



อิทธิพลของเทคนิคการแทรกซึมและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อการเสริมโพรโปติคในขนุน
อบแห้ง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

อิทธิพลของเทคนิคการแทรกซึมและอุณหภูมิต่ำที่ใช้ในการทำแห้งต่อการเสริมโพรไบโอติกใน
ขนุนอบแห้ง



โดย
นางสาวจิตาภา นพพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

THE EFFECT OF IMPREGNATION METHOD AND DRYING TEMPERATURE ON
PROBIOTIC FORTIFICATION OF DRIED JACKFRUIT



By
MISS Jidapa NOPPHAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (FOOD TECHNOLOGY)
Department of FOOD TECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

620920097 : เทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

คำสำคัญ : จุลินทรีย์โพรไบโอติก การแทรกซึม สุกญากาศแบบพัลส์ คลื่นอัลตราซาวด์ การทำแห้งแบบลมร้อน ขนุนอบแห้ง

นางสาว จิตภา นพพันธ์: อิทธิพลของเทคนิคการแทรกซึมและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อการเสริมโพรไบโอติกในขนุนอบแห้ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุศราภรณ์ มหาโยธี

งานวิจัยนี้ ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติก *Lactobacillus casei* sups. *casei* และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก โดยการนำเนื้อขนุนพันธุ์สีทองสุกพอดีรับประทาน ที่มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 23.73 ± 0.34 °Brix มีสีเหลืองสม่ำเสมอ ไม่ขำ ไม่มีตำหนิ มาลวกในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อก่อนนำไปศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมในสภาวะบรรยากาศ (Atmospheric impregnation; AI) สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์ (Pulsed-vacuum impregnation; PVI) และการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (Ultrasonic impregnation; UI) ที่เวลาการแทรกซึม 15, 30, 45 และ 60 นาที ต่อปริมาณ *L. casei* ในเนื้อขนุนก่อนการทำแห้ง เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเสริม *L. casei* พบว่าวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกมีผลต่อปริมาณ *L. casei* ในเนื้อขนุนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และระยะเวลาที่ทำให้ขนุนมีปริมาณ *L. casei* สูงสุดสำหรับวิธี AI เท่ากับ 60 นาที มีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 6.22 ± 0.02 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) ในขณะที่วิธี PVI เวลาที่เหมาะสมในการแทรกซึมเท่ากับ 45 นาที มีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 8.16 ± 0.02 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) และวิธี UI เวลาที่เหมาะสมในการแทรกซึมเท่ากับ 45 นาที มีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 7.62 ± 0.05 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) จากนั้นใช้เวลาแทรกซึมดังกล่าวนำไปศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกโดยทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาด พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำแห้งเป็น 60 องศาเซลเซียสจะทำให้ตัวอย่างมีค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีเหลือง (b^*) ลดลง แต่มีค่าสีแดง (a^*) เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ขนุนอบแห้งที่ผ่านการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี PVI มีค่าความแตกต่างของสี (ΔE) น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่แทรกซึมด้วยวิธีอื่นๆ ในขณะที่วิธี AI ทำให้ตัวอย่างมีค่า ΔE มากที่สุด สำหรับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* ที่เหลืออยู่ในชั้นขนุนอบแห้งพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งที่สูงขึ้นมีผลต่อการลดลงของปริมาณ *L. casei* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และการแทรกซึมด้วยวิธี PVI ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีปริมาณ *L. casei* คงเหลือมากที่สุดมีค่า 7.76 ± 0.06 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) คิดเป็น

ร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ $89.08 \pm 0.13\%$ และปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานขององค์การอาหารและยาประเทศไทยที่ระบุว่าอาหารที่มีโพรไบโอติกต้องมีจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า $6 \log\text{CFU/กรัม}$ ในขณะที่การทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการศึกษาไม่สามารถใช้ได้เนื่องจากทำให้มีปริมาณ *L. casei* คงเหลือในชั้นขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการแทรกซึมโพรไบโอติก



620920097 : Major (FOOD TECHNOLOGY)

Keyword : Probiotic microorganism. Impregnation. Pulsed-vacuum. Ultrasonic. Hot-air drying. Dried jackfruit

MISS JIDAPA NOPPHAN : THE EFFECT OF IMPREGNATION METHOD AND DRYING TEMPERATURE ON PROBIOTIC FORTIFICATION OF DRIED JACKFRUIT THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR BUSARAKORN MAHAYOTHEE, Ph.D.

The effect of probiotic-impregnation (*Lactobacillus casei*) methods and drying temperature on viability of *L. casei* and quality of probiotic-enriched dried jackfruit were examined in this study. Jackfruit bulbs (var. Sithong) that have uniform yellow color and free from defects or bruises with total soluble solids (TSS) of 23.7 ± 0.3 °Brix were selected. The bulbs were blanched at 80°C for 2 min and cooled in a biosafety cabinet prior submerging in impregnation solution. Impregnation was performed at atmospheric pressure (AI), pulsed-vacuum (PVI) and with ultrasonic (UI) for 15, 30, 45 and 60 min. The impregnation methods had significant influenced ($p < 0.05$) on the *L. casei* content in submerged sample. The highest *L. casei* content in submerged sample was found at 8.12 ± 0.02 log CFU/g sample (wb) followed by 7.62 ± 0.05 log CFU/g sample (wb) and 6.22 ± 0.02 log CFU/g sample (wb) when using PVI method for 45 min, UI method for 45 min and using AI method for 60 min, respectively. Therefore, these optimum conditions were used as impregnation pretreatments. After impregnation, the samples were dried at 50°C and 60°C using tray dryer and the quality of product were evaluated. The results showed that the quality of probiotic-enriched dried jackfruit was significantly affected ($p < 0.05$) by drying temperature. L^* value and b^* value of were significantly decreased ($p < 0.05$) while a^* value was significantly increased ($p < 0.05$) when drying the sample at 60°C . The lowest of total color difference (rE) was found in dried sample prepared by PVI method while the highest rE was observed in dried sample obtained by AI method. Increasing of drying temperature from 50°C to 60°C resulted in significant decreasing of viability of *L. casei* in dried sample. The highest concentration of *L. casei* was found in the sample prepared by PVI + drying at 50°C at 7.76 ± 0.06 log CFU/g sample (wb) which account for $89.08 \pm 0.13\%$ viability. Regarding the standard of probiotic products of Thai FDA that required the

minimum concentration of probiotic viability at 6 log CFU/g, therefore, the sample prepared by PVI + drying at 50 °C could be considered as a probiotic product whereas the sample dried at 60 °C contained probiotic less than 6 log CFU/g for all impregnation methods.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุศราภรณ์ มหาโยธี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้การสนับสนุน และคอยให้คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึงให้คำแนะนำต่างๆ ที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการทำงาน ตลอดจนตรวจเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คูวิจิตรจากรุ ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาในระหว่างการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ขวัญใจ กลิ่นจางกล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. นิโบล โกมลสิงห์ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบความเรียบร้อยของงานวิจัย ไปจนถึงการคำนวณ และการทำเล่มวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาวภัสรินทร์ เกิดผล นางสาวกมลวัลย์ แดงมาตี นายสมัชชา กรุงแก้ว และเพื่อนร่วมงานทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา รวมไปถึงทุกคนในครอบครัวของดิฉัน ที่คอยให้กำลังใจสนับสนุนการทำงาน และช่วยเหลือด้านต่างๆ

นางสาว จิตาภา นพพันธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	5
2.1 โพรไบโอติก.....	5
2.1.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก.....	5
2.1.2 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก.....	6
2.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโพรไบโอติก.....	8
2.1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความคงอยู่ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	11
2.1.5 ผลข้างเคียงหรือโอกาสที่อาจส่งผลต่อความปลอดภัยในการใช้โพรไบโอติก.....	12
2.2 การใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร.....	12
2.2.1 ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโพรไบโอติกที่ได้จากนม.....	12
2.2.2 เครื่องดื่มโพรไบโอติกจากผักและผลไม้.....	13

2.2.3 ธัญชาติ	14
2.2.5 ผลไม้อบแห้ง.....	14
2.3 ขนุน	19
2.4 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี vacuum impregnation	20
2.5 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี ultrasonic impregnation.....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	25
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	25
3.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา.....	26
3.3.1 การเตรียมสารละลายโพรไบโอติก	28
3.3.2 การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	30
3.4 วัตถุประสงค์.....	30
3.4.1 การคัดเลือกขนุน.....	30
3.4.2 การเตรียมชั้นขนุน.....	32
3.4.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของขนุนสด.....	32
3.4.3.1 คุณภาพทางกายภาพ.....	32
3.4.3.2 คุณภาพทางเคมี.....	33
3.4.4 การเตรียมตัวอย่างขนุนที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น.....	34
3.4.4.1 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมขนุนปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่อปริมาณ L. casei.....	35
3.4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic plate count).....	35
3.4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold plate count).....	36
3.4.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ L. casei ในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ	36
3.5 การศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในชั้นขนุนที่เวลาต่างๆ	37

3.5.1 การแทรกซึมที่ความดันบรรยากาศ	38
3.5.2 การแทรกซึมที่สภาวะสูญญากาศแบบพัลส์	39
3.5.3 การแทรกซึมโดยวิธีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์.....	39
3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือภายหลังการแทรกซึม.....	40
3.6 การศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก	40
3.6.1 การทำแห้ง.....	40
3.6.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก	41
3.6.2.1 คุณภาพทางกายภาพ.....	41
3.6.2.2 คุณภาพทางเคมี.....	42
3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก.....	42
3.6.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic plate count).....	42
3.6.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold plate count).....	43
3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือภายหลังการทำแห้ง.....	43
3.7 การทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสขนุนอบแห้งที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีที่เหมาะสม	44
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	46
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	47
4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของขนุนสด.....	47
4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา	49
4.3 ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างขนุนให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมเริ่มต้น .49	
4.4 ผลของวิธีการแทรกซึมจุลินทรีย์โพรไบโอติกและเวลาในการแทรกซึมต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ในขนุนที่ผ่านการลวก	51

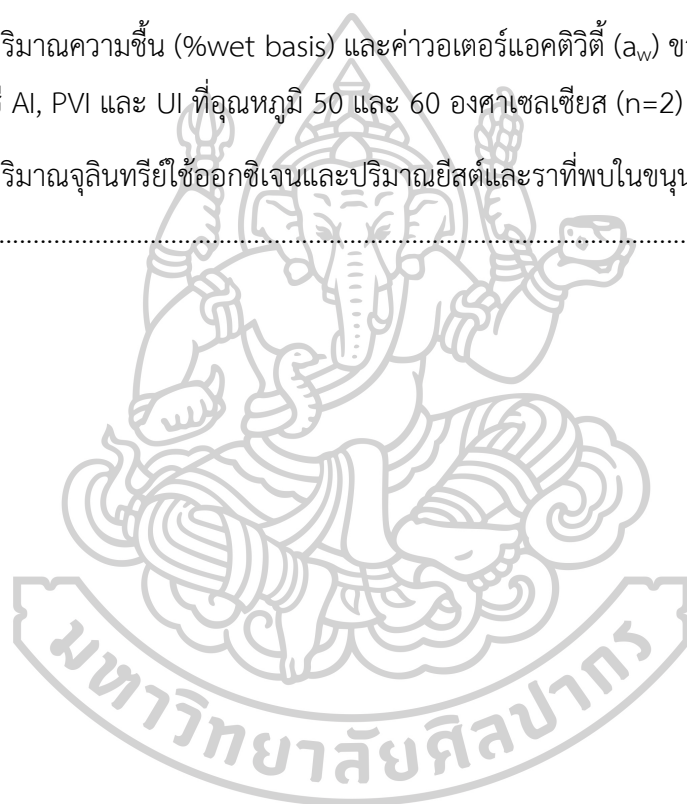
4.5 ผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อคุณภาพ ปริมาณ <i>L. casei</i> และร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก.....	53
4.5.1 ลักษณะปรากฏและค่าสี.....	53
4.5.2 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้.....	55
4.5.3 ปริมาณ <i>L. casei</i> ในชั้นขนุนอบแห้ง.....	56
4.6 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสขนุนอบแห้งที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติก	59
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	63
ภาคผนวก ก	64
ภาคผนวก ข	66
ภาคผนวก ค	69
ภาคผนวก ง.....	73
รายการอ้างอิง.....	77
ประวัติผู้เขียน	92



