



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การเพิ่มมูลค่าถั่วเหลืองและถั่วเขียวพืชมันโดยใช้ผลิตเป็นไอศกรีมซินไบโอติก

Value – added of soybean and mung bean by using in
synbiotic ice cream production

โดย

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และ มยุรา ศรีกัลยานุกูล

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2556

รหัสโครงการวิจัย

มจ.1-55-049



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การเพิ่มมูลค่าถั่วเหลืองและถั่วเขียวผิวน้ำมันโดยใช้ผลิตเป็นไอศกรีมซินไบโอติก
Value – added of soybean and mung bean by using in synbiotic ice cream
production

ได้รับการจัดงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555
จำนวน 238,900 บาท

หัวหน้าโครงการ

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

ผู้ร่วมโครงการ

มยุรา ศรีกัลยานุฑ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

27 กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2555 และงานวิจัยชิ้นสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความความอนุเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดพืชตระกูลถั่วจากหน่วยงานต่างๆ ดังต่อไปนี้ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ คุณรุ่งทิพย์ กาวารี และคุณนงคราญ พงษ์ตระกูล นักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งนางสาวสุทธิพร นันติ และนางสาววาสนา จินะธรรม นักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและวิเคราะห์ผลต่างๆ

ผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	๖
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลการวิจัย	17
วิจารณ์ผลการวิจัย	28
สรุปผลการวิจัย	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	37

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโปรไบโอติก	5
ตารางที่ 2	แสดงตัวอย่าง NDOs ที่มีการผลิตในทางการค้า	7
ตารางที่ 3	แสดงองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว	9
ตารางที่ 4	ปริมาณน้ำตาลที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กชนิดต่างๆ ในถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ (g/100 g dry wt)	10
ตารางที่ 5	แสดงการทดสอบการใช้ RFOs ในคน	10
ตารางที่ 6	แสดงส่วนผสมของไอศกรีมซินไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง	15
ตารางที่ 7	แสดงปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (Soluble sugar content) ในสารละลาย น้ำตาลที่เตรียมขึ้นจากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียว	17
ตารางที่ 8	แสดงปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเล็กและโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่ม Raffinose family of oligosaccharide ในสารละลายน้ำตาลที่เตรียมขึ้นจาก เมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียว	17
ตารางที่ 9	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวัด ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid	40
ตารางที่ 10	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวัด ด้วยวิธี DNS	42

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แสดงประโยชน์ของ Bifidobacteria ที่มีต่อผู้บริโภค	6
ภาพที่ 2	โครงสร้างทางเคมีของ RFOs บางชนิด	9
ภาพที่ 3	ลักษณะของไอศกรีมนมสดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก และน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลือง (ซ่าย) และถั่วเขียว (ขวา)	18
ภาพที่ 4	แสดงการรอดชีวิตของเชื้อ <i>L. casei</i> ในไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	19
ภาพที่ 5	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	20
ภาพที่ 6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	21
ภาพที่ 7	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	22
ภาพที่ 8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลสตาซิโอสของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	23
ภาพที่ 9	การเปรียบเทียบค่า Overrun ของไอศกรีมซินไบโอติกแต่ละชุดการทดลอง	24
ภาพที่ 10	การเปรียบเทียบเวลาการเกิดหยดแรกและเวลาในการละลายหมดของไอศกรีมซินไบโอติกแต่ละชุดการทดลอง	25
ภาพที่ 11	การเปรียบเทียบผลการทดสอบความพึงใจของอาสาสมัครที่มีต่อไอศกรีมซินไบโอติกแต่ละชุดการทดลอง	27
ภาพที่ 12	ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดถั่วทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้	38
ภาพที่ 13	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid	40
ภาพที่ 14	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS method	42
ภาพที่ 15	บรรยากาศการประเมินความพึงพอใจของอาสาสมัครที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซินไบโอติก	44

การเพิ่มมูลค่าถั่วเหลืองและถั่วเขียวผิวนำโดยใช้ผลิตเป็นไอศกรีมซินไบโอติก

Value – added of soybean and mung bean by using in synbiotic ice cream production

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และ มยุรา ศรีกัลยานุกุล

Pairote Wongputtisin and Mayura Srikalyanukul

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

เมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่60 และถั่วเขียวสายพันธุ์ชยันนาท36 ถูกพบว่ามีย่านตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (Raffinose family oligosaccharides; RFOs) สะสมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งน้ำตาลกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้หลายสายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์นำน้ำตาล RFOs ที่เตรียมได้จากเมล็ดถั่วทั้งสองสายพันธุ์มาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตไอศกรีมซินไบโอติกจากนมวัวโดยมีการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* ลงไปร่วมด้วย ผลการวิจัยพบว่าไอศกรีมซินไบโอติกที่เตรียมขึ้นนี้ยังคงมีแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ยังมีชีวิตหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ แม้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบน้ำตาล RFOs ชนิดสตาคิโอส (Stachyose) หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เช่นกัน ไอศกรีมซินไบโอติกที่มีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs นี้พบที่ใช้เวลาในการละลายจนเกิดเป็นหยดแรกนานกว่าไอศกรีมสูตรที่ไม่เติมน้ำตาล RFOs อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การทดสอบทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมซินไบโอติกโดยอาสาสมัคร 16 รายก็แสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครให้การยอมรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซินไบโอติกที่มีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs ไม่แตกต่างกับไอศกรีมสูตรที่ไม่เติมน้ำตาล RFOs ($p > 0.05$)

คำสำคัญ: ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ไอศกรีมซินไบโอติก แลคโตบาซิลลัส แลคตัส
น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส

Abstract

Raffinose family oligosaccharides (RFOs) were found in soybean seed of cultivar Chiang Mai 60 and mung bean seed of cultivar Chainat 36 with high concentration. These sugars exhibit prebiotic properties that stimulate growth of several probiotic bacteria. Therefore, RFOs prepared from seed of both cultivars were applied as prebiotic ingredient in synbiotic ice cream production from cow milk and *Lactobacillus lactis* was also added as probiotic ingredient. The results from this research revealed that viable cell of this probiotic could survive in these products, although they were stored at -20 °C for 8 weeks. Moreover, stachyose (member of RFOs) moiety was also detected in the products. First dripping time of synbiotic ice creams containing each RFOs was studied and found that their first dripping times were longer than that of ice cream without RFOs addition significantly ($p < 0.05$). Sensory test of synbiotic ice creams by 16 panelists showed that the acceptance of synbiotic ice cream with RFOs addition was not markedly different from that without RFOs addition ($p > 0.05$).

Key words: soybean, mung bean, synbiotic ice cream, *Lactobacillus lactis*, raffinose family oligosaccharides

คำนำ

จากผลงานวิจัยหัวข้อ “คุณสมบัติฟรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดพืชตระกูลถั่วบางชนิดเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์” ซึ่งได้รับการสนับสนุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติในปีงบประมาณ 2553 พบว่าเมล็ดพืชตระกูลถั่ว 4 ชนิด จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่นำมาศึกษา มีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (Raffinose family oligosaccharides; RFOs) ได้แก่ ราฟฟิโนส (raffinose) สตาชิโอส (stachyose) และเวอบาสโคส (verbascose) เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงตั้งแต่ 0.6-16% โดยน้ำหนัก และยังพบว่าน้ำตาลเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารฟรีไบโอติก โดยสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่อาศัยในร่างกายของคนและสัตว์ ช่วยส่งเสริมสุขภาพที่ดีให้กับทั้งคนและสัตว์ที่บริโภคได้ ทั้งนี้พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ชัยนาท 36 มี RFOs ในปริมาณที่สูงถึง 16.2 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งมีศักยภาพที่จะสกัดออกมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้

คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดเพิ่มมูลค่าให้กับพืชตระกูลถั่วทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยี-ชีวภาพร่วมกับเทคโนโลยีการอาหาร โดยทำการสกัด RFOs แล้วนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพให้แก่ผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม พบว่าได้มีผู้ผลิตหลายรายที่ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมสารฟรีไบโอติกออกมาจำหน่าย ไม่ว่าจะเป็นไส้กรอก นมผง โยเกิร์ต และไอศกรีม โดยส่วนใหญ่สารฟรีไบโอติกที่นิยมใช้คือ น้ำตาลฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และกาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ไม่เพียงเท่านั้นผลิตภัณฑ์ที่มีการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกก็ได้มีผู้ผลิตออกมาในท้องตลาดแล้วเช่นกัน อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลงานวิจัยหลายชิ้น ได้ระบุว่าผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของทั้งฟรีไบโอติกและโปรไบโอติกที่มีความเฉพาะเจาะจงซึ่งกันและกัน หรือที่เรียกว่าอาหารซินไบโอติก (synbiotic) อยู่ด้วยกัน จะช่วยให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภคได้ดีกว่าการใช้ฟรีไบโอติกหรือโปรไบโอติกเพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารซินไบโอติกที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์โปรไบโอติกและฟรีไบโอติกที่เป็น RFOs ซึ่งสกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ชัยนาท 36 โดยอาหารที่คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาคือไอศกรีม เนื่องจากเป็นอาหารที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคทุกเพศทุกวัย ซึ่งน่าจะทำให้ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซินไบโอติกนี้เป็นที่รู้จักได้ไม่ยาก ประโยชน์ที่จะได้รับจากงานวิจัยนี้นอกจากจะเกิดกับผู้บริโภคและเกษตรกรผู้เพาะปลูกถั่วแล้ว ยังเป็นการนำเสนอผลิตภัณฑ์สุขภาพชนิดใหม่ให้กับภาคอุตสาหกรรมทุกระดับที่สนใจ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไอศกรีมซินไบโอติก
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมีของไอศกรีมซินไบโอติก
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสของไอศกรีมซินไบโอติก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตร นั่นคือเมล็ดพืชตระกูลถั่ว โดยใช้องค์ความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับวิทยาศาสตร์การอาหาร ดังนั้นประโยชน์ที่ได้ชัดเจนคือ

1. ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่สู่ท้องตลาด เพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์
2. องค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติได้ในหัวข้อ “Characteristics of symbiotic milk ice cream containing RFOs extracted from soybean and mung bean”
3. กระบวนการผลิตไอศกรีมซินไบโอติกสามารถนำไปจดสิทธิบัตรได้

หน่วยงานที่จะได้รับประโยชน์จากงานวิจัยชิ้นนี้คือ หน่วยงานที่ทำการผลิตผลิตภัณฑ์จากนม ทั้งภาครัฐและเอกชน ตลอดจนกลุ่มสหกรณ์และวิสาหกิจชุมชนที่สนใจผลิตภัณฑ์นี้

การตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก พรีไบโอติก และซินไบโอติก

1.1 โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (probiotics) เป็นภาษากรีกที่แปลว่า “for life” โดย Parker เป็นคนแรกที่ให้นิยามของคำว่าโพรไบโอติกในเชิงเดียวกับที่ใช้ในทุกวันนี้ โดยได้ให้นิยามว่า “โพรไบโอติกเป็นสิ่งมีชีวิตหรือสารชนิดที่ก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ขึ้นภายในทางเดินอาหาร”

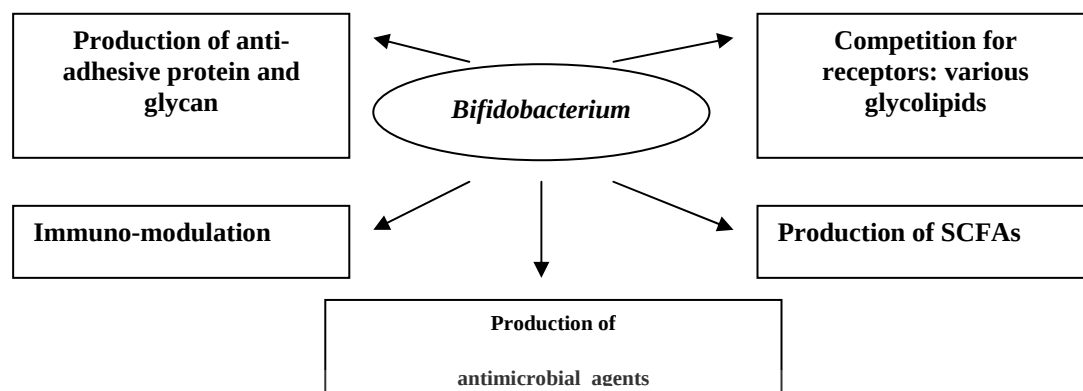
(Schrezenmer and Vrese, 2001) จึงอาจตีความรวมไปได้ถึงสารปฏิชีวนะ ต่อมาในปี 1989 Fuller ก็ได้ปรับปรุงนิยามนี้เสีย ใหม่กล่าวคือ “โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหารสัตว์เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์นั้นๆ โดยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้” ส่วน Havennaar และคณะ (1992) ก็ได้ให้นิยามคำว่าโพรไบโอติกไว้เช่นกัน โดยกล่าวไว้ว่า “โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์เดี่ยวหรือผสมก็ได้ที่มีชีวิต ที่เมื่อเสริมให้คนหรือสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อคนหรือสัตว์โดยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์เจ้าถิ่น” หลังจากนั้นก็มีผู้ปรับปรุงนิยามเพิ่มเติมเรื่อยมา แต่อย่างไรก็ตามโดยรวมแล้วอาจกล่าวได้ว่า โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของคนและสัตว์นั่นเอง ตัวอย่างของจุลินทรีย์โพรไบโอติกแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Other lactic acid bacteria	Non-lactic acid bacteria
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	<i>Bacillus subtilis</i> ¹
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>cerevisiae</i> ¹
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	strain nissle
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>		

หมายเหตุ: ¹ ส่วนใหญ่ใช้เสริมในสัตว์

ที่มา: Holzapfel *et al.*, 2001.



ภาพที่ 1 แสดงประโยชน์ของ Bifidobacteria ที่มีต่อผู้บริโภค
ที่มา: Rastall *et al.*, 2000.

ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกต่อคนและสัตว์มีมากมาย นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) ในทางเดินอาหารอันเป็นสาเหตุของอาหารท้องร่วงแล้ว ยังช่วยลดระดับของลิพิดในซีรัมอีกด้วย เช่น *L. acidophilus* สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลและลดอัตราการดูดซึม cholesterol micelles ในลำไส้ (Mazza, 1998) โปรไบโอติกบางสายพันธุ์ยังช่วยกำจัดสารก่อมะเร็งและ secondary bile salt ซึ่งจะก่อให้เกิดมะเร็งในลำไส้ได้ (Marteau *et al.*, 2001) Rastall และคณะ (2000) ก็รายงานอีกว่าโปรไบโอติกช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะเจาะจงให้กับร่างกายด้วย และที่เห็นได้ชัดที่สุดอีกประการหนึ่งคือโปรไบโอติกจะช่วยกำจัดน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมที่ทำให้บางคนเกิดอาการแพ้ น้ำนม (Wongputtisin, 2003)

1.2 โปรไบโอติก (Prebiotics)

คำๆ นี้ได้ถูกเสนอขึ้นมาเป็นครั้งแรกโดย Gibson และ Roberfroid (1995) โดยให้นิยามว่า “โปรไบโอติกคือส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยทางเดินอาหารของคนและสัตว์แต่ให้คุณประโยชน์แก่คนและสัตว์โดยการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในทางเดินอาหารอย่างเฉพาะเจาะจง” ดังนั้นคุณสมบัติของสารโปรไบโอติกจึงควรมีดังต่อไปนี้

- ไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในทางเดินอาหาร
- เป็นสารอาหารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกที่เฉพาะเจาะจง
- สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของจุลินทรีย์อันจะก่อให้เกิดสุขภาพที่ดี

พรีไบโอติกสามารถเป็นได้ทั้งเปปไทด์สายสั้นๆ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตหรือแม้กระทั่ง ลิพิด แต่สารกลุ่มที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษามากที่สุดคือ โอลิโกแซคคาไรด์ที่ย่อยไม่ได้ (non-digestible oligosaccharides; NDOs) (Wongputtisin, 2003) ตัวอย่างของสารพรีไบโอติกกลุ่ม NDOs ที่มีการผลิตในทางการค้าแล้วแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่าง NDOs ที่มีการผลิตในทางการค้า

Names	Chemical structure	Osidic bond	Origins (Sources)	Trade name
FOS, inulin	Glucosyl (fructosyl) _n fructose (n=2-20)	$\beta 1 \rightarrow 2$	Plant	Raftiline Fibrulin
Neosugar	Glucosyl (fructosyl) _n fructose (n=1-3)	$\beta 1 \rightarrow 2$	Enzymatic	Neosugar Actilight
Galactooligosaccharide (GOS or TOS)	Glucosyl (galactosyl) _n galactose (n=1-3)	$\beta 1 \rightarrow 6$	Enzymatic	Oligomate
Transgalactooligosaccharide	(galactosyl) _n galactose (n=2)	$\alpha 1 \rightarrow 6$	Enzymatic	Cup-oligo
Isomaltooligosaccharide (IMO)	(glucosyl) _n glucose (n=2-7)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	Enzymatic	Isomalto
Sololigosaccharide (SOS)	Raffinose+stachyose (n=3-4)	-	Enzymatic	Soya-Oligo

ที่มา: Roberfroid, 1999.

มีรายงานว่า การเสริม NDOs ในอาหารคนจะช่วยให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพคือ ช่วยกระตุ้นการเจริญของโปรไบโอติกในลำไส้ เช่น การเสริม fructooligosaccharides (FOS) ในอาหารจะช่วยให้การเจริญของ *Bifidobacterium* sp. ดีขึ้นส่งผลให้ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค เช่น *Clostridium* sp. (La Blay *et al.*, 1999; Kullen *et al.*, 1998; Bouhnik *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1996) น้ำตาล FOS และอนุพันธ์ของซูโครสไม่ก่อให้เกิดฟันผุ ช่วยเพิ่มระดับของ short chain fatty acid (SCFA) เพิ่มการบีบ-หดตัวของลำไส้ (peristalsis) (Mazza, 1998) NDOs ยังช่วยลดระดับไขมันในเลือดจึงช่วยลดโอกาสเกิดโรคหัวใจ ดังเช่นจากการศึกษาในชาย 12 คนที่มีอาการ hypercholesterolemia โดยเสริม inulin 20 กรัม ในไอศกรีมให้กินทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าระดับของไตรกลีเซอไรด์และคอเรสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Causey *et al.*, 2000)

1.3 ซินไบโอติก (Synbiotics)

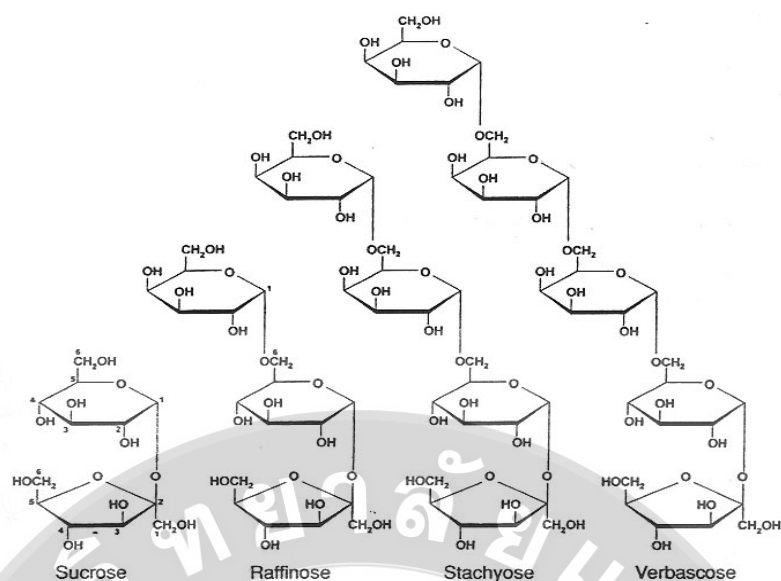
ซินไบโอติกคือผลิตภัณฑ์ที่เป็นส่วนผสมของทั้งโปรไบโอติกและพรีไบโอติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานในร่างกายคนและสัตว์ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นพรีไบโอติกที่ใช้จะต้องกระตุ้นการเจริญของโปรไบโอติกที่ใช้อย่างเฉพาะเจาะจง (Wongputtisin, 2003) ยกตัวอย่างเช่นส่วนผสมของ FOS และ *Bifidobacterium* เป็นต้น

Bilecka และคณะ (2002) รายงานว่าหนูที่ได้รับการเสริม *Bifidobacterium* ร่วมกับ FOS หรือ fructans ก็จะช่วยเพิ่มจำนวน *Bifidobacterium* ในลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในขณะที่ช่วยลดจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม ในปี 2002 Rastall และ Maitin รายงานโดยอ้างอิงจากงานวิจัยอื่นๆ ว่า FOS ยังช่วยให้ *Bifidobacterium* มีความทนทานต่อ bile salt ได้มากขึ้นด้วย ทั้งยังได้เสนอซินไบโอติกอีกหนึ่งระบบคือ *Lactobacillus reuteri* ผสมกับ soygerm powder ซึ่งเป็นแหล่งของ soybeanoligosaccharide (SOS) ซึ่งยังช่วยให้ได้รับคุณประโยชน์จากสาร isoflavone อีกด้วย ส่วนหนูที่ได้รับ *Bifidobacterium breve* (10^8 cfu/day/rat) ร่วมกับ GOS (2-50 μ g/day/rat) ก็พบว่าช่วยลดจำนวน *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ได้

2. โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (Raffinose family oligosaccharides; RFOs) ในพืชตระกูลถั่ว และคุณสมบัติพรีไบโอติก

RFOs เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบขึ้นมาจากโมเลกุลน้ำตาลกาแลคโตสต่ออยู่กับน้ำตาลซูโครส โดยเกิดพันธะ $\alpha(1\rightarrow6)$ กับน้ำตาลกลูโคสของซูโครส อาจกล่าวได้ว่าโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลซูโครส จำนวนหน่วยของกาแลคโตสที่เข้าต่อกับซูโครสนั้นอาจมีตั้งแต่ 1 ไปจนถึง 9 โมเลกุล (Kadlec *et al.*, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2 จนเราอาจเรียกโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มนี้ว่า galacto-oligosaccharide (GOS) ได้เช่นกัน (Karr-Lilienthal *et al.*, 2005) ชื่อในระบบ IUPAC ของ RFOs แต่ละชนิดมีดังต่อไปนี้

Raffinose:	α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside
Stachyose:	α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside
Verbascose:	α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6) - [α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-] $_2$ - α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside
Ajugose:	α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-] $_3$ - α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ RFOs บางชนิด

ที่มา: Kadlec *et al.*, 2000.

ในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว (legume seeds) พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตหลายๆ รูปแบบเป็นองค์ประกอบอยู่ และแน่นอนคือพบว่ามี RFOs เป็นองค์ประกอบอยู่เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว

พืช	ปริมาณในเมล็ด (%)						
	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	แป้ง	ซูโครส	ราฟฟิโนส	สตาชิโอส	เวอบาสโคส	เส้นใย
Soybean	32.5	1.5	6.2	0.9	4.3	0.1	20
Lupin	36.7	0.4	2.5	0.7	6.8	0.6	26
Chickpea	65.2	44.4	2.0	1.5	5.5	3.0	9
Mung bean	60.0	45.0	1.1	1.7	2.0	3.0	7
Pigeon pea	64.9	44.3	2.5	1.0	3.0	4.0	10
Jack bean	47.8	35.0	1.5	0.7	1.5	0.1	9
Common bean	61.3	41.5	5.0	0.3	4.1	0.1	10
Faba bean	59.8	41.0	3.3	0.2	0.7	2.5	12
Lentil	64.4	46.0	2.9	0.5	2.4	0.9	12
pea	65.5	45.0	2.1	0.9	2.4	3.2	12

ที่มา: Kadlec *et al.*, 2000.

ในปี 2006 Espinosa-Martos และ Rupérez ได้รายงานปริมาณ GOS ชนิดต่างๆ ในเมล็ดถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ และพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์หลักได้แก่ stachyose, raffinose และ sucrose นอกจากนี้ความอายุของเมล็ดมีผลต่อปริมาณน้ำตาลชนิดต่างในเมล็ด โดยเมล็ดที่สุกจะพบ GOS สูงกว่าเมล็ดที่ยังไม่สุก 47-53% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กชนิดต่างๆในถั่วเหลือง4สายพันธุ์(g/100gdry wt)

สายพันธุ์	monosaccharide	sucrose	GOS		total
			stachyose	raffinose	
YSBC	0.72±0.23	6.09±0.24	1.06±0.11	0.89±0.07	9.75±0.55
YSIC	0.84±0.07	6.16±0.12	0.94±0.08	0.90±0.15	9.44±0.47
GSBC	0.84±0.24	0.85±0.10	1.43±0.39	Trace	3.87±0.27
GSIC	1.10±0.20	0.78±0.07	1.61±0.07	Trace	3.62±0.22

ที่มา: Espinosa-Martos and Rupérez, 2006.

คุณสมบัติฟิโบริโอติกของน้ำตาลกลุ่ม RFOs นั้นเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง (Xiaoli *et al.*, 2008; Espinosa-Martos and Rupérez, 2006) Rycroft และคณะ (2001) รายงานโดยอ้างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ว่าน้ำตาลราฟิโนส และสตาซิโอสจากถั่วเหลืองสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium infantis* ได้แต่ไม่กระตุ้นการเจริญของ *E. coli*, *Streptococcus faecalis* และ *L. acidophilus* นอกจากนี้น้ำตาลทั้งสองที่สกัดได้มาจากถั่วเหลืองนั้นเมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ activated charcoal chromatography แล้วจะได้สตาซิโอส 71% ราฟิโนส 20% และน้ำตาลอื่นๆ อีก 2 % เมื่อนำไปทดสอบก็พบว่าทำให้การเจริญของ *Bifidobacteria* เจริญได้สูงขึ้นมาก เมื่อเทียบกับการทดสอบในเชื้อชนิดอื่นๆ การทดสอบในคนก็ได้มีการวิจัยแล้วเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการทดสอบการใช้ RFOs ในคน

subjects	substrate	dose	duration	results
7 adults	raffinose	15 g/d	4 weeks	Significant increase in bifidobacteria, significant decrease in bacteroides and clostridia
6 adults	Soybean oligosaccharide	10 g/d	3 weeks	Significant increase in bifidobacteria and lactobacillus, large decrease in clostridia and peptostreptococcus
7 adults	Soybean oligosaccharide	10.6 g/d	3 weeks	Significant increase in bifidobacteria, slight decrease in bacteroides, significant decrease in NH ₃ and β-glucosidase, large decrease in indole, skatole, phenol, and p-cresol

ที่มา: Rycroft *et al.*, 2001.

3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอาหารเสริมโพรไบโอติก โปรไบโอติก และซินไบโอติก

Martines-Villaluenga และ Gomez (2007) ได้ทำการผลิตนมหมักซินไบโอติกที่ใช้เชื้อ Bifidobacteria เป็นหัวเชื้อ จากนั้นมีการเติม RFOs ที่สกัดจากถั่ว lupin ลงไปในปริมาณ 0.1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผลการทดลองพบว่าทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; μ), generation time (T_g), ปริมาณกรด และกิจกรรมของเอนไซม์ดีขึ้น

โยเกิร์ตซินไบโอติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และเติมโพรไบโอติกชนิด FOS ที่มีความยาวของสายโพลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่างๆ ในปริมาณ 1.5 g/ 100g ได้ถูกผลิตขึ้นโดย Aryana และ McGrew (2007) แล้วจากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ตลอดจนลักษณะทางประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่า FOS ทุกขนาดไม่ได้ส่งผลต่อสีของโยเกิร์ต โยเกิร์ตที่เติม FOS สายสั้นทำให้ pH ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่มี FOS ตลอดจนกลิ่นก็ดีกว่าด้วย

Basyigit และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติกที่เติม *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* และ *L. rhamnosus* นอกจากนี้มีการเติมน้ำตาลซูโครสหรือ aspartame เป็นสารให้ความหวานและยังช่วยเป็นสาร cryoprotectant อีกด้วย จากนั้นทำการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของเชื้อเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ผลการทดลองพบว่าเชื้อยังคงมีชีวิตรอดได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้คุณสมบัติของไอศกรีมก็ไม่เปลี่ยนแปลง

Aragon-Alego และคณะ (2007) ผลิตซ็อกโกเลตมูสซินไบโอติกที่มีส่วนประกอบของ *L. paracasei* subsp. *Paracasei* LBC82 และ inulin ทำให้ได้อาหารสุขภาพชนิดใหม่ที่เป็นแหล่งของโพรไบโอติกและโพรไบโอติก หลังจากเก็บมูสไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วันแล้วพบว่าโพรไบโอติกยังมีการรอดชีวิตอยู่ ในขณะที่ไม่พบการปนเปื้อนโดยยีสต์และเชื้อรา นอกจากนี้โพร-และโพรไบโอติกที่เติมลงไปนั้นไม่มีผลกระทบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์

Homayouni และคณะ (2008) ทำการผลิตไอศกรีมซินไบโอติกที่ประกอบไปด้วยเชื้อ *L. casei* (Lc-01) และ *B. lactis* (Bb-12) ร่วมกับ resistant starch โดยเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกดังกล่าวได้ถูกห่อหุ้มด้วยเคลือบแอลจินเนต ซึ่งก็พบว่าเชื้อโพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตอยู่ในระดับประมาณ $4.2 \times 10^6 - 1.1 \times 10^7$ cfu/ ml ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 วันโดยเชื้อที่ถูกห่อหุ้มไว้จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเชื้ออิสระ

Pinto และคณะ (2012) ได้รายงานว่ายูโกรมโยเกิร์ต (Frozen yogurt) ที่เติม microcapsules ของเชื้อ *Bifidobacterium* BB-12 ที่ถูกผลิตจากนมผงคืนรูปพร้อมมันเนย (reconstituted skim milk) และอินนูลิน (inulin) โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยนั้นมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตคงที่และมีค่ามากกว่า $6 \log \text{CFU/g}$ ตลอดช่วงระยะเวลาหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ ยูโกรมโยเกิร์ตที่เติมเชื้ออิสระที่มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตลดลง $3.88 \log \text{CFU/g}$ ในระหว่าง 30 วันแรกที่มีการเก็บรักษา และลดลงไปอีก $0.25 \log \text{CFU/g}$ หลังจากการเก็บรักษา 60 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ และสารเคมี

- เมล็ดถั่วเหลือง สายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่
- เมล็ดถั่วเขียวผิวนั้น สายพันธุ์ชัยนาท 36 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ ชัยนาท
- แบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus lactis*
- นมโคสดพาสเจอร์ไรส์
- ครีมผง (U-Wipp™)
- ผงเวย์ สำหรับทำไอศกรีม
- น้ำตาลทราย
- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth, Nutrient agar, MRS agar, EMB agar และ SS agar
- เอทานอล
- น้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) แล็กโตส (Lactose) ราฟฟิโนส (Raffinose) สตาคิโอส (Stachyose) และเวอบาสโคส (Verbascose)
- สารละลาย DNS (3,5 dinitrosalicylic acid)
- Acetonitrile (HPLC grade)

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องแก้ว ได้แก่ หลอดทดลอง งานเพาะเชื้อ ขวดเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น
- ตู้เย็นเชื้อ (Biocyt®)
- เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Thomo forma®)
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert ®)
- ตู้อบลมร้อน (BINDER ®)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Hettich ®)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectronic genesys 5; Thermo ®)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert ®)
- เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Buchi ®)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Alltech®)
- เครื่องทำไอศกรีม ยี่ห้อ Homemate®

2. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 2.1 ไอศกรีมชินไบโอดีทในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นไอศกรีมที่ใช้นมโคเป็นวัตถุดิบ
- 2.2 สารพรีไบโอดีทที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้คือน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนสที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่60 และเมล็ดถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ชัยนาท36
- 2.3 จุลินทรีย์โปรไบโอดีทที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้เป็น แบคทีเรีย *L. lactis*

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมน้ำตาล RFOs

3.1.1 การสกัด RFOs

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ชัยนาท 72 มาชั่งน้ำหนักปริมาณ 250 กรัม ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นผงและร่อนผงตัวอย่างผ่านตะแกรงร่อน จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้น 70% ลงไปให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ให้นำไปวางบนเครื่องกวนสารและคนด้วยแท่ง Magnetic bar เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิดปากบีกเกอร์ด้วยฟรอยด์เพื่อลดการระเหยของเอทานอล ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้สารโมเลกุลใหญ่ตกตะกอน จากนั้นทำการกรองด้วยชุดเครื่องกรองสุญญากาศ (Buchner funnel) ทำการกรองซ้ำ 2 รอบ

3.1.2 การกำจัดเอทานอลและลดปริมาตร

ทำการกำจัดเอทานอลออกจากตัวอย่างสารละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และระเหยน้ำบางส่วนออกไปจนกระทั่งได้สารละลายน้ำตาลเข้มข้นในปริมาตรที่น้อยที่สุดเก็บไว้ในขวดสีชาและอุณหภูมิต่ำ

3.1.3 การกำจัดไขมัน

โดยใช้เฮกเซนผสมกับสารละลายน้ำตาลเข้มข้นในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเพื่อสกัดไขมันออกไป แล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อแยกเฮกเซน จากนั้นสกัดเฮกเซนที่หลงเหลืออยู่ด้วยการนำไประเหยในเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

3.1.4 การวิเคราะห์น้ำตาลในสารละลายน้ำตาลเข้มข้น

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric acid น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method คำนวณขนาดโมเลกุลเฉลี่ย (Degree of polymerization; DP) ของน้ำตาลที่ละลายได้จากสูตร

$$DP = \text{ปริมาณ total sugar} / \text{ปริมาณ reducing sugar}$$

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล RFOs ด้วยเครื่อง HPLC ที่ประกอบไปด้วยคอลัมน์ Previal Amino (Alltech®) ELSD2000 Detector (Alltech®) ใช้ Acetonitrile และน้ำปราศจากไอออนเป็น Mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในการนี้ใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แลคโตส ราฟฟิโนส สตาซิโอส และเวอบาโคส เป็นน้ำตาลมาตรฐาน

3.2 การเตรียมมวลเซลล์ *Lactobacillus lactis*

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *L. lactis* ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 การผลิตมวลเซลล์

ถ่ายหัวเชื้อลงไปในอาหาร MRS broth ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* ครบ 24 ชั่วโมงจึงนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหาร หลังจากนั้นจึงทำการล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วยสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ก่อนเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นบนอาหาร MRS agar ก่อนนำมาใช้ทดลอง

3.2.3 การนับจำนวนเชื้อ *L. lactis*

ทำการเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% โดยทำการเจือจางแบบ Ten fold dilution จากนั้นทำการ Pour plate บนอาหารแข็ง MRS agar ที่มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเชื้อที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การผลิตไอศกรีมซินไบโอติก

ทำการเตรียมไอศกรีมที่มีส่วนผสมของ RFOs และเชื้อ *L. lactis* โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ทริตเมนต์ แต่ละทริตเมนต์มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

ตารางที่ 6 แสดงส่วนผสมของไอศกรีมซินไบโอติกในแต่ละชุดการทดลอง

สูตรไอศกรีม	นมสด 250 ml	นมผง 30 g	ครีมผง 120 g	น้ำตาลทราย 70 g	1% RFOs (ถั่วเหลือง)	1% RFOs (ถั่วเขียว)
สูตรที่ 1 (ชุดการทดลองที่ 1)	/	/	/	/		
สูตรที่ 2 (ชุดการทดลองที่ 2)	/	/	/	/	/	
สูตรที่ 3 (ชุดการทดลองที่ 3)	/	/	/	/		/
สูตรที่ 4 (ชุดการทดลองที่ 4)	/	/	/		/	
สูตรที่ 5 (ชุดการทดลองที่ 5)	/	/	/			/

ในไอศกรีมทุกชุดการทดลองจะมีการเติมเชื้อ *L. lactis* 10^8 cfu/g และทำการผลิตไอศกรีมโดยใช้เครื่องปั่นขนาดเล็กยี่ห้อ Homemate เป็นเวลา 40 นาทีหลังจากนั้นจึงแบ่งเก็บไว้ในถ้วยเก็บตัวอย่างและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของไอศกรีมซินไบโอติก

3.4.1 การวัดน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด

นำตัวอย่างไอศกรีมทั้ง 5 ชุดการทดลองที่ถูกเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลายโดยนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS method และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric method

3.4.2 การวัดปริมาณน้ำตาล RFOs ด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างไอศกรีมทั้ง 5 ชุดการทดลองที่ถูกเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลายโดยนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างโดย คูดตัวอย่าง 1000 μ l ลงหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 ml และทำการเติมแอลกอฮอล์ 70% ปริมาตร 2.8 ml ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดส่วนใสใส่ลงในขวดระเหยขนาด 25 ml ระเหยจนตัวอย่างแห้ง หลังจากนั้นจึงทำการเติมน้ำปราศจากไอออน 1 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์น้ำตาล RFOs ด้วยเครื่อง HPLC นั้น ใช้เครื่อง HPLC ที่ประกอบไปด้วยคอลัมน์ Previal Amino (Alltech®) ELSD2000 Detector (Alltech®) ใช้ Acetonitrile และน้ำปราศจากไอออนเป็น Mobile phase ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min. ในการนี้ใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แลคโตส ราฟฟิโนส สตาซิโอส และเวอบาโคส เป็นน้ำตาลมาตรฐาน

3.4.3 ค่าความเป็นกรด - ด่าง

นำตัวอย่างไอศกรีมทั้ง 5 ชุดการทดลองที่ถูกเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลายโดยนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

3.4.4 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ

นำตัวอย่างไอศกรีมทั้ง 5 ชุดการทดลองที่ถูกเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลายโดยนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตัวอย่างจะถูกนำมาเจือจางแบบ ten fold dilution และทำการ Pour plate บนอาหาร MRS agar ด้วยอัตราการเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการนับเชื้อเพื่อนำมาใช้ในการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

3.4.5 ค่าโอเวอร์รัน (Overrun)

เมื่อปั่นไอศกรีมเสร็จแล้ว ตักไอศกรีมใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ml จนเต็ม หลอดพร้อมปิดฝาหลอดทดลอง แล้วนำไปแช่ไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไอศกรีมที่อยู่ในหลอดทดลองไปกำจัดอากาศออกโดย การเปิดฝาหลอดทดลองและตั้งไว้ในเครื่อง Sonicator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำหลอดทดลองออกจากเครื่องทันทีและวัดปริมาณสารละลายที่เหลืออยู่ด้านล่าง พร้อมบันทึกผลและนำไปคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{Overrun (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักไอศกรีมเหลว} - \text{น้ำหนักไอศกรีม}) \times 100}{\text{น้ำหนักไอศกรีม}}$$

3.4.6 ค่าการละลายของไอศกรีมซินไบโอติก

ค่าการละลายจนเกิดหยดแรก (First dripping) และเวลาที่ใช้ในการละลายจนหมด (complete melting time) ของไอศกรีมซินไบโอติกได้ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Ranadheera และคณะ (2013) โดยเมื่อปั่นไอศกรีมเสร็จแล้ว ตักไอศกรีมใส่ในถ้วยพลาสติกขนาด 15 ml ซึ่งน้ำหนักไอศกรีมให้ได้ 15.04 g ปิดฝาด้วยแล้วนำไปแช่ไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดอัตราการละลายที่ 22 °C โดยนำตะแกรงที่มีช่องขนาด 0.2×0.2 cm มาวางไว้บนบีกเกอร์ขนาด 250 ml แล้วนำถ้วยพลาสติกที่บรรจุไอศกรีมมากกว่าไว้บนตะแกรง จากนั้นเริ่มบันทึกเวลา โดยบันทึกเวลาของหยดไอศกรีมที่ตกหยดเป็นจันแรก และบันทึกเวลาที่ไอศกรีมละลายจนหมด

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แต่ละการทดลองจะถูกทำสามซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป STATISTIX©

ผลการวิจัย

1. การเตรียมน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และชัณนาท 36

ภายหลังการสกัดน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่ละลายได้จากเมล็ดถั่วทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์และสกัดไขมันทิ้งด้วยเฮกเซนแล้ว จะทำให้ได้สารละลายน้ำตาลที่มีลักษณะใส โดยน้ำตาลที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองจะมีสีเหลืองเล็กน้อย ส่วนที่สกัดจากเมล็ดถั่วเขียว จะมีสีเขียว สารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้ดังกล่าวพบว่ามีปริมาณน้ำตาลแต่ละกลุ่มดังแสดงในตาราง ที่ 7 และ 8 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid, DNS method และ HPLC ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดลองนี้สามารถเตรียมน้ำตาลกลุ่ม RFOs จากเมล็ดถั่วเหลืองได้ในปริมาณมากกว่าเมล็ดถั่วเขียว

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (Soluble sugar content) ในสารละลายน้ำตาลที่เตรียมขึ้นจากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียว

เมล็ดถั่ว	ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (Soluble sugar content; มก./ กรัม นน.แห้ง)			ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดที่ผลิตได้ (กรัม) (เทียบจากถั่ว 1 กก.)
	น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)	น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)	Degree of polymerization (DP)	
ถั่วเหลือง (เชียงใหม่60)	55	11.9	4.6	85
ถั่วเขียว (ชัณนาท36)	32.9	5.4	6.0	65

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเล็กและโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่ม Raffinose family of oligosaccharide ในสารละลายน้ำตาลที่เตรียมขึ้นจากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียว

ตัวอย่างถั่ว	ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัม/ กรัม นน. แห้ง) $\pm$ SD				
	glucose	sucrose	raffinose	stachyose	verbascose
เชียงใหม่60	10.73 $\pm$ 1.35	13.28 $\pm$ 2.16	6.74 $\pm$ 1.62	145.32 $\pm$ 18.74	1.60 $\pm$ 0.52
ชัณนาท36	trace	4.55 $\pm$ 0.53	2.18 $\pm$ 0.11	46.09 $\pm$ 4.86	17.56 $\pm$ 1.67

หมายเหตุ: แต่ละตัวอย่างวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2. การผลิตไอศกรีมชีนโปรไบโอติก

สูตรการทำไอศกรีมที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นสูตรทั่วไปที่ประกอบไปด้วยนมโคนที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ผสมกับกับครีมผง และมีการให้ความหวานด้วยน้ำตาลทราย ภายหลังการผสมน้ำตาล RFOs และเซลล์แบคทีเรีย *L. lactis* ที่เตรียมขึ้นลงในส่วนผสมต่างๆ แล้วจากนั้นนำไปปั่นในเครื่องไอศกรีมขนาดครอบครัว ซึ่งมีการให้ความเย็นผ่านน้ำแข็งผสมเกลือเม็ด เมื่อเวลาผ่านไป ก็จะเห็นว่าเกิดเป็นเนื้อไอศกรีมขึ้น โดยลักษณะของไอศกรีมได้แสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งจะเห็นว่าสีของไอศกรีมที่ผสมน้ำตาล RFOs จากถั่วเขียวลงไป จะมีสีขาวอมเขียวเล็กน้อย ซึ่งเป็นผลมาจากสีของสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้นั่นเอง ส่วนไอศกรีมสูตรที่เติมน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลืองนั้น พบว่าสีไม่ได้แตกต่างจากไอศกรีมนมสดทั่วไปมากนัก ไอศกรีมสูตรต่างๆ ที่เตรียมขึ้นนี้จะได้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกในไอศกรีมคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสต่อไป

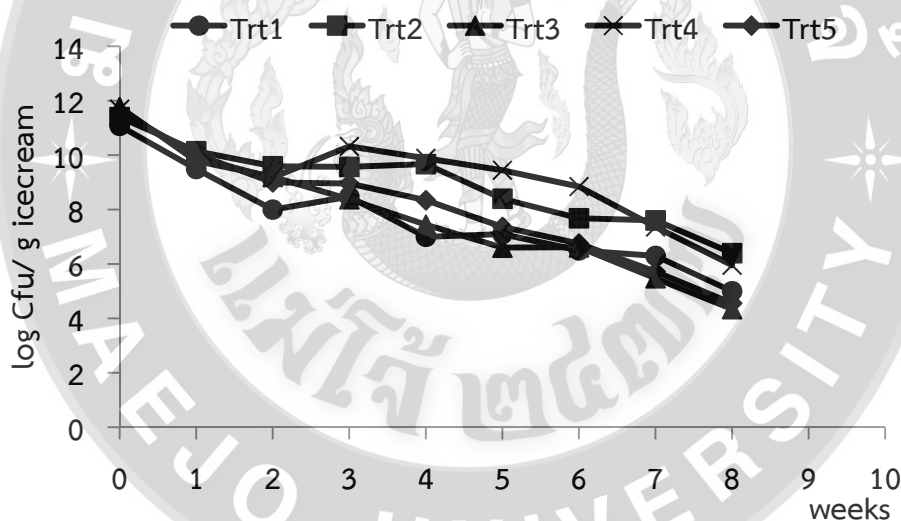


ภาพที่ 3 ลักษณะของไอศกรีมนมสดที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกและน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลือง (ซ้าย) และถั่วเขียว (ขวา)

3. การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพและเคมีของไอศกรีมซินไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษา

3.1 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *L. lactis* ในไอศกรีมซินไบโอติก

ภายหลังจากที่ทำการเก็บรักษาไอศกรีมซินไบโอติกไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งระหว่างการเก็บรักษานี้ก็จะได้เก็บตัวอย่างขึ้นมาวิเคราะห์การรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติก ซึ่งผลการทดลองก็พบว่า เชื้อ *L. lactis* ก็ยังคงสามารถรอดชีวิตในไอศกรีมได้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ก็มีจำนวนที่ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งมีค่าอยู่ที่ประมาณ 10^4 - 10^7 cfu/กรัมของไอศกรีม ดังแสดงในภาพที่ 4 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าในช่วงสองสัปดาห์แรกนั้น จำนวนเชื้อ *L. lactis* ในชุดทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นไอศกรีมที่ไม่เติมน้ำตาล RFOs (แต่น้ำตาลทราย) ได้ลดลงด้วยอัตราที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 8 สัปดาห์ พบว่าชุดทดลองที่ 2 และ 4 (มีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลือง) มีจำนวนเชื้อ *L. lactis* ลดเหลือในระดับที่สูงกว่าชุดการทดลองที่เหลือ



ภาพที่ 4 แสดงการรอดชีวิตของเชื้อ *L. casei* ในไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

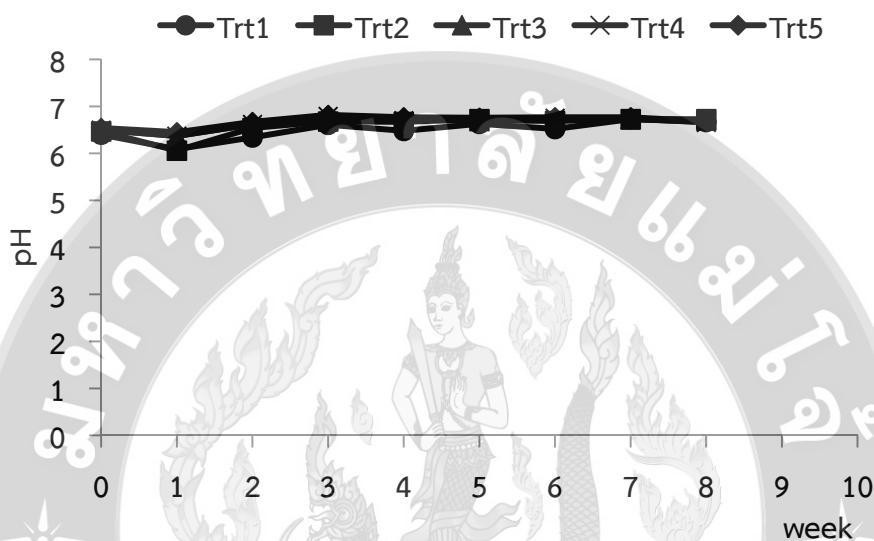
Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)

3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีมซินไบโอติก

ค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีมซินไบโอติกแต่ละสูตรภายหลังการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันตลอดอายุการเก็บรักษา โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-6.5 ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงค่ากรดอ่อน แสดงให้เห็นว่าการเติมน้ำตาล RFOs จากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียวทั้งสองสายพันธุ์นั้น แทบไม่ส่งผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีม



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

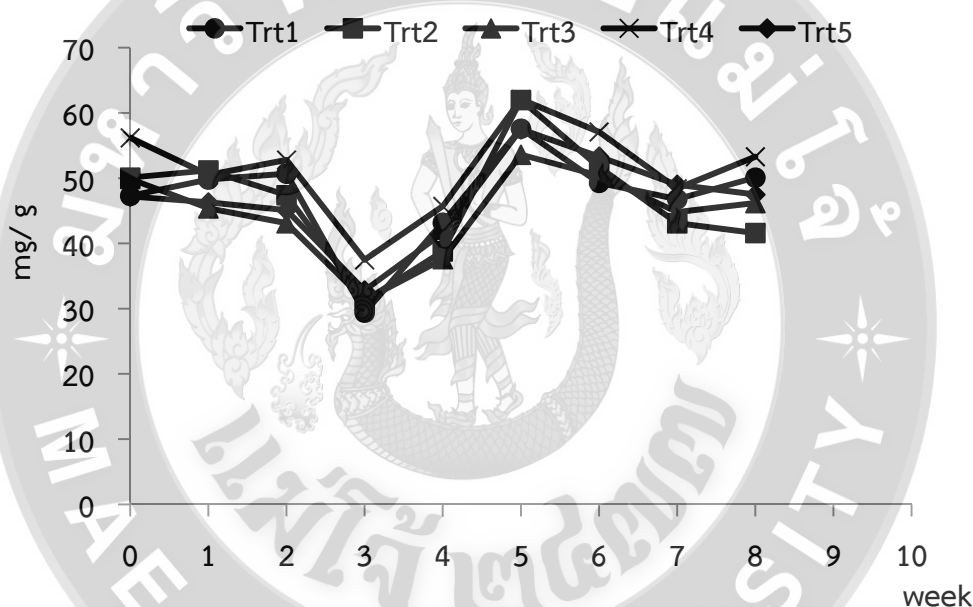
Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)

3.3 ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ในไอศกรีมซินไบโอติก

ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (Soluble sugar) ที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ในไอศกรีมไบโอติก ทั้ง 5 สูตรครั้งนี้ได้แก่ ค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดในแต่ละสัปดาห์จะมีค่าที่ไม่สม่ำเสมอแต่ก็ใกล้เคียงกันในไอศกรีมแต่ละสูตร โดยค่าที่วัดได้จะอยู่ในช่วงประมาณ 30-60 มิลลิกรัม/กรัมของไอศกรีม ในขณะที่ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็พบปัญหาในการตรวจวัดโดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อนข้างไม่สม่ำเสมอจนกระทั่งไม่สามารถวิเคราะห์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงได้ อย่างไรก็ตามพบว่าในช่วงสองสัปดาห์แรกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ซึ่งชุดที่ 1 นี้เป็นชุดการทดลองที่มีอัตราการตายสูงสุดในช่วง 2 สัปดาห์แรก



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ:

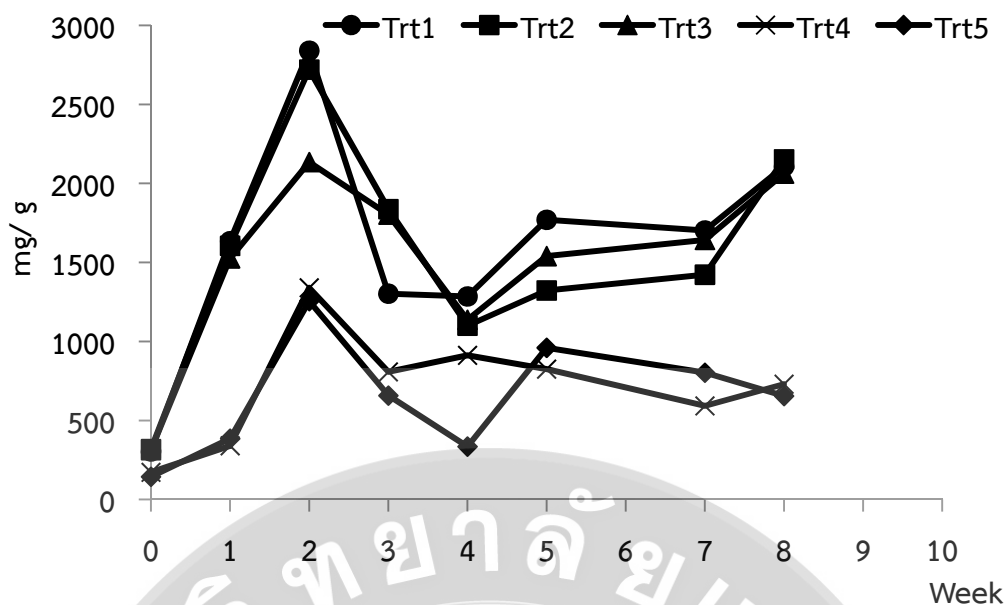
Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายได้ของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

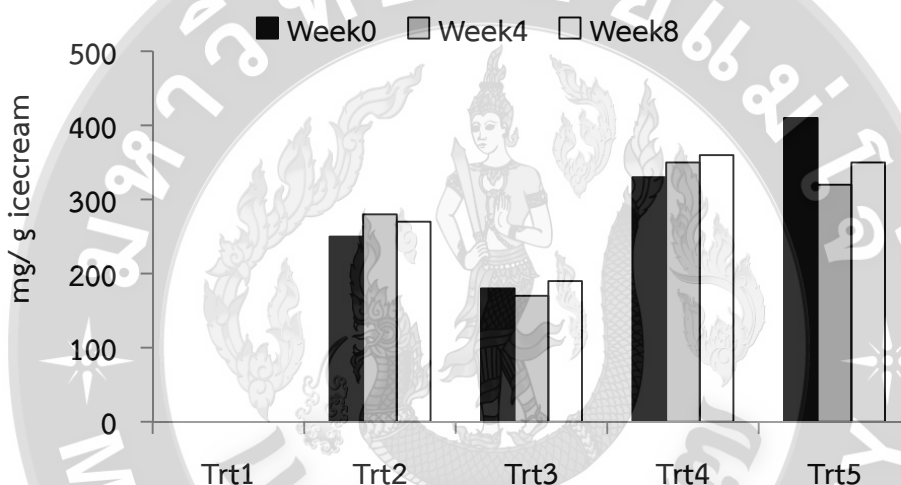
Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)

3.4 ปริมาณน้ำตาล RFOs ในไอศกรีมซินไบโอติก

ไอศกรีมแต่ละสูตรที่ผลิตขึ้นได้ถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลุ่ม RFOs ได้แก่ ราฟฟิโนส สตาซิโอส และเวอบาสโคส ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งแม้ว่าในสารละลายน้ำตาล RFOs ที่เตรียมจากเมล็ดถั่วทั้งสองชนิดจะตรวจพบน้ำตาลทั้งสามชนิด แต่กลับพบว่าไม่สามารถตรวจวัดน้ำตาลราฟฟิโนสและเวอบาสโคสในไอศกรีม พบเพียงน้ำตาลสตาซิโอสเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยชุดทดลองที่ 4 และ 5 ซึ่งมีการผสมน้ำตาล RFOs ลงไปในปริมาณถึง 1 เปอร์เซ็นต์ก็จะพบน้ำตาลสตาซิโอสในปริมาณที่สูงกว่าชุดทดลองที่ 2 และ 3 ซึ่งผสมน้ำตาล RFOs ในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ เมื่อทำการเก็บรักษาไอศกรีมซินไบโอติกที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์แล้ว ก็ยังคงสามารถตรวจพบน้ำตาลสตาซิโอสในผลิตภัณฑ์ได้



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลสตาซิโอสของไอศกรีมซินไบโอติกเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

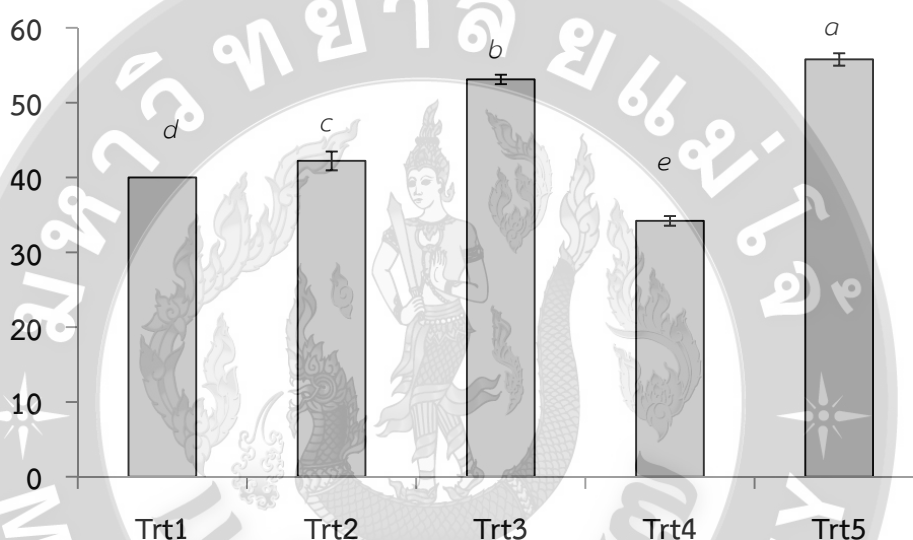
Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)

3.5 ค่า Overrun ของไอศกรีมซินไบโอติก

ค่า Overrun เป็นหนึ่งในคุณสมบัติทางกายภาพของไอศกรีมที่นิยมทำการวิเคราะห์ เป็นค่าที่บอกถึงสัดส่วนของอากาศที่ถูกอัดเข้าไปในเนื้อไอศกรีม ซึ่งจะส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของไอศกรีม และการยอมรับของผู้บริโภคได้ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 9 โดยทุกชุดการทดลองมีค่า overrun ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งไอศกรีมที่มีค่า Overrun สูงที่สุดคือชุดทดลองที่ 5 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสูตรที่มีการเติมน้ำตาล RFOs จากเมล็ดถั่วเขียว ทั้งนี้ระยะเวลาในการปั่นไอศกรีมน่าจะส่งผลต่อค่า Overrun นี้ เพราะความเร็วในการปั่นของใบพัดเครื่องทำไอศกรีมนั้นมีค่าคงที่



ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบค่า Overrun ของไอศกรีมซินไบโอติกแต่ละชุดการทดลอง

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt3 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเขียว)

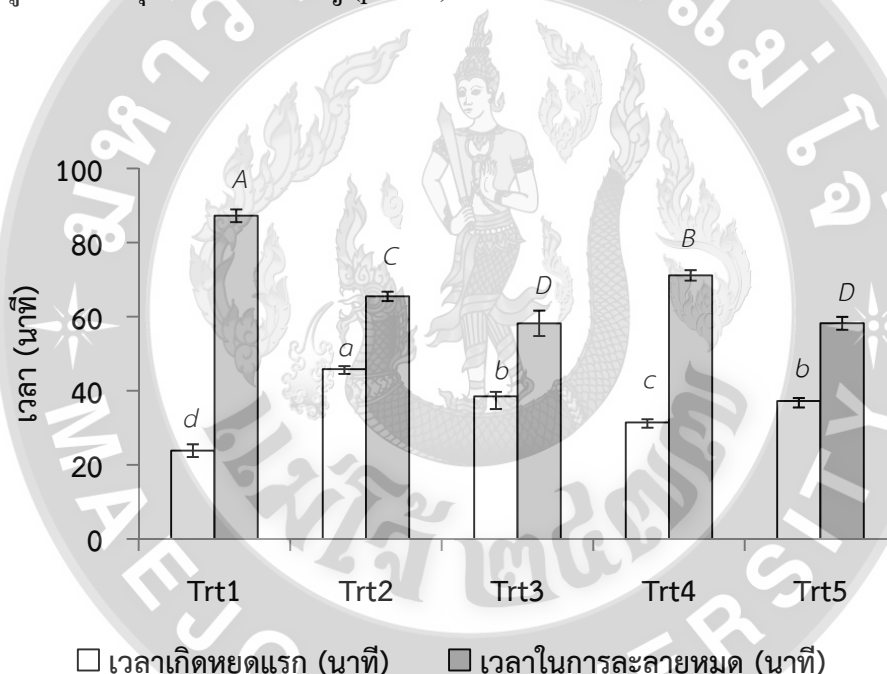
Trt4 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมซินไบโอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเขียว)

3.6 การละลายของไอศกรีมชินไปไอติก

การละลายของไอศกรีมชินไปไอติกทั้ง 5 ชุดการทดลองได้ถูกวิเคราะห์ขึ้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไอศกรีมในชุดทดลองที่ 1 (ไม่มีน้ำตาล RFOs) เกิดการละลายและเกิดเป็นหยดแรกโดยใช้เวลาที่สั้นที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ไอศกรีมชินไปไอติกที่ผสมน้ำตาล RFOs จากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเจียวนั้นใช้เวลาในการเกิดหยดแรกที่สูงกว่าชุดทดลองที่ 1 อย่างชัดเจน ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามทั้ง 4 ชุดการทดลองที่ผสมน้ำตาล RFOs แม้จะใช้เวลาการเกิดหยดแรกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่ก็แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 10

แม้ไอศกรีมในชุดการทดลองที่ 1 (ไม่มีน้ำตาล RFOs) จะละลายและเกิดเป็นหยดแรกในเวลาที่น้อยที่สุด แต่กลับพบว่าใช้เวลาในการละลายอย่างสมบูรณ์นานที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือใช้เวลา 87 นาที ดังภาพที่ 10 ในขณะที่ชุดทดลองที่ 3 และ 5 ใช้เวลาในการละลายอย่างสมบูรณ์น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คือประมาณ 58 นาที



ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบเวลาการเกิดหยดแรกและเวลาในการละลายหมดของไอศกรีมชินไปไอติกแต่ละชุดการทดลอง

หมายเหตุ:

Trt1 = ไอศกรีมสูตรมาตรฐาน (เติม *L. casei*)

Trt2 = ไอศกรีมชินไปไอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt3 = ไอศกรีมชินไปไอติก (*L. casei* + sucrose + RFOs จากถั่วเจียว)

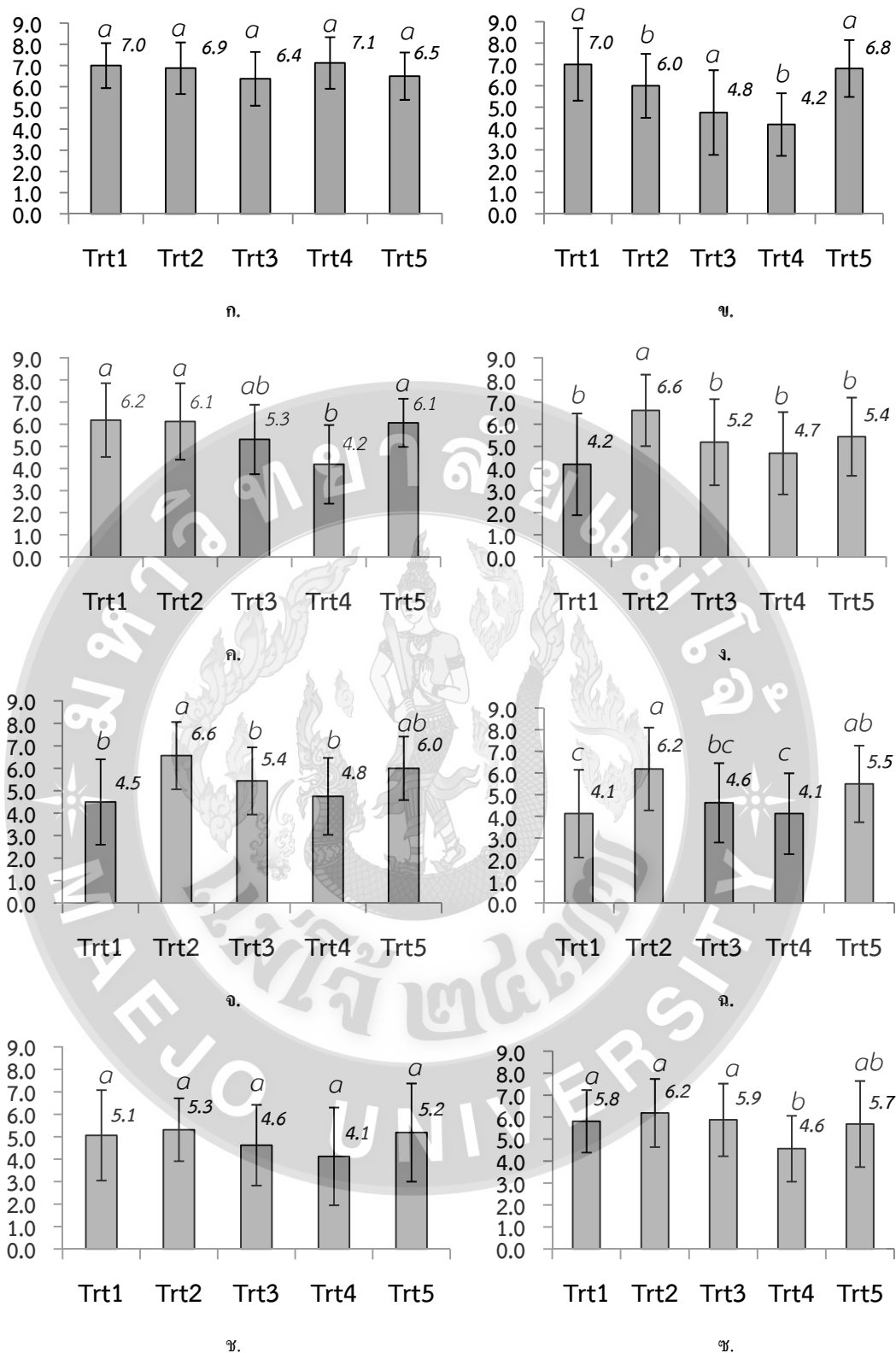
Trt4 = ไอศกรีมชินไปไอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเหลือง)

Trt5 = ไอศกรีมชินไปไอติก (*L. casei* + RFOs จากถั่วเจียว)

3.7 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมชินไบโอติกโดยอาสาสมัคร

การงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 16 คน ผู้ซึ่งไม่เคยได้รับการฝึกฝนในการประเมินการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยอาสาสมัครทั้ง 16 คน แบ่งเป็นเพศชาย 7 คนและหญิง 9 คน แบบทดสอบที่ใช้เป็นแบบ 9 points hedonic scale ที่ให้คะแนนตั้งแต่ 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ไปจนถึง 9 (ชอบมากที่สุด) ดังมีตัวอย่างแสดงในภาคผนวกที่ 3 ผลการประเมินแสดงดังภาพที่ 11 (ก-ข) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาสาสมัครให้การยอมรับของลักษณะสีและกลิ่น-รสตัวของไอศกรีมทั้ง 5 ชุดทดสอบไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยความชอบในสีไอศกรีมนั้นได้รับคะแนนในช่วงขอบเล็กน้อย-ชอบปานกลาง ในเรื่องของความหวานนั้นพบว่าอาสาสมัครรับรู้และให้การประเมินว่าไอศกรีมชุดทดสอบที่ 1, 3 และ 5 มีความหวานสูงมากกว่า ($p < 0.05$) ชุดทดสอบที่ 2 และ 4 ซึ่งมีการเติมน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลือง ค่าความหวานของไอศกรีมสูตรที่ 3 และ 4 ได้รับคะแนนความพึงพอใจเฉลี่ยค่อนข้างน้อยคือ ไม่ชอบเล็กน้อย-เฉยๆ

การประเมินความพึงพอใจในเนื้อสัมผัสที่เรียบเนียนของไอศกรีมก็ได้รับการประเมินโดยพบว่าไอศกรีมที่ไม่เติมน้ำตาล RFOs (ชุดทดสอบที่ 1) มีคะแนนค่าความเรียบเนียนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับไอศกรีมที่ผสมน้ำตาล RFOs อย่างไรก็ดีก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับคะแนนความพึงพอใจต่อการละลายของไอศกรีมทั้ง 5 ชุดทดสอบ ที่ชุดทดสอบที่ 1 ได้รับคะแนนน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เวลาที่เกิดการละลายหยดแรก อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์การยอมรับโดยรวมต่อไอศกรีมทั้ง 5 ชุดทดสอบแล้ว ก็จะเห็นว่าได้คะแนนความพึงพอใจค่อนข้างใกล้เคียงกันยกเว้นไอศกรีมชุดทดสอบที่ 4 ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำตาลทรายและน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลือง ที่ได้คะแนนน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยได้คะแนนเพียงในระดับไม่ชอบเล็กน้อย-เฉยๆ



ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบผลการทดสอบความพึงใจของอาสาสมัครที่มีต่อไอศกรีมชินไบโอติกแต่ละชุดการทดลอง: (ก) สีส, (ข) รสหวาน, (ค) ความมัน, (ง) ความเรียบเนียน, (จ) การละลายในปาก, (ฉ) ความเหนียวหนืด, (ช) กลิ่นรสตัว, (ซ) การยอมรับโดยรวม

วิจารณ์ผลการวิจัย

น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟิโนส (Raffinose family oligosaccharides) หรือที่เรียกสั้นๆ ว่าน้ำตาล RFOs ได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีจึงได้ถูกคัดเลือกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตไอศกรีมเพื่อสุขภาพในงานวิจัยครั้งนี้ โดยมีศักยภาพที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติกหลายชนิดได้ เช่น *Bifidobacterium lactis*, *B. longum*, *L. acidophilus* เป็นต้น (Sumarna, 2008; Martínez-Villaluenga et al., 2005a; Martínez-Villaluenga et al., 2005b) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ α -galactosidase เพื่อใช้ในการสลายน้ำตาลราฟิโนสและสมาชิกในกลุ่ม RFOs โดยจะทำการย่อยพันธะชนิดแอลฟา (α) ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกาแลคโตสกับน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้เชื่อดังกล่าวจะต้องมีการผลิตเอนไซม์ β -galactosidase เพื่อย่อยสลายพันธะชนิดเบต้าที่พบในน้ำตาลซูโครสและแลคโตสด้วย ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ α -galactosidase นี้พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียกลุ่มแลคติกส่วนใหญ่ (Donkor et al., 2007; Sumarna, 2008; LeBlanc et al., 2005; Fredslund et al., 2011) ในขณะที่เชื้อก่อโรคเช่น *S. typhimurium* และ *E. coli* ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลุ่ม RFOs ในการเจริญได้น้ำตาล RFOs จึงได้ถูกผลิตในเชิงการค้าเป็นที่รู้จักกันในนาม Soybean oligosaccharides หรือชื่อในทางการค้าคือ Soya-oligo (Crittenden and Playne, 1996; Mussatto and Mancilha, 2007) อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่าน้ำตาล RFOs เป็นน้ำตาลที่ก่อให้เกิดอาการท้องอืดในคนและสัตว์เนื่องจากร่างกายไม่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่ม α -galactosidase ออกมาย่อยน้ำตาลดังกล่าว จึงเกิดการสะสมในลำไส้ใหญ่และถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ต่อไปจนเกิดแก๊สทำให้ท้องอืด (Mulimani et al., 1996; Viana et al., 2005) ข้อมูลนี้อาจจะส่งผลกระทบต่อการใช้ของผู้บริโภคอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs ดังเช่นไอศกรีมซินไบโอติกจากงานวิจัยชิ้นนี้ได้ แต่ผู้วิจัยคาดว่าน้ำตาล RFOs ดังกล่าวไม่น่าจะก่อผลเสียดังกล่าว เนื่องจากอาหารซินไบโอติกจะมีส่วนผสมของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่จะช่วยย่อยน้ำตาล RFOs เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตอยู่แล้ว จึงไม่น่ากังวลในการบริโภค ประกอบกับมีรายงานของ Rycroft และคณะ (2001) ที่รายงานโดยอ้างอิงจากงานวิจัยต่างๆ ว่าอาสาสมัครที่บริโภคน้ำตาล soybean oligosaccharides 15 กรัมต่อวัน เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์จะส่งผลดีต่อร่างกายโดยมีระดับของเชื้อ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น ในขณะที่จำนวนเชื้อกลุ่ม *Bacteroides* และ *Clostridium* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ไอศกรีมเป็นอาหารที่ได้รับการยอมรับและได้รับความนิยมในผู้บริโภคทุกเพศทุกวัยและทุกเชื้อชาติ จึงน่าจะเป็นสื่อกลางที่ดีในการพาเชื้อโปรไบโอติกเข้าไปสู่ร่างกายของผู้บริโภค (Ranadheera et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีมนั้นอยู่ในช่วงกลางซึ่งเหมาะสมกับการอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกได้ (Homayouni et al., 2008) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของไอศกรีมซินไบโอติกทั้ง 5 ชุดการทดลองในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วงระหว่าง 6-7

เช่นกัน ทั้งนี้อาหารที่มีส่วนประกอบของเชื้อโปรไบโอติกควรมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 10^7 cfu/กรัม ซึ่งเป็นตัวเลขที่สมาคม International Dairy Federation (IDF) ได้แนะนำไว้ (Homayouni et al., 2008; Rajam et al., 2012) แต่ในงานวิจัยนี้กลับพบว่าจำนวนเชื้อโปรไบโอติกที่รอดชีวิตในไอศกรีมซินไบโอติกกลับลดลงเป็นอย่างมากในทุกๆ ชุดการทดลอง แม้จะมีการเติมน้ำตาล RFOs ที่เตรียมจากเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วเขียวลงไปก็ตาม ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการเติมเชื้อโปรไบโอติกเริ่มต้นที่น้อย ซึ่งในงานวิจัยอื่นๆ ที่ผลิตไอศกรีมซินไบโอติกด้วยองค์ประกอบที่แตกต่างจากงานวิจัยชิ้นนี้ได้พบว่าเชื้อโปรไบโอติกได้มีจำนวนที่ลดลงเช่นกันเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เช่นงานวิจัยของ Homayouni และคณะ (2008) ที่ผลิตไอศกรีมซินไบโอติกที่มีส่วนผสมของเซลล์อิสระของ *L. casei* (Lc-01) และ *B. lactis* (Bb-12) กับ Resistant starch ก็พบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงไปประมาณ 3 log (cfu/g) เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 180 วัน

กระบวนการผลิตไอศกรีมซึ่งต้องอาศัยความเย็นระดับต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อโปรไบโอติกตาย (Homayouni et al., 2008) เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะทิ่มแทงผนังเซลล์ทำให้เซลล์เสียหายและตายได้ ความไม่คงที่ของอุณหภูมิในตู้แช่แข็งก็เป็นสาเหตุทำให้ผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นเช่นกัน (Ranadheera et al., 2013) ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงได้มีการเติมสารจำพวก Cryoprotectant ซึ่งจะช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ภายในเซลล์ได้ สาร cryoprotectant ที่หาง่ายและมีการใช้งานกันสำหรับการแช่แข็งเซลล์แบคทีเรียคือน้ำตาลซูโครส (Ying et al., 2013) ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็ได้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตไอศกรีมด้วย แต่ก็ไม่พบว่ายังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดการตายของเซลล์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ต่ำ น้ำตาลราฟฟิโนสก็จัดได้ว่าเป็นสาร cryoprotectant ที่ใช้ในงานทางด้านจุลชีววิทยาเช่นกัน (Hubálek, 2003) ผู้วิจัยจึงคาดหวังว่าการเติมน้ำตาลกลุ่ม RFOs ลงในไอศกรีมซินไบโอติกจะช่วยลดการตายของโปรไบโอติกได้ ซึ่งผลการทดลองก็ได้แสดงให้เห็นว่าในช่วง 2 สัปดาห์แรกนั้นจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *L. lactis* ในไอศกรีมซินไบโอติกที่มีส่วนผสมของน้ำตาล RFOs จะสูงกว่าไอศกรีมชุดการทดลองที่ 1 (ไม่มีน้ำตาล RFOs) แต่หลังจากนั้นอัตราการรอดชีวิตก็ใกล้เคียงกับสูตรที่เติมน้ำตาล RFOs จากถั่วเขียว ยังคงเหลือเพียงแต่สูตรที่เติมน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลืองที่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่า

อีกสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกรอดชีวิตน้อยลง น่าจะเกิดจากความเป็นพิษของออกซิเจน (Oxygen toxicity) (Ranadheera et al., 2013) เนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เป็นแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) นี้ไม่ชอบอากาศในการเจริญเติบโต (Facultative anaerobic bacteria) บางชนิดไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างยิ่งยวด (Strictly anaerobic bacteria) เช่น *Bifidobacterium* sp. เป็นต้น ดังนั้นกระบวนการผลิตไอศกรีมซึ่งต้องมีการปั่นอัดอากาศให้แทรกในน้ำนมจึงเป็นสภาวะที่เป็นส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอ

ดึกเป็นอย่างมาก สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่า Overrun ของไอศกรีมชุดการทดลองที่ 2 และ 4 ที่ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และก็พบว่ามีค่า Overrun ที่ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆ เช่นกัน ภาชนะที่ใช้บรรจุไอศกรีมชินไบโอติกก็ควรลดการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ด้วย

ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลุ่ม RFOs ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมชินไบโอติกแต่ละสูตรครั้งนี้ได้ล้มเหลว เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลราฟฟิโนสและเวอร์บาสโคสได้ พบเพียงน้ำตาลสตาซิโอสในผลิตภัณฑ์เท่านั้นซึ่งโดยทั่วไปจะพบในปริมาณที่สูงกว่าน้ำตาลราฟิโนสและเวอร์บาสโคสอยู่ ส่วนสาเหตุที่ตรวจไม่พบน้ำตาลอีกสองชนิดนั้น คาดว่าอาจจะเนื่องมาจากเทคนิคการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นน้ำนม โดยผู้วิจัยไม่สามารถกรองอนุภาคขนาดเล็กในไอศกรีมเหลว (ทิ้งไว้ให้ละลายอย่างสมบูรณ์) ด้วยแผ่นกรองที่ใช้อยู่ ทำให้ไม่สามารถนำตัวอย่างไอศกรีมเหลวนิดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์น้ำตาล RFOs ได้ จึงต้องประยุกต์เทคนิคด้วยการนำไอศกรีมเหลวมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้เฉพาะน้ำตาล RFOs จากนั้นจึงนำตัวอย่างดังกล่าวชนิดเข้าเครื่อง HPLC ดังนั้นน้ำตาลที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วอาจจะสูญหายไประหว่างกระบวนการสกัดนี้ได้

Ranadheera และคณะ (2013) ได้อธิบายถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเวลาที่ใช้ในการละลายของไอศกรีมจนเกิดเป็นหยดแรกและการละลายจนสมบูรณ์ไว้ว่า เกิดจากองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไอศกรีมเอง โดยไอศกรีมประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างหลัก 3 ส่วน ได้แก่ ช่องอากาศ ผลึกน้ำแข็ง และเม็ดไขมัน ซึ่งความสัมพันธ์ของทั้งสามองค์ประกอบนี้ แม้ว่าจะไม่เข้าใจแน่ชัด แต่ก็ส่งผลต่ออัตราการละลายและความแน่นเนื้อของไอศกรีมเป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งขนาดของผลึกน้ำแข็งก็ส่งผลต่อการละลายของไอศกรีม เพราะผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กจะมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำกว่าผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่เล็กน้อย ทำให้ละลายเร็วกว่า และส่งผลให้เกิดการละลายหยดแรกเร็วขึ้น

ผลการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภค (อาสาสมัคร) ที่มีต่อไอศกรีมนมวัวโปรไบโอติกที่ผสมเชื้อ *L. lactis* และไอศกรีมนมวัวชินไบโอติกที่ผสมเชื้อ *L. lactis* และน้ำตาล RFOs จากถั่วเหลืองและถั่วเขียว พบว่าแทบไม่มีความแตกต่างกัน ถึงแม้จะได้รับคะแนนความพึงพอใจที่ค่อนข้างน้อยก็ตาม ซึ่งก็อาจเกิดจากสูตรไอศกรีมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ยังไม่ใช่สูตรที่พัฒนามาเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รวมไปถึงการรับรู้ของอาสาสมัครที่มีต่อกลิ่นถั่ว (beany) ก็ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งก็หมายความว่ากลิ่นของไอศกรีมชินไบโอติกทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่ได้แตกต่างไปจากไอศกรีมที่ไม่มีส่วนผสมจากถั่วเลย ซึ่งก็น่าจะส่งผลดีต่อการยอมรับของผู้บริโภคต่อไปในอนาคต เนื่องจากมีผู้บริโภคจำนวนมากที่ไม่นิยมอาหารที่มีกลิ่นเหม็นเขียวของเมล็ดถั่วปนอยู่ด้วย เช่นเดียวกับกลิ่นสาบของสัตว์จำพวกแพะหรือที่เรียกว่ากลิ่น 'goaty' ก็ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคหลายกลุ่มเช่นกัน

โดยรวมแล้วผู้วิจัยมีความเห็นว่าการผลิตไอศกรีมชินไบโอดีทที่มีองค์ประกอบของเชื้อโปรไบโอดีทและน้ำตาล RFOs ควรได้มีการศึกษาและพัฒนาต่อไปเนื่องจากจะเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคเป็นอย่างมาก แต่มีประเด็นที่จำเป็นต้องพัฒนาอีกหลายประการ ยกตัวอย่างเช่น อัตราการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอดีทในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เทคนิคการสกัดและเตรียมน้ำตาล RFOs จากเมล็ดพืชตระกูลถั่วให้มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น รวมถึงสูตรไอศกรีมที่เป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภคทั่วไป



สรุปผลการวิจัย

1. งานวิจัยนี้สามารถผลิตไอศกรีมชินไบโอดีทจากนมวัวสดได้ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรไบโอดีทและพรีไบโอดีทคือแบคทีเรีย *L. lactis* และน้ำตาล RFOs ที่เตรียมมาจากเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่60 หรือถั่วเขียวสายพันธุ์ชัยนาท36
2. เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอดีท *L. lactis* ยังคงรอดชีวิตในไอศกรีมชินไบโอดีทภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แต่มีจำนวนลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์
3. คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไอศกรีมชินไบโอดีทแทบไม่มีความแตกต่างกันกับไอศกรีมที่เติมเพียงเชื้อ *L. lactis* ยกเว้นน้ำตาลกลุ่ม RFOs บางชนิดที่จะตรวจพบในไอศกรีมชินไบโอดีทเท่านั้น และยังคงตรวจพบตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา
4. การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อไอศกรีมชินไบโอดีทเทียบกับไอศกรีมที่เติมเพียงเชื้อ *L. lactis* พบว่าใกล้เคียงกัน แต่มีคะแนนในระดับเพียงเฉยๆ – ชอบเล็กน้อย (5-6) เท่านั้น
5. ประเด็นที่จำเป็นต้องพัฒนาเพิ่มเติมสำหรับไอศกรีมชินไบโอดีทในงานวิจัยนี้คือ การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โปรไบโอดีทในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เทคนิคการสกัดและเตรียมน้ำตาล RFOs จากเมล็ดพืชตระกูลถั่วให้มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น รวมถึงสูตรไอศกรีมที่เป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภคทั่วไป

เอกสารอ้างอิง

- Aragon-Alegro, L.C., Alegro, J.H.A, Cardarelli, H.R., Chiu, M.C. and Saad, S.M.I. 2007. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. *LWT* 40: 669-675.
- Aryana, K.J. and McGrew, P. 2007. Quality attributes of yoghurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT* 40: 1808-1814.
- Basyigit, G., Hulcasan, H. and Karahan, A. 2006. Viability of human-derived probiotic Lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. *J Int Microbiol Biotechnol* 33: 796-800.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., and Majakowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Intern.* 35: 125-131.
- Bourhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Bornet, F., and Rambaud, J. (1998). Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy human. *J. Nutr.* 129 : 113-116.
- Cambell, J. M., Fahey, G. C., and Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 127: 130-136.
- Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tungland, B. C., and Slavin, J. L. (2000). Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutr. Res.* 20: 191-201.
- Crittenden, R.G. and Playne, M.J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7: 353-361.
- Espinosa-Martos, I and Rupérez, P. 2006. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. *Nutr Hosp.* 21: 92-96.
- Geilman, W.G. and Schmidt, D.E. 1992. Physical characteristics of frozen deserts made from ultrafiltered milk and various carbohydrate. *J. Dairy Sci.* 75: 2670-2675.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Hanvonnar, R. And Huis In't Veld, M.J.H. (1992). Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Amsterdam: Elsevier Applied Science

Publishers.

- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr* 73: 365s-373s.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry* 111: 50-55.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
- Kadlec, P. (2001). Carbohydrate Chemistry. In Hedley, C. L., (Ed.), *Carbohydrates in Grain Legume Seeds: Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics* (pp.15-60), UK: Biddles Ltd.
- Kullen, M. J., Khil, J., Busta, F. F., Gallaher, D. D., and Brady, L. (1998). Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* *in vivo* and *in vitro*. *Nutr. Res.* 18: 1889-1897.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottiere, H. M., and Cherbut, C. (1999). Prolong intake of fructooligosaccharides induces a short term elevation of lactic acid- producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J. Nutr.* 129: 2231-2235.
- Marteau, P. R., Vrese, M. D., Cellier, C. J., and Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am. J. Clin. Nutr* 73: 430s-436s.
- Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. Gomez, R. and Vidal-Valverde, C. 2006. Influence of addition of raffinose oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 16: 768-774.
- Martinez-Villaluenga, C. and Gomez, R. 2007 Characterization of bifidobacteria as starter in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal* 17: 116-122.

- Mazza, G. (1998). Vegetables Rich in Nondigestible Oligosaccharide. In *Functional Foods: Biochemical & Processing Aspects* (pp.215-220), Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc.
- Mulimani, V.H. and Thippeswamy, S. 1997. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. *Food Chemistry* 59: 279-282.
- Mussatto, S.I. and Mancilha, I.M. 2007. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers* 68: 587-597.
- Pinto, S. S., Fritzen-F.C. B., Munoz, I. B., Barreto, P. L.M., Prudencio, E. S. and Amboni, R. D. M. C. 2012. Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. *Journal of Food Engineering*. 111: 563–569.
- Rajam,R., Karthik, P.,Parthasarathi, S., Joseph, G.S. and Anandharamakrishnan, C. 2012. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods* 4(4): 891–898.
- Rastall, R. A., Fuller, R., Gaskins, H. R., and Gibson, G. R. (2000). In Gibson, G. R., and Williams, C. M., (Ed.), *Functional Foods: Concept to product* (pp.71-95), Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Ranadheera, C.S., Evans, C.A., Adams, M.C. and Baines, S.K. 2013. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. *Small Ruminant Research* 112: 174-180.
- Roberfroid, M. B. (1999). Dietary fiber properties and health benefits of non-Digestible oligosaccharide. In Cho, S. S., Prosky, L., and Dreher, M., (Ed.), *Complex carbohydrates in foods* (pp.25-33), New York: Marcel Dekker.
- Rycroft, C.E., Rastall, R.A. and Gibson, G.R. (2001). The role of prebiotics in human gut microbiology: prebiotic oligosaccharides. In Van Broekhoven, A. (Ed.), *Novel frontiers in the production of compounds for biomedical use* (pp. 411-428), Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Scherzenmeir, J., and Vrese, M. (2001). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics-approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 361s-364s.

- Sumarna. 2008. Change of Raffinose and Stachyose in soy milk fermentation by lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian. *Malaysian Journal of Microbiology* 4: 26-34.
- Viana, S.F., Guimãraes, V.M., José, I.C., Oliveira, M.G.A., Costa, N.M.B., Barros, E.G., Moreira, M.A. and Rezende, S.T. 2005. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean galactosidase. *Food Chemistry* 93: 665-670.
- Ying, D., Schwander, S., weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., Augustin, M.A. 2013. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GC in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods* 5: 98-105.





ภาคผนวกที่ 1
ภาพเมล็ดถั่วที่ใช้ในงานวิจัย



ถั่วเหลือง : เชียงใหม่ 60



ถั่วเขียวผิวมัน : ชัยนาท 36

ภาพที่ 12 ภาพแสดงลักษณะของเมล็ดถั่วทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ภาคผนวกที่ 2

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย DNS

เตรียมโดยการชั่ง DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 10 g ในน้ำกลั่น 250 ml เติมน้ำ NaOH 16 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 200 ml คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมน้ำ Sodium potassium tartate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 g ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 ml เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. Phenol solution ความเข้มข้น 5% (w/v)

ชั่ง Phenol 0.5 g ค่อยๆ เทสารผสมกับน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ในตู้ดูดควัน แล้วใช้แท่งแก้วคนสารให้สารเข้ากันดี จากนั้นเก็บสารไว้ในขวดสีชา

3. สารละลายมาตรฐานกลูโคส 1500 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

ชั่งกลูโคส 0.15 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml โดยใช้ขวดปรับปริมาตร 100 ml

ขั้นตอนการวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Phenol-sulfuric method)

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1.1 เตรียมหลอดทดลองที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 500 μl

1.2 เติมน้ำสารละลายฟีนอล 5% ลงไป 500 μl เขย่าให้เข้ากัน

1.3 เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 2.5 ml โดยเติมอย่างช้าๆ แล้วเขย่าให้เข้ากัน

1.4 ตั้งหลอดทิ้งไว้ 10 นาที

1.5 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

1.6 สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสขึ้น โดยพล็อตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2.1 คูณสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 500 μl ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำสารละลายฟีนอล 5% ลงไป 500 μl เขย่าให้เข้ากัน

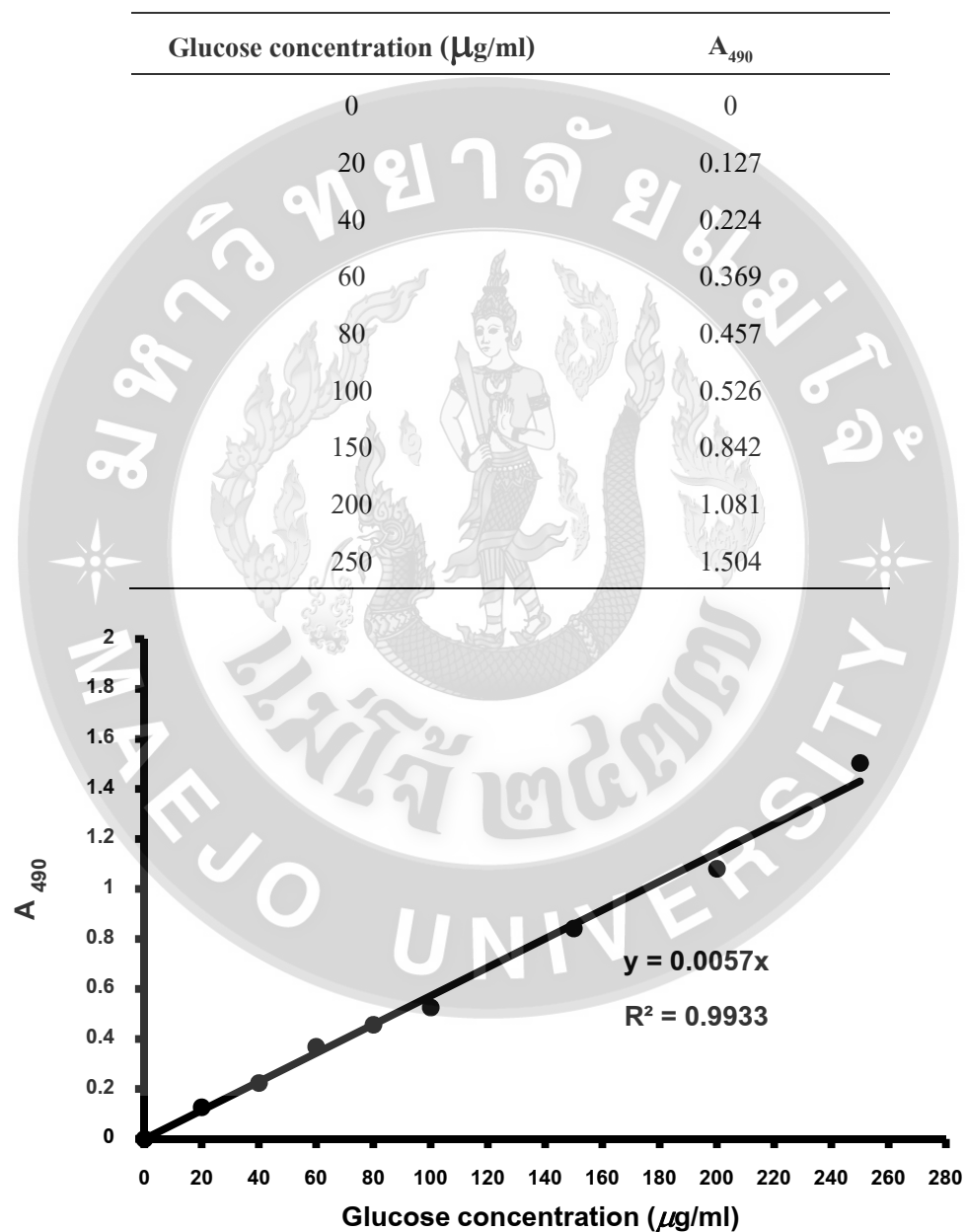
2.2 เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ml ลงไป โดยเติมอย่างช้าๆ แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.3 ตั้งหลอดทิ้งไว้ 10 นาที

2.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

2.5 คำนวณค่าปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวัดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid

ขั้นตอนการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS method

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

1.1 เตรียมหลอดทดลองที่มีสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาณ 500 μl

1.2 เติมสารละลาย DNS ลงไป 500 μl เขย่าให้เข้ากัน

1.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที

1.4 เมื่อหลอดเย็นให้เติมน้ำกลั่นปริมาณ 4 μl เขย่าให้เข้ากัน

1.5 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

1.6 สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสขึ้น โดยพล็อตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.1 คูณสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 500 μl ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DNS ลงไป 500 μl เขย่าให้เข้ากัน

2.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที

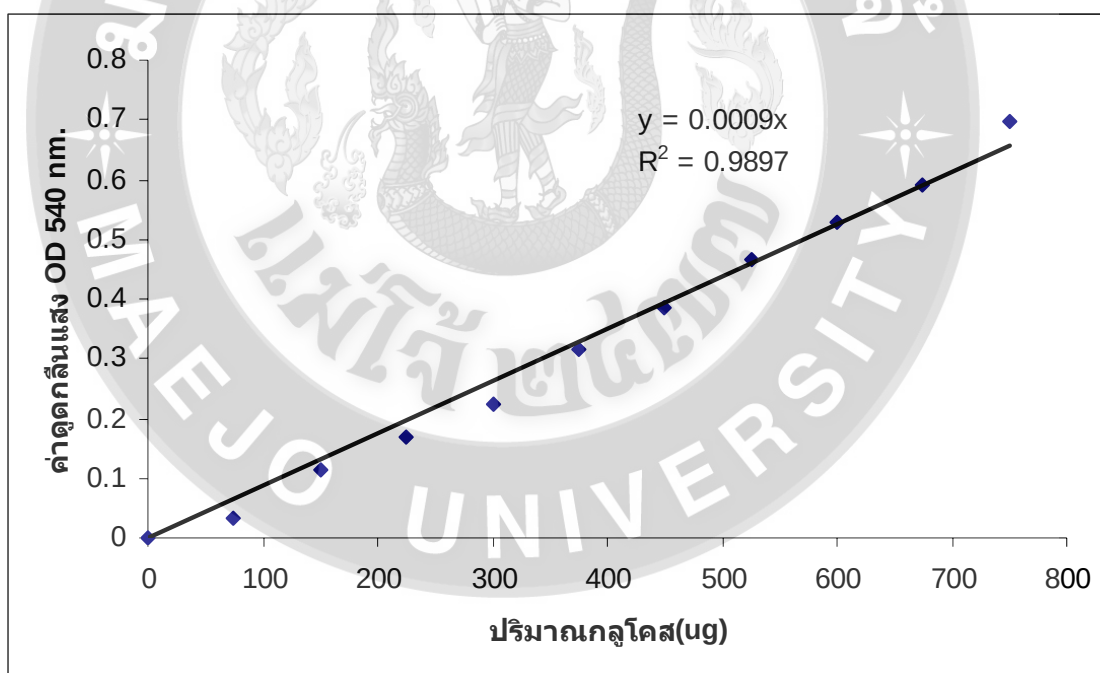
2.3 เมื่อหลอดเย็นให้เติมน้ำกลั่นปริมาณ 4 μl เขย่าให้เข้ากัน

2.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

2.5 คำนวณค่าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวัดด้วยวิธี DNS

ปริมาณน้ำตาล (μl)	น้ำกลั่น (μl)	ค่า A540
0	500	0
50	450	0.03
100	400	0.11
150	350	0.17
200	300	0.23
250	250	0.31
300	200	0.39
350	150	0.47
400	100	0.53
450	50	0.59
500	0	0.70



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS method

ภาคผนวกที่ 3

ตัวอย่างแบบทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ไอศกรีม

ชื่อ.....วันที่.....อายุ.....

ระดับการศึกษา.....เพศ.....

ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนม ตัวอย่างที่

1. กรุณาให้คะแนนในแต่ละลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามความรู้สึกของท่าน โดยกำหนดระดับการให้คะแนนดังนี้

9 คือ ชอบมากที่สุด

8 คือ ชอบมาก

7 คือ ชอบปานกลาง

6 คือ ชอบเล็กน้อย

5 คือ เฉยๆ

4 คือ ไม่ชอบเล็กน้อย

3 คือ ไม่ชอบปานกลาง

2 คือ ไม่ชอบมาก

1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด

สีปรากฏ.....

รสหวาน.....

ความมัน.....

ความเรียบเนียน.....

การละลายในปาก.....

ความเหนียวหนืด.....

กลิ่นรสตัว.....

การยอมรับโดยรวม.....

หมายเหตุ:

สีที่ปรากฏ = ความเข้มหรือความสว่างของสีขาว ถ้าเข้มมากไอศกรีมจะมีสีเข้มหรือคล้ำ ถ้าอ่อนจะมีสีอ่อนหรือสว่าง

ความมัน = ความรู้สึกของความเหนียวร่วมกับการลิ้นไหลในปากของไอศกรีมขณะละลาย ค่ามากมีความมันมาก

ความเรียบเนียน = การสัมผัสของลิ้นกับอนุภาคต่างๆหรือผลึกน้ำแข็ง ค่ามากเรียบเนียนมาก ค่าน้อยเรียบเนียนน้อย

การละลายในปาก = ระยะเวลาของการละลายไอศกรีมในปากค่ามากละลายช้า ค่าน้อยละลายเร็ว

ความเหนียวหนืด = ความเหนียวหนืดของไอศกรีมในปากค่ามากมีความหนืดมาก ค่าน้อยมีความหนืดน้อย

2. ท่านยอมรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนมนี้หรือไม่

() ขอมรับ

() ไม่ยอมรับ

3. ถ้ามีผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนมออกจำหน่ายตามท้องตลาดท่านจะซื้อหรือไม่

() ซื้อ

() ไม่ซื้อ

เพราะ.....

ข้อเสนอแนะ.....



ภาพที่ 15 บรรยากาศการประเมินความพึงพอใจของอาสาสมัครที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไอศกรีม
ซินไบโอติก