P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 31 ฉบับที่ 3 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2566) หน้า [105-118]

ผลของแป้งข้าวดัดแปลงต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก

Effect of Modified Rice Starch on Enhancing Survival of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a in Synbiotic Gummy Candy Supplemented with Khao-Mak

รัชนู เมยดง*, บุษบา แสงแก้ว, รัตน์สุภา ธรรมาภรณ์, ศิริพร ทิพย์สิงห์
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600
Ratchanu Meidong*, Butsaba Seangkaew, Ratsupa Thammaporn, Siriporn Thipsing
Department of Medical Sciences, Faculty of Science and Technology
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600
Received 5 March 2023; Received in revised 2 May 2023; Accepted 11 May 2023

บทคัดย่อ

อาหารที่มีโพรไบโอติกส์เป็นองค์ประกอบจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งคือการมีปริมาณโพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตสูงในผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากที่ช่วยคงปริมาณการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ไว้ได้สูงหลังการเก็บรักษา ยีสต์และราได้ถูกแยกมาจากลูกแป้งข้าวหมากเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทำข้าวหมาก โดยได้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomycopsis oxydans YKa22f* และ *Wickerhamomyces lynferdii YKa22f* และราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* MA22d และ *A. oryzae* MSri30a โดยเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากในการทดลองนี้มี 4 สูตร ประกอบด้วยสูตรที่ไม่มีพรีไบโอติกส์ (GL01) ผสมอินนูลิน (GL02) ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (GL03) และผสมแป้งข้าวดัดแปลง (GL04) พบว่าเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากทั้ง 4 สูตรมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระแม้เก็บเป็นเวลา 2 เดือน อีกทั้งยังพบว่าภายหลังการเก็บเป็นเวลา 2 เดือน สูตรที่มีแป้งข้าวดัดแปลงมีการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a สูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการเตรียมเยลลี่จากโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์เสริมข้าวหมากสามารถประยุกต์ใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพโพรไบโอติกส์ได้

คำสำคัญ: โพรไบโอติกส์; ยีสต์; ข้าวหมาก; แป้งข้าวดัดแปลง

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** ratchanu.me@bsru.ac.th **doi:** 10.14456/tstj.2023.48

745-66-.indd 105 14/7/2566 BE 15:18

Abstract

Foods containing probiotics are classified as functional foods. One critical point is the high content of live probiotics in the products. This research aimed to develop synbiotic gummy candies supplemented with khao-mak that has high probiotic survival after storage. Yeast and mold were isolated from look-pang-khao-mak for use as a starter culture for khao-mak production. The yeast isolates were identified as *Saccharomycopsis oxydans* YKa22f and *Wickerhamomyces lynferdii* YKa22f, while the mold isolates were identified as *Aspergillus flavus* MA22d and *A. oryzae* MSri30a. There were four formulations of synbiotic gummy candy supplemented with khao-mak, including those without prebiotics (GL01), with inulin (GL02), with fructo-oligosaccharides (GL03), and with modified rice starch (GL04). It was found that all four formulations of synbiotics mixed with khao-mak had antioxidant activity even after being stored for two months. Additionally, after two months of storage, the modified rice starch formulation showed probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a survival significantly higher than that of other formulations. Therefore, using probiotics and prebiotics as gummy candy supplemented with khao-mak could be a promising probiotic food application.

Keywords: Probiotics; Yeast; Khao-mak; Modified rice starch

1. บทนำ

ผู้คนในปัจจุบันให้ความสนใจกับอาหารที่รับประทานมากขึ้นอันเนื่องมาจากความใส่ใจในด้านผลที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่จัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ซึ่งมีการคาดการณ์ว่าจะได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ปี [1] โดยอาหารที่มีโพรไบโอติกส์ (probiotics) และพรีไบโอติกส์ (prebiotics) จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเพื่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่งผลดีต่อระบบทางเดินอาหาร [2] โพรไบโอติกส์ได้ถูกให้คำนิยามว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ส่งผลดีต่อสุขภาพเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม โดยทั่วไปต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคต่อร่างกายของมนุษย์ [3] จุลินทรียที่ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์มากที่สุดคือกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. [4] และ *Lactobacillus* spp. [5, 6] โดยในการศึกษานี้ใช้โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *Lactiplantibacillus plantarum* BL60a (เดิม *Lactobacillus plantarum*) ซึ่งมีการศึกษาว่ามีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกส์ [7] ประกอบด้วยคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค การทนต่อสภาวะในทางเดินอาหาร คุณสมบัติในการเกาะที่ลำไส้ และมีความปลอดภัย ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ในอาหาร [8]

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์จะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากน้ำนม (dairy product) แต่ปัจจุบันได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ผสมโพรไบโอติกส์ที่ทำมาจากวัตถุดิบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่น้ำนม (non-dairy product) ที่เหมาะสำหรับคนที่รับประทานน้ำนมไม่ได้และกลุ่มที่รับประทานอาหารแบบมังสวิรัติ [9] โดยผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือปริมาณโพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตสูงเพียงพอในผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องไม่น้อยกว่า 106 CFU/ml [10] ซึ่งโพรไบโอติกส์จะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อมีอาหารที่เหมาะสม นั่นคือสารประกอบกลุ่มพรีไบโอติกส์ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพของแป้งข้าวดัดแปลงว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์และสามารถส่งเสริมการเจริญ

745-66-.indd 106 14/7/2566 BE 15:18

ของเชื้อ *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium animalis* ได้ [11] อีกทั้งมีรายงานว่าแป้งข้าวดัดแปลงสามารถส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *L. casei, Levilactobacillus brevis* และ *La. plantarum* เมื่อใช้ร่วมกับวิธีการห่อหุ้มเซลล์ได้ [12]

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ในรูปแบบขนมคือเยลลี่ โดยมีการเสริมพรีไบโอติกส์จากแป้งข้าวดัดแปลงและผสมข้าวหมากที่ผลิตขึ้นจากหัวเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์เยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากที่รับประทานได้ทั้งเด็กและผู้ใหญ่ ข้าวหมากเป็นการหมักของจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล และมีจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่เปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นแอลกอฮอล์ในระดับต่ำ [13, 14] ในการทำข้าวหมากที่ใช้หัวเชื้อทางการค้าพบปัญหาคือปริมาณเชื้อสำคัญในข้าวหมากมีปริมาณที่ไม่แน่นอน และอาจปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เหมาะสมทำให้ข้าวหมากเน่าเสีย ดังนั้นหากเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตข้าวหมากได้เองจะช่วยให้รักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์ข้าวหมากได้ในทุกรอบของการผลิต ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งข้าวหมากเพื่อทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตข้าวหมาก และการประยุกต์ใช้ข้าวหมากในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เยลลี่ รวมศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ที่มีข้าวหมากเป็นส่วนผสม

2. อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

2.1 การแยกเชื้อยีสต์และราจากลูกแป้งข้าวหมาก

ลูกแป้งข้าวหมากในการศึกษานี้รวบรวมมาจากตลาดใน 11 จังหวัด ประกอบด้วย กำแพงเพชร สุพรรณบุรี อ่างทอง สมุทรสาคร ราชบุรี ปทุมธานี ศีรสะเกษ ขอนแก่น หนองคาย สุราษฎร์ธานี และสกลนคร ในการแยกเชื้อยีสต์และรา ทำโดยนำตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากมาจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน Normal saline solution (0.85% NaCl; NSS) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และทำการเจือจางและนำความเจือจางที่เหมาะสมมาเกลี่ย (spread) ลงในอาหาร Rose Bengal chloramphenicol agar บ่มที่อุณภูมิ 28 ºC เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีของยีสต์และราที่แตกต่างกันมาเพาะเลี้ยง ในอาหาร Potato Dextrose agar (PDA, Himedia, india) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่ตู้ -80 ºC สำหรับใช้ศึกษาต่อ

2.2 ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้ง

ยีสต์ที่ถูกเลือกมาศึกษาต่อคือไอโซเลต YKa22f และ YCh02a ส่วนราคือไอโซเลต MA22d และ MSri30a เลี้ยงใน Potato Dextrose broth (PDB, Himedia, india) บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่รอบเขย่า 150 rpm เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ºC (MPW- 352R, Gibthai, Bangkok, Thailand) เพื่อเก็บส่วนใสไว้เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์

วิธีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยการตรวจหา reducing sugar] จากการย่อยสลายแป้ง เริ่มจากนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และ soluble starch (1 %) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มใน water bath อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 30 นาที [15] จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสแล้วนำไปตรวจหา reducing sugar ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method [16] โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน เพื่อหาปริมาณ reducing sugar ในสารสกัดโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กำหนดให้ 1 หน่วย (Unit, U) คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมล ของ reducing sugar จากการย่อยสารละลาย soluble starch (1%) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ในการตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยราและยีสต์ไอโซเลตที่ย่อยแป้งได้นำมาศึกษาการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยเลี้ยง

745-66-.indd 107 14/7/2566 BE 15:18

ในอาหาร PDB บ่มแบบเขย่าที่ 150 rpm นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมลงใน soluble starch (1%) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร บ่มใน water bath อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลาย NaOH (1 mol/L) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ปรับให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี Fehling's test [15] กำหนดให้ 1 หน่วย คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมล ของ reducing sugar จากการย่อยสารละลาย soluble starch (1%) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.3 การจำแนกยีสต์และรา

การจำแนกยีสต์ใช้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและยืนยันด้วยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ โดยสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง D1/D2 ของ 26s rDNA gene ด้วยไพร์เมอร์ NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAG GAAAAG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') [17] โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ราจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเพาะเลี้ยงราด้วยเทคนิค slide culture นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นศึกษาต่อด้วยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB method) ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ด้วยวิธี PCR [18] จากนั้นนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ของทั้งยีสต์และรามาระบุสปีชีส์ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับยีสต์หรือราร่วมกับสายพันธุ์อื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide Blast และนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7 [19]

2.4 การทำลูกแป้งข้าวหมากจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

เชื้อยีสต์และราที่ใช้ในการผลิตลูกแป้งในการศึกษานี้ ประกอบด้วยราไอโซเลต MA22d และ MSri30a และยีสต์ไอโซเลต YKa22f และ YCh02a โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมให้เจริญอย่างสมบูรณ์ จากนั้นปรับเซลล์ยีสต์ให้เข้มข้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และสปอร์ราให้เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเตรียมลูกแป้งโดยใช้เป็นเชื้อผสม เริ่มจากนำแป้งข้าวเจ้ามาร่อนด้วยตะแกรงร่อน เพื่อไม่ให้แป้งข้าวเจ้าจับตัวเป็นก้อน ต่อมาเตรียมสมุนไพร ได้แก่ ข่า (2.5%) ขิง (2.5%) กระเทียม (2.5%) ชะเอม (2.5%) พริกไทย (0.7%) และดีปลี (0.7%) ผสมสมุนไพรที่อัตราส่วนดังกล่าวแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 ºC เป็นเวลา 15 นาที ผสมเครื่องสมุนไพรคลุกเคล้ากับแป้งที่ร่อนเตรียมไว้ให้เข้ากัน แล้วจึงใส่หัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไปที่ร้อยละ 5 ผสมให้เข้ากัน ตามด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยนวดแป้งไปเติมน้ำไปเพื่อไม่ให้แป้งเหลวเกินไป สามารถปั้นก้อนแป้งได้ นำก้อนแป้งไปอบที่อุณหภูมิ 55 ºC จนลูกแป้งแห้งและเก็บไว้ศึกษาต่อ

2.5 การทำข้าวหมากจากลูกแป้งที่เตรียมจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์

ในการศึกษานี้จะใช้ลูกแป้งข้าวหมากที่พัฒนาขึ้นมาเตรียมข้าวหมาก เริ่มจากการนำข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข. 6 ที่ผ่านการนึ่งให้สุกแล้วและปล่อยให้เย็น จากนั้นนำมาล้างยางข้าวออก ด้วยน้ำต้มสุกที่เย็นแล้ว และนำข้าวเหนียวที่เตรียมไว้มาคลุกด้วยลูกแป้งที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3 และบรรจุลงในภาชนะ ปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-35 ºC) เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ได้ข้าวหมากสำหรับนำไปใช้ศึกษาต่อ โดยข้าวหมากที่ทำขึ้นทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (DPPH method) ตามวิธีของ Ding et al. [20] ตรวจแอลกอฮอล์ด้วย Ebulliometer (Dujardin-

745-66-.indd 108 14/7/2566 BE 15:18

Salleron, Alcohol Burner, France) ตรวจของแข็งทั้งหมด (total solid) ด้วย Atago Master-53M refractometer (Atago Co., Ltd., Fukuoka, Japan) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย pH meter (Mettler Toledo, SevenEasy, Switzerland) และตรวจโคลิฟอร์มด้วยวิธี MPN method

2.6 การเตรียมแป้งข้าวดัดแปลง

แป้งข้าวดัดแปลงในการทดลองนี้เตรียมโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เตรียมตามวิธีของ Almeida et al. [21] โดยแช่ข้าวในสารละลายโซเดียมเมแทไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite; Na2S2O5) ร้อยละ 0.2 ที่อัตราส่วน 1:2 (w/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทสารละลายทิ้งและล้างข้าวต่อด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำข้าวไปปั่นร่วมกับน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:2; w/v) ด้วยเครื่องปั่นจนละเอียด กรองเอาสารละลายแป้ง นำน้ำแป้งที่ได้มาย่อยโดยการเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 2 unit/g pH 8.0 บ่มที่ 35 ºC เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 121 ºC เป็นเวลา 10 นาที และนำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 55 ºC จนกระทั่งแห้ง และนำแป้งไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช เรียก modified rice starch (MS) เก็บในที่แห้งและไม่มีแสงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.7 การทำเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก

2.7.1 การเตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ในการทำเยลลี่

แบคทีเรียโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ *La. plantarum* BL60a [7] เลี้ยงในอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (BioMerieux, France) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ºC เพื่อเก็บรักษาเซลล์และทำการเจือจางด้วย NSS จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่น และปรับให้มีค่าความขุ่น OD_{600} เท่ากับ 2.0 (1×10^{10} CFU/ml) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.7.2 การทำเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก

การทำเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากในการศึกษานี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Miranda et al. [22] มีองค์ประกอบของสูตรต่าง ๆ ดังแสดงใน Table 1 เริ่มจากผสมน้ำและเจลลาตินจากนั้นละลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 ºC เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการเติมน้ำตาลซูโครส น้ำเชื่อมกลูโคส กรดซิตริก ข้าวหมากและพรีไบโอติกส์ ได้แก่ อินนูลิน ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides, FOS) และ MS ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปสเตอริไลส์ ที่อุณหภูมิ 110 ºC เป็นเวลา 10 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45 ºC ก่อนเติมเซลล์แขวนลอยโพรไบโอติกส์ กวนให้เข้ากันและเทลงแม่พิมพ์ วางที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อให้ได้รูปแบบที่แข็งแบบเจลก่อนนำไปศึกษาต่อ

2.8 การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่เมื่อผ่านสภาวะจำลองของทางเดินอาหาร

นำเยลลี่แต่ละสูตรมา 1 กรัม ละลายใน NSS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม simulated gastric fluid (SGF, pepsin 0.3%; Sigma-Aldrich, USA), pH 2.0 ตามวิธีของ Huang & Adam [23] ใส่ตัวอย่างเยลลี่ที่เตรียมไว้ลงใน SGF ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทุก 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ออกมาตรวจนับเชื้อด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร MRS ผสม $CaCO_3$ ที่ร้อยละ 0.5 (MRS- $CaCO_3$) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (6000 rpm, 4 ºC, 10 นาที) เพื่อเก็บตัวอย่างและใส่ลงในสารละลาย simulated intestinal fluid (SIF, pancreatin 0.1%, bile salt 0.3%; Sigma-Aldrich, USA), pH 8.0 บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร MRS- $CaCO_3$ และรายงานผลเป็นร้อยละการรอดชีวิต

ร้อยละการรอดชีวิต = (log จำนวนเซลล์รวมหลังทดสอบที่เวลาต่างๆ ÷ log จำนวนเซลล์เริ่มต้น) x 100

745-66-.indd 109 14/7/2566 BE 15:18

Table 1 The composition of gummy candy with the addition of the prebiotic.

Compositions	Treatments			
	GL01	GL02	GL03	GL04
Gelatin (g)	10	10	10	10
Water (ml)	20	20	20	20
Sucrose (g)	11	11	11	11
Glucose syrup (g)	24	24	24	24
Citric acid (g)	2	2	2	2
La. plantarum BL60a (1 x 10^{10} CFU/ml)	2	2	2	2
Inulin (g)	0	2	0	0
FOS (g)	0	0	2	0
Modified rice starch (g)	0	0	0	2
Khao-mak (g)	30	30	30	30

2.9 การศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเยลลี่ซินไบโอติกส์

การตรวจกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเยลลี่ซินไบโอติกส์สูตรต่าง ๆ ตรวจตามวิธีของ Ding et al. [20] โดยเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วยการนำเยลลี่มา 1 กรัม ผสมกับแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใสไว้ใช้ ในการศึกษานี้ใช้สารละลาย 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 0.2 mM ซึ่งทำการละลายในเอทานอล (Merck, Germany) ร้อยละ 95 ในส่วนของขั้นตอนการทดสอบใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในขณะที่ blank จะใช้ PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (SPECTROstar Nano, BGM LABTECH, Germany) แล้วนำมาคำนวณค่า Scavenging effect (%) โดยในการทดสอบจะใช้ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

มีสูตรดังนี้ Antioxidant (%) = [(A control - A sample) ÷ A control] × 100

745-66-.indd 110 14/7/2566 BE 15:18

2.10 การศึกษา shelf life ของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก

เยลลี่ทั้ง 4 สูตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 ºC) เป็นเวลา 60 วัน โดยทุก 10 วัน ตรวจการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่แต่ละสูตรด้วยวิธี spread plate technique บนอาหาร MRS - $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 35 ºC ตรวจนับโคโลนี และรายงานผลเป็น log CFU/g เยลลี่

2.11 สถิติในการวิจัย

ทุกการทดลองทำสามซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One Way Analysis of Variance: ANOVA) หาความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการแยกเชื้อและจำแนกเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมาก

จากการคัดเลือกเชื้อและศึกษาคุณลักษณะที่เหมาะสมเพื่อใช้พัฒนาลูกแป้งข้าวหมาก โดยได้แยกเชื้อจากจังหวัดกำแพงเพชร สุพรรณบุรี อ่างทอง สมุทรสาคร ราชบุรี ปทุมธานี ศรีสะเกษ ขอนแก่น หนองคาย สุราษฎร์ธานี และสกลนคร จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง แยกเชื้อยีสต์ได้จำนวน 96 ไอโซเลต และรา จำนวน 41 ไอโซเลต

ผลการจำแนกยีสต์และราสายพันธุ์ที่ถูกเลือกมาศึกษาต่อ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สูง รวมถึงการผลิตแอลกอฮอล์ในระดับต่ำ ยีสต์ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อคือไอโซเลต YKa22f และ YCh02a ผลการจำแนกใกล้เคียงสายพันธุ์ *Saccharomycopsis oxydans* และ *Wickerhamomyces lynferdii* ตามลำดับ และราไอโซเลตที่คัดเลือกไปใช้ศึกษาต่อคือ MA22d และ MSri30a ซึ่งใกล้เคียงกับราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *A. oryzae* ตามลำดับ

3.2 ผลการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้งของยีสต์และรา

นำยีสต์ (96 ไอโซเลต) และรา (41 ไอโซเลต) ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก มาตรวจสอบกิจกรรมในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง คือเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส โดยเริ่มจากการศึกษาเอนไซม์อะไมเลส พบมียีสต์และราที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 31 และ 21 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยไอโซเลตที่มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ที่สูงแสดงใน Figure 1 พบกิจกรรมของการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของยีสต์อยู่ระหว่าง 125.86-147.50 unit/ml (ไอโซเลต YKa22f ผลิตสูงสุดที่ 147.50 unit/ml) และราผลิตเอนไซม์อะไมเลสระหว่าง 108.13-159.41 unit/ml (ไอโซเลต MA22d ผลิตสูงสุดที่ 159.41 unit/ml) และพบว่ามียีสต์จำนวน 26 ไอโซเลต และรา จำนวน 22 ไอโซเลต ที่สร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Figure 1) โดยยีสต์ผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอยู่ระหว่าง 120.26-142.44 unit/ml (ไอโซเลต YKa22f ผลิตสูงสุดที่ 142.44 unit/ml) ขณะที่ราผลิตกลูโคอะไมเลสอยู่ระหว่าง 120.90-155.94 unit/ml (ไอโซเลต MSri30a ผลิตสูงสุดที่ 155.94 unit/ml)

3.3 ผลการทำข้าวหมากจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้

ข้าวหมากจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของลูกแป้งที่ร้อยละ 3 และหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าข้าวหมากมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH 4.437 มีแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 0.45 และมีค่าของแข็งรวม (total solid) ที่ร้อยละองศาบริกซ์ในข้าวหมาก คือ 40.98 และมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 40.55 อีกทั้งข้าวหมากที่ทำขึ้นไม่มีการปนเปื้อนของโคลิฟอร์ม จึงเหมาะสมต่อการนำไปใช้ไปผลิตเยลลี่ในการศึกษาต่อไป

745-66-.indd 111 14/7/2566 BE 15:18

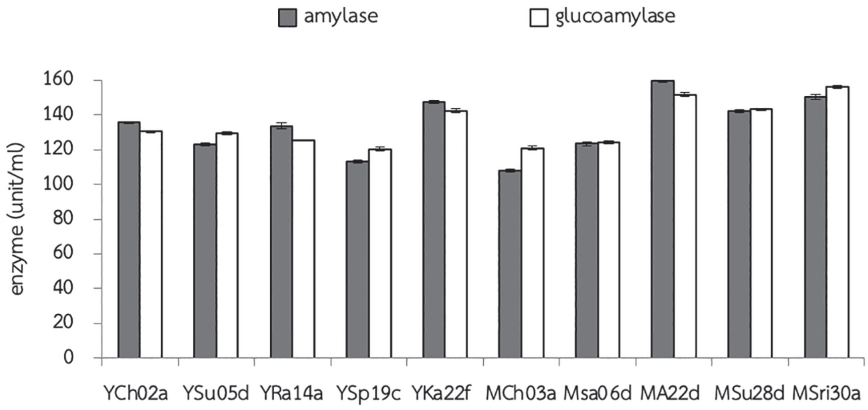

Figure 1 Amylase and glucoamylase activities from yeast and mold isolated from look-pang-khao-mak Results show the average values of three replicates ± standard error. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at $p < 0.05$.

3.4 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากหลังผ่านสภาวะในทางเดินอาหาร

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์หลังทดสอบในสภาวะของทางเดินอาหาร แสดงใน Figure 2 เมื่อทดสอบในสภาวะของทางเดินอาหาร โดยเริ่มจากกระเพาะเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบการรอดชีวิตเชื้อโพรไบโอติกส์อยู่ระหว่างร้อยละ 82.98-96.28 (สูตรที่มีแป้งดัดแปลงรอดชีวิตสูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ) และเมื่อศึกษาการรอดชีวิตหลังผ่านสภาวะจำลองของลำไส้ พบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากอยู่ที่ร้อยละ 70.20 - 88.19 โดยเยลลี่ซินไบโอติกส์ที่มีส่วนผสมของแป้งข้าวดัดแปลง (GL04) พบมีการรอดชีวิตในลำไส้สูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อยู่ที่ร้อยละ 88.19

3.5 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากสูตรต่าง ๆ แสดงใน Table 2 โดย Trolox (50 mM) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 58.45 ผลการทดลองพบว่าในผลิตภัณฑ์เยลลี่ทุกสูตรมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในวันเริ่มต้นอยู่ระหว่างร้อยละ 31.86 - 32.32 ซึ่งเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากทุกสูตรมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในวันเริ่มต้นของการเก็บและในแต่ละสูตรเมื่อเก็บเป็นเวลา 30 วัน พบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่างร้อยละ 31.80 -32.20 เมื่อเก็บเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในแต่ละสูตรของเยลลี่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากวันแรกอยู่ที่ร้อยละ 30.58 – 31.73

745-66-.indd 112 14/7/2566 BE 15:18

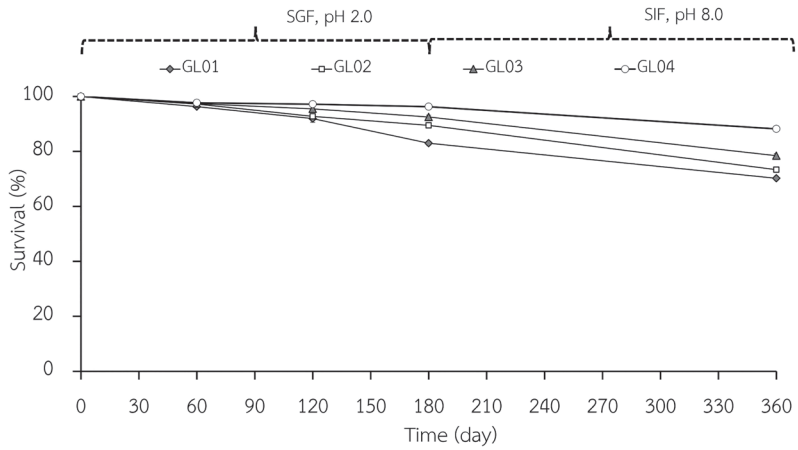

Figure 2 Survival of probiotic in synbiotic gummy candy supplemented with khoa-mak after exposed in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid. The mean values with different lowercase letters indicate significantly different ($p < 0.05$).

Table 2 Antioxidant activity of synbiotic gummy candy supplemented with khao-mak.

Treatments	Storage time (day)		
	0	30	60
GL01	31.86±0.89^{aA}	31.80±1.04^{aA}	30.58±0.94^{aA}
GL02	31.92±0.71^{aA}	31.81±0.19^{aA}	30.84±1.01^{aA}
GL03	32.32±0.58^{aA}	32.14±0.59^{aA}	31.54±1.62^{aA}
GL04	32.24±0.99^{aA}	32.20±0.96^{aA}	31.73±0.90^{aA}

* The mean values in the same row with different lowercase superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

** The mean values in the same column with different uppercase superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

3.6 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์เมื่อเก็บเป็นเวลา 2 เดือน

หลังเก็บเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากที่อุณหภูมิห้องนาน 2 เดือน พบว่าสูตรที่มีแป้งข้าวดัดแปลงเป็นองค์ประกอบ (GL04) มีเชื้อโพรไบโอติกส์รอดชวิตสูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยพบเชื้อที่ 7.08 log CFU/g รองลงมาคือสูตรที่มีพรีไบโอติกส์ FOS (GL03) (5.65 log CFU/g) และสูตรที่มีพรีไบโอติกส์อินนูลิน (GL02) (5.37 log CFU/g) ซึ่งมีปริมาณเชื้อโพรไบโอติกส์สูงกว่าสูตรที่ไม่มีพรีไบโอติกส์ (GL01) (3.63 log CFU/g) อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 3)

745-66-.indd 113 14/7/2566 BE 15:18

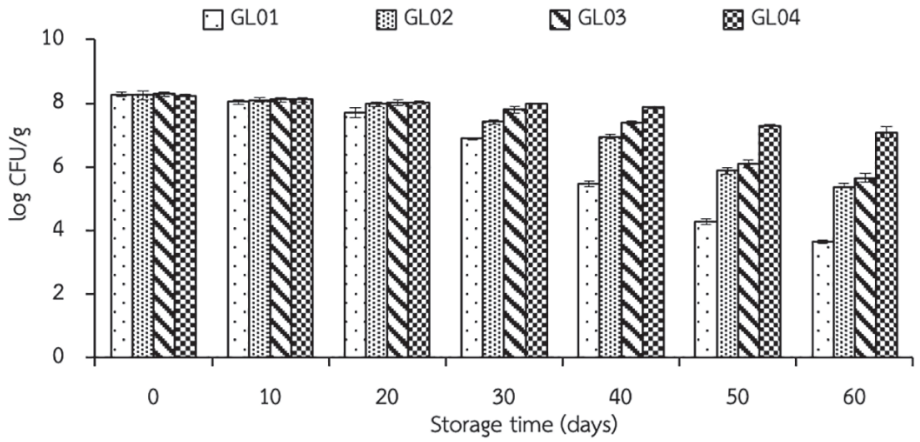

Figure 3 Viable cell of probiotic in synbiotic gummy candy supplemented with khao-mak after 60 days of storage at room temperature. Means at the same sampling day with different lowercase letters indicate significantly different ($p < 0.05$).

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

ลูกแป้งข้าวหมากคือแหล่งของหัวเชื้อที่ใช้ในการนำมาหมักกับข้าวเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสหวานและแอลกอฮอล์ระดับต่ำ ซึ่งข้าวหมากเป็นขนมจากการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งของไทยที่มีการทำมาอย่างยาวนาน ในการหมักข้าวหมากขั้นตอนแรกคือการที่จุลินทรีย์ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล ขั้นตอนที่ 2 คือจุลินทรีย์อีกกลุ่มเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็นแอลกอฮอล์ โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. oxydans* YKa22f และ *W. lynferdii* YKa22f และราสายพันธุ์ A. flavus MA22d และ A. oryzae MSri30a โดยในงานวิจัยอื่น ๆ ได้รายงานกลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญในลูกแป้งสำหรับทำข้าวหมาก ในกลุ่มยีสต์ได้แก่ *S. fibuligera, W. anomalus, Rhodotorula philyla, Candida tropicalis, C. rugosa, Issatchenkia orientalis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในขณะที่กลุ่มราในลูกแป้งข้าวหมากประกอบด้วย *Rhizopus* sp., *Amylomyces* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., **Monascus** sp. และ *Actinomucor* sp. เป็นต้น [13, 14]

ยีสต์และราที่เป็นจุลินทรีย์หลักในการหมักข้าวหมาก ต้องมีคุณสมบัติในการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลจากการสร้างเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส [14] ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ทั้งสองเป็นคุณสมบัติหลักในการคัดเลือกยีสต์และราเพื่อนำมาใช้ทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตข้าวหมาก และผลที่ได้จากการทำข้าวหมากเมื่อนำยีสต์และราที่คัดเลือกได้ไปใช้ผลิตข้าวหมาก พบว่าข้าวหมากที่ผลิตขึ้นมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH 4.437 มีแอลกอฮอล์ที่ร้อยละ 0.45 และมีค่าของแข็งรวม ที่ร้อยละองศาบริกซ์ในข้าวหมาก คือ 40.98 ซึ่งอยู่ในช่วงมาตรฐานข้าวหมากของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. 162/2546) ที่ได้ระบุถึงคุณลักษณะที่ต้องการของผลิตภัณฑ์ข้าวหมากในด้านแอลกอฮอล์ ค่ากรด-ด่าง ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และด้านจุลินทรีย์ในข้าวหมาก

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ *La. plantarum* BL60a ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก เมื่อผ่าน

745-66-.indd 114 14/7/2566 BE 15:18

สภาวะของทางเดินอาหารในสูตรที่มีแป้งข้าวดัดแปลงพบเชื้อรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 88.19 ซึ่งสูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ โดยในงานของ Ashwar et al. [12] พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวดัดแปลงในกระบวนการหุ้มเซลล์ช่วยให้โพรไบโอติกส์ *L. casei, Le. brevis* และ *La. plantarum* รอดชีวิตได้สูง และในงานของ Feng et al. [6] ที่พบว่าโพรไบโอติกส์ *La. plantarum* YC-5 ในเยลลี่ที่มีส่วนผสมของพรีไบโอติกส์ที่สกัดได้จากเห็ดสามารถช่วยให้เชื้อรอดชีวิตได้สูงเมื่อทดสอบในสภาวะของทางเดินอาหาร จากข้อมูลเหล่านี้จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าการเลือกใช้สารประกอบพรีไบโอติกส์ที่เหมาะสมต่อโพรไบโอติกส์ในผลิตภัณฑ์จะช่วยส่งเสริมให้โพรไบโอติกส์รอดชีวิตในทางเดินอาหารได้ดี ดังผลจากงานวิจัยนี้พบว่าแป้งข้าวดัดแปลงเป็นพรีไบโอติกส์ที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียโพรไบโอติกส์สายพันธุ์นี้และช่วยให้รอดชีวิตได้สูงเมื่อผ่านสภาวะในทางเดินอาหาร

สารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ตัวอย่างเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ($O_2^{\bullet}$)และไฮดรอกซิลแรดดิเคิล ($OH^{\bullet}$) เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มในเซลล์จะทำลายไขมัน โปรตีนและดีเอ็นเอในเซลล์ได้ ซึ่งจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหลายโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และเบาหวาน เป็นต้น [24] ในงานวิจัยนี้พบว่าเยลลี่ซินไบโอติกส์ในทุกสูตรยังคงตรวจพบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ แม้เก็บเป็นเวลา 60 วัน (ร้อยละ 31.86 - 32.32) ซึ่งกิจกรรมไม่แตกต่างจากวันแรกของการเก็บ โดยกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเยลลี่มาจากข้าวหมากและโพรไบโอติกส์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบ มีรายงานการวิจัยที่ได้พัฒนาเยลลี่ที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัยของ Charoen et al. [25] รายงานกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในเยลลี่ผสมสารสกัดจากใบฝรั่ง พบว่ามีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่สูง และในงานของ Feng et al. [6] ได้พัฒนาเยลลีโพรไบโอติกส์ผสมพรีไบโอติกส์จากสารสกัดจากเห็ด ซึ่งโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ที่นำมาใช้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเมื่อใช้วิตามินซีเป็นตัวเทียบ โดยอยู่ที่ 15.98 mg AAE/L

การรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ (25 °C) เป็นเวลา 60 วัน พบว่าสูตรที่มีแป้งข้าวดัดแปลงมีแบคทีเรียโพรไบโอติกส์สูงกว่าสูตรอื่นที่มีพรีไบโอติกส์ทางการค้าและสูตรที่ไม่เติมพรีไบโอติกส์ โดยมีเชื้อที่มีชีวิตที่ 7.08 log CFU/g โดยสูงกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การรอดชีวิตที่สูงของโพรไบโอติกส์ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บจะช่วยยืนยันปริมาณเชื้อแม้เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้องเชื้อก็ยังคงมีปริมาณสูงเพียงพอเป็นเวลานานก่อนถึงมือผู้บริโภค ซึ่ง Ashwar et al. [26] รายงานผลการวิจัยว่าแป้งข้าวดัดแปลงช่วยให้ *L. casei* รอดชีวิตสูงในการเก็บรักษา ดังนั้นแป้งข้าวดัดแปลงที่ใช้ในการศึกษานี้จึงมีส่วนช่วยให้ *La. plantarum* BL60a รอดชีวิตได้สูงในเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมากเมื่อเทียบกับเยลลี่สูตรอื่น ๆ

5. สรุปผล

เชื้อยีสต์และราที่แยกได้มีความเหมาะสมในการทำข้าวหมาก โดยข้าวหมากที่ได้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดและสามารถนำไปใช้แปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้ เมื่อนำไปพัฒนาเป็นเยลลี่ซินไบโอติกส์ผสมข้าวหมาก พบว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเซลล์โพรไบโอติกส์สูงและมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไปได้

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2565 และมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

745-66-.indd 115 14/7/2566 BE 15:18

7. References

[1] Szydłowska, A. and Sionek, B., 2023, Probiotics and postbiotics as the functional food components affecting the immune response, Microorganisms. 11: 104.

[2] Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N. and Fakiri, E.M., 2013, Health benefits of probiotics: a review, ISRN Nutr. 481651: 1-7.

[3] FAO/WHO., 2006, Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO Food Nutr. Pap. 85.

[4] Asadzadeh, A., Jalali, H., Azizi, M.H. and Nafchi, H.H., 2021, Production of oat bran functional probiotic beverage using *Bifidobacterium lactis,* Food Mea. 15: 1301–1309.

[5] Lele, V., Ruzauskas, M., Zavistanaviciute, P., Laurusiene, R., Rimene, G., Kiudulaite, D., Tomkeviciute, J., Nemeikstyte, J., Stankevicius, R. and Bartkiene, E., 2018, Development and characterization of the gummy–supplements, enriched with probiotics and prebiotics, CyTA. J. Food. 16: 580-587.

[6] Feng, S., Wang, H., Lin, X., Liang, H., Zhang, S., Chen, Y. and Ji, C., 2023, Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* and application in prebiotic gummies, LWT - Food Sci. Technol. 174: 114357.

[7] Meidong, R. and Tongpim, S., 2019, Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* BL60a isolated from fermented food for functional food applications, Ver. E-J. Sci. Tech. Sil. Uni. 6(4): 81-96. (in Thai)

[8] Koirala, S. and Anal, A.K., 2021, Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims, Future Foods. 3: 100013.

[9] Küçükgöz, K. and Trząskowska, M., 2022, Nondairy probiotic products: functional foods that require more attention, Nutrients. 14: 753.

[10] Farahmand, A., Ghorani, B., Emadzadeh, B., Sarabi-Jamab, M., Emadzadeh, M., Modiri, A. and Tucker, N., 2022, Millifluidic-assisted ionic gelation technique for encapsulation of probiotics in double-layered polysaccharide structure, Int. Food Res. J. 160: 111699.

[11] Arshad, N.H., Zaman, S.A., Rawi, M.H. and Sarbini, S.R., 2018, Resistant starch evaluation and in vitro fermentation of lemantak (native sago starch), for prebiotic assessment, Int. Food Res. J. 25(3): 951-957.

[12] Ashwar, B.A., Gani, A., Gani, A., Shah, A. and Masoodi, F.A., 2018, Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics, Food Chem. 239: 287-294.

745-66-.indd 116 14/7/2566 BE 15:18

[13] Daroonpunt, R., Tanasupawat, S. and Keeratipibul, S., 2016, Characterization and amylolytic activity of yeast and mold strains from Thai sweet rice, Malaysian J. Microb. 12(2): 121-131.

[14] Roongrojmongkhon, N., Rungjindamai, N., Vatanavicharn, T. and Ochaikul, D., 2020, Isolation and identification of fungi with glucoamylase activity from Loog-pang-khao-mak (a Thai traditional fermentation starter), J. Pure Appl. Microbiol. 14(1): 233-246.

[15] Yassin, S.N., Jiru, T.M. and Indracanti, M., 2021, Screening and characterization of thermostable amylase-producing bacteria isolated from soil samples of Afdera, afar region, and molecular detection of amylase-coding gene, Int. J. Microbiol. 2021: 5592885.

[16] Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. chem. 3: 426-428.

[17] Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J., 1998, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, Anton. Leeuw. 73: 331-371.

[18] Huzar-Novakowiski, J. and Dorrance. A.E., 2018, Genetic diversity and population structure of *Pythium irregulare* from soybean and corn production fields in Ohio, Plant Dis. 102: 1989-2000.

[19] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, Mol. Biol. Evol. M. 33(1): 1870-1874.

[20] Ding, W., Wang, L., Zhang, J., Ke, W., Zhou, J., Zhu, J. and Long, R., 2017, Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented, J. Func. Foods. 35: 481-488.

[21] Almeida, R.L.J., Pereira, T., Almeida, R.D., Santiago, A.M., Marsiglia, W.I.M., Nabeshima, E.H., Conrado, L. and Gusmão, R.P., 2021, Rheological and technological characterization of red rice modified starch and jaboticaba peel powder mixtures, Sci. Rep. 11; 9284.

[22] Miranda, J.S., Costa, B.V., de Oliveira, I.V., de Lima, D.C.N., Martins, E.M.F., de Castro, B.R. and Martins, M.L., 2020, Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086, LWT - Food Sci. Technol. 126: 09275.

[23] Huang, Y. and Adams, M.C., 2004, *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria, Int. J. Food Microbiol. 91(3): 253-260.

[24] Wang, H., Chen, G., Li, X., Zheng, F. and Zeng, X., 2020, Yeast β-glucan, a potential prebiotic, showed a similar probiotic activity to inulin, Food Func. 11(12): 10386-10396.

745-66-.indd 117 14/7/2566 BE 15:18

[25] Charoen, R., Savedboworn, W., Phuditcharnchnakun, S. and Khuntaweetap, T., 2015, Development of antioxidant gummy jelly candy supplemented with *Psidium guajava* leaf. KMUTNB Int. J. Appl. Sci. Technol. 8(2): 145-151.

[26] Ashwar, B.A., Gani, A., Gani, A., Ahmad, M. and Shah, A., 2021, Encapsulating probiotics in novel resistant starch wall material for production of rice flour extrudates, LWT - Food Sci. Technol. 140: 10839.

745-66-.indd 118 14/7/2566 BE 15:18

พิมพ์ที่: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, พ.ศ. 2566
โทรศัพท์ 0-2564-3104 ถึง 6
โทรสาร 0-2564-3119
http://www.thammasatprintinghouse.com

745-66-.indd 119 14/7/2566 BE 15:18

745-66-.indd 120 14/7/2566 BE 15:18