti® GR (GR),

** g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ = กรัม มิลลิเมตร ชั่วโมง⁻¹ เมตร⁻¹ กิโลพาสคาล⁻¹

ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มเป็นผลมาจากสมบัติทางเคมีของวัสดุที่ใช้ในการเตรียมฟิล์ม งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนมีสมบัติละลายน้ำได้ดี 51.01-92.98% (Kurt and Kahyaoglu, 2014; Wiset *et al.*, 2014) ในกรณีของงานวิจัยนี้พบว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนทุกสูตรมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูงแสดงว่าฟิล์มที่เตรียมได้ไม่ทนน้ำ ดังนั้นผลิตภัณฑ์อาหารที่จะนำฟิล์มนี้ไปใช้ร่วมด้วยหรือนำไปเป็นสารเคลือบไม่ควรเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำสูง เช่น ผลไม้สดตัดแต่ง หรือผักสด เป็นตัวบ่งชี้ว่าฟิล์มที่ได้จากงานวิจัยนี้จะละลายได้ในทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นระบบที่มีน้ำ ซึ่งแสดงถึงกลไกการทำงานของฟิล์มที่ทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) ของเซลล์โพรไบโอติก *L. casei*-01 และโพรไบโอติกในอาหาร เมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารซึ่งเป็นระบบที่มีน้ำเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในฟิล์มจะถูกปลดปล่อยออกมาจากกลูโคแมนแนน ดังนั้นกลูโคแมนแนนจึงไม่ได้ทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกเพื่อปกป้องไปจนถึงส่วนท้ายของทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตาม *L. casei*-01 เป็นโพรไบโอติกทางการค้ามีศักยภาพในการรอดชีวิตได้ดีเมื่อเผชิญสภาวะจากกรดและเอนไซม์ได้ในทางเดินอาหาร เนื่องจากโพรไบโอติกมีกลไกระดับเซลล์และโมเลกุลช่วยในการปรับตัวกับสภาวะดังกล่าวได้ (Botes, 2008)

4.3.3 สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability; WVP)

สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการนำฟิล์มไปประยุกต์ใช้ เนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อการช่วยยืดอายุของอาหาร การวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำสำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป จากตารางที่ 4.4 ฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เป็นฟิล์มควบคุมมีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเท่ากับ $0.0050 \pm 0.0003 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$ สำหรับฟิล์มที่มีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำสูงที่สุดในงานวิจัยนี้คือ ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติก Orafti[®] GR (KGM/GR) และฟิล์มที่มีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำที่สุดคือ ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรไบโอติก *L. casei*-01 (KGM/LC) โดยงานวิจัยนี้พบว่าการเติมโพรไบโอติกหรือโพรไบโอติกทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนี้

การเติมโพรไบโอติก Orafti[®] GR ทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มสูงขึ้น โดยพิจารณาสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์ม 2 คู่ ในตารางที่ 4.4 เพื่อศึกษาผลของการเติมโพรไบโอติก คู่แรกคือ ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM) ซึ่งมีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเท่ากับ $0.0050 \pm 0.0003 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$ มีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Orafti[®] GR ในฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafti[®] GR (KGM/GR) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.0066 \pm 0.0005 \text{ g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$ และเมื่อเปรียบเทียบคู่ที่สองระหว่างฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) กับฟิล์มกลูโคแมน

แน่นที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR (KGM/LC/GR) พบว่า Orafti® GR ส่งผลให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.0035 ± 0.0002 ไปเป็น 0.0056 ± 0.0001 g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ โดยการเพิ่มขึ้นในสองกรณีนี้มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

การเติมโพรไบโอติก *L. casei*-01 ทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มลดลง โดยพิจารณาสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์ม 2 คู่ ในตารางที่ 4.4 เพื่อศึกษาผลของการเติมเซลล์โพรไบโอติก ประกอบด้วย คู่ของฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM) และฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) ซึ่งมีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงจาก 0.0050 ± 0.0003 ไปเป็น 0.0035 ± 0.0002 g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ และคู่ที่สองเปรียบเทียบระหว่างฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafti® GR (KGM/GR) กับฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafti® GR และ *L. casei*-01 (KGM/LC/GR) พบว่าสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงจาก 0.0066 ± 0.0005 ไปเป็น 0.0056 ± 0.0001 g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ โดยการลดลงในสองกรณีนี้มีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยทั้งพอลิเมอร์ที่ใช้ในการเตรียมฟิล์ม และลักษณะของฟิล์มที่เตรียมได้ (Souza *et al.*, 2010) กลูโคแมนแนนของผงบุกเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อนำมาผลิตฟิล์มจึงได้ฟิล์มที่มีความสามารถในการขัดขวางการซึมผ่านไอน้ำและแก๊สต่ำ เมื่อเติมอินูลินซึ่งมีสมบัติชอบน้ำเช่นเดียวกับกลูโคแมนแนนทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำสูงขึ้น ส่วนการเติมเซลล์โพรไบโอติกลงในฟิล์มทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลง เช่นเดียวกับที่พบในการเติมโพรไบโอติกลงในฟิล์มพอลูลูแลน/สตาร์ช เนื่องจากเซลล์ไปขัดขวางการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ในฟิล์ม (polymer chain mobility) (Kanmani and Lim, 2013) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ทางการค้า Orafti® GR ที่เติมลงในฟิล์มประกอบด้วยอินูลินและน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้เข้าไปทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ในฟิล์มได้ โดยไปเพิ่มปริมาตรช่องว่าง (free volume) ในระบบพอลิเมอร์ของฟิล์ม ทำให้โครงสร้างของฟิล์มหลวมขึ้น (หรือกล่าวได้ว่าน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้ไปลดอันตรกิริยาระหว่างกันของสายโซ่พอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน) (Skurtys *et al.*, 2011) ทำให้สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มที่เติม Orafti® GR สูงขึ้นกรณีที่ต้องการพัฒนาฟิล์มเป็นบรรจุภัณฑ์ แผ่นสำหรับห่อหุ้มอาหาร หรือสารเคลือบเพื่อยืดอายุอาหาร สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำควรมีค่าต่ำเนื่องจากช่วยลดการถ่ายโอนความชื้นระหว่างอาหารและสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR กับฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เตรียมในงานวิจัยอื่น (Chambi and Grosso, 2011; Kurt and Kahyaoglu, 2014) และฟิล์มบรีโภาคได้ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ชนิดอื่นในหลายงานวิจัย (Chambi and Grosso, 2011; Erdohan *et al.*, 2011) ฟิล์มที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้มีสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำกว่า เมื่อเทียบกับการจำแนกกลุ่มของฟิล์มและสารเคลือบบรีโภาคได้และพลาสติกของ Han (2014) ซึ่งพิจารณาตามสภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำออกเป็น 4 กลุ่ม (>10 = แย่,

10-1 = เกือบแย่, 1-0.1 = ดี และ <0.1 = ดีมาก ในหน่วย $\text{g mm d}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) แสดงว่าฟิล์มที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้จัดอยู่ในกลุ่มดีและดีมาก อยู่ในระดับเดียวกับเซลลูล์ก ซ็อกโกแลต และอยู่ในระดับที่ดีกว่าฟิล์มจากโปรตีนหลายชนิด เช่น เวย์โปรตีนไอโซเลต โปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลือง โปรตีนไข่ขาว กลูเตนข้าวสาลี ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฟิล์มนี้นอกจากจะเป็นตัวพาซินไบโอติกในอาหาร ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์หลักแล้วอาจทำหน้าที่ยึดอายุอาหารได้

4.3.4 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break)

นอกจากความหนา สีและความโปร่งแสงแล้ว สมบัติเชิงกลของฟิล์มเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยอมรับฟิล์มของผู้บริโภค (Adebowale *et al.*, 2014) ข้อมูลส่วนนี้ยังมีความสำคัญต่อการพัฒนาฟิล์มเป็นบรรจุภัณฑ์ด้วย งานวิจัยนี้พบว่าการเติมพรีไบโอติกหรือโพรไบโอติกส่งผลให้ความต้านทานของฟิล์มเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดไม่เปลี่ยนแปลงไปจากฟิล์มควบคุมซึ่งเป็นฟิล์มกลูโคแมนแนนที่ไม่มีการเติมทั้งพรีไบโอติกและโพรไบโอติก (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (ฟิล์มควบคุม) และฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 หรือ Orafiti® GR หรือเติมทั้งสองอย่าง

สูตรฟิล์ม*	ความต้านทานแรงดึงขาด (MPa)**	การยืดตัวถึงจุดขาด (%)
KGM	36.11 ± 3.86 ^a	23.64 ± 4.75 ^a
KGM/GR	20.69 ± 2.77 ^b	22.59 ± 8.34 ^a
KGM/LC	34.31 ± 2.02 ^a	25.66 ± 7.05 ^a
KGM/LC/GR	21.10 ± 3.97 ^b	23.83 ± 5.77 ^a

ค่าที่แสดงในตารางอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่แตกต่างกันภายในตัวแปรสมบัติเชิงกลตัวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

*KGM = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก, KGM/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafiti® GR (GR), KGM/LC = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC), KGM/LC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafiti® GR (GR), **MPa = เมกะพาสคาล

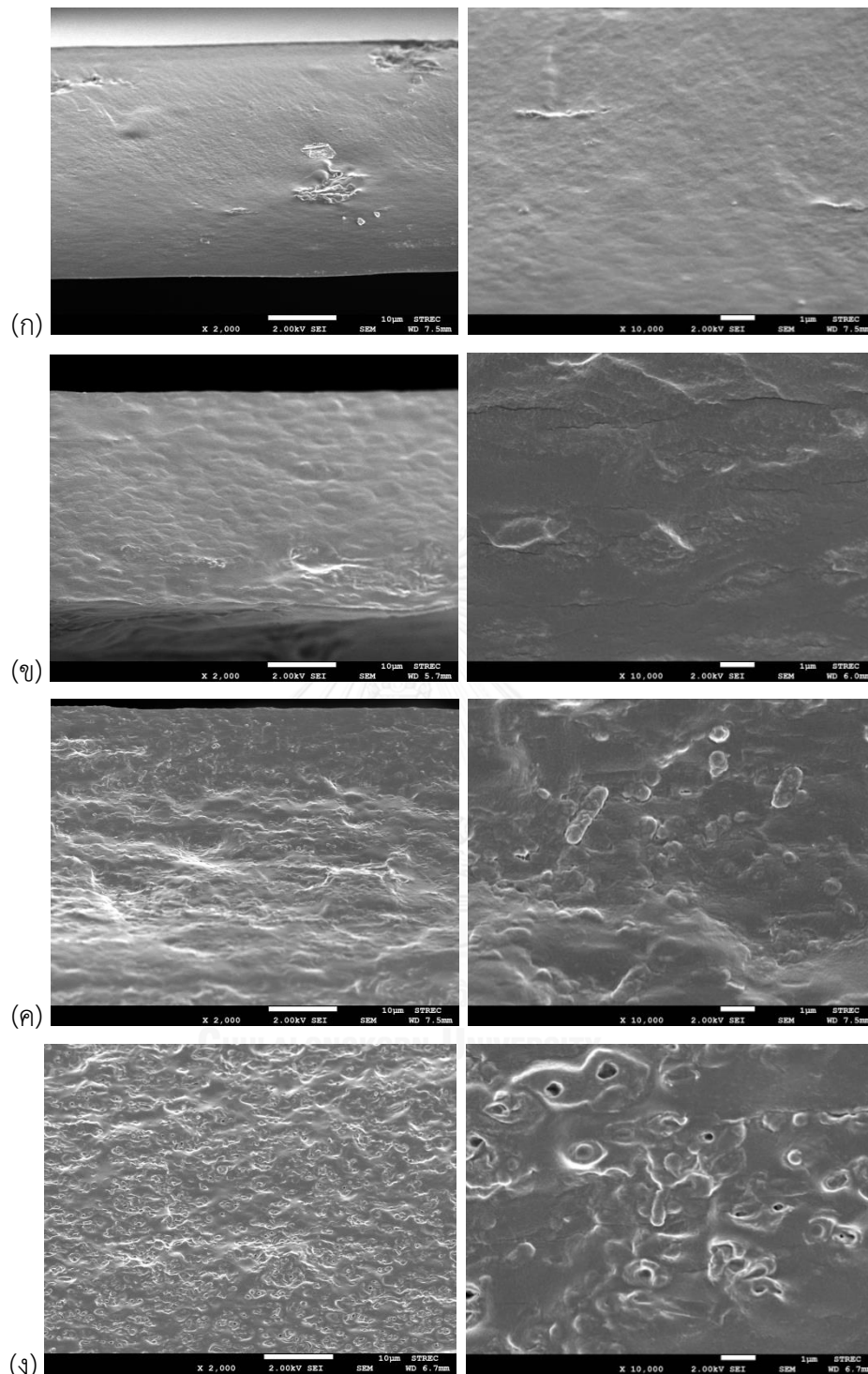
หากเปรียบเทียบความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM) สูตรที่ไม่เติม *L. casei*-01 พบว่าการเติม Orafiti® GR ให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มลดลงจาก 36.11 ไปเป็น

20.69 MPa และหากเปรียบเทียบระหว่างฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM) สูตรที่เติม *L. casei*-01 พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ การเติม Orafti[®] GR ทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มลดลงจาก 34.31 ไปเป็น 21.10 MPa เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทางการค้า Orafti[®] GR ที่เติมลงในฟิล์มประกอบด้วย อินูลินและน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้เข้าไปทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ในฟิล์มได้ โดยไปเพิ่มปริมาตรช่องว่าง (free volume) ในระบบพอลิเมอร์ของฟิล์ม ทำให้โครงสร้างของฟิล์มหลวมขึ้น (หรือกล่าวได้ว่าน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้ไปลดอันตรกิริยาระหว่างกันของสายโซ่พอลิเมอร์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน) (Skurtys *et al.*, 2011) ทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มที่เติม Orafti[®] GR ลดลง จากผลการทดลองในตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า Orafti[®] GR มีบทบาททำให้ค่าความต้านทานแรงดึงขาดลดลงในขณะที่การเติมโพรไบโอติกไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต้านทานแรงดึงของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการเติมโพรไบโอติกลงในฟิล์มกลูโคแมนแนนของ ผงบุกที่ไม่เติม Orafti[®] GR ส่งผลให้ความต้านทานแรงดึงขาดลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanmani and Lim (2013) ที่รายงานว่าค่าความต้านทานแรงดึงขาดในฟิล์มพุลูลูแลน ลดลงจาก 15.2 ± 2.9 MPa ไปเป็น 3.76 ± 0.68 MPa เมื่อเติมโพรไบโอติก การลดลงของความต้านทานแรงดึงขาดเช่นนี้ยังพบในฟิล์มคีเฟอแรนที่เติม *L. plantarum* CIDCA 8327 และ *K. marxianus* CIDCA 8154 (Piermaria *et al.*, 2015) อีกด้วย อย่างไรก็ตามการเติม *L. casei*-01 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความต้านทานทางแรงดึงขาดของฟิล์มในฟิล์มกลูโคแมนแนนของ ผงบุกที่เติม Orafti[®] GR สำหรับค่าการยืดตัวถึงจุดขาดในตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนทั้ง 4 สูตรให้ค่าการยืดตัวถึงจุดขาดไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 22.59 – 23.83 %

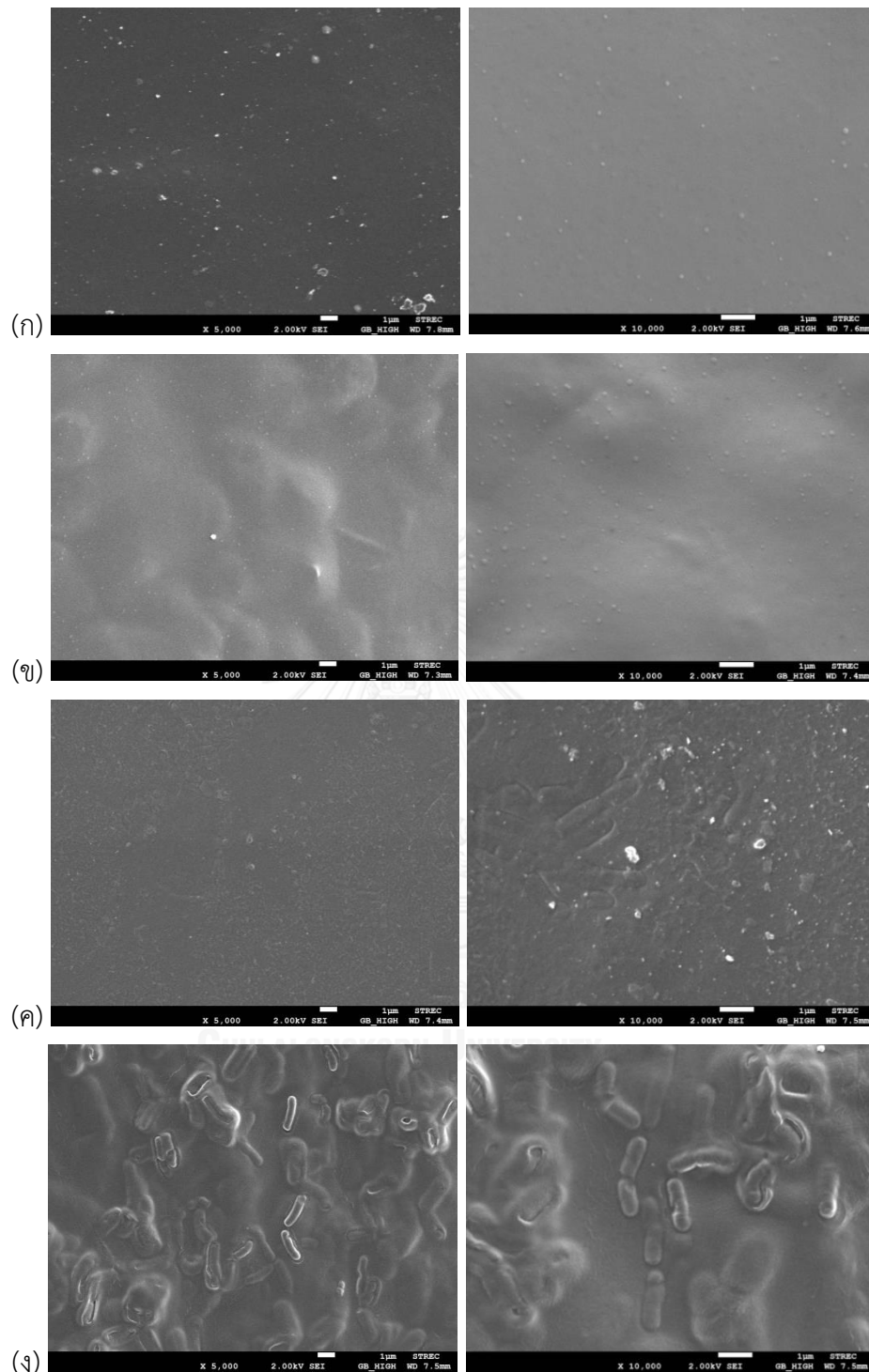
ฟิล์มที่เหมาะสมต่อการทำเป็นบรรจุภัณฑ์ควรมีค่าความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูง (Pitak and Rakshit, 2011) เมื่อเทียบฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti[®] GR กับการจำแนกกลุ่มของฟิล์มและสารเคลือบบริโภาคได้และพลาสติกของ Han (2014) พบว่าค่าความต้านทานแรงดึงขาดอยู่ในเกณฑ์ดี (10-100 MPa) และการยืดตัวถึงจุดขาดอยู่ในเกณฑ์ดี (10-100 %)

4.3.5 ลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวางของฟิล์ม

เมื่อนำฟิล์มที่เตรียมได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อศึกษาโครงสร้างจุลภาคของฟิล์มเมื่อเติมโพรไบโอติกและพรีไบโอติก ได้ภาพถ่ายในฟิล์มทั้งในรูปแบบภาคตัดขวางดังแสดงในภาพที่ 4.4 และพื้นผิวของฟิล์มดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM micrograph) แสดงภาคตัดขวางของฟิล์ม (ก) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM), (ข) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafit[®] GR (KGM/GR), (ค) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC), และ (ง) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafit[®] GR (KGM/LC/GR) (คอลัมน์ซ้ายกำลังเป็นภาพถ่ายที่กำลังขยาย 2,000 เท่า สเกลบาร์ = 10 µm และคอลัมน์ขวาเป็นภาพถ่ายที่กำลังขยาย 10,000 เท่า สเกลบาร์ = 1 µm)



ภาพที่ 4.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM micrograph) แสดงพื้นผิวของฟิล์ม (ก) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM), (ข) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafti® GR (KGM/GR), (ค) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC), และ (ง) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafti® GR (KGM/LC/GR) (คอลัมน์ซ้ายเป็นภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5,000 เท่า สเกลบาร์ = 1 µm และคอลัมน์ขวาเป็นภาพถ่ายที่กำลังขยาย 10,000 เท่า สเกลบาร์ = 1 µm)

สำหรับภาคตัดขวางของฟิล์ม (ภาพที่ 4.4ก-ง) ฟิล์มกลูโคแมนแนนที่ไม่เติมทั้งโพรไบโอติก และพรีไบโอติกมีโครงสร้างแน่นและเรียบ (ภาพที่ 4.4ก) เมื่อเติม Orafti® GR ลงในฟิล์มกลูโคแมนแนนโครงสร้างภายในของฟิล์มมีความขรุขระและไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 4.4ข) เมื่อเติมโพรไบโอติกในฟิล์มพบว่าเซลล์กระจายทั่วไปและมีช่องว่างปรากฏรอยตัดขวางซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์เคยอยู่และหลุดไประหว่างการหักฟิล์มซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ (ภาพที่ 4.4ค-ง) จากภาพถ่ายแสดงพื้นผิวของฟิล์ม (ภาพที่ 4.5ก-ง) การเติมจุลินทรีย์ลงในฟิล์มไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณพื้นผิวของฟิล์มกลูโคแมนแนนจากผงบุก สิ่งที่เปลี่ยนไปมีเพียงการมีเซลล์โพรไบโอติก *L. casei*-01 ซึ่งมีรูปร่างท่อน ขนาดประมาณ $0.7 \times 1.5-3.0 \mu\text{m}$ ฝังอยู่ในฟิล์ม

งานวิจัยก่อนหน้าระบุว่าเมทริกซ์ที่ใช้ผลิตฟิล์มหรือไมโครแคปซูลทำหน้าที่ช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมและทำให้เซลล์รอดชีวิตมากขึ้น (Odila Pereira *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2011) เป็นไปได้ว่ากลูโคแมนแนนซึ่งเคลือบเซลล์ *L. casei*-01 ในแผ่นฟิล์มนั้นก็จะทำหน้าที่เช่นเดียวกัน

4.3.6 Fourier transform infrared (FT-IR) spectra ของฟิล์ม

จากข้อที่ 4.3.5 ทำให้เห็นภาพโครงสร้างของฟิล์มและลักษณะของเซลล์โพรไบโอติกที่ถูกกักไว้ในฟิล์ม การทดลองในส่วนนี้ใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy เพื่อให้ทราบลักษณะทางเคมีขององค์ประกอบต่างๆในโครงสร้างของฟิล์ม ได้แก่ พอลิเมอร์ที่ใช้ขึ้นรูปฟิล์ม เซลล์โพรไบโอติก และพรีไบโอติก นำสเปกตรัมของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกทั้งฟิล์มควบคุมและฟิล์มที่มีการเติมโพรไบโอติก *L. casei*-01 และ/หรือพรีไบโอติก Orafti® GR มาเปรียบเทียบกันดังแสดงในภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.6 เพื่อศึกษาหมู่ฟังก์ชันและอันตรกิริยาระหว่างโพรไบโอติกหรือพรีไบโอติกกับกลูโคแมนแนนของผงบุก สเปกตรัมในช่วง wavenumber ตั้งแต่ 4000 ถึง 515 cm^{-1}

จากภาพแสดงให้เห็นลักษณะเด่นของสเปกตรัมจากกลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลส่งผลให้มี absorption band กว้างปรากฏในช่วง wavenumber $3000-3700 \text{ cm}^{-1}$ ของสเปกตรัม ดังปรากฏเหมือนกันในฟิล์มทุกสูตรที่ wavenumber เท่ากับ 3337.01, 3292.15, 3308.21 และ 3291.97 cm^{-1} เนื่องจาก -OH stretching vibration ที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุลของกลูโคแมนแนน (Tripetch *et al.*, 2016) จากพรีไบโอติก Orafti® GR และหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์จากเซลล์แบคทีเรียด้วย (Romano *et al.*, 2014)

พบ absorption band ที่ wavenumber ประมาณ 2900 cm^{-1} เกิดจาก aliphatic -CH₂- stretching vibration พบ absorption band ในช่วง wavenumber 900 ถึง 800 cm^{-1} ซึ่งเกิด

จาก β -glycosidic linkage และ β -mannosidic linkage โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า absorption peak ที่เป็นลักษณะเฉพาะของแมนโนสในโมเลกุลกลูโคแมนแนนจะพบที่ 810 และ 880 cm^{-1} (Xiao *et al.*, 2000b; Xiao *et al.*, 2001b; Xiao *et al.*, 2001c) นอกจากนี้ยังพบ absorption peak ของโมเลกุลน้ำที่หลงเหลืออยู่ในฟิล์มกลูโคแมนแนน (bound water) (Zhang *et al.*, 2001) ปรากฏการณ์นี้พบเช่นเดียวกันในฟิล์มจากพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นด้วย (Jin *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2012)

เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมระหว่างฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) กับฟิล์มกลูโคแมนแนนที่ไม่เติม *L. casei*-01 (KGM) พบว่าสเปกตรัมของฟิล์มไม่แตกต่างกัน มีเพียงการปรากฏของ absorption band ที่ wavenumber 1596.49 และ 1544.31 cm^{-1} ของ amide ที่เกิดจากโปรตีนจากเซลล์โพรไบโอติก ซึ่ง absorption peak นี้พบเช่นเดียวกันในสเปกตรัมของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti[®]GR (KGM/LC/GR) แสดงว่าการเติมโพรไบโอติกไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัม เป็นข้อมูลที่สนับสนุนสมมุติฐานว่าไม่มีอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างเซลล์โพรไบโอติก *L. casei*-01 กับกลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งเป็นวัสดุที่ใช้ขึ้นรูปฟิล์ม หมายความว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกเมื่อเติมเซลล์โพรไบโอติก *L. casei*-01 สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (Odila Pereira *et al.*, 2016) ที่รายงานว่าไม่มีอันตรกิริยาระหว่างเซลล์กับวัสดุที่ใช้ขึ้นรูปฟิล์ม

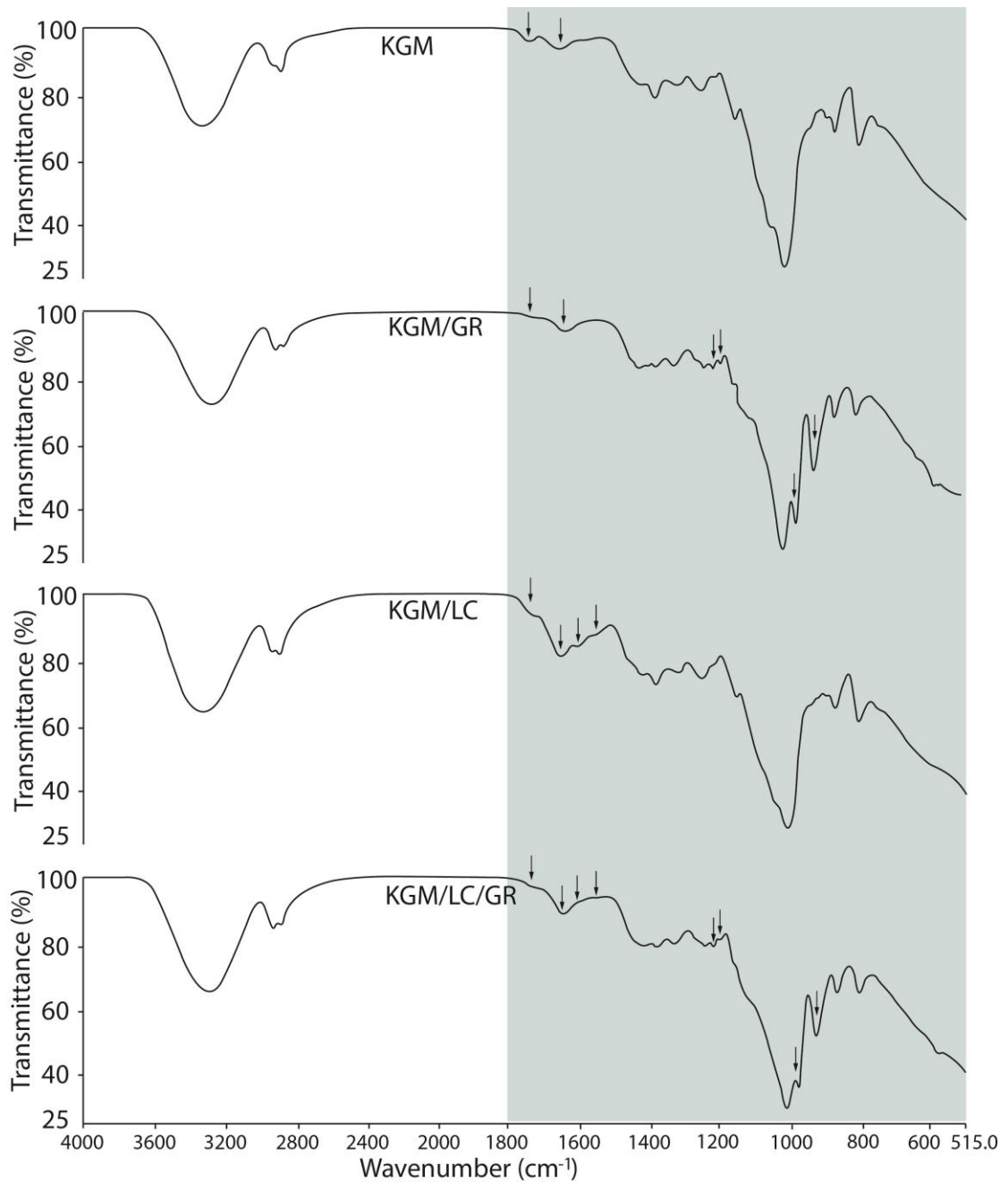
เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมระหว่างฟิล์มที่เติมพรีไบโอติก Orafti[®]GR กับฟิล์มที่ไม่เติมพรีไบโอติก Orafti[®]GR พบว่าการเติมพรีไบโอติก Orafti[®]GR ทำให้เกิด absorption band ปรากฏเพิ่มขึ้นที่ 986.02 และ 933.80 cm^{-1} ในฟิล์มกลูโคแมนแนนของบุกที่เติม Orafti[®]GR และมี absorption band ปรากฏเพิ่มในฟิล์มกลูโคแมนแนนที่มี *L. casei*-01 และเติม Orafti[®]GR ที่ wavenumber 988.06 และ 934.72 cm^{-1} ซึ่งเกิดจาก β (OH) และ α -glucose residue ในสายโซ่ของอิโนลินจาก Orafti[®]GR การเติมพรีไบโอติก Orafti[®]GR ทำให้ absorption peak ของหมู่คาร์บอนิล -C=O เปลี่ยนแปลงไปในสเปกตรัมของฟิล์ม ได้แก่ absorption peak ที่ 1725.27 cm^{-1} มี %Transmittance สูงขึ้นหรือมีสัญญาณอ่อนลงในสเปกตรัมของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติมพรีไบโอติก และ absorption peak ที่ 1719.49 cm^{-1} มี %Transmittance สูงขึ้นหรือมีสัญญาณอ่อนลงในสเปกตรัมของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และเติมพรีไบโอติก การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแสดงถึงการมีอันตรกิริยาดัวยพันธะไฮโดรเจน (Tripetch *et al.*, 2016) ระหว่างกลูโคแมนแนนของผงบุกและพรีไบโอติก

ตารางที่ 4.6 FT-IR characteristic absorption band ของฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกสูตรต่างๆ

Assignment*	สูตรฟิล์ม/Absorption band (cm ⁻¹)			
	KGM	KGM/GR	KGM/LC	KGM/LC/GR
-OH, intermolecular H-bonds	3337.01	3292.15	3308.21	3291.97
C-H of methyl, -CH ₂ , -CH ₃	-	2929.38	2925.21	2930.03
	2882.62	2882.28	2883.53	2885.51
C=O	1725.27	**	1719.49	**
Water	1643.63	1639.45	1643.15	1643.99
Amide	-	-	1596.49	1544.31
-CH, -OH	1416.49	1429.10	1411.42	1417.59
-CH-	1374.80	1381.43	1374.39	1379.65
	1308.14	1329.52	1312.12	1329.83
-CH ₂ OH, C(=O)O	1245.08	1242.19	1243.39	1243.24
β(OH)	-	1218.83	-	1219.38
	-	1196.44	-	1198.01
C-O	1149.39	1160.82	1147.45	-
	1019.45	1024.13	1022.64	1023.78
α-D-glucose residue in inulin chain	-	986.02	-	988.06
	-	933.80	-	934.72
mannose, anomeric bending (C1-H), ring vibration (2-ketofuranose)	894.80	***	895.93	***
	872.55	872.98	871.26	873.03
	806.85	813.76	807.75	812.12
	-	592.04	-	591.68

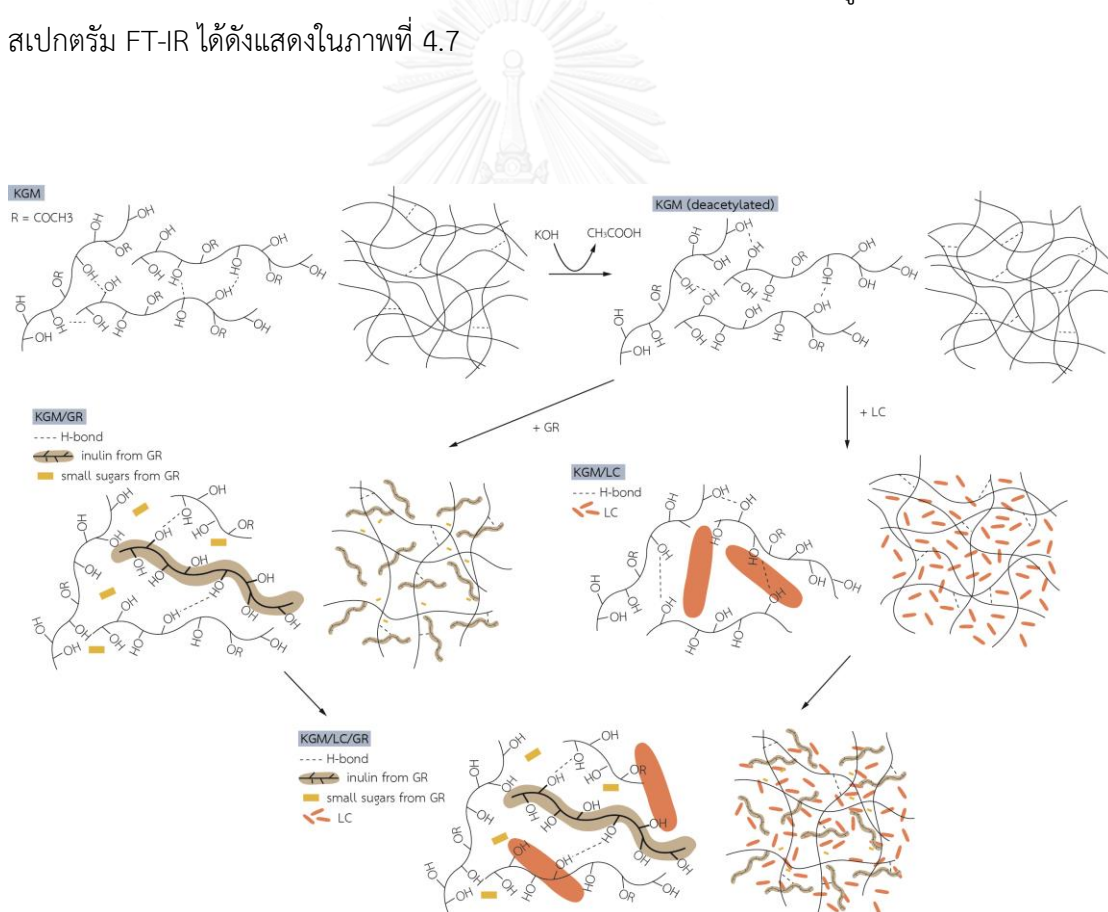
*Abou-Arab *et al.* (2011), Widjanarko *et al.* (2011), Wu *et al.* (2012) และ Melanie *et al.* (2015)

ปรากฏพีกเล็กมาก, *เกิดพีกแต่โดนบังด้วยพีกข้างเคียง



ภาพที่ 4.6 FT-IR spectrum ของฟิล์มบริโกลได้จากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่มีสูตรแตกต่างกัน (ก) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM), (ข) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม Orafiti[®] GR (KGM/GR), (ค) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC), และ (ง) ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafiti[®] GR (KGM/LC/GR) ส่วนที่แรเงาคือส่วนที่มีความแตกต่างกัน

นอกจากนี้พบว่าฟิล์มที่เติมพรีไบโอติก Orafti® GR ทั้งที่มีและไม่มีจุลินทรีย์ *L. casei*-01 พบว่า absorption band ของ intermolecular H-bond เลื่อนตำแหน่งไปสู่ wavenumber ต่ำลง จาก 3337.01 ไปเป็น 3292.15 cm^{-1} ในฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafti® GR และเลื่อนลงจาก wavenumber 3308.21 ไปเป็น 3291.97 cm^{-1} ในฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และเติม Orafti® GR แสดงว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนกันระหว่างโมเลกุลของกลูโคแมนแนนและโมเลกุลของอินูลิน (Wu *et al.*, 2012) จาก Orafti® GR อย่างไรก็ตามนอกจากอินูลินที่เป็นองค์ประกอบหลักของ Orafti® GR ยังมีน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆด้วย ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆเหล่านี้มีบทบาทเป็นพลาสติไซเซอร์ที่ไปลดอันตรกิริยาภายในโครงสร้างของฟิล์มที่อาจเกิดขึ้นดังที่กล่าวมาข้างต้นด้วยจึงทำให้ความแข็งแรงของโครงสร้างฟิล์มลดลงดังที่พบในข้อที่ 4.3.4 ดังนั้นสรุปโครงสร้างของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ที่อาจเป็นไปได้โดยพิจารณาจากข้อมูลภาพถ่าย SEM และสเปกตรัม FT-IR ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 สรุปโครงสร้างของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ที่อาจเป็นไปได้โดยพิจารณาจากข้อมูลภาพถ่าย SEM และสเปกตรัม FT-IR

สำหรับกลีเซอรอลที่เติมลงในฟิล์มทุกสูตรเพื่อทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ไม่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลไม่ได้สร้างพันธะโคเวเลนต์กับพอลิเมอร์และองค์ประกอบอื่นๆของฟิล์ม การทำงานของกลีเซอรอลเกิดขึ้นจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของโมเลกุลกลีเซอรอลสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่หมู่คาร์บอนิลและไฮดรอกซิลโมเลกุลของกลีเซอรอลซึ่งมีขนาดเล็กจะช่วยลด glass transition temperature และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล เพื่อให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นขึ้น (Rhim and Wang, 2013)

4.4 ตรวจวัดปริมาณโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในฟิล์มกลูโคแมนแนนระหว่างการเก็บรักษา

เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบ่งชี้ถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เสริมโพรไบโอติก ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่ำกว่าที่เกณฑ์กำหนดไว้แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นไม่สามารถให้ผลเชิงสุขภาพจากโพรไบโอติกได้ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดอายุของผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ด้วย การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเฉพาะก่อนและหลังผ่านการขึ้นรูปฟิล์มในข้อ 4.2.1 อาจไม่เพียงพอสำหรับเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ฟิล์ม เช่น ควรนำฟิล์มไปใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีอายุยาวหรือสั้น ฟิล์มที่พัฒนาได้สามารถใช้เป็นตัวกลางในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้หรือไม่ เป็นต้น ดังนั้นทดลองนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาว่าฟิล์มที่เติมโพรไบโอติก *L. casei*-01 ทั้งสูตรที่เติมและไม่เติมโพรไบโอติก Orafiti® GR จะมีการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ได้มากน้อยเพียงใดและสามารถเก็บรักษาได้นานเท่าไร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของฟิล์มชนิดนี้สำหรับการประยุกต์ใช้ต่อไป

จากตารางที่ 4.7 ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 ทั้งสองสูตร คือ สูตรที่ไม่เติม Orafiti® GR (KGM/LC) และสูตรที่เติม Orafiti® GR (KGM/LC/GR) มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตลดลงตามระยะเวลาของการเก็บรักษาฟิล์ม จากปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มต้นหลังการขึ้นรูปฟิล์มในฟิล์มทั้งสองสูตรมีค่าประมาณ 9 log CFU/g ฟิล์ม และจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตลดลงต่ำกว่าที่เกณฑ์กำหนด (< 6 log CFU/g) เมื่อเก็บฟิล์มทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 4 วัน

ตารางที่ 4.7 *L. casei*-01 ที่มีชีวิตในฟิล์มเกลือโคแมนแนนที่เติมและไม่เติม Oraffi® GR ระหว่างการเก็บรักษา 8 วัน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

สูตรฟิล์ม*	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (logCFU/mL FFS)	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในฟิล์ม (logCFU/g ฟิล์ม)	Log (N/N ₀)	% การรอดชีวิต
KGM/LC				
ก่อนขึ้นรูปฟิล์ม	9.02 ± 0.08 ^f	-	0.00 ± 0.00 ^{fi}	100.00 ± 0.00 ^{fh}
หลังขึ้นรูปฟิล์ม (วันที่ 0)	7.33 ± 0.13 ^e	9.22 ± 0.14 ^e	-1.68 ± 0.21 ^{eh}	81.37 ± 2.18 ^{eg}
วันที่ 1	6.11 ± 0.06 ^d	7.96 ± 0.04 ^d	-2.91 ± 0.14 ^{dfg}	67.74 ± 1.29 ^{def}
วันที่ 2	5.81 ± 0.23 ^d	7.65 ± 0.22 ^d	-3.21 ± 0.16 ^{defg}	64.42 ± 2.03 ^{dde}
วันที่ 3	5.93 ± 0.63 ^d	7.76 ± 0.62 ^d	-3.08 ± 0.56 ^{defg}	65.80 ± 6.46 ^{cdef}
วันที่ 4	4.91 ± 0.35 ^c	6.74 ± 0.36 ^c	-4.10 ± 0.42 ^{cd}	54.51 ± 4.30 ^{cc}
วันที่ 6	2.09 ± 0.15 ^b	3.91 ± 0.15 ^b	-6.93 ± 0.11 ^{bbc}	23.12 ± 1.49 ^{ba}
วันที่ 8	1.51 ± 0.03 ^a	3.33 ± 0.04 ^a	-7.50 ± 0.11 ^{aab}	16.76 ± 0.48 ^{aA}
KGM/LC/GR				
ก่อนขึ้นรูปฟิล์ม	9.40 ± 0.10 ^f	-	0.00 ± 0.00 ^{fi}	100.00 ± 0.00 ^{fh}
หลังขึ้นรูปฟิล์ม (วันที่ 0)	7.40 ± 0.04 ^e	9.00 ± 0.04 ^e	-2.00 ± 0.07 ^{eh}	78.75 ± 0.56 ^{eg}
วันที่ 1	6.51 ± 0.69 ^d	8.12 ± 0.69 ^{de}	-2.88 ± 0.74 ^{dfe}	69.35 ± 7.73 ^{def}
วันที่ 2	6.77 ± 0.03 ^{de}	8.37 ± 0.03 ^{de}	-2.63 ± 0.12 ^{dfe}	71.99 ± 0.96 ^{def}
วันที่ 3	5.98 ± 0.42 ^{cd}	7.58 ± 0.42 ^{cd}	-3.42 ± 0.34 ^{cdef}	63.61 ± 3.91 ^{cde}
วันที่ 4	5.55 ± 0.76 ^c	7.15 ± 0.76 ^c	-3.85 ± 0.77 ^{cde}	59.05 ± 8.14 ^{cd}
วันที่ 6	3.07 ± 0.11 ^b	4.67 ± 0.67 ^b	-6.33 ± 0.59 ^{bc}	32.65 ± 6.87 ^{bb}
วันที่ 8	1.56 ± 0.03 ^a	3.16 ± 0.03 ^a	-7.84 ± 0.07 ^{aA}	16.56 ± 0.14 ^{aA}

ค่าที่แสดงในตารางอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่มีอักษรตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันและฟิล์มชนิดเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ค่าที่มีอักษรตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

*KGM/LC = ฟิล์มเกลือโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01. KGM/LC/GR = ฟิล์มเกลือโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Oraffi® GR

แสดงว่าฟิล์มที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้มีอายุการเก็บสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มชนิดอื่น (Kanmani and Lim, 2013; López de Lacey *et al.*, 2014; Odila Pereira *et al.*, 2016; Piermaria *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2014) และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ จุลินทรีย์ระหว่างฟิล์มสองชนิดนี้พบว่า การเติม Orafiti[®] GR ไม่ได้ช่วยให้การรอดชีวิตของ *L. casei*-01 ในฟิล์มดีขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในฟิล์มที่เตรียมได้ในการทดลองนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ ไม่สามารถปรับตัวกับสภาวะความเครียดทั้งระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มและระหว่างการเก็บรักษาฟิล์ม การทำพรีทรีตเมนต์จุลินทรีย์ด้วยสภาวะความเครียดสามารถช่วยให้จุลินทรีย์ได้ปรับตัวได้และมีการ รอดชีวิตได้นานขึ้น (Kang *et al.*, 2015; Paéz *et al.*, 2012) โดยงานวิจัยของ Prasad *et al.* (2003) แสดงให้เห็นว่า *L. rhamnosus* HN001 (หรือ DR20) มีความสามารถในการทนต่อ ความเครียดจากออสโมติกและความร้อนได้ดีหากได้รับ osmotic shock หรือ heat shock มาก่อน

4.5 การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบความเป็นไปได้ของการนำฟิล์มชนิดนี้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร จากข้อมูลสมบัติของฟิล์มและการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในข้อ 4.3 และ 4.4 ทำให้ทราบแนวทางการประยุกต์ใช้ฟิล์ม เนื่องจากฟิล์มนี้มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็น องค์ประกอบดังนั้นสิ่งที่ควรคำนึงเสมอ คือ ฟิล์มชนิดนี้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารที่ต้อง ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงเป็นเวลานานอีก เช่น ทอด ชงด้วยน้ำร้อน อบ เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยนี้เลือกโมเดลอาหารเป็นขนมปังโดยประยุกต์ใช้ฟิล์มชนิดนี้ไปใช้กับอาหารในรูปแบบ สารเคลือบที่ผิวของขนมปัง เนื่องจากขนมปังนอกจากเป็นอาหารหลักแล้วยังปรากฏในเมนูอาหารว่าง ขนม อาหารจานด่วน และขนมปังสำเร็จรูปตามร้านสะดวกซื้อ เป็นอาหารที่รับประทานง่ายเนื่องจาก มีเนื้อสัมผัสนุ่มและไม่เหนียวจึงบริโภคได้ทุกวัยตั้งแต่เด็กจนถึงผู้สูงอายุ ขนมปังจึงเป็นช่องทางที่ทำให้ คนทั่วไปได้รับโพรไบโอติกได้ง่าย นอกจากนี้ขนมปังยังมีศักยภาพพัฒนาเป็นอาหารสุขภาพได้ด้วย เช่น ขนมปังเสริมธัญพืช ขนมปังสอดไส้ธัญพืช เป็นต้น

จากตารางที่ 4.8 แสดงสมบัติของขนมปังที่ไม่เคลือบฟิล์มกลูโคแมนแนน (กลุ่มควบคุม) และ ขนมปังเคลือบฟิล์มกลูโคแมนแนนสูตรแตกต่างกันระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน น้ำหนัก ของขนมปังไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 7 ในทุกทรีตเมนต์ โดยมีน้ำหนัก อยู่ในช่วง 40.30 – 41.43 กรัม/ชิ้น ระหว่างการเก็บรักษาพบราเจริญบนขนมปังในทุกทรีตเมนต์ ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเก็บรักษา ยกเว้นขนมปังที่เคลือบด้วยกลูโคแมนแนนที่เติมเฉพาะ *L. casei*-01 และเมื่อเก็บครบ 7 วันพบราเจริญบนขนมปังในทุกทรีตเมนต์ (ภาคผนวก ฉ ภาพที่ ๑3) แสดงว่าขนม ปังที่เตรียมในการทดลองนี้มีอายุการเก็บไม่เกิน 5 วัน

ตารางที่ 4.8 น้ำหนักขนมปัง, water activity และการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ระหว่างการรักษาเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน

ไม่เค็บบ	น้ำหนักขนมปัง (g/portion)	Water activity (a _w)	จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (log CFU/portion)	% การมีชีวิต	รายงานปัง
ไม่เค็บบ					
ก่อนอบแห้ง					
วันที่ 0	40.99 ± 0.29 ^a	0.979 ± 0.010 ^f	-	-	-
วันที่ 3	40.64 ± 0.63 ^a	0.950 ± 0.013 ^{bcd}	-	-	-
วันที่ 5	40.80 ± 0.76 ^a	0.940 ± 0.006 ^{abcde}	-	-	✓
วันที่ 7	40.34 ± 0.47 ^a	0.936 ± 0.008 ^{abcd}	-	-	✓
KGM					
ก่อนอบแห้ง					
วันที่ 0	40.47 ± 0.13 ^a	0.925 ± 0.030 ^{ab}	-	-	-
วันที่ 3	40.31 ± 0.20 ^a	0.934 ± 0.008 ^{abc}	-	-	-
วันที่ 5	40.75 ± 0.15 ^a	0.942 ± 0.004 ^{abcde}	-	-	✓
วันที่ 7	40.45 ± 0.46 ^a	0.931 ± 0.004 ^{ab}	-	-	✓
KGM/LC					
ก่อนอบแห้ง					
วันที่ 0	41.08 ± 0.12 ^a	0.958 ± 0.020 ^{cdef}	10.40 ± 0.01 ^{db}	100.00 ± 0.00 ^{db}	-
วันที่ 3	41.08 ± 0.36 ^a	0.960 ± 0.007 ^{def}	10.28 ± 0.03 ^{db}	98.82 ± 0.18 ^{db}	-
วันที่ 5	42.64 ± 2.08 ^b	0.943 ± 0.003 ^{abcde}	7.82 ± 0.49 ^{abA}	75.26 ± 4.78 ^{abA}	-
วันที่ 7	40.30 ± 1.09 ^a	0.923 ± 0.017 ^a	8.19 ± 0.06 ^{abA}	78.83 ± 0.61 ^{abA}	-
KGM/LC/GR					
ก่อนอบแห้ง					
วันที่ 0	40.68 ± 0.16 ^a	0.961 ± 0.019 ^{ef}	10.43 ± 0.01 ^{dc}	100.00 ± 0.00 ^{dc}	-
วันที่ 3	40.96 ± 0.57 ^a	0.949 ± 0.006 ^{bcd}	10.24 ± 0.08 ^{dc}	98.16 ± 0.71 ^{dc}	-
วันที่ 5	41.43 ± 0.29 ^a	0.939 ± 0.004 ^{abcde}	9.22 ± 0.74 ^{cb}	88.34 ± 7.01 ^{cb}	-
วันที่ 7	40.40 ± 0.29 ^a	0.926 ± 0.005 ^{ab}	8.53 ± 0.09 ^{ba}	81.86 ± 0.89 ^{bca}	✓
			8.19 ± 0.10 ^{abA}	78.50 ± 0.89 ^{abA}	✓

ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่มีอักษรตัวพิมพ์เล็กเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่าที่มีอักษรตัวพิมพ์ใหญ่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

พิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในก่อนและหลังกระบวนการเคลือบฟิล์มบนผิวขนมปัง พบว่ากระบวนการเคลือบฟิล์มบนผิวขนมปังที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 25 นาที ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับเคลือบขนมปังทั้งสองสูตรลดลง โดยมีปริมาณลดลงจาก 10.40 เป็น 10.28 log CFU/ชิ้น (ลดลงประมาณ 0.12 log CFU/ชิ้น) ในขนมปังที่เคลือบฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) และลดลงจาก 10.43 เป็น 10.24 log CFU/ชิ้น ในขนมปังที่เคลือบฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และเติม Orafit[®] GR (ลดลงประมาณ 0.19 log CFU/ชิ้น) เนื่องจากกระบวนการทำแห้งสารเคลือบด้วยการพาคความร้อนทำให้การมีชีวิตของจุลินทรีย์ลดลง ความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์และทำให้เมมเบรนของเซลล์สูญเสียการทำงาน (Desmond *et al.*, 2004; Fu and Chen, 2011) ผลการทดลองของงานวิจัยนี้สอดคล้องกันกับการเคลือบฟิล์มโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) และฟิล์มโซเดียมอัลจิเนต/เวย์โปรตีนเข้มข้น (whey protein concentrate) ซึ่งใช้กระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิเดียวกัน (60 °C) แต่ใช้เวลาทำแห้งน้อยกว่า (10 นาที) (Soukoulis *et al.*, 2014b)

พิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาขนมปังจากตารางที่ 4.10 ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในวันที่ 0 ของขนมปังที่เคลือบฟิล์มทั้งสองสูตร คือ สูตรสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) และสูตรสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และเติม Orafit[®] GR (KGM/LC/GR) มีปริมาณไม่แตกต่างกัน จากนั้นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะลดลงตามระยะเวลาของการเก็บรักษา โดยในวันที่ 7 จุลินทรีย์ที่มีชีวิตของขนมปังทั้งสองกลุ่มลดลงมากกว่า 2 log CFU/ชิ้น และขนมปังที่เคลือบกลูโคแมนแนนที่เติมเฉพาะ *L. casei*-01 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือน้อยกว่า (7.70 ± 0.99 log CFU/ชิ้น) เนื่องจากในระหว่างการเก็บรักษานี้โปรไบโอติกสัมผัสกับความเครียดทั้งจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (เช่น ออกซิเจน) และความเครียดจากอาหารและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอาหาร (เช่น การเสื่อมคุณภาพของขนมปัง (bread staling), การถ่ายโอนความชื้น) (Soukoulis *et al.*, 2014b) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรไบโอติกในสารเคลือบทั้งสองชนิดอยู่ในระดับสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด แม้ว่าสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติมทั้ง *L. casei*-01 และ Orafit[®] GR มีปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติมเฉพาะ *L. casei*-01 หรือกล่าวได้ว่าการเติมโปรไบโอติกไม่ช่วยให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกในฟิล์มกลูโคแมนแนนในระหว่างการเก็บขนมปังดีขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของจำนวน *L. casei*-01 ที่มีชีวิตในฟิล์มในข้อที่ 4.4 กับการลดลงของจำนวน *L. casei*-01 ที่มีชีวิตในสารเคลือบบนผิวขนมปังในข้อ 4.5 จะเห็นได้ว่า *L. casei*-01 ในสารเคลือบบนผิวขนมปังมีอัตราการลดจำนวนลงต่ำกว่า สาเหตุมาจากสิ่งที่แตกต่างกันของ 2 การทดลองนี้ คือ ขนมปัง จากตารางที่ 4.8 พบว่าค่า water activity ของขนมปัง (เป็นค่าที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างขนมปังทั้งชิ้น) ระหว่างการเก็บรักษานาน 7 วัน อยู่ในช่วง 0.926-0.979 แนวโน้มมีการลดลง

เล็กน้อยระหว่างการเก็บรักษา ค่า water activity แสดงให้เห็นว่าขนมปังมีความเหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ($a_w > 0.91$) จึงทำให้การรอดชีวิตของ *L. casei*-01 ตลอดการเก็บรักษาขนมปังค่อยๆลดลงไม่เหมือนกับกรณีของ *L. casei*-01 ที่ในฟิล์มที่เก็บรักษาในรูปแบบแผ่น โดยงานวิจัยของ Soukoulis *et al.* (2014b) อธิบายว่าในระหว่างการเก็บรักษาขนมปังนาน 7 วัน ขนมปังจะมี water activity เพิ่มขึ้นจาก 0.85 ไปเป็น 0.95 และมีความชื้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่ เนื้อขนมปังจะมี water activity ลดลงเล็กน้อยจาก 0.97 ไปเป็น 0.96 และมีความชื้นลดลง แสดงถึงการถ่ายโอนมวลของไอน้ำระหว่างเนื้อขนมปังและผิวขนมปังทำให้สภาวะมีความเหมาะสมกับการรอดชีวิตของโพรไบโอติกมากขึ้น จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ *L. casei*-01 ในสารเคลือบขนมปังมีการรอดชีวิตได้ดีกว่าในฟิล์มที่เป็นแผ่นทั้งที่เป็นสูตรฟิล์มชนิดเดียวกัน

ตารางที่ 4.9 สีของผิวขนมปังที่เคลือบด้วยสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่มีสูตรแตกต่างกันและขนมปังที่ไม่มีการเคลือบด้วยฟิล์ม

สูตรสารเคลือบ	สีของผิวขนมปัง			
	L^*	a^*	b^*	ΔE
ไม่เคลือบ	66.45 ± 0.53^a	-10.11 ± 1.12^a	26.43 ± 1.25^a	-
KGM	66.58 ± 0.26^a	-9.77 ± 0.62^a	25.17 ± 1.12^a	2.28 ± 0.68^a
KGM/LC	67.21 ± 0.31^a	-9.82 ± 0.43^a	25.79 ± 0.49^a	2.06 ± 0.45^a
KGM/LC/GR	67.20 ± 0.53^a	-9.56 ± 0.33^a	25.57 ± 0.69^a	2.27 ± 0.09^a

ค่าที่แสดงในตารางอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.10 ผลการสำรวจเบื้องต้นของความพอใจของผู้บริโภคต่อลักษณะปรากฏและกลิ่นของขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafiti[®] GR เปรียบเทียบกับขนมปังที่ไม่มีสารเคลือบ

กลุ่มทดสอบ	ลักษณะของขนมปัง	
	ลักษณะปรากฏ	กลิ่น
ไม่เคลือบ	6.50 ± 1.65	6.57 ± 1.45
KGM/LC/GR	7.07 ± 1.07	6.79 ± 1.05

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสีของสารเคลือบต่อสีของขนมปังในตารางที่ 4.9 พบว่าสารเคลือบทุกสูตรไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผิวขนมปังทั้งค่า L^* , a^* และ b^* ส่วนค่าความแตกต่างของ

สี (ΔE) ของขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนทุกสูตรมีค่าน้อยกว่า 3 แสดงว่าผู้บริโภคไม่สามารถแยกแยะสีที่แตกต่างกันได้ระหว่างสีของขนมปังที่ไม่มีสารเคลือบกับสีของขนมปังที่มีสารเคลือบ เนื่องจากสมบัติของฟิล์มที่มีความโปร่งแสงที่ได้อธิบายแล้วในข้อที่ 4.3.1 ผลจากการตรวจสอบด้วยเครื่องมือนี้สอดคล้องกันกับผลการสำรวจความพอใจของผู้บริโภคต่อลักษณะปรากฏและกลิ่นของขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR เปรียบเทียบกับขนมปังที่ไม่มีสารเคลือบ (ผลการสำรวจเบื้องต้นจากจำนวนผู้เข้าร่วมการสำรวจ 14 คนแสดงในตารางที่ 4.10) โดยใช้สเกลแบบ 9-point hedonic scale พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความพอใจต่อลักษณะปรากฏและกลิ่นของขนมปังที่มีสารเคลือบและไม่มีสารเคลือบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยผู้บริโภคให้คะแนน "ชอบเล็กน้อย" ต่อลักษณะปรากฏและกลิ่นของขนมปังทั้งแบบที่ไม่มีสารเคลือบและแบบที่มีสารเคลือบ *L. casei*-01 และ Orafti® GR ยกเว้นลักษณะปรากฏของขนมปังที่มีสารเคลือบที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ที่ผู้บริโภคให้คะแนน "ชอบปานกลาง" (7.07 ± 1.07) อย่างไรก็ตามเนื่องจากจำนวนผู้เข้าร่วมการประเมินมีค่าน้อยกว่า 30 คน จึงไม่เพียงพอที่จะตัดสินใจได้ในการทดลองนี้ว่าผู้บริโภคจะยอมรับขนมปังที่มีสารเคลือบ จากผลการทดลองนี้บอกได้เพียงว่ามีความเป็นไปได้ที่ผู้บริโภคอาจจะยอมรับขนมปังที่มีสารเคลือบเท่านั้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาซินไบโอติก โดยจับคู่โพรไบโอติกทางการค้า 3 สายพันธุ์ (*L. casei*-01, *L. paracasei* และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12) กับโพรไบโอติกทางการค้า 4 ชนิด (Orafti® P95, Orafti® GR, Orafti® HSI และ Oligomate® 55N) และกลูโคแมนแนนเพื่อหาคู่ที่มีศักยภาพจากค่า prebiotic activity score จากการทดสอบความสามารถในการใช้โพรไบโอติกของโพรไบโอติก พบว่าคู่ของ *L. casei*-01 กับ Orafti® GR ให้ค่า prebiotic activity score สูงที่สุด และพบว่ากลูโคแมนแนนของผงบุกซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) สามารถส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกทั้งสามสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยช่วยให้ *L. paracasei* เจริญได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกคู่ซินไบโอติกทั้งสองคู่นี้มาพัฒนาฟิล์มในขั้นต่อไป

เมื่อนำคู่ซินไบโอติกที่คัดเลือกมาเติมลงในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มแล้วทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 16 ชั่วโมง พบว่าคู่ของ *L. casei*-01 กับ Orafti® GR มีความเหมาะสมต่อการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสูง ($78.75 \pm 0.56\%$) โดยกระบวนการทำแห้งทำให้ปริมาณ *L. casei*-01 ลดลงประมาณ 2 log cycle อย่างไรก็ตามความเข้มข้นสุดท้ายของ *L. casei*-01 ในฟิล์มมีค่า 9.02 ± 0.04 logCFU/g film (มากกว่า 6 logCFU/g ซึ่งเป็นเกณฑ์ขั้นต่ำของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ควรมีอยู่ในผลิตภัณฑ์) เมื่อพิจารณาทั้งค่า prebiotic activity score และอัตราการรอดชีวิตร่วมกันทำให้ *L. casei*-01 และ Orafti® GR มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาฟิล์มเพื่อศึกษาสมบัติและศึกษาการประยุกต์ใช้ในอาหารต่อไป

การวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มพบว่าฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ไม่มีสี มีความโปร่งแสง สามารถต้านทานแรงดึงได้ดี มีความสามารถในการละลายน้ำสูง มีศักยภาพต่อการพัฒนาต่อไปเพื่อเป็นบรรจุภัณฑ์ สารเคลือบ หรือฟิล์มบิโอบคได้เพื่อเสริมคุณค่าทางสุขภาพและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

เมื่อเก็บรักษาฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR ในรูปแบบแผ่นที่อุณหภูมิห้องโดยมีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/g ฟิล์ม พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตลดลงต่ำกว่าที่เกณฑ์กำหนด (น้อยกว่า 6 log CFU/g ฟิล์ม) เมื่อเก็บฟิล์มนานเกิน 4 วัน ดังนั้นฟิล์มที่พัฒนาได้มีความเหมาะสมในการใช้ร่วมกับกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารที่มีอายุการเก็บสั้น และต้องไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนอีก

เมื่อประยุกต์ใช้ฟิล์มในรูปแบบสารเคลือบบนผิวขนมปังพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะลดลงประมาณ $2 \log\text{CFU/ชิ้น}$ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา 7 วัน (จากปริมาณเริ่มต้นในวันที่ 0 ประมาณ $10.24 \log\text{CFU/ชิ้น}$ เหลือประมาณ $8.19 \log\text{CFU/ชิ้น}$) ทำให้ปริมาณของ *L. casei*-01 ที่มีชีวิตยังคงมีค่ามากกว่า $6 \log\text{CFU/ชิ้น}$ แม้ว่าขนมปังจะมีราขึ้นแล้วก็ตาม สำหรับการยอมรับจากผู้บริโภคนั้น ด้วยสมบัติเชิงเคมี กายภาพ และสมบัติเชิงกลของฟิล์ม รวมทั้งผลการสำรวจเบื้องต้นพบว่าผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะยอมรับฟิล์มสูตรนี้ ดังนั้นฟิล์มบริโภคได้ที่มีสมบัติขึ้นไบโอติกจากกลูโคแมนแนนของผงบุกจึงอาจเป็นแนวทางลดข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ฟิล์มในผลิตภัณฑ์อาหารและเพื่อให้คนทั่วไปมีทางเลือกหลากหลายในการรับประทานโพรไบโอติกและพรีไบโอติกในชีวิตประจำวัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มหรือสารเคลือบและระหว่างการเก็บรักษาสามารถปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดยการทำพรีทรีตเมนต์ซึ่งเป็นขั้นตอนให้ความเครียดทั้งออกซิเดติกและความร้อนแก่จุลินทรีย์โดยที่ยังไม่ทำให้จุลินทรีย์ตายก่อนนำมาใช้เตรียมฟิล์ม เพื่อให้จุลินทรีย์ปรับตัวต่อสภาวะดังกล่าวได้ดีขึ้น ปรับองค์ประกอบในสูตรฟิล์ม เช่น การเติมสารป้องกันกลุ่ม thermoprotectant การเติมสารทำลายอนุมูลอิสระ เป็นต้น และปรับกระบวนการขึ้นรูปฟิล์มทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุด หากจุลินทรีย์มีการรอดชีวิตยาวนานขึ้นอายุการเก็บของฟิล์มก็จะมากขึ้นด้วย สามารถใช้ฟิล์มเป็นตัวกลางเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง นำไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่มีอายุยาวนานขึ้น หรืออาจนำไปเคลือบบรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้งที่ใส่อาหารเย็น (เช่น แก้วใส่เครื่องดื่มเย็น ถ้วยใส่ซีเรียล เมื่อใส่อาหารที่เป็นของเหลวจะมีการปลดปล่อยจุลินทรีย์ออกมาจากฟิล์ม)

5.2.2 จากผลการศึกษาอายุการเก็บของฟิล์มในรูปแบบแผ่นที่พบว่าจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 4 วัน อาจปรับรูปแบบผลิตภัณฑ์โดยเคลือบฟิล์มด้วยวัสดุที่ช่วยปกป้องเซลล์ทับฟิล์มอีกชั้น หรือเปลี่ยนให้อยู่รูปผลิตภัณฑ์เป็นผงพร้อมชงด้วยน้ำประกอบด้วยจุลินทรีย์แบบเอนแคปซูลชันเป็นผงแห้ง พรีไบโอติกในรูปแบบผง และกลูโคแมนแนนของในรูปแบบผง

5.2.3 การวิจัยเพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มและการยอมรับจากผู้บริโภค การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาด้านอื่นๆของฟิล์มระหว่างการเก็บรักษาก่อนนำฟิล์มบริโภคได้ออกสู่ตลาด

รายการอ้างอิง

- Abou-Arab, A. A., A.Talaat, H. and Abu-Salem, F. M., 2011. Physico-chemical properties of inulin produced from Jerusalem artichoke tubers on bench and pilot plant scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5: 1297-1309.
- Adebowale, A. A., Olatunde, O. O., Adegunwa, M. O., Asiru, W. B. and Sanni, L. O., 2014. Mechanical and sensorial characteristics of cassava and yam composite starch films. *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 1994-1998.
- Ahn, Y. T., Lim, K. L., Ryu, J. C., Kang, D. K., Ham, J. S., Jang, Y. H. and Kim, H. U., 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15: 1790-1797.
- Al-Ghazzewi, F. H., Khanna, S., Tester, R. F. and Piggott, J., 2007. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1758-1766.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M. and Hassan, F. A., 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* 5: 1542-1553.
- Alles, M. S., Hautvast, J. G. A. J., Nagengast, F. M., Hartemink, R., Van Laere, K. M. J. and Jansen, J. B. M. J., 2007. Fate of fructo-oligosaccharides in the human intestine. *British Journal of Nutrition* 76: 211-221.
- Amara, A. A. and Shibl, A., 2015. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23: 107-114.
- Andersen, J. M., Abou Hachem, M., Svensson, B., Barrangou, R. and Klaenhammer, T., 2017. A snapshot into the uptake and utilization of potential oligosaccharide prebiotics by probiotic lactobacilli and bifidobacteria as accessed by transcriptomics, functional genomics, and recombinant protein characterization. Department of Systems Biology, Technical University of Denmark.

- Antosova, M. and Polakovic, M., 2001. Fructosyltransferases: The enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides. *Chemical Papers* 55: 350-358.
- Ashraf, R. and Shah, N. P., 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *International Journal of Food Microbiology* 149: 194-208.
- ASTM, 2003. Annual book of ASTM standards: Pennsylvania: American Society for Testing and Materials.
- ASTM, 2001. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In Standard designations D 882: Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Atlas, R. M., 2010. Handbook of microbiological media. Washington, D.C.: CRC Press.
- Behera, S. S. and Ray, R. C., 2016a. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide of *Amorphophallus konjac* K. Koch in health care. *International Journal of Biological Macromolecules* 92: 942-956.
- Behera, S. S. and Ray, R. C., 2016b. Nutritional and potential health benefits of konjac glucomannan, a promising polysaccharide of elephant foot yam, *Amorphophallus konjac* K. Koch: A review. *Food Reviews International* 33: 22-43.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juśkiewicz, J. and Wróblewska, M., 2002. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Research International* 35: 139-144.
- Botes, M., 2008. Survival of probiotic lactic acid bacteria in the intestinal tract, their adhesion to epithelial cells and their ability to compete with pathogenic microorganisms, University of Stellenbosch.
- Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15: 237-248.
- Bultosa, G., 2016. Functional foods: Dietary fibers, prebiotics, probiotics, and synbiotics. In Reference Module in Food Science: Elsevier.
- Burns, A. J. and Rowland, I. R., 2004. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells.

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 551: 233-243.

- Chaluvadi, S., Hotchkiss Jr, A. T. and Yam, K. L., 2016. Chapter 36 - Gut Microbiota: Impact of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Pharmabiotics, and Postbiotics on Human Health A2 - Watson, Ronald Ross. In Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics, ed. Victor R. Preedy, 515-523: Academic Press.
- Chambi, H. N. M. and Grosso, C. R. F., 2011. Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31: 739-746.
- 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.
- Chen, H. L., Cheng, H. C., Wu, W. T., Liu, Y. J. and Liu, S. Y., 2008. Supplementation of konjac glucomannan into a low-fiber chinese diet promoted bowel movement and improved colonic ecology in constipated adults: A placebo-controlled, diet-controlled trial. *Journal of the American College of Nutrition* 27: 102-108.
- Chen, H. L., Fan, Y. H., Chen, M. E. and Chan, Y., 2005. Unhydrolyzed and hydrolyzed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice. *Nutrition* 21: 1059-1064.
- Chiu, Y. T. and Stewart, M., 2012. Comparison of konjac glucomannan digestibility and fermentability with other dietary fibers *in vitro*. *Journal of Medicinal Food* 15: 120-125.
- Chua, M., Baldwin, T. C., Hocking, T. J. and Chan, K., 2010. Traditional uses and potential health benefits of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N.E.Br. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 268-278.
- Clemente, Jose C., Ursell, Luke K., Parfrey, Laura W. and Knight, R., 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 148: 1258-1270.

- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C. and Fuentes, R., 2011. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control* 22: 485-489.
- Conlon, M. A. and Bird, A. R., 2014. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 7: 17-44.
- Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A. and Wall-Medrano, A., 2013. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 614-628.
- Cruz-Guerrero, A., Hernandez-Sanchez, H., Rodriguez-Serrano, G., Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M. and Figueroa-Gonzalez, I., 2014. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J Sci Food Agric* 94: 2246-2252.
- de Araujo, B. V., Diniz, A., Palma, E. C., Buffe, C. and Dalla Costa, T., 2011. PK-PD modeling of beta-lactam antibiotics: in vitro or in vivo models? *J Antibiot (Tokyo)* 64: 439-446.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. and Lionetti, P., 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14691-14696.
- De Prisco, A. and Mauriello, G., 2016. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology* 48: 27-39.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. and Sikkema, J., 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20: 292-302.
- Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Ross, R. P., 2004. Improved Stress Tolerance of GroESL-Overproducing *Lactococcus lactis* and Probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5929-5936.

- Dhanapal, A., Sasikala.P, Rajamani, L., Kavitha.V, Yazhini.G and Banu, M. S., 2012. Edible film from polysaccharides. *Food Science and Quality Management* 3.
- do Espirito Santo, A. P., Perego, P., Converti, A. and Oliveira, M. N., 2011. Influence of food matrices on probiotic viability – A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science & Technology* 22: 377-385.
- Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M. and Teixeira, J. A., 2013. An Overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. *Food and Bioprocess Technology* 7: 324-337.
- Dong, Q.-Y., Chen, M.-Y., Xin, Y., Qin, X.-Y., Cheng, Z., Shi, L.-E. and Tang, Z.-X., 2013. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *International Journal of Food Science & Technology* 48: 1339-1351.
- Du, X., Li, J., Chen, J. and Li, B., 2012. Effect of degree of deacetylation on physicochemical and gelation properties of konjac glucomannan. *Food Research International* 46: 270-278.
- Erdohan, Z. Ö., Turhan, K. N., Şahmurat, F. and Ekiz, H. İ., 2011. An application of methylcellulose-whey protein films on Japanese persimmon. *African Journal of Food Science* 5: 643-649.
- Erothu, H. and Kumar, A. C., 2017. Hydrophilic polymers. In *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, eds. Raju Francis and D. Sakthi Kumar, 416. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C. and Otoni, C. G., 2016. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International* 90: 42-52.
- FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.
- Felton, L. A., 2013. Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics* 457: 423-427.
- Finamore, A., Peluso, I. and Serafini, M., 2016. Chapter 41 - Synbiotics: A new strategy to improve the immune system from the gut to peripheral sites. In *Probiotics*,

- Prebiotics, and Synbiotics, ed. Ronald Ross Watson/Victor R. Preedy, 567-574: Academic Press.
- Flint, H. J., 2012. The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews* 70: S10-S13.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P. and Duncan, S. H., 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology* 9: 577-589.
- Fu, N. and Chen, X. D., 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International* 44: 1127-1149.
- Gao, S. and Nishinari, K., 2004. Effect of deacetylation rate on gelation kinetics of konjac glucomannan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 38: 241-249.
- Garrigues, C., Stuer-Lauridsen, B. and Johansen, E., 2005. Characterisation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and other probiotic bacteria using genomics, transcriptomics and proteomics. *Australian Journal of Dairy Technology* 60: 84-92.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G. and Koutsoumanis, K. P., 2010. Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International* 43: 2402-2408.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. and Roberfroid, M. B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 17: 259-275.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412.
- Gomez, B., Miguez, B., Yanez, R. and Alonso, J. L., 2017. Manufacture and properties of glucomannans and glucomannooligosaccharides derived from konjac and other sources. *J Agric Food Chem* 65: 2019-2031.
- González-Forte, L., Bruno, E. and Martino, M., 2014. Application of coating on dog biscuits for extended survival of probiotic bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 195: 76-84.

- Greg Kelly, N. D., 2008. Inulin-type prebiotics - a review: part 1. *Alternative Medicine review* 13: 315-329.
- Han, J. H., 2014. Edible films and coatings: A review. In *Innovations in Food Packaging*, ed. Jung H. Han, 624. Tokyo, Japan: Academic Press.
- Harmayani, E., Aprilia, V. and Marsono, Y., 2014. Characterization of glucomannan from *Amorphophallus oncophyllus* and its prebiotic activity *in vivo*. *Carbohydrate Polymers* 112: 475-479.
- Huebner, J., Wehling, R. L. and Hutkins, R. W., 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal* 17: 770-775.
- Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., Gervais, P. and Beney, L., 2015. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology* 214: 17-26.
- Ibrahim, S. A. and Carr, J. P., 2006. Viability of bifidobacteria in commercial yogurt products in North Carolina during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology* 59: 272-277.
- IDF, 1999. Guideline for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. Brussels: International Dairy Federation.
- Impaprasert, R., 2017. *Amorphophallus mulleri* Blume. In *Amorphophallus mulleri* Blume.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. and Reddy, D. N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 21: 8787-8803.
- Jia, D., Fang, Y. and Yao, K., 2009. Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan-chitosan-soy protein isolate edible films. *Food and Bioproducts Processing* 87: 7-10.
- Jin, Y., Zhang, H., Yin, Y. and Nishinari, K., 2006. Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of rheology, DSC, and AFM. *Carbohydrate Research* 341: 90-99.
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J., Stuer-Lauridsen, B. and Eskesen, D., 2014. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* 2: 92-110.

- Kang, C.-H., Jeon, H., Shin, Y., Kwon, Y.-J. and So, J.-S., 2015. Heat adaptation improves viability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HE-1 after heat stress. *Food Science and Biotechnology* 24: 1823-1827.
- Kanmani, P. and Lim, S. T., 2013. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry* 141: 1041-1049.
- Khanna, S., 2003. The chemical, physical and nutritional properties of the plant polysaccharide konjac glucomannan, Glasgow Caledonian University.
- Koh, J. H., Kim, Y. J. and Park, S. W., 2015. Synbiotic food composition containing tagatose and probiotic lactic acid bacteria. In Synbiotic food composition containing tagatose and probiotic lactic acid bacteria: Google Patents.
- Kolida, S. and Gibson, G. R., 2011. Synbiotics in health and disease. *Annual Review of Food Science and Technology* 2: 373-393.
- Konar, N., Toker, O. S., Oba, S. and Sağdıç, O., 2016. Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends in Food Science & Technology* 49: 35-44.
- Kumar, H. and Salminen, S., 2016. Probiotics. In *Encyclopedia of Food and Health*, eds. Benjamin Caballero, Paul M. Finglas and Fidel Toldrá, 510-515. Oxford: Academic Press.
- Kurt, A. and Kahyaoglu, T., 2014. Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers* 104: 50-58.
- Laparra, J. M. and Sanz, Y., 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* 49: 695-701.
- Longares, A., Monahan, F. J., O'Riordan, E. D. and O'Sullivan, M., 2004. Physical properties and sensory evaluation of WPI films of varying thickness. *LWT - Food Science and Technology* 37: 545-550.
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P., 2012a. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 16: 277-282.

- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P., 2012b. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 277-282.
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E. and Montero, P., 2014. Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT - Food Science and Technology* 55: 559-564.
- Manning, T. S. and Gibson, G. R., 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18: 287-298.
- Marotti, I., Bregola, V., Aloisio, I., Di Gioia, D., Bosi, S., Di Silvestro, R., Quinn, R. and Dinelli, G., 2012. Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2133-2140.
- Martínez-Cervera, S., Salvador, A., Muguerza, B., Moulay, L. and Fiszman, S. M., 2011. Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. *LWT - Food Science and Technology* 44: 729-736.
- Mathew, S., Brahmakumar, M. and Abraham, T. E., 2006. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. *Biopolymers* 82: 176-187.
- Matsumoto, M., Ohishi, H. and Benno, Y., 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 93: 109-113.
- Matsuura, Y., 1998. Degradation of konjac glucomannan by enzymes in human feces and formation of short-chain fatty acids by intestinal anaerobic bacteria. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 44: 423-436.
- Mazzola, G., Aloisio, I., Biavati, B. and Di Gioia, D., 2015. Development of a synbiotic product for newborns and infants. *LWT - Food Science and Technology* 64: 727-734.
- McHugh, T. H., 2000. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Food / Nahrung* 44: 148-151.

- Melanie, H., Susilowati, A., Iskandar, Y. M., Lotulung, P. D. and Andayani, D. G. S., 2015. Characterization of Inulin from Local Red Dahlia (*Dahlia* sp. L) Tubers by Infrared Spectroscopy. *Procedia Chemistry* 16: 78-84.
- Mikkonen, K. S., 2009. Mannans as film formers and emulsion stabilizers. Department of Applied Chemistry and Microbiology Department of Food Technology, University of Helsinki.
- Molis, C., Flourié, B., Ouarne, F., Gailing, M. F., Lartigue, S., Guibert, A., Borner, F. and Galmiche, J. P., 1996. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 64: 324-328.
- Moore, K. E., 2011. Biological analysis of prebiotics in various processed food matrices. Food Science and Technology Department, University of Nebraska-Lincoln.
- Morrill, J., Kulcinskaja, E., Sulewska, A. M., Lahtinen, S., Stalbrand, H., Svensson, B. and Abou Hachem, M., 2015. The GH5 1,4-beta-mannanase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL-04 possesses a low-affinity mannan-binding module and highlights the diversity of mannanolytic enzymes. *BMC Biochem* 16: 26.
- Mussatto, S. I. and Mancilha, I. M., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 68: 587-597.
- Niness, K. R., 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *The Journal of Nutrition* 129: 1402S-1406S.
- Nishinari, K., Williams, P. A. and Phillips, G. O., 1992. Review of the physico-chemical characteristics and properties of konjac mannan. *Food Hydrocolloids* 6: 199-222.
- Nopchinda, S., 2014. Probiotics for health promotion. *Journal of The Royal Thai Army Nurses* 15: 430-435.
- Odila Pereira, J., Soares, J., Sousa, S., Madureira, A. R., Gomes, A. and Pintado, M., 2016. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* 73: 543-550.
- Ogaji, I. J., Nep, E. I. and Audu-Peter, J. D., 2012. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients. *Pharmaceutica Analytica Acta* 03.

- Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N. and Reinheimer, J., 2012. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International* 48: 748-754.
- Palframan, R., Gibson, G. R. and Rastall, R. A., 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology* 37: 281-284.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. and Kim, H. Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1171-1185.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G. and Abraham, A., 2015. Edible kefir films as vehicle for probiotic microorganisms. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 32: 193-199.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S. and Prudencio, S. H., 2015. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology* 63: 415-422.
- Pitak, N. and Rakshit, S. K., 2011. Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving fresh-cut vegetables. *LWT - Food Science and Technology* 44: 2310-2315.
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D., 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition* 6: 285-306.
- Prasad, J., McJarrow, P. and Gopal, P., 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 917-925.
- Prychid, C. J., Jabaily, R. S. and Rudall, P. J., 2008. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). *Ann Bot* 101: 983-995.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K. and Adams, M. C., 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43: 1-7.

- Rastall, R. A. and Gibson, G. R., 2004. Functional foods: Developments in colonic functional foods for improved digestive health. *Bioscience explained* 2: 1-7.
- Rattananin, J., 2011. Production of edible film from konjac powder incorporated with Thai medical plants extracts for extending shelf life of mangoes cv. Nam Dok Mai # 4. Department of Food Technology, Chulalongkorn University.
- Reid, A. A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P. and Vuilleumard, J. C., 2007. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science* 72: M031-M037.
- Rezvani, F., Ardestani, F. and Najafpour, G., 2017. Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology* 48: 251-258.
- Rhim, J.-W. and Wang, L.-F., 2013. Mechanical and water barrier properties of agar/K-carrageenan/konjac glucomannan ternary blend biohydrogel films. *Carbohydrate Polymers* 96: 71-81.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R. and Delzenne, N., 1993. The Biochemistry of Oligofructose, a Nondigestible Fiber: An Approach to Calculate Its Caloric Value. *Nutrition Reviews* 51: 137-146.
- Roberfroid, M. B., 1999. Caloric Value of Inulin and Oligofructose. *The Journal of Nutrition* 129: 1436S-1437S.
- Roberfroid, M. B., 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition* 137: 2493S-2502S.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Sousa Lobo, J. M., Costa, P., Amaral, M. H., Pintado, M. M., Gomes, A. M., Malcata, F. X. and Freitas, A. C., 2011. Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal* 21: 869-876.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A. and Gómez-Zavaglia, A., 2014. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International* 64: 560-566.

- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F. and Zamora, S., 2009. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry* 65: 315-328.
- Saeheng, P., Eamsakulrat, P., Mekkerdchoo, O. and Borompichaichartkul, C., 2016. Production of konjac glucomannan antimicrobial film for extending shelf life of fresh-cut vegetables. *Horticulturae* 3: 17.
- Sako, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R., 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* 9: 69-80.
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L. and Mauri, A. N., 2015. Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science* 5: 86-92.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. and Chiralt, A., 2014. Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control* 35: 200-206.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I. and Chiralt, A., 2013. Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids* 33: 92-98.
- Sangwan, V., Tomar, S. K., Ali, B., Singh, R. R. B., Singh, A. K. and Mandal, S., 2014. Galactooligosaccharides purification using microbial fermentation and assessment of its prebiotic potential by *in vitro* method. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 573-585.
- Saulnier, D. M., Molenaar, D., de Vos, W. M., Gibson, G. R. and Kolida, S., 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl Environ Microbiol* 73: 1753-1765.
- Scourboutakos, M., 2010. 1 + 1 = 3...Synbiotics: Combining the power of pre- and probiotics. *Journal of Food Science Education* 9: 36-37.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. and Finlay, B. B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90: 859-904.

- Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C. and Baines, S. K., 2012. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry* 135: 1411-1418.
- Shokrvash, B., Homayouni, A., Payahoo, L., Biglu, M.-H., Mehrabany, E. V. and Jafarabadi, M. A., 2016. Chapter 53 - Probiotics and health: What publication rate on probiotics, prebiotics, and synbiotics implies? In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, ed. Ronald Ross Watson Victor R. Preedy, 691-698: Academic Press.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enronoe, J., Osorio, F. and Aguilera, J. M., 2011. *Food hydrocolloid edible films and coatings*: Nova Science Publishers, Inc.
- Smitinand, T., 2014. Thai plant names. Bangkok: Office of the Forest Herbarium, Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation.
- Song, D., Ibrahim, S. and Hayek, S., 2012. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In *Probiotics*, ed. Everlon Cid Rigobelo, Ch. 01. Rijeka: InTech.
- Soukoulis, C., Behboudi-Jobbehdar, S., Yonekura, L., Parmenter, C. and Fisk, I. D., 2014a. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. *Food Chem* 159: 302-308.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.-H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C. and Fisk, I., 2014b. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids* 39: 231-242.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A. and Vicente, A. A., 2010. The use of electric fields for edible coatings and films development and production: A review. *Food Engineering Reviews* 2: 244-255.
- Spherix Consulting Inc., 2010. Generally recognized as safe (GRAS) determination for the use of galacto-oligosaccharides (GOS) in foods and infant formulas. Maryland, USA: Spherix Consulting, Inc.
- Srisuvor, N., Prakitchaiwattana, C., Chinprahast, N. and Subhimaros, S., 2013. Use of banana purée from three indigenous Thai cultivars as food matrices for

- probiotics and application in bio-set-type yoghurt production. *International Journal of Food Science and Technology* 48: 1640-1648.
- Stein, K., Borowicki, A., Scharlau, D., Schettler, A., Scheu, K., Obst, U. and Gleis, M., 2012. Effects of synbiotic fermentation products on primary chemoprevention in human colon cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 777-784.
- Sukumonnan, T., 2005. Konjac cultivars in Thailand. Bangkok, Thailand: Department of Agriculture Office of Agricultural Research and Development.
- Suput, D., Lazic, V., Popovic, S. and Hromis, N., 2015. Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research* 42: 11-22.
- Takigami, S., 2009. Konjac Mannan. In *Handbook of Hydrocolloids*, eds. G. O. Phillips and P. A. Williams. Boston, USA: CRC Press.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A. and Martín-Belloso, O., 2007. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science* 72: E190-E196.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H. and Masoudpour-Behabadi, M., 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers* 137: 360-374.
- Tester, R. and Al-Ghazzewi, F., 2017. Glucomannans and nutrition. *Food Hydrocolloids* 68: 246-254.
- Tester, R. F. and Al-Ghazzewi, F. H., 2016. Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan. *J Sci Food Agric* 96: 3283-3291.
- Tester, R. F. and Al-Ghazzewi, F. H., 2013. Mannans and health, with a special focus on glucomannans. *Food Research International* 50: 384-391.
- Thitiratsakul, B. and Anprung, P., 2014. Prebiotic activity score and bioactive compounds in longan (*Dimocarpus longan Lour.*): Influence of pectinase in enzyme-assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology* 51: 1947-1955.
- Thomas, W. R., 1997. Konjac gum. In *Thickening and Gelling Agents for Food*, ed. Alan P. Imeson, 169-179. Boston, MA: Springer US.

- Thongaram, T., Hoeflinger, J. L., Chow, J. and Miller, M. J., 2017. Prebiotic galactooligosaccharide metabolism by probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 4184-4192.
- Tripathi, A. S. and Marathe, S. J., 2016. Chapter 47 - Probiotics and Physical Strength. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, ed. Ronald Ross Watson Victor R. Preedy, 635-640: Academic Press.
- Tripathi, M. K. and Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9: 225-241.
- Tripetch, P., Borompichaichartkul, C., Duangmal, K. and Srzednicki, G., 2016. Entrapment of 5-aminolevulinic acid under edible composite film of konjac glucomannan and chitosan. *Engineering in Life Sciences* 16: 386-395.
- Vernazza, C. L., Gibson, G. R. and Rastall, R. A., 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *Journal of Applied Microbiology* 100: 846-853.
- Vinderola, C. G. and Reinheimer, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Vulevic, J., Rastall, R. A. and Gibson, G. R., 2004. Developing a quantitative approach for determining the *in vitro* prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters* 236: 153-159.
- Wang, Y., 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* 42: 8-12.
- Weichselbaum, E., 2009. Probiotics and health: A review of the evidence. *Nutrition Bulletin* 34: 340-373.
- WHO/FAO, 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*.
- Widjanarko, S. B., Nugroho, A. and Estiasih, T., 2011. Functional interaction components of protein isolates and glucomannan in food bars by FTIR and SEM studies. *African Journal of Food Science* 5: 12-21.

- Williams, N. T., 2010. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm* 67.
- Wiset, L., Poomsa-ad, N., Jomlapeeratikul, P. and Borompichaichartkul, C., 2014. Effects of drying temperatures and glycerol concentrations on properties of edible film from konjac flour. *Journal of Medical and Bioengineering* 3: 171-174.
- Wu, C., Peng, S., Wen, C., Wang, X., Fan, L., Deng, R. and Pang, J., 2012. Structural characterization and properties of konjac glucomannan/curdlan blend films. *Carbohydrate Polymers* 89: 497-503.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D. and Lewis, J. D., 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105-108.
- Xiao, C., Gao, S., Wang, H. and Zhang, L., 2000a. Blend films from chitosan and konjac glucomannan solutions. *Journal of Applied Polymer Science* 76: 509-515.
- Xiao, C., Gao, S. and Zhang, L., 2000b. Blend films from konjac glucomannan and sodium alginate solutions and their preservative effect. *Journal of Applied Polymer Science* 77: 617-626.
- Xiao, C., Liu, H., Lu, Y. and Zhang, L., 2001a. Characterization of poly(vinylpyrrolidone)-konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 81: 1049-1055.
- Xiao, C., Lu, Y., Gao, S. and Zhang, L., 2001b. Characterization of konjac glucomannan-gelatin blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 79: 1596-1602.
- Xiao, C., Lu, Y., Liu, H. and Zhang, L., 2001c. Preparation and characterization of konjac glucomannan and sodium carboxymethylcellulose blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 80: 26-31.
- Xiao, C., Weng, L. and Zhang, L., 2002. Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science* 84: 2554-2560.
- Xu, J. and Gordon, J. I., 2003. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 10452-10459.

- Xu, X., Li, B., Kennedy, J. F., Xie, B. J. and Huang, M., 2007. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. *Carbohydrate Polymers* 70: 192-197.
- Yanuriati, A., Marseno, D. W., Rochmadi and Harmayani, E., 2017. Characteristics of glucomannan isolated from fresh tuber of Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Carbohydrate Polymers* 156: 56-63.
- Yee, M. C. F., 2011. An investigation of the biology and chemistry of the Chinese medicinal plant, *Amorphophallus konjac*. Research Center of Applied Sciences, University of Wolverhampton.
- Yeh, S.-L., Lin, M.-S. and Chen, H.-L., 2010. Partial hydrolysis enhances the inhibitory effects of konjac glucomannan from *Amorphophallus konjac* C. Koch on DNA damage induced by fecal water in Caco-2 cells. *Food Chemistry* 119: 614-618.
- Yirga, H., 2015. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal of Probiotics & Health* 03.
- Yonejima, Y., Hisa, K., Kawaguchi, M., Ashitani, H., Koyama, T., Usamikrank, Y., Kishida, N., Kishino, S. and Ogawa, J., 2015. Lactic acid bacteria-containing chocolate as a practical probiotic product with increased acid tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4: 773-777.
- Zhang, C., Chen, J.-d. and Yang, F.-q., 2014. Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS. *Carbohydrate Polymers* 104: 175-181.
- Zhang, H., Yoshimura, M., Nishinari, K., Williams, M. A. K., Foster, T. J. and Norton, I. T., 2001. Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers* 59: 38-50.
- Zhang, Y.-q., Xie, B.-j. and Gan, X., 2005. Advance in the applications of konjac glucomannan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* 60: 27-31.
- Ziemer, C. J. and Gibson, G. R., 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *International Dairy Journal* 8: 473-479.



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารสำหรับการวิเคราะห์ prebiotic activity score

ก1 การเตรียมอาหารทดสอบ

ก1.1 อาหารที่เติมกลูโคส 1% (w/v)

อาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส 1% (w/v) ปริมาตร 40 mL เตรียมโดยละลายกลูโคส 1 g/100 mL ลงในอาหารแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที ส่วนอาหารเหลว M9 ที่เติมกลูโคส 1% (w/v) ปริมาตร 40 mL ให้เติมกลูโคสที่ปราศจากเชื้อพร้อมกับบองค์ประกอบอาหารที่เหลือ โดยใช้สารละลายกลูโคส 20%

ก1.2 สารละลาย Orafti® P95 10% (w/v) ปริมาตร 10 mL

ละลาย Orafti® P95 1 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เมื่อนำไปใช้ให้ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 mL ลงในอาหารเหลว MRS หรือ M9 ปริมาตร 9 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% (w/v)

ก1.3 สารละลาย Orafti® HSI 10% (w/v) ปริมาตร 10 mL

ละลาย Orafti® HSI 1 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เมื่อนำไปใช้ให้ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 mL ลงในอาหารเหลว MRS หรือ M9 ปริมาตร 9 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% (w/v)

ก1.4 สารละลาย Orafti® GR 10% (w/v) ปริมาตร 10 mL

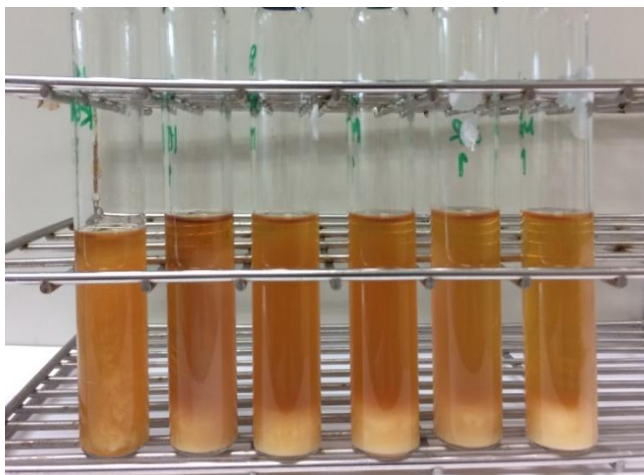
ละลาย Orafti® GR 1 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL แล้วนำมาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง เมื่อนำไปใช้ให้ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 mL ลงในอาหารเหลว MRS หรือ M9 ปริมาตร 9 mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% (w/v)

ก1.5 สารละลาย Oligomate® 55N 10 % (w/v) ปริมาตร 10 mL

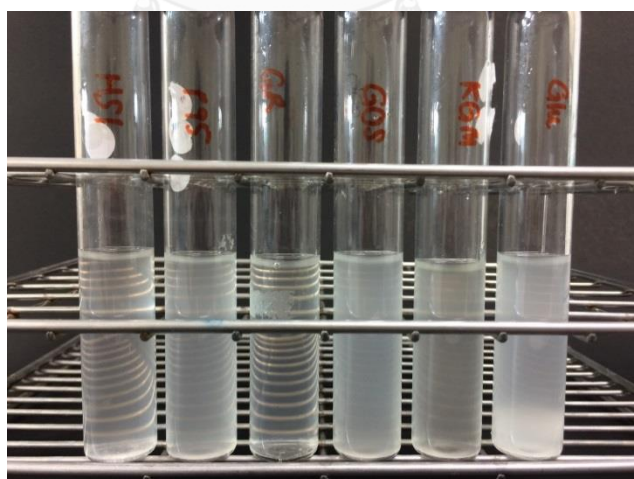
เนื่องจากสารละลายอยู่ในรูปของไซรัป มีความหนืดและกรองได้ยากกว่าสารละลายอื่นๆ จึงนำมาผสมน้ำ โดยปิเปต Oligomate® 55N มาจำนวน 1.8 mL (มีกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์อย่างน้อย 1 g) ใส่ในน้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 mL กรองให้ปราศจากเชื้อ เมื่อนำไปใช้ให้ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 mL ต่อ 10 mL อาหารเหลว MRS หรือ M9 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% (w/v)

ก1.6 กลูโคแมนแนนของผงบุก กรณีนี้เตรียมโดยการผสมกลูโคแมนแนนของผงบุกลงในอาหารเหลว MRS แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที ส่วนอาหาร M9 แยกทำปราศจากเชื้อกลูโคแมนแนนของผงบุกแล้วผสมอาหาร M9 ในภายหลัง

ก2 การเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและ enteric mixture ในการวิเคราะห์ prebiotic activity score



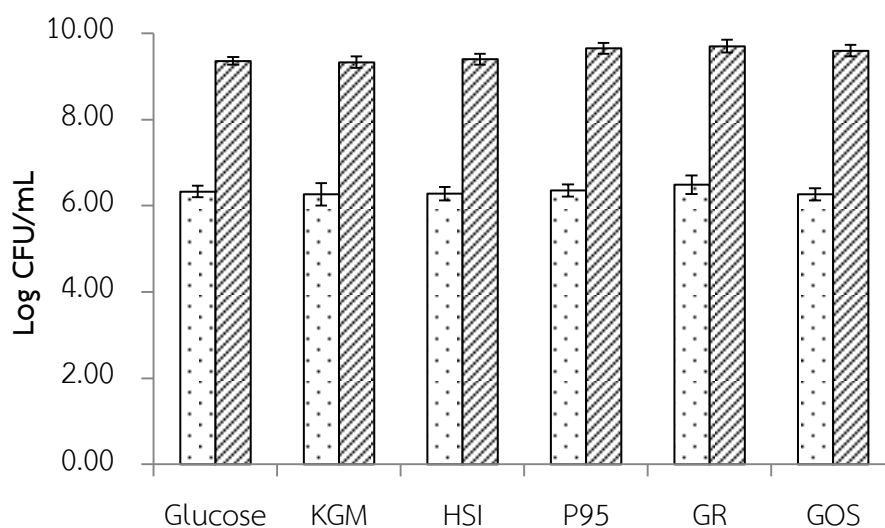
ภาพที่ ก2.1 การหาค่า prebiotic activity score ตัวอย่างการเจริญจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง หลอดทดลองจากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 เต็มกลูโคสแมนแนนของผงบูก , หลอดที่ 2 เต็ม Orafti[®] HSI, หลอดที่ 3 เต็ม Oligomate[®] 55N, หลอดที่ 4 เต็ม Orafti[®] P95, หลอดที่ 5 เต็ม Orafti[®] GR, หลอดที่ 6 เต็มกลูโคส



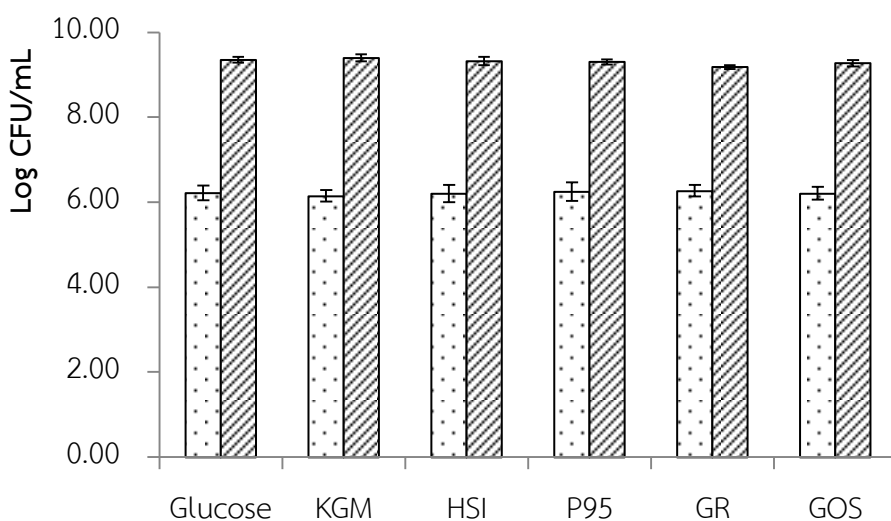
ภาพที่ ก2.2 การหาค่า prebiotic activity score ตัวอย่างการเจริญจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 เต็ม Orafti[®] HSI, หลอดที่ 2 เต็ม Orafti[®] P95, หลอดที่ 3 เต็ม Orafti[®] GR, หลอดที่ 4 เต็ม Oligomate[®] 55N, หลอดที่ 5 เต็มกลูโคสแมนแนนของผงบูก , หลอดที่ 6 เต็มกลูโคส

ก3 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

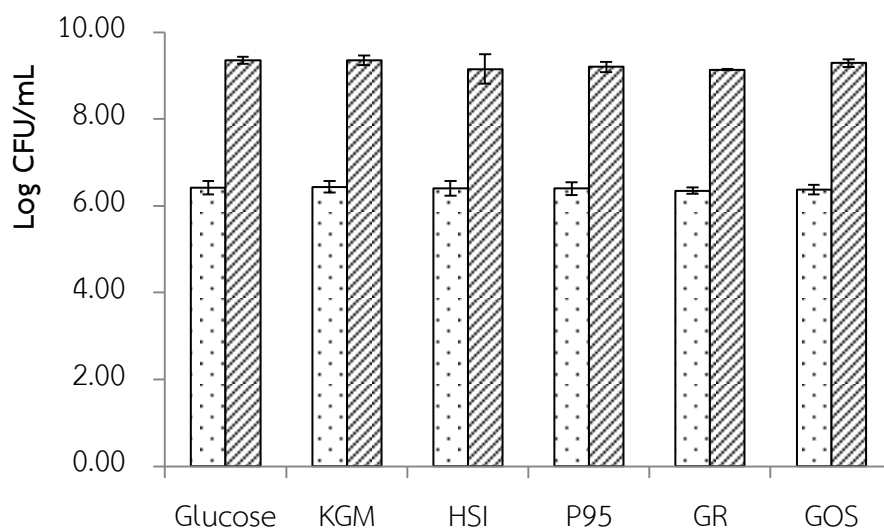
โดยภาพที่ ก3.1-ก3.4 กราฟแท่งลายจุดแสดงความหนาแน่นของเซลล์ที่ 0 ชั่วโมง และกราฟแท่งลายเส้นแสดงความหนาแน่นของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง



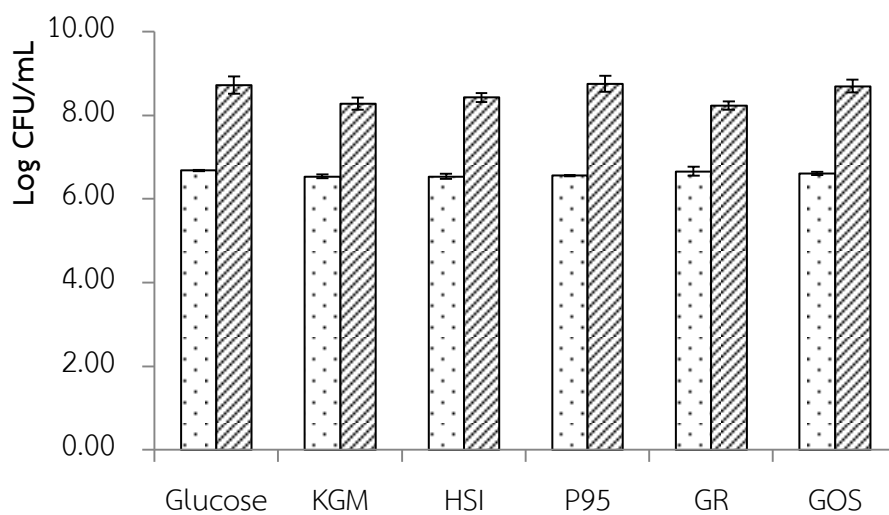
ภาพที่ ก3.1 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ *L. casei-01* ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ ก3.2 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ *L. paracasei* ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

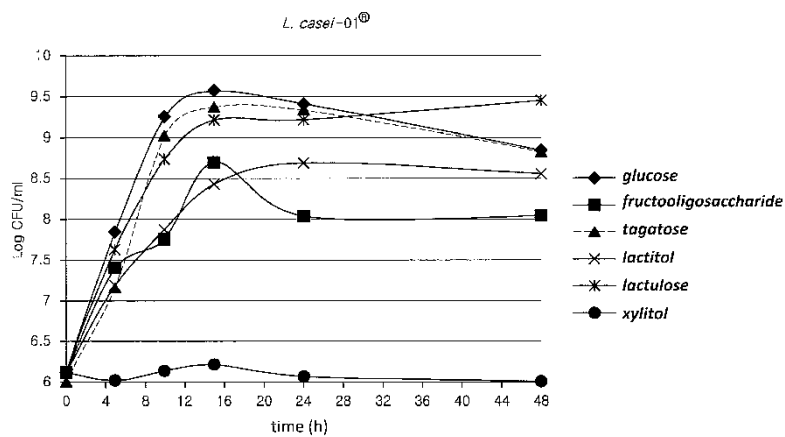


ภาพที่ ก3.3 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

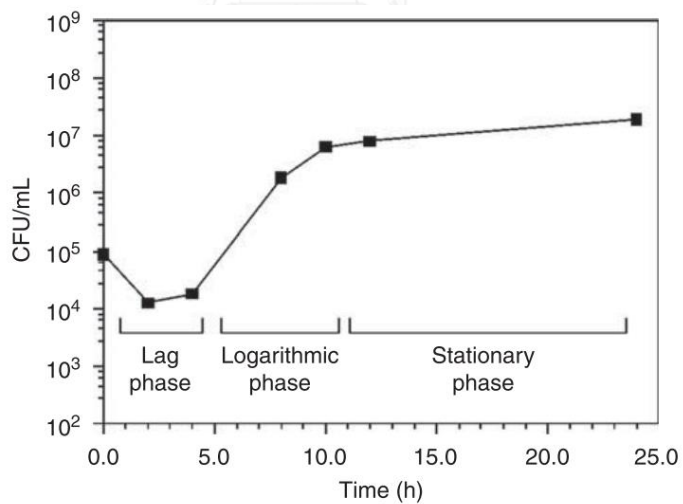


ภาพที่ ก3.4 ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ enteric mixture ในอาหารเหลว M9 ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

ก4 ตัวอย่างกราฟการเจริญของจุลินทรีย์



ภาพที่ ก4.1 กราฟการเจริญของ *L. casei*-01
ที่มา: Koh *et al.* (2015)



ภาพที่ ก4.2 กราฟการเจริญของ *E. coli* ATCC25922
ที่มา: de Araujo *et al.* (2011)

ก5 Prebiotic activity score ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ

ตารางที่ ก5.1 Prebiotic activity score ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่เติมคาร์โบไฮเดรตทดสอบ

คาร์โบไฮเดรตทดสอบ	โพรไบโอติก		
	<i>L. casei</i> -01	<i>L. paracasei</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12
1% Konjac glucomannan (KGM)	0.16 ± 0.06 ^{bc}	0.18 ± 0.07 ^b	0.14 ± 0.11 ^{bc}
1% Orafiti [®] HSI (HSI)	0.12 ± 0.03 ^{bc}	0.08 ± 0.04 ^{cd}	0.03 ± 0.06 ^{de}
1% Orafiti [®] P95 (P95)	0.01 ± 0.04 ^{de}	-0.11 ± 0.02 ^{fg}	-0.13 ± 0.02 ^g
1% Orafiti [®] GR (GR)	0.29 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.03 ^{bc}	0.18 ± 0.03 ^b
1% Oligomate [®] 55N (GOS)	0.07 ± 0.02 ^{cd}	-0.05 ± 0.04 ^{efg}	-0.03 ± 0.02 ^{ef}

a-c อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความหนาแน่นเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นมีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ข1 การเตรียมอาหารเหลว De Man Rogosa Sharpe (MRS)

สูตรอาหาร (Difco™ Lactobacilli MRS Agar, USA)

ปริมาตร 1 L

Proteose peptone No.3	10.0	g
Beef extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Dextrose	20.0	g
Polysorbate 80	1.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Manesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
Dipotassium phosphate	2.0	g
Agar	15.0	g

วิธีเตรียม (ใช้อาหารผงสำเร็จรูป Difco™, USA)

1. ละลาย MRS agar powder น้ำหนัก 70 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 mL คนให้เข้ากัน
2. ให้ความร้อนและคนบ่อยๆ และทำให้เดือดนาน 1 นาที เพื่อให้ผงอาหารละลายหมด
3. แบ่งอาหารลงในขวดแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที
4. เติม clindamycin stock solution ปริมาตร 0.5 mL/1 L medium
5. pH หลังจากทำการปราศจากเชื้อแล้วมีค่าประมาณ 6.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เตรียมได้ สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน ในที่มืด อุณหภูมิ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ส่วนอาหารที่หลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วสามารถเก็บได้นาน 10 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

ข2 การเตรียมอาหารเหลว De Man Rogosa Sharpe (MRS)

สูตรอาหาร (Difco™ Lactobacilli MRS Broth, USA)

ปริมาณ 1 L

Proteose peptone No.3	10.0	g
Beef extract	10.0	g
Yeast extract	5.0	g
Dextrose	20.0	g
Polysorbate 80	1.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
Dipotassium phosphate	2.0	g

วิธีเตรียม (ใช้อาหารผงสำเร็จรูป Difco™, USA)

1. ละลายผงสำเร็จรูป MRS น้ำหนัก 70 g ในน้ำกลั่นปริมาณ 1,000 mL คนให้เข้ากัน
2. ให้ความร้อนและคนบ่อยๆ และทำให้เดือดนาน 1 นาที เพื่อให้ผงอาหารละลายหมด
3. แบ่งอาหารลงในขวดแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที
4. เติม clindamycin stock solution ปริมาตร 0.5 mL/1 L medium
5. pH หลังจากทำการปราศจากเชื้อแล้วมีค่าประมาณ 6.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

ข3 การเตรียมอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB)

สูตรอาหาร (Difco™ Tryptic Soy Broth, USA)

ปริมาณ 1 L

Pancreatic digest of casein	15.0	g
Papaic digest of soybean	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g

วิธีเตรียม (ใช้อาหารผงสำเร็จรูป Difco™, USA)

1. ละลายผงสำเร็จรูป TSA ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน
2. ให้ความร้อนและคนเพื่อให้ผงอาหารละลายหมด

3. แบ่งอาหารลงในขวดแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ห้าม overheat
4. pH หลังจากทำการปราศจากเชื้อแล้วมีค่าประมาณ 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

ข4 การเตรียมอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

สูตรอาหาร (Difco™ Tryptic Soy Broth, USA)

ปริมาตร 1 L

Pancreatic digest of casein	15.0	g
Papaic digest of soybean	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	15.0	g

วิธีเตรียม (ใช้อาหารผงสำเร็จรูป Difco™, USA)

1. ละลายผงสำเร็จรูป TSB ในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน
2. ให้ความร้อนและคนเพื่อให้ผงอาหารละลายหมด
3. แบ่งอาหารลงในขวดแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ห้าม overheat
4. pH หลังจากทำการปราศจากเชื้อแล้วมีค่าประมาณ 7.3 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

ข5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 Minimal Medium broth (Atlas, 2010)

สูตรอาหาร

ปริมาตร 1 L

Na ₂ HPO ₄ (Disodium phosphate) (anhydrous)	6.0	g
KH ₂ PO ₄ (Monopotassium phosphate)	3.0	g
NaCl (Sodium chloride)	0.5	g
NH ₄ Cl (Ammonium chloride)	1.0	g
สารละลาย 20% glucose	10.0	mL
สารละลาย MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	mL
สารละลาย Thiamine·HCl	1.0	mL
สารละลาย CaCl ₂	1.0	mL

pH 7.0 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

วิธีเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบของ M9 Minimal Medium

สารละลาย 20% glucose:

ส่วนประกอบ ต่อปริมาตร 100.0 mL:

D-Glucose 20.0 g

วิธีเตรียม: ละลายกลูโคสในน้ำกลั่น คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 L แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

สารละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:

ส่วนประกอบ ต่อปริมาตร 1 L:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 246.5 g

วิธีเตรียม: เติม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 L คนให้ละลายแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

สารละลาย Thiamine-HCl:

ส่วนประกอบ ต่อปริมาตร 10.0 mL:

Thiamine-HCl 10.0 mg

วิธีเตรียม: เติม Thiamine-HCl ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 L คนให้ละลาย แล้วนำไป filter sterilize

สารละลาย สารละลาย $CaCl_2$:

ส่วนประกอบ ต่อปริมาตร 1 L:

$CaCl_2$ 14.7 g จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียม: ละลาย $CaCl_2$ ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1.0 L แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

การเตรียมอาหารเหลว M9 Minimal Medium

- ผสมส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดในน้ำกลั่น ยกเว้น สารละลาย 20% glucose, สารละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, สารละลาย Thiamine-HCl และสารละลาย $CaCl_2$ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 987.0 mL คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- ปรับ pH เป็น 7.0
- นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที
- ทิ้งให้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

5. เป็นขั้นตอนที่ต้องปราศจากเชื้อ (aseptic) คือ การเติมสารละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, สารละลาย 20% glucose, สารละลาย Thiamine-HCl และสารละลาย $CaCl_2$ ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งอาหารลงในหลอดหรือขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อ



ภาคผนวก ค
การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต

ค1 วิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสำหรับ *Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus paracasei* และ *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ด้วยเทคนิค pour plate

1. เจือจางตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) สำหรับงานวิจัยนี้ใช้การเจือจางแบบ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ดังนั้นเริ่มต้นการเจือจางด้วยการปิเปตของเหลวจากตัวอย่างปริมาตร 1 mL ใส่ลงหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มี 1% (w/v) เปปโทน ปริมาตร 9 mL และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) จะได้ของเหลวในหลอดนี้มีความหนาแน่นของเซลล์เจือจางเป็น 10 เท่า ของตัวอย่างซึ่งอยู่ในหลอดก่อนหน้า
2. ปิเปตของเหลวในหลอดเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดมีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มี 1% (w/v) เปปโทน ปริมาตร 9 mL และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) จะได้ของเหลวในหลอดนี้มีความหนาแน่นของเซลล์เจือจางลงอีก 10 เท่าของของเหลวอยู่ในหลอดก่อนหน้า ทำซ้ำ 2 ซ้ำจนกระทั่งได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสม คือ มีความหนาแน่นของเซลล์เหมาะสมอยู่ในช่วงที่สามารถนับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี (colony forming unit หรือ CFU)
3. ปิเปตตัวอย่างที่ถูกเจือจางจากหลอดที่มีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ปริมาตร 1 mL ลงบนจานเพาะเชื้อ
4. เทอาหาร MRS agar ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อและยังมีสภาพเป็นของเหลวอยู่ (อุณหภูมิประมาณ 45-50°C) ปริมาตร 15-20 mL ลงบนจานเพาะเชื้อ
5. กระจายตัวอย่างให้ผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการหมุนจานเลี้ยงเชื้อไปในทิศทางหนึ่ง แล้วหมุนย้อนกลับอีกครั้งหนึ่ง
6. รอให้อาหารแข็งตัวบนพื้นราบ ประมาณ 5-10 นาที กลับจานเพาะเชื้อให้ตัวจานที่มีอาหารแข็งอยู่ด้านบนและฝาอยู่ด้านล่าง แล้ววางเรียงซ้อนกัน บรรจุใส่ภาชนะที่ปิดมิดชิด กรณีของจุลินทรีย์ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ซึ่งต้องเลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ ให้ใส่ใน anaerobic jar ใส่ AnaeroGen[®] และ anaerobic indicator
7. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 วัน

8. นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ *L. casei*-01, *L. paracasei* และ *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 โคโลนีมีสีขาว ฝังอยู่ในอาหารแข็งหรืออยู่บนอาหาร
9. คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่างและรายงานค่าเบื้องต้นในหน่วย log CFU/mL ตัวอย่าง

ค2 วิธีการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสำหรับ enteric mixture ด้วยเทคนิค spread plate

1. เจือจางตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) สำหรับงานวิจัยนี้ใช้การเจือจางแบบ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ดังนั้นเริ่มต้นการเจือจางด้วยการปิเปตของเหลวจากตัวอย่างปริมาตร 1 mL ใส่ลงหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มี 1% (w/v) เปปโตน ปริมาตร 9 mL และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) จะได้ของเหลวในหลอดนี้มีความหนาแน่นของเซลล์เจือจางเป็น 10 เท่า ของตัวอย่างซึ่งอยู่ในหลอดก่อนหน้า
2. ปิเปตของเหลวในหลอดเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดมีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9 mL และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) จะได้ของเหลวในหลอดนี้มีความหนาแน่นของเซลล์เจือจางลงอีก 10 เท่าของของเหลวอยู่ในหลอดก่อนหน้า ทำข้อ 2 ซ้ำจนกระทั่งได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสม คือ มีความหนาแน่นของเซลล์เหมาะสมอยู่ในช่วงที่สามารถนับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อระหว่าง 30 – 300 โคโลนี (colony forming unit หรือ CFU)
3. ปิเปตตัวอย่างที่ถูกเจือจางจากหลอดที่มีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 mL ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง TSA
4. กระจายตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้ spreader จนกระทั่งตัวอย่างกระจายทั่วและแห้ง
5. กลับจานเพาะเชื้อ แล้วใส่ในภาชนะปิดมิดชิด
6. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง
7. นับจำนวนโคโลนีซึ่งมีสีขาวอยู่บนอาหารแข็ง
8. คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่างและรายงานค่าเบื้องต้นในหน่วย log CFU/mL ตัวอย่าง

ค3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มี 1% (w/v) เปปโตนสำหรับการเจือจาง

ส่วนประกอบ ต่อปริมาตร 1 L:

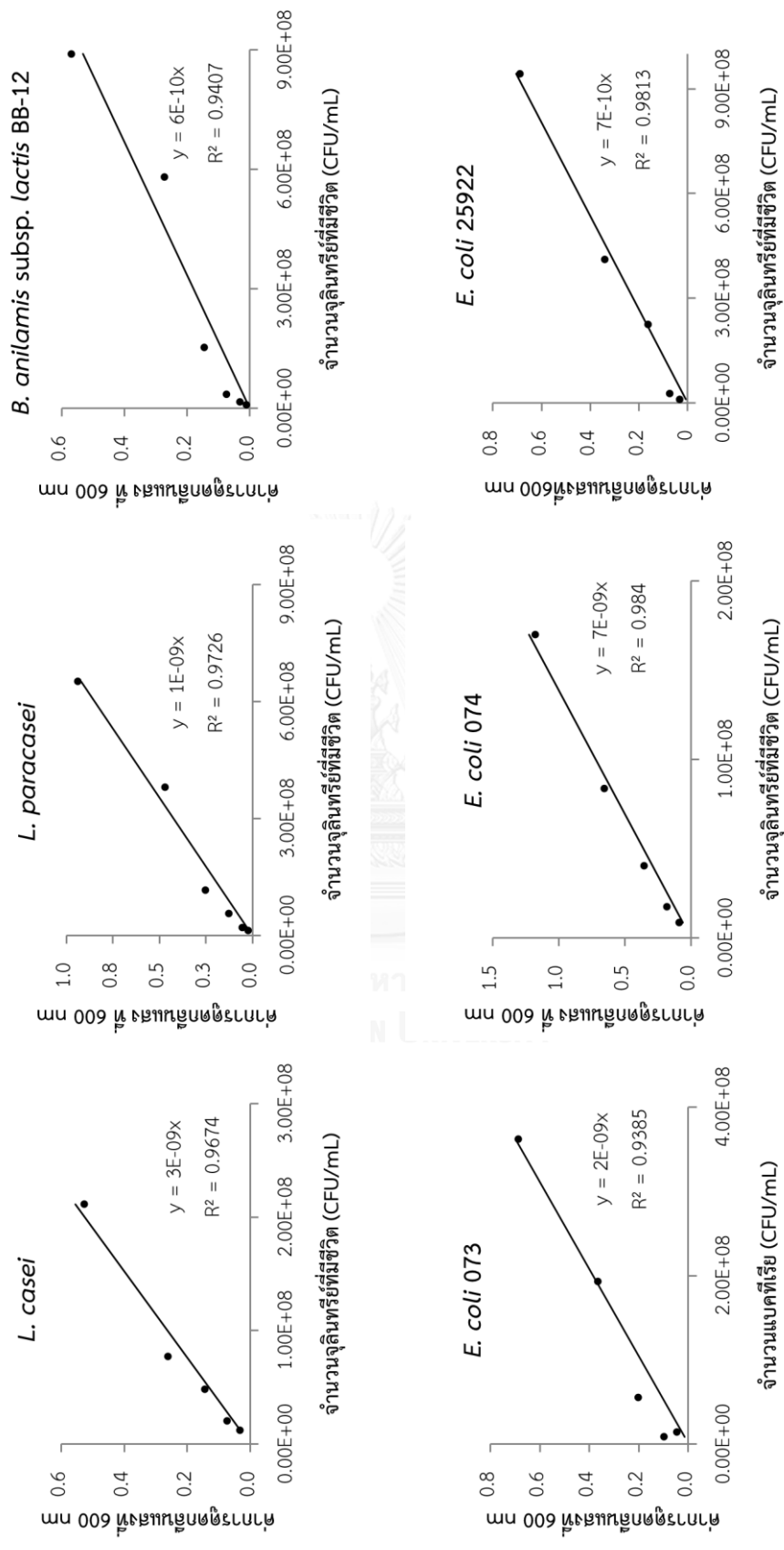
Bacteriological peptone	1.0 g
Sodium chloride	8.5 g

pH 7.0 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25°C

วิธีเตรียม: ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 L นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

ค4 การสร้างกราฟสำหรับประมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในอาหารเหลว

1. เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับการสร้างกราฟเพื่อประมาณจำนวนจุลินทรีย์ ประกอบด้วย จุลินทรีย์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei*-01, *L. paracasei*, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Escherichia coli* 25922, *E. coli* 073 และ *E. coli* 074 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมงสำหรับโพรไบโอติก และนาน 18 ชั่วโมงสำหรับ *E. coli* ทั้งสามสายพันธุ์
2. ใช้เทคนิคการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เจือจางตัวอย่างด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสมอย่างน้อย 5 หลอด
3. เก็บข้อมูลสำหรับการสร้างกราฟ 2 ส่วน คือ ข้อมูลการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ของตัวอย่างที่ถูกเจือจางทุกหลอด และข้อมูลจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจากเทคนิค pour plate หรือ spread plate ตามวิธีที่อธิบายในภาคผนวก ค1-ค2
4. สร้างกราฟโดยมีแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm และแกนนอนเป็นจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (CFU/mL) (ภาพที่ ค4.1) นำกราฟที่เตรียมได้ไปใช้ในการประมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่จะเติมลงในหลอดอาหารทดสอบเพื่อวิเคราะห์ค่า prebiotic activity score



ภาพที่ ๓4.1 กราฟสำหรับการประมาณจำนวนจุลินทรีย์สำหรับวิเคราะห์ prebiotic activity score

ภาคผนวก ง

ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลังกระบวนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์

ง1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลังกระบวนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์

ตารางที่ ง1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในสารละลายสำหรับขึ้นรูปฟิล์มและในฟิล์มหลังกระบวนการขึ้นรูปด้วยการทำแห้ง และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของจุลินทรีย์

ตัวแปรที่ศึกษา	สูตรฟิล์ม**			
	KGM/LC	KGM/LC/GR	KGM/LPC	KGM/LPC/GR
น้ำหนักฟิล์ม (g)	0.26±0.00 ^c	0.48±0.00 ^a	0.30±0.01 ^b	0.49±0.01 ^a
การมีชีวิตก่อนทำแห้ง (logCFU/mL FFS)	9.02±0.08 ^b	9.40±0.10 ^a	9.21±0.03 ^b	9.34±0.04 ^a
การมีชีวิตหลังทำแห้ง (logCFU/mL FFS*)	7.34±0.13 ^{ab}	7.40±0.04 ^a	7.13±0.12 ^a	< 1.00
การมีชีวิตหลังทำแห้ง (logCFU/film)	8.64±0.13 ^{ab}	8.70±0.04 ^a	8.43±0.12 ^a	< 1.00
การมีชีวิตหลังทำแห้ง (logCFU/g film)	9.22±0.14 ^a	9.02±0.04 ^b	8.95±0.12 ^b	< 1.00
% การรอดชีวิต	81.38±2.17 ^a	78.75±0.56 ^b	77.44±0.96 ^b	< 10.00

ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวนอนแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

*ปริมาตรเทียบเท่า

** KGM/LC = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM) ที่เติม *L. casei*-01 (LC), KGM/LC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM) ที่เติม *L. casei*-01 (LC) และ Orafti® GR (GR), KGM/LP = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM) ที่เติม *L. paracasei* (LPC), KGM/LPC/GR = ฟิล์มกลูโคแมนแนนของผงบุก (KGM) ที่เติม *L. paracasei* (LPC) และ Orafti® GR (GR)

ภาคผนวก จ

วิธีวิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม

จ1 ความหนา (thickness)

ทำตามวิธี Kanmani and Lim (2013) โดยใช้ดิจิตอลไมโครมิเตอร์ (Absolute Digimatic Thickness Gauge, บริษัท Mitutoyo, ประเทศญี่ปุ่น) วัดความหนาของแผ่นฟิล์ม ตัดฟิล์มตัวอย่างให้เป็นแถบมีความกว้าง 3 cm × 10 cm มีขอบเรียบ สุ่มวัดความหนาของแผ่นฟิล์มทั้งหมด 10 ตำแหน่งต่อฟิล์มตัวอย่าง 1 แผ่น นับเป็นหนึ่งซ้ำ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยที่ได้เป็นค่าความหนาของแผ่นฟิล์ม รายงานความหนาในหน่วย mm

จ2 สี (color)

วัดค่า L^* , a^* และ b^* ในระบบ CIELAB โดยใช้ chroma meter (Konica Minolta Chromameter CR-400, Minolta Camera Co., Osaka, ประเทศญี่ปุ่น) ตามวิธี Odila Pereira *et al.* (2016) วัดค่าสีของแผ่นมาตรฐานสีขาว (white standard plate), ฟิล์มควบคุม และฟิล์มที่เติมพรูโบไอติกและ/หรือพรูโบไอติก การวัดค่าสีของฟิล์มทำโดยวางฟิล์มบนแผ่นมาตรฐานสีขาวแล้ววัดสีทั้งหมด 10 ตำแหน่งต่อตัวอย่างฟิล์ม 1 แผ่น บันทึกค่า Lightness (L^*) ค่า chromaticity parameters a^* (red-green) และ b^* (yellow-blue) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของสีฟิล์มระหว่างฟิล์มควบคุมกับฟิล์มกับฟิล์มที่เติมพรูโบไอติกและพรูโบไอติกแต่ละชนิด โดยคำนวณค่าความแตกต่างของค่าสี (color difference, ΔE) ระหว่างฟิล์มควบคุมและฟิล์มที่เติมพรูโบไอติกและพรูโบไอติกแต่ละชนิด จากสมการ

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

โดยที่ ΔL^* , Δa^* และ Δb^* คือความแตกต่างของค่า Lightness, redness และ yellowness จากฟิล์มควบคุม ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

จ3 ความโปร่งแสง (transparency)

โดยใช้เครื่อง UV/Vis spectrophotometer ตามวิธีจาก Kanmani และ Lim (2013) (Kanmani and Lim, 2013) ตัดฟิล์มให้มีขนาด 1 cm × 4 cm จำนวน 6 ชิ้น ต่อฟิล์มหนึ่งชนิดติดตั้งฟิล์มใน cuvette โดยแนบผิวของฟิล์มติดกับผิวด้านในของ cuvette แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้ cuvette เปล่าซึ่งมีอากาศเป็น blank จากนั้นนำไปหาค่าความโปร่งแสงจากสมการ

$$T = A_{550}/x$$

โดย T คือ ความโปร่งแสง

A_{550} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm

x คือ ความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์ม (mm)

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าที่คำนวณได้ยิ่งมีค่ามาก ความโปร่งแสงของฟิล์มยิ่งมีค่าน้อย

จ4 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation)

โดยใช้เครื่อง Instron® universal material testing machine ตามวิธีทดสอบมาตรฐาน (ASTM, 2001) ตัดฟิล์มสำหรับการทดสอบให้มีขอบเรียบจำนวน 10 ชิ้น มีความกว้าง 3 cm × 10 cm ก่อนการทดสอบให้วัดความหนาของฟิล์มทั้งหมด 10 ตำแหน่ง/แผ่น ใช้หัววัด pneumatic side-action grips ยึดปลายทางด้านกว้างของฟิล์มทั้งสองด้านกับหัวทดสอบ โดยมีระยะห่างระหว่างจุดที่ยึดฟิล์มเท่ากับ 30 mm ตั้งค่าอัตราเร็วในการดึงฟิล์ม 30 mm/min ใช้ load cell ขนาดเท่ากับ 5 kN บันทึกค่าแรงที่ใช้ดึงตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (หน่วยเป็น g-force) และระยะการยืดตัวถึงจุดขาด (หน่วยเป็น mm) คำนวณการต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{ความต้านทานแรงดึงขาด (MPa)} = [F \times 0.009807 \times 10^{-6}] / wd$$

เมื่อ F คือ แรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (g-force)

w คือ ความกว้างของชิ้นตัวอย่าง (m)

d คือ ความหนาของชิ้นตัวอย่าง (m)

ค่า 0.009807 เป็นตัวเลขที่ใช้ในการแปลงหน่วยจาก g-force ให้เป็น N

ค่า 10^{-6} เป็นตัวเลขสำหรับแปลงหน่วยจาก Pa ให้เป็นหน่วย MPa

$$\text{การยืดตัวถึงจุดขาด (\%)} = L_f \times 100 / L_i$$

เมื่อ L_f คือ ระยะทางที่สามารถดึงขึ้นฟิล์มให้ยืดได้มากที่สุดก่อนที่ฟิล์มจะขาดออกจากกัน (mm)

L_i คือ ความยาวของฟิล์มระหว่างส่วนยึดจับก่อนดึง (mm)

จ5 สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability หรือ WVP)

ทำตามวิธีมาตรฐาน (ASTM, 2003) เตรียมโถแก้วที่อิมมิดด้วยน้ำ โดยเทน้ำกลั่นลงในโถแก้วแล้วปิดฝาทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 100% บรรจุซิลิกาเจล 20 กรัมลงในขวดแก้วทรงกระบอกซึ่งผ่านการอบแห้งแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.75 เซนติเมตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ในการทดสอบเพื่อให้ภายในขวดแก้วทดสอบมีความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 0% เตรียมขวดแก้วสำหรับการทดสอบโดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 5 cm x 5 cm ปิดปากขวดแก้วด้วยฟิล์ม รััดด้วยยางแล้วพันทับด้วยพาราฟิล์ม ซึ่งน้ำหนักเริ่มต้นของขวดแก้วที่มีตัวอย่างฟิล์มปิดปากขวด จากนั้นนำไปวางในโถทดสอบที่อิมมิดด้วยไอน้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26±2 °C) ติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของขวดทดสอบทุก 5 ชั่วโมง จนครบ 80 ชั่วโมง (ดังแสดงในภาพที่ จ5.1) ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้กราฟดังแสดงในภาพที่ จ5.2-จ5.5 แล้วคำนวณสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}) = W/t \times [d/(\Delta P \times A)]$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของขวดทดสอบ (g)

d คือ ความหนาของแผ่นฟิล์ม (mm)

A คือ พื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์มที่ไอน้ำผ่านได้ (m²)

t คือ เวลาที่น้ำหนักของขวดทดสอบคงที่ (h)

$\Delta P = P_{\text{โถทดสอบ}} - P_{\text{ขวดทดสอบ}}$ คือ ความแตกต่างของความดันไอน้ำระหว่างสองด้านของแผ่นฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 °C (kPa)

W/t คำนวณโดยการถดถอยเชิงเส้น ($R^2 > 0.9$) จากการดูดซึมไอน้ำโดยระบบเมื่อถึงสภาวะคงที่

โดย $P_{\text{โถทดสอบ}} - P_{\text{ขวดทดสอบ}} = \text{ค่าความดันไอน้ำอิมมิดที่ } 25 \text{ }^\circ\text{C} \times (RH_{\text{โถทดสอบ}} - RH_{\text{ขวดทดสอบ}})$

ค่าความดันไอน้ำอิมมิดที่ 25 °C เท่ากับ 3.1690 kPa

$RH_{\text{โถทดสอบ}}$ คือ ความชื้นสัมพัทธ์ภายในโถทดสอบ เท่ากับ 100%

$RH_{\text{ขวดทดสอบ}}$ คือ ความชื้นสัมพัทธ์ภายในขวดทดสอบ เท่ากับ 0%

ตัวอย่างการคำนวณของฟิล์ม KGM/LC ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 0.0035 g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ โดยแทนค่าดังนี้

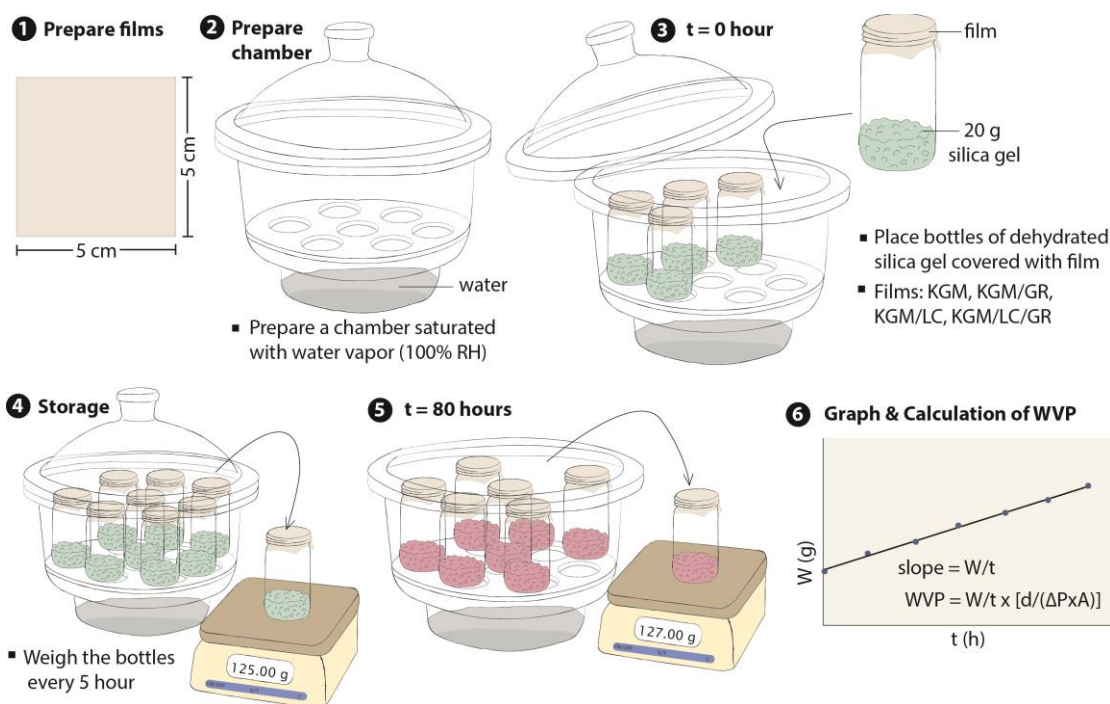
$$W/t = 0.0222, 0.0203 \text{ และ } 0.0213 \text{ g h}^{-1} \quad d = 0.059, 0.059 \text{ และ } 0.054 \text{ mm}$$

$$A = 0.0011, 0.0011 \text{ และ } 0.0011 \text{ m}^2 \quad \Delta P = 316.9 \text{ kPa}$$

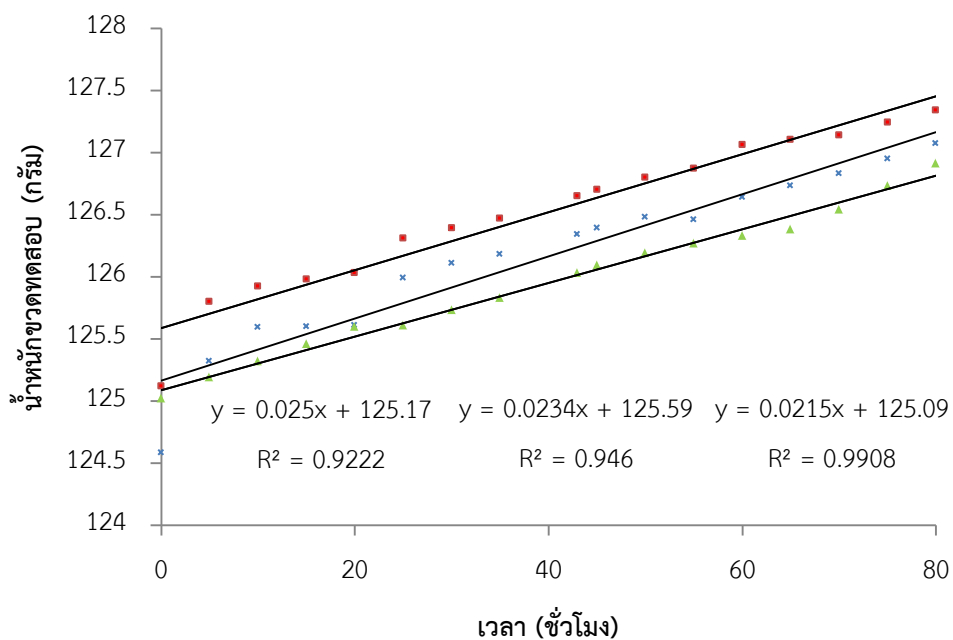
$$\text{จะได้ค่า WVP จากซ้ำที่ 1} = 0.0222 \times [0.059/(316.9 \times 0.0011)] = 0.0037$$

$$\text{WVP จากซ้ำที่ 2} = 0.0203 \times [0.059/(316.9 \times 0.0011)] = 0.0034$$

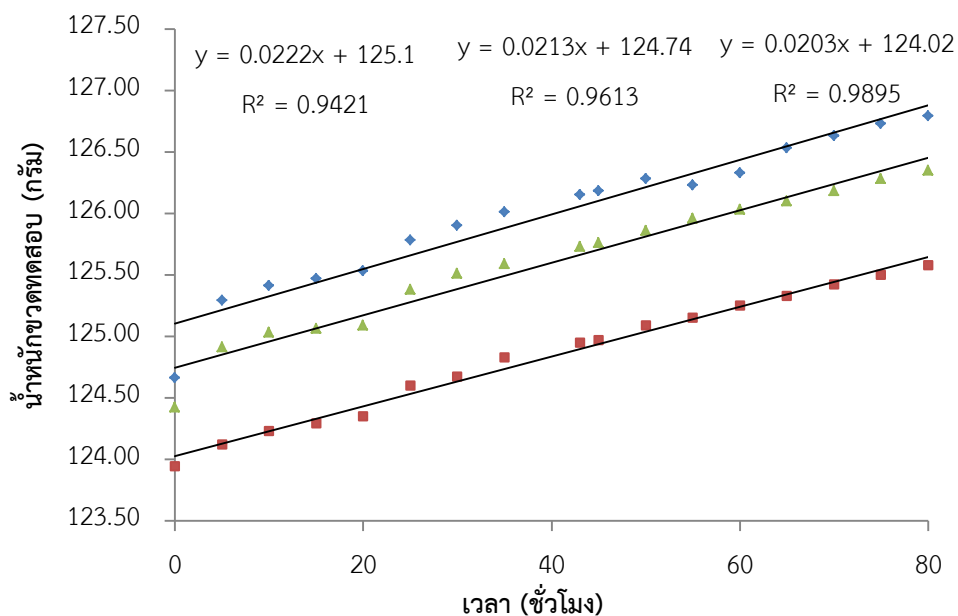
$$\text{WVP จากซ้ำที่ 3} = 0.0213 \times [0.054/(316.9 \times 0.0011)] = 0.0033$$



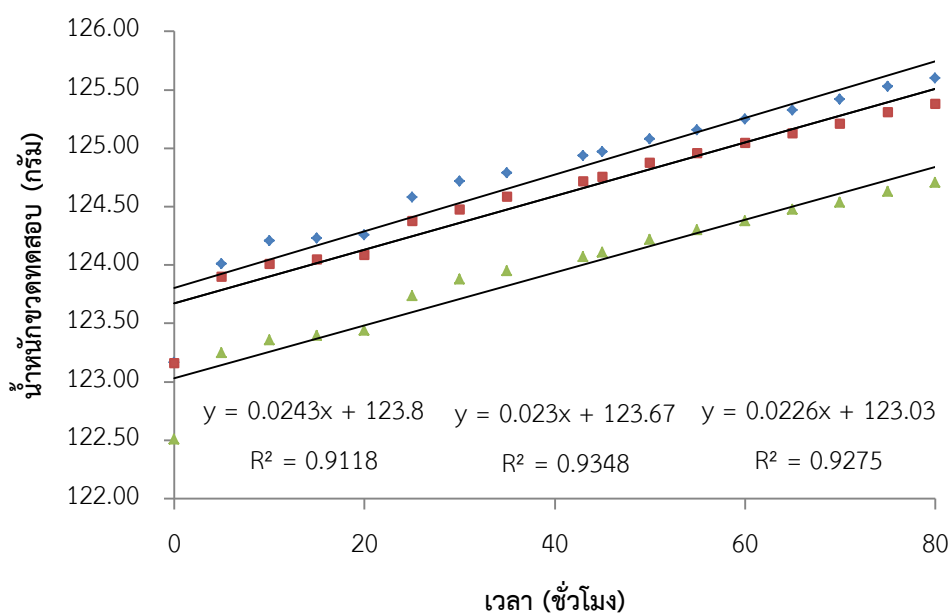
ภาพที่ จ5.1 วิธีการวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability)



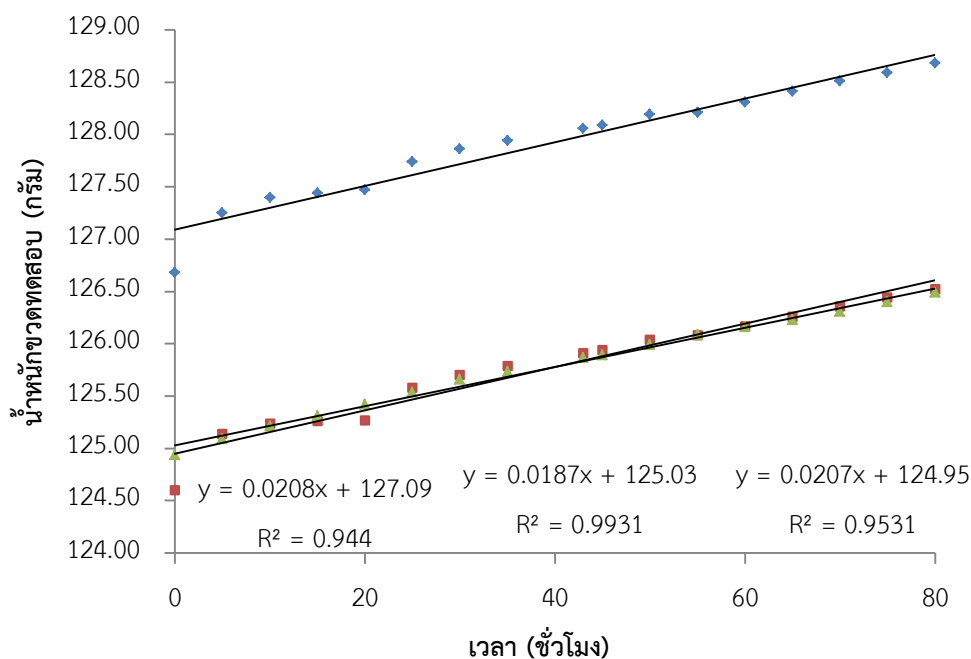
ภาพที่ จ5.2 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนน (KGM)



ภาพที่ จ5.3 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei-01* (KGM/LC)



ภาพที่ จ5.4 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาพซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม Orafiti[®] GR (KGM/GR)



ภาพที่ จ5.5 กราฟสำหรับวิเคราะห์สภาวะซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafti® GR (KGM/LC/GR)

จ6 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility)

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kurt and Kahyaoglu (2014) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 2 cm x 2 cm นำตัวอย่างฟิล์มไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วนำตัวอย่างฟิล์มมาชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างฟิล์มเป็น W_i ละลายตัวอย่างฟิล์มอบแห้งลงในน้ำกลั่น 50 mL เขย่าเบาๆอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องเขย่านาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกชิ้นฟิล์มที่ไม่ละลายไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ คำนวณความสามารถในการละลายน้ำโดยใช้สมการ

$$\text{ความสามารถในการละลายน้ำ} = (W_i - W_f) / W_i \times 100$$

เมื่อ W_i คือ น้ำหนักตัวอย่างฟิล์มเริ่มต้น (g)

W_f คือ น้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ (g)

จ7 ลักษณะพื้นผิวและภาคตัดขวาง (surface and cross section)

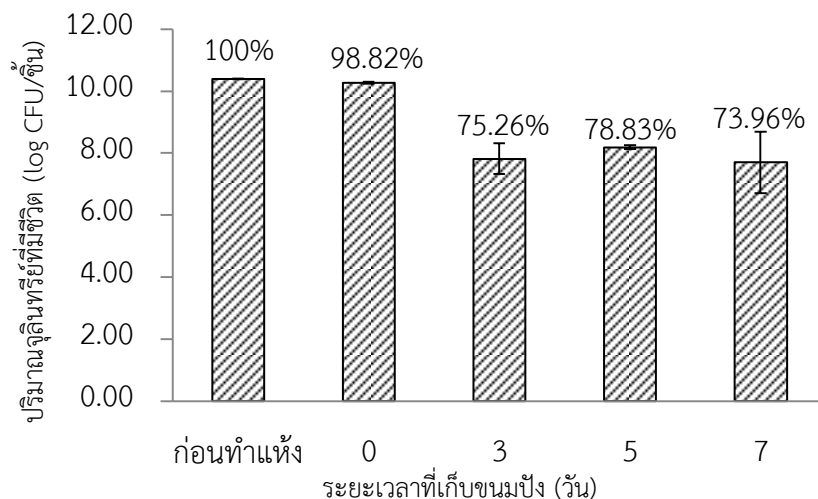
ทำตามวิธีของ Tripetch *et al.* (2016) สำหรับการศึกษาพื้นผิวหน้าของฟิล์ม ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 5 mm x 5 mm แล้วติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปคาร์บอน กระจกศึกษาภาคตัดขวางของฟิล์ม เตรียมตัวอย่างโดยตัดฟิล์มขนาด 5 mm x 10 mm แล้วนำขึ้นฟิล์มแช่ลงในไนโตรเจนเหลวให้ฟิล์มแข็งตัวและหักตัวอย่างฟิล์ม ทิ้งให้ตัวอย่างฟิล์มอ่อนตัวลง ใช้เทปคาร์บอนติดตั้งฟิล์มบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) ที่มีลักษณะเป็นร่องตั้งฉากกับพื้นผิวสำหรับติดตั้งตัวอย่างเคลือบตัวอย่างฟิล์มด้วยทองแล้ววิเคราะห์โครงสร้างจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ด้วยเทคนิค field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) ด้วยเครื่อง JEOL JSM-7610F Field Emission Scanning Electron Microscope โดยใช้ accelerating voltage เท่ากับ 2 kV บันทึกภาพที่กำลังขยาย 2,000 และ 10,000 เท่าสำหรับการศึกษาภาคตัดขวางของฟิล์ม และบันทึกภาพที่กำลังขยาย 5,000 และ 10,000 เท่าสำหรับการศึกษาพื้นผิวของฟิล์ม

จ8 Fourier transform infrared (FT-IR) spectra

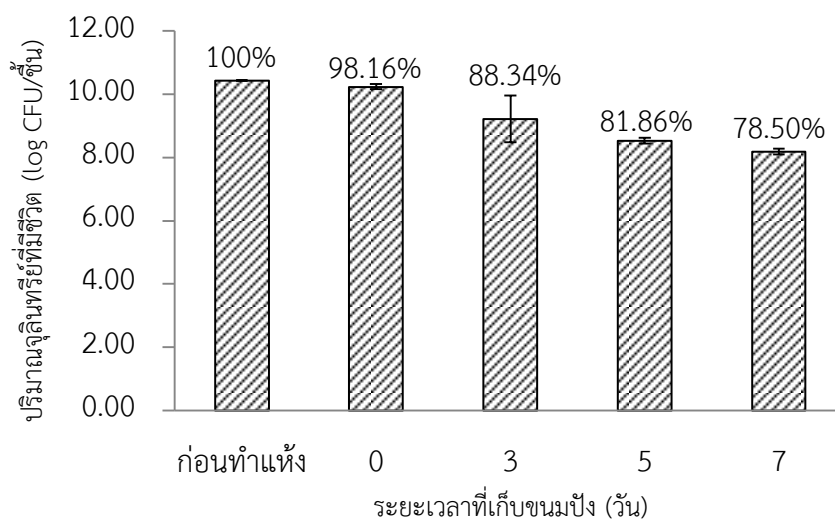
ทำตามวิธีของงานวิจัยก่อนหน้า (Tripetch *et al.*, 2016) เพื่อตรวจสอบการสร้างพันธะระหว่างกลูโคแมนแนนและพรีไบโอติกในแผ่นฟิล์ม โดยเตรียมฟิล์มทั้งหมด 4 สูตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.2.3.2 ได้แก่ ฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุก, ฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมโพรบิโอดีค *L. casei*-01, ฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมพรีไบโอดีค Orafiti® GR และฟิล์มจากกลูโคแมนแนนของผงบุกที่เติมทั้งโพรบิโอดีคและพรีไบโอดีค วิเคราะห์ตัวอย่างฟิล์มด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR spectroscopy) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (PerkinElmer Spectrum One FT-IR Spectrometer) ที่ต่อกับ Miracle Single-Reflection Diamond ATR device ในช่วงความยาวคลื่น 4000-400 cm^{-1} ใช้ transmission mode และวิธี KBr-pellet เก็บข้อมูล 64 สแกน และ resolution เท่ากับ 4 cm^{-1}

ภาคผนวก ฉ
การนำฟิล์มที่พัฒนาได้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

ฉ1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตระหว่างการเก็บรักษาขนมปัง



ภาพที่ ฉ1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *L. casei*-01 ในขนมปังที่มีสารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 (KGM/LC) ระหว่างการเก็บนาน 7 วัน กราฟแท่งแสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และตัวเลขบนแท่งกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต



ภาพที่ ฉ1.2 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *L. casei*-01 ในขนมปังที่มี สารเคลือบกลูโคแมนแนนที่เติม *L. casei*-01 และ Orafiti® GR (KGM/LC/GR) ระหว่างการเก็บนาน 7 วัน กราฟแท่งแสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และตัวเลขบนแท่งกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต



ภาพที่ ฉ1.3 ตัวอย่างขนมปังที่ไม่เคลือบฟิล์มและเคลือบฟิล์ม ในภาพเป็นขนมปังวันที่ 7 พบว่า บางส่วนมีราขนมปังเจริญบนขนมปังแล้ว



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัทธ์ศรัณย์ พฤกษาโรจนกุล เกิดวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ.2530 ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557 โดยทำงานวิจัยภายใต้การดูแลของคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รับรางวัลรองชนะเลิศอันดับสองจากการแข่งขันนำเสนอผลงานวิจัยในรูปแบบบรรยาย จากการประชุมวิชาการ Food Innovation Asia Conference (FIAC) 2017 ระหว่างวันที่ 15-17 มิถุนายน พ.ศ. 2560 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