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโพรไบโอติก.....	8
ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ แล็กโตบาซิลลัส ไบฟิโดแบคทีเรียม และ สเตรปโตคอคคัส ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับแปนอาหารมนุษย์	13
ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยผลิตภัณฑ์ผลไม้อบแห้งเสริมโพรไบโอติก	16
ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อขนุนสุก (100 กรัมเนื้อขนุน)	20
ตารางที่ 5 รายละเอียดการซื้อขนุนสายพันธุ์สีทอง สำหรับแต่ละชุดการทดลอง (ในแต่ละรุ่นจะทำการ ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)	31
ตารางที่ 6 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของชิ้นขนุนสดที่ใช้ในการทดลองแต่ละรุ่น (n=7).....	48
ตารางที่ 7 ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria count) ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count) ที่พบในขนุนสดและขนุนที่ผ่านการลดเชื้อด้วยวิธีการแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) และการลวกในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือที่พบใน ขนุนที่ผ่านการลดเชื้อจุลินทรีย์จากทั้ง 2 วิธี (n=2).....	50
ตารางที่ 8 ปริมาณ <i>L. casei</i> ที่คงเหลือในชิ้นขนุนหลังจากการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี AI, PVI และ UI ที่เวลาต่าง ๆ (n=2).....	52
ตารางที่ 9 ค่าสีของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีต่างๆ ที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาด (n=2).....	54
ตารางที่ 10 ปริมาณความชื้น และค่าวอเตอร์แอกติวิตี ของขนุนอบแห้งที่เสริมโพรไบโอติกด้วยวิธี AI, PVI และ UI ที่ทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับ (n=2).....	55
ตารางที่ 11 ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือในชิ้นขนุนอบแห้งที่เสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีต่างๆ หลังการทำ แห้งด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสและร้อยละการรอดชีวิตของ โพรไบโอติก <i>L. casei</i> (n=2)	58
ตารางที่ 12 คะแนนความชอบ (Liking score) จากวิธี 9-point hedonic scale ของขนุนอบแห้ง เสริมโพรไบโอติกและขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งสภาวะ เดียวกัน (n=15)	60

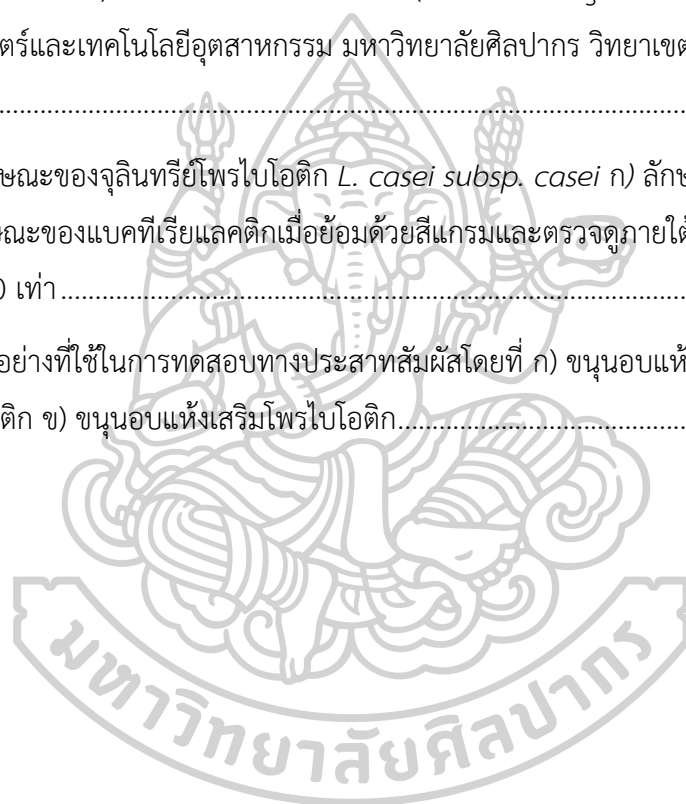
ตารางที่ 13 คะแนนร้อยละของผู้ทดสอบที่ให้คะแนนความพอดีจากวิธี just about right scale ของ ขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก (n=15).....	61
ตารางที่ 14 คุณภาพด้านสีและคุณภาพทางเคมีของขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติที่ไม่ผ่านการเสริม โพรไบโอติก และขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งในสภาวะเดียวกันที่นำมาทดสอบทางประสาท สัมผัส (n=5).....	62
ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงสีของขนุนอบแห้งชุดควบคุมด้วยวิธีต่างกันได้แก่วิธี AI , PVI และ UI ที่ อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส (n=2).....	74
ตารางที่ 16 ปริมาณความชื้น (%wet basis) และค่าออสโมลลิตี (a _w) ของขนุนอบแห้งชุด ควบคุมที่ใช้วิธี AI, PVI และ UI ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส (n=2).....	75
ตารางที่ 17 ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนและปริมาณยีสต์และราที่พบในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอ ติก (n=2).....	75



สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 บทบาทหลักของโพรไบโอติกที่มีต่อสุขภาพ ได้แก่การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร การเพิ่มสิ่งขัดขวาง และการปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน	7
ภาพที่ 2 Bifidobacterium.....	9
ภาพที่ 3 ลักษณะของ Lactic acid bacteria เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า ..	9
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครงสร้างในระดับจุลภาคที่ได้จากเครื่อง SEM ของแอปเปิลเสริมโพรไบโอติก	
ก) ตัวอย่าง PCD ที่ 100 เท่า ข) ตัวอย่าง PCD ที่ 5000 เท่า ค) ตัวอย่าง PVD ที่ 100 เท่า	
ง) ตัวอย่าง PVD ที่ 5000 เท่า	15
ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกที่จำหน่ายในปัจจุบัน	15
ภาพที่ 6 การเคลื่อนที่ของสารละลายในช่องว่างระหว่างเซลล์โดยกลไก HDM.....	21
ภาพที่ 7 ภาพแสดงกระบวนการ pulsed-vacuum impregnation (PVI).....	22
ภาพที่ 8 ลักษณะของตัวอย่างที่เตรียมด้วยการใช้อ่างอัลตราซาวด์ (ก) แอปเปิล และ (ข) มันฝรั่ง โดยใช้กำลังขยาย 100x และ 200x ตามลำดับ (ลูกศรแสดงจุดเกิดไมโครคาแนล).....	24
ภาพที่ 9 ร้อยละปริมาณแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> คงเหลือหลังจากให้ความถี่ของคลื่นอัลตราซาวด์ที่แตกต่างกันได้แก่ 20, 38, 512 และ 850 kHz (100% CFU คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น) .	24
ภาพที่ 10 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> (TBRC 388) ที่ใช้ในการศึกษา.....	27
ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายโพรไบโอติก.....	29
ภาพที่ 12 การเตรียมชั้นขนุนตัดแต่ง.....	32
ภาพที่ 13 วิธีการเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างขนุนที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น	35
ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ปริมาณ <i>L. casei</i> ในตัวอย่างชั้นขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธีที่แช่ในสารละลายโพรไบโอติก.....	37
ภาพที่ 15 การเตรียมชั้นขนุนในสารละลายโพรไบโอติก	38
ภาพที่ 16 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยความดันบรรยากาศโดยแช่ในสภาวะบรรยากาศที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส.....	38

ภาพที่ 17 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมที่สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์ที่ความดัน 0.02 MPa อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส.....	39
ภาพที่ 18 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในอ่างอัลตราซาวด์ 40	
ภาพที่ 19 การเรียงตัวอย่างขนุนเสริมโพรไบโอติกสำหรับการทำแห้งด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบภาคที่ อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส.....	41
ภาพที่ 20 บรรยายภาพการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ (9- point hedonic scale) และการคะแนนความพอดี (Just about right scale) นักศึกษาจากคณะ วิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์	45
ภาพที่ 21 ลักษณะของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. casei subsp. casei</i> ก) ลักษณะโคโลนี ข) รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียแลคติกเมื่อย้อมด้วยสีแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มี กำลังขยาย 40 เท่า.....	49
ภาพที่ 22 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยที่ ก) ขนุนอบแห้งธรรมชาติที่ไม่ผ่านการ เสริมโพรไบโอติก ข) ขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก.....	60



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

แนวโน้มการบริโภคในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าผู้บริโภคมีความใส่ใจในการดูแลสุขภาพมากขึ้น ตลาดอาหารเพื่อสุขภาพทั่วโลกมีมูลค่าถึง 1.1 ล้านล้านเหรียญสหรัฐฯ (ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2564) โดยผู้บริโภคให้ความสำคัญกับคุณค่าทางอาหารมากกว่ารสชาติและราคา (International food information council, 2020) และเน้นบริโภควัตถุดิบหรือผลผลิตทางการเกษตรที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อาหารเสริมโพรไบโอติกเป็นหนึ่งในอาหารเพื่อสุขภาพมีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยลดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านไวรัส COVID-19 เป็นต้น (Cerdó และคณะ, 2019; Singh และ Rao, 2021) ผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติก ได้แก่ โยเกิร์ต ไอศกรีม ชีส นม นมเปรี้ยวควมูมิส และคีเฟอร์ (Saarela, 2007) อย่างไรก็ตาม การบริโภคอาหารเสริมโพรไบโอติก ยังเป็นข้อจำกัดให้กับผู้บริโภคบางกลุ่ม เช่น ผู้ที่มีอาการภูมิแพ้หรือผู้ที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้เนื่องจากขาดเอนไซม์ย่อยแลคโตส (Schaafsma, 2008) ทำให้ผู้ผลิตในปัจจุบันพยายามผลิตผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกที่มีความหลากหลายมากขึ้น เช่น น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติก (Worku, Kurabachew และ Umar, 2021) และผลไม้อบแห้งเสริมโพรไบโอติก (Ribeiro และคณะ, 2014) เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้เสริมโพรไบโอติกได้แก่ จุลินทรีย์ในกลุ่ม *lactobacillus* และ *bifidobacterium* (Vinderola, Burns และ Reinheimer, 2017) โดยอาหารที่มีโพรไบโอติกต้องมีจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 6 logCFU/กรัม/มิลลิลิตร (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2561) การเสริมโพรไบโอติกในผลไม้อบแห้งยังเป็นเรื่องยาก เนื่องจากการคงอยู่ของโพรไบโอติกขึ้นอยู่กับ วิธีการแทรกซึม และ อุณหภูมิในการทำแห้ง (impregnation method) ส่วนมากเป็นผลไม้อบแห้งจากต่างประเทศ เช่น แอปเปิล (Valerio และคณะ, 2020)

เทคนิคการแทรกซึมโพรไบโอติกใส่ในผลไม้อบแห้งทำได้หลากหลายวิธี ได้แก่ วิธีการแทรกซึมในสภาวะบรรยากาศ (atmospheric impregnation) การแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศ (vacuum impregnation) และการแทรกซึมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (ultrasonic impregnation) วิธีการแทรกซึมในสภาวะบรรยากาศเป็นวิธีการที่ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ยุ่งยาก ตัวอย่างจะถูกแช่ในสารละลายในสภาวะบรรยากาศ อาจมีการกวนผสมให้เข้ากันในระยะเวลานึง (Oliveira และคณะ, 2017) การแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศอาศัยการพาสารละลายหรือสารแขวนลอยเข้าไปในตัวอย่างที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนด้วยการเกิดกลไกการไหลอุทกพลศาสตร์ (Hydrodynamic) (Fito และคณะ,

2000) การแทรกซึมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวิเทชัน (Cavitation effect) และเกิด sponge effect ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด micro scopic channel ในเนื้อเยื่อของผลไม้ (Tarleton, 1992; de la Fuente-Blanco และคณะ, 2006)

งานวิจัยผลไม้ตัดแต่งและผลไม้อบแห้งเสริมโพรไบโอติกได้แก่ การศึกษาของ Oliveira และคณะ (2017) ศึกษาการแทรกซึมโพรไบโอติก *L. acidophilus* LA-3 ในเมล่อนตัดแต่งด้วยวิธีการแทรกซึมโดยการแช่สภาวะบรรยากาศ (soaking) นาน 4 นาที และการแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศ (vacuum impregnation) ความดัน 500 mmHg นาน 2 นาที และความดันบรรยากาศนาน 2 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างในถุง PET ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน พบว่าในวันที่ 8 มีปริมาณ *L. acidophilus* LA-3 ของการแทรกซึมแบบ vacuum มากกว่าแบบแช่ เท่ากับ 8.61 และ 7.98 logCFU/กรัม ตามลำดับ

ขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) เป็นไม้ผลที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2564) รายงานว่าในปี 2563 มีการส่งออกขนุนสด 49,006 ตัน คิดเป็นมูลค่า 629 ล้านบาท ตลาดส่งออกสำคัญ ได้แก่ จีน เวียดนาม เมียนมา และ ลาว องค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อขนุนได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน แคลเซียม โพแทสเซียม เหล็ก และโซเดียม เป็นต้น (Swami และคณะ, 2012) อีกทั้งยังประกอบไปด้วยแคโรทีนอยด์ (Chandrika, Jansz และ Warnasuriya, 2005) อย่างไรก็ตามการแปรรูปขนุนยังเป็นที่น่าสนใจเนื่องจากขนุนสดมีราคาถูก อีกทั้งการแกะรับประทานทำได้ยากเพราะผลมีขนาดใหญ่ ประกอบไปด้วยซังและยางเป็นจำนวนมาก จึงทำให้ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมรับประทานขนุนที่ผ่านกระบวนการตัดแต่งและแปรรูปมากกว่า เนื้อขนุนเป็นผลไม้ที่ทำหายในการแทรกซึมโพรไบโอติกเนื่องจากมีรูพรุนน้อย ค่า firmness เท่ากับ 44 (Saxena, Bawa และ Srinivas Raju, 2008) เพราะฉะนั้นจึงต้องใช้วิธีการแทรกซึมที่สามารถเปิดรูพรุนของเนื้อเยื่อขนุนให้มากขึ้นเพื่อให้โพรไบโอติกสามารถแทรกซึมได้มากขึ้น แทนที่จะเกาะอยู่แค่ที่พื้นผิว จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณโพรไบโอติกคงเหลือมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก คุณภาพและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 วิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ ที่สภาวะบรรยากาศ สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์ และการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ที่ระยะเวลาต่างๆ ส่งผลต่อปริมาณ *L. casei* และ

ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก โดยการใช้ระยะเวลาแทรกซึมนานทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์คงอยู่มากที่สุด

1.3.2 อุณหภูมิมีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ การใช้อุณหภูมิสูงในการทำแห้งอาจทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ

1.3.3 วิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกทำให้ตัวอย่างมีปริมาณ *L. casei* อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการทดลองคือเนื้อขนุนพันธุ์สีทองจากร้านค้าในจังหวัดนครปฐม ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 23.5 - 24.5 °Brix ควบคุมขนาดของตัวอย่างก่อนทำแห้งให้มีขนาด (กว้าง × ยาว × หนา) เท่ากับ 20 × 40 × 5 มิลลิเมตร

1.4.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) คือ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ที่ได้รับรองว่ามีความสามารถเป็นโพรไบโอติกจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ก่อนการใช้ต้องนำมาละลายในสารละลาย rehydration fluid

1.4.3 ทำการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนเริ่มต้นในชั้นขนุนสด 2 วิธี ได้แก่ 1) การแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที และลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน และปริมาณยีสต์และรา

1.4.4 ทำการแช่ขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อจาก 2 วิธีในสารละลายโพรไบโอติก กวนที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ในชั้นขนุน

1.4.5 คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมีของขนุนสดทำการศึกษา ได้แก่ ภาพถ่าย ค่าสี ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids, TSS) ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity; TA), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ปริมาณความชื้น (moisture content) และค่าวอเตอร์แอกติวิตี (water activity; a_w)

1.4.6 การแทรกซึมโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วย 3 วิธี ได้แก่

1.4.6.1 วิธีการแทรกซึมที่ความดันบรรยากาศ (Atmospheric impregnation; AI) โดยนำชั้นขนุนที่แช่สารละลายโพรไบโอติก มาวางที่ความดันบรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15, 30, 45, และ 60 นาที

1.4.6.2 วิธีการแทรกซึมที่สภาวะสูญญากาศแบบพัลส์ (Pause-Vacuum impregnation; PVI) โดยนำชั้นขนุนที่แช่สารละลายโพรไบโอติก มาวางในตู้อบความร้อนสูญญากาศ (Vacuum

Oven) ที่ความดัน 0.02 MPa จับเวลา 10 นาที สลับกับความดันบรรยากาศ 5 นาที จนครบเวลา 15, 30, 45, และ 60 นาที

1.4.6.3 วิธีการแทรกซึมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (Ultrasonic impregnation; UI) นำขุ่นที่แช่สารละลายโพรไบโอติก วางในอ่างอัลตราซาวด์ที่สร้างคลื่นความถี่ 37 kHz เป็นเวลา 15, 30, 45, และ 60 นาที

1.4.7 วิธีการทำแห้งที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือ การทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งขึ้นขุ่นมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.65

1.4.8 การวัดปริมาณ *L. casei* ใช้วิธีการนับจำนวนโคโลนีที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายต้องมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่ต่ำกว่า 6 logCFU/กรัม (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2561) มีปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนไม่เกิน 10^6 CFU/กรัม และปริมาณยีสต์และราไม่เกิน 10^3 CFU/กรัม

1.4.9 คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมีของขุ่นอบแห้งเสริมโพรไบโอติกได้แก่ค่าสี ปริมาณความชื้น (moisture content) และค่าวอเตอร์แอกติวิตี (water activity; a_w)

1.4.10. การทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสขุ่นอบแห้งที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติก โดยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ (9-point hedonic scale) และให้คะแนนความพอดี (just about right scale) ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนด้านการทดสอบชิมจำนวน 15 คน



บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 โพรไบโอติก

ในอุตสาหกรรมอาหารนิยามคำว่าโพรไบโอติกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในส่วนผสมของอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ต้องปลอดภัยและมีปริมาณเพียงพอต่อร่างกาย (FAO/WHO, 2002) ช่วยรักษาสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหาร (Amara และ Shibl, 2015) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารเพื่อปรับสมดุลแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของมนุษย์ (Cerdó และคณะ, 2019) สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาปี 2561 ประกาศหลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารว่าปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 6 logCFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการอยู่รอดเป็นเวลานานเพื่อรักษาบทบาทในกระบวนการทางอุตสาหกรรม

แม้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดและหลายสายพันธุ์จะเรียกว่าโพรไบโอติก แต่ส่วนใหญ่แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในอาหารมักจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติก (LAB) ได้แก่ *Lactobacillus spp.* และ *Bifidobacterium spp.* (Tham และคณะ, 2012)

2.1.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ให้ดีขึ้น ดังนั้นโพรไบโอติกที่จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารจะต้องทนต่อสภาวะที่รุนแรงทางส่วนบนและส่วนล่างของระบบได้ จึงต้องมีคุณสมบัติดังนี้

2.1.1.1 ความสามารถในการทนกรด

จุลินทรีย์ที่พบในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นค่อนข้างมีปริมาณต่ำ ($10^3 - 10^5$ bacteria/มิลลิลิตร) เนื่องจากมี pH ต่ำ ในขณะที่ลำไส้เล็กส่วนปลายมีปริมาณจุลินทรีย์ที่หลากหลายและสูงกว่า (10^8 bacteria/มิลลิลิตร) และในลำไส้ใหญ่มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด ($10^{10} - 10^{11}$ bacteria/มิลลิลิตร) (Mackie, Sghir และ Gaskins, 1999) ระบบย่อยอาหารของมนุษย์มี pH อยู่ในช่วง 1.5 ถึง 4.5 ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ได้รับประทานอาหาร แบคทีเรียจะเหลือรอดมากขึ้นถ้าภายในกระเพาะมีอาหาร เนื่องจากอาหารสามารถช่วยป้องกันแบคทีเรียโพรไบโอติกจากฤทธิ์ของเปปซินและกรดในกระเพาะอาหาร (Lin และคณะ, 2006) เมื่อโพรไบโอติกอยู่ในสภาวะ pH เท่ากับ 1.5 และ 3.0 จะมีปริมาณลดลง ในขณะที่ pH 7.0 ยังคงมีปริมาณเท่าเดิม (Sahadeva และคณะ, 2011)

L. paracasei มีความต้านทานต่อกรดในกระเพาะอาหารต่ำกว่าในลำไส้ (ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น 10^{10} CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ pH 3 พบว่าลดลงเหลือมากกว่า 10^7 CFU/มิลลิลิตร (Mishra และ Prasad, 2005)

2.1.1.2 ความสามารถในการทนเกลือ น้ำดี

น้ำดีมีอิทธิพลอย่างมากต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของน้ำดีที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในมนุษย์คือ 0.15% ถึง 0.3% (Goldin และ Gorbach, 1992)

2.1.1.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

โดยการสร้างกรดแลคติกกรดไขมันสายสั้นๆ ทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ (Markowiak-Kopeć และ slizewska, 2020)

2.1.1.4 ความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์

โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน (gammaglobulin) เพิ่มกิจกรรมฟาโกไซติก (phagocytic) ของแกรนูโลไซต์ (granulocytes) และกระตุ้น cytokine-activated monocytes และแมคโครฟาจ ทำให้สามารถปลดปล่อยสารพิษทำลายเชื้อโรค (Nagpal และคณะ, 2012)

2.1.2 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

กลไกการทำงานของโพรไบโอติกมีหลายกระบวนการรวมกันแสดงดังนี้

2.1.2.1 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Antimicrobial activity)

โพรไบโอติกสามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้แก่ แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ และกรดไขมันสายสั้น (Li และ Gu, 2018) โดยแบคเทอริโอซินสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และ DNA ของแบคทีเรีย และยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ทำให้จุลินทรีย์แปลกปลอมตายในที่สุด (Todorov และคณะ, 2011)

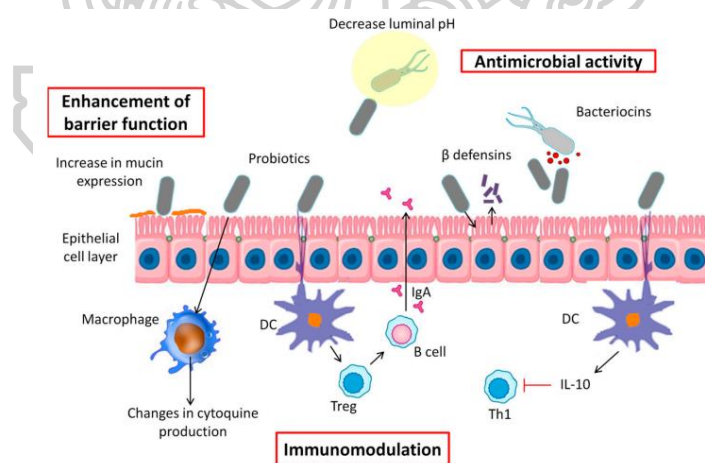
L. reuteri สามารถผลิตสารรูเทอรินในภาวะไม่ใช้ออกซิเจนและมีกลูโคส เมื่อสัมผัสกับเซลล์เป้าหมาย *L. reuteri* จะผลิตสารรูเทอรินมาเพื่อกำจัดแบคทีเรีย และไวรัส (Mu, Tavella และ Luo, 2018)

2.1.2.2 การเพิ่มสิ่งขัดขวาง (Barrier function)

โดยการสร้างสิ่งขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์แปลกปลอมโดยอาศัยกระบวนการได้แก่ การเพิ่มการผลิตน้ำเมือก (Mucus) ในระบบทางเดินอาหาร (Ng และคณะ, 2009)

2.1.2.3 การสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation)

โพรไบโอติกสามารถเพิ่มสัดส่วนของ CD69+ ในลิมโฟไซต์ T cells และ NK cells และเพิ่มสัดส่วนของ CD25+ ในลิมโฟไซต์และ NK cells (Dong, Rowland และ Yaqoob, 2012) จากการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อโรคหอบหืดโดยให้ *L. bulgaricus* N45.10 (ปริมาณ 1×10^9 CFU/0.2 มิลลิลิตร/ตัว/สามครั้ง/สัปดาห์) แก่หนูพบว่าสามารถลดการหลั่ง eosinophils เมือกและคอลลาเจน ลดการผลิต IgE ลดการหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Anatriello และคณะ, 2019) จากการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อ SARS-CoV-2 โดยแบ่งกลุ่มโพรไบโอติกสองชนิด คือ OL-1 และ OL-2 ให้แก่พังพอนที่มีเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 และประเมินผลต่อการผลิตไซโตไคน์และการถอดรหัสในมาโครฟาจ พบว่า OL-1 และ OL-2 สามารถกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์และยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันต้านไวรัส SARS-CoV-2 (Lehtinen และคณะ, 2022)



ภาพที่ 1 บทบาทหลักของโพรไบโอติกที่มีต่อสุขภาพ ได้แก่การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร การเพิ่มสิ่งขัดขวาง และการปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน
ที่มา: Cerdó และคณะ (2019)

2.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโพรไบโอติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งได้แก่ *Lactobacilli*, และ *Bifidobacterium* (Parracho, McCartney และ Gibson, 2007) สำหรับแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำมาใช้ในอาหารโดยทั่วไป ได้แก่ จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ดังแสดงในตารางที่ 1

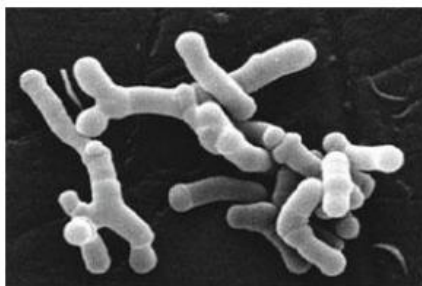
ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei (rhamnosus)</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. lactis</i>	

ที่มา: Alvarez-Olmos และ Oberhelman (2001)

2.1.3.1 บีฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacterium)

บีฟิโดแบคทีเรีย ลักษณะเป็นรูปแท่งคล้ายตัวอักษรวาย (bifid rod) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ย้อมติดสีแกรมบวก ดังแสดงในภาพที่ 2 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดซิตริกและกรดแลคติก ไม่ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Hoover, 2014) อีกทั้งยังผลิตเอนไซม์ β -galactosidase ย่อยน้ำตาลแลคโตสทำให้ร่างกายสามารถนำแลคโตสไปใช้ได้โดยไม่ก่อให้เกิดอาการ lactose intolerance (Hung และคณะ, 2001)

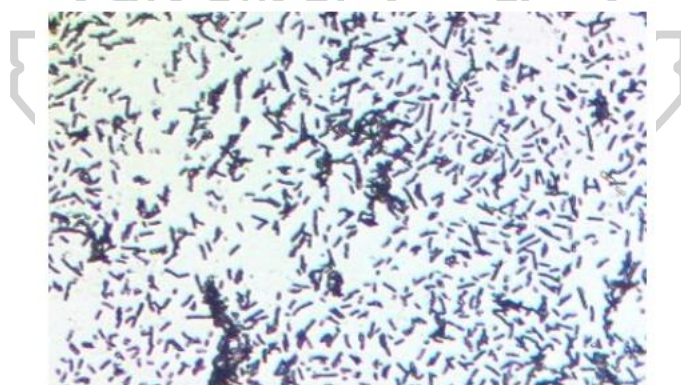


ภาพที่ 2 Bifidobacterium

ที่มา: Schell และคณะ (2002)

2.1.3.2 แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ (Narvhus และ Axelsson, 2003) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Stiles และ Holzapfel, 1997) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้อยู่ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไข่กรอกหมัก (Munekata และคณะ, 2021) และผลิตภัณฑ์นมหมัก (Mahmoudi และคณะ, 2015)

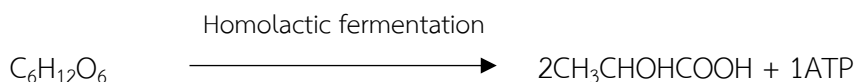


ภาพที่ 3 ลักษณะของ Lactic acid bacteria เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า

ที่มา: De และคณะ (2017)

กระบวนการหมักที่เกิดจาก lactic acid bacteria มี 2 กระบวนการ คือ

1) Homolactic fermentation เป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (Mokoena, 2017)



2) Heterolactic fermentation เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติกได้เพียง 50% เท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Mokoena, 2017)



2.1.3.3 *Lactobacillus casei*

L. casei มีลักษณะเป็นแท่ง ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก มีขนาด 0.7–1.1 × 2.0–4.0 ไมครอน (Gobbetti และ Minervini, 2014) *L. casei* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม facultative heterofermentative (“Group II”) ผลิตกรดแลคติกผ่านทางวิถี Embden-Meyerhof และจากเพนโทสโดยวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase (Nissen, Pérez-Martínez และ Yebra, 2005) *L. casei* สามารถทน pH ได้ถึง 3 (Mishra และ Prasad, 2005) ส่วนใหญ่จะนำมาประยุกต์ในอาหารวัฒนธรรมแต่ละชาติ เช่น kefir ve Laban Zeer ชีสเช่น provolone และ Parmesan (Yerlikaya, 2014)

การศึกษาประโยชน์ของกลุ่ม *L. casei* ในระดับ vivo และ vitro ได้แก่ การทดสอบในหลอดทดลองพบว่าการเติม *L. casei*-01 ลงในไอศกรีม (9 logCFU/มิลลิลิตร) สามารถช่วยเพิ่มการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เป็นประโยชน์ต่อแบบจำลองลำไส้ของมนุษย์ เช่น โพรพิโอเนต อะซิเตท กรดแลคติก บิวทิเรต และลดปริมาณแอมโมเนียที่เป็นพิษ นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย ได้แก่ clostridium และ fecal coliforms โดยผลที่ได้ดีกว่า *L. acidophilus* La-5 อีกทั้งยังผลิตสารต้านแบคทีเรีย ได้แก่ กรดอินทรีย์ กรดไขมัน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Chaikham และคณะ, 2013) จากการศึกษาการบริโภคน้ำ Minas Frescal ที่เสริม *L. casei*-01 (50 กรัมเป็นเวลา 28 วัน ปริมาณ 8.32 logCFU/กรัม) สามารถปรับปรุงระดับไขมัน ความดันโลหิต และพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาของผู้หญิงที่มีน้ำหนักเกินและมีความดันโลหิตสูง คอเลสเตรอลและระดับ low-density

lipoprotein-cholesterol ลดลง อีกทั้งทำให้ระดับ high-density lipoprotein-cholesterol เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้หญิงที่รับประทานชีส Minas Frescal ที่ไม่เสริมโพรไบโอติก (Sperry และคณะ, 2018) การเพิ่ม *L. casei*-01 ลงในผลิตภัณฑ์อาหารส่งผลให้ความเครียดออกซิเดชันลดลง โดยศึกษาการบริโภค prato cheese ที่มีโพรไบโอติก (50 กรัมเป็นเวลา 5 วัน ปริมาณ $9.33 \log\text{CFU/กรัม}$) ต่อความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและการอักเสบในหนูเพศผู้ C57BL/6 โดยการสัมผัสกับควันทูริ จากการทดลองพบว่าหนูที่กิน prato cheese ที่มีโพรไบโอติก ผลของเม็ดเลือดขาวและกระบวนการ lipid peroxidation ในหลอดเลือดและลำไส้ น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่กินชีสที่ไม่เสริมโพรไบโอติก ผลของหนูที่สัมผัสควันทูริและกิน prato cheese ที่มีโพรไบโอติก นั้นคล้ายกับหนูที่ไม่ได้สัมผัสกับควันทูริซึ่งแสดงให้เห็นว่าการรับประทานโพรไบโอติก สามารถช่วยลดการเกิดความเครียดของออกซิเดชันในลำไส้ ตับ และปอด (Vasconcelos และคณะ, 2019)

2.1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความคงอยู่ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

2.1.4.1. อุณหภูมิ

Lactic acid bacteria ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม mesophilic bacterium อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส (Wang, Corrieu และ Béal, 2005) ความใกล้ชิด (affinity) จะลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการแข่งตัวของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการขนส่งโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง อีกทั้งยังทำให้จุลินทรีย์ที่กำลังเติบโตไม่สามารถแยกสารตั้งต้นภายในสภาพแวดล้อมได้ส่งผลให้เกิดสภาวะอดอาหารรุนแรงขึ้น (Goyal และคณะ, 2022) Dijkstra และคณะ (2014) รายงานว่า *Lactococcus lactis* ที่เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นมียื่นแสดงเพิ่มความเครียดเพิ่มขึ้น

2.1.4.2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่า pH เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อความมีชีวิตของโพรไบโอติกโดยส่งผลต่อเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียได้หลากหลายทาง ประการแรกจะส่งผลต่อสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ ค่า pH เป็นกิจกรรมทางเคมีของโปรตอนซึ่งเป็นส่วนสำคัญในปฏิกิริยารีดอกซ์ การละลายและการตกตะกอนของแร่ธาตุ ปฏิกิริยารีดอกซ์จำนวนมากจะผลิตหรือใช้โปรตอน ดังนั้นพลังงานอิสระที่ได้จึงแปรผันตาม pH (Bethke และคณะ, 2011) pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6.0 – 6.5 (Panesar และคณะ, 2010) จากการศึกษาของ Nualkaekul, Salmeron และ Charalampopoulos (2011) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium longum* ในสารละลายตัวอย่างและในน้ำผลไม้ (ส้ม เกรปฟรุต

แบล็คเคอแรนท์ สับปะรด ทับทิม และสตอเบอร์รี่) หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าน้ำส้ม เกรปฟรุต แบล็คเคอแรนท์ และสับปะรด มีไบโอดีแบคทีเรียลดลงไป 0.8 logCFU/มิลลิลิตร

2.1.5 ผลข้างเคียงหรือโอกาสที่อาจส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยในการใช้โพรไบโอติก

การบริโภคโพรไบโอติกเป็นประจำนั้น ถ้าโพรไบโอติกมีปริมาณมากเกินไปพื้นที่ที่จะสามารถยึดเกาะอยู่ได้ก็จะถูกขับออกไปทางระบบทางเดินอาหารและขับออกสู่ร่างกายได้โดยไม่ก่อให้เกิดอันตราย แต่อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงในการบริโภคโพรไบโอติกสามารถเกิดขึ้นได้ส่วนใหญ่มักพบในผู้ป่วยที่มีปัญหาของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย หรือเกิดจากการรับประทานยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น โดยผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นได้มีดังนี้ การติดเชื้อทางระบบทั่วไป (systemic infection) การเสื่อมของเมแทบอลิซึม (deleterious metabolic activity) และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงเกินในผู้ที่มีปัญหาภูมิคุ้มกันไวเกิน (excessive immune stimulation in susceptible individual) (Kothari, Patel, และ Kim, 2019)

2.2 การใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

2.2.1 ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโพรไบโอติกที่ได้จากนม

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมคือผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตได้ผ่านการหมักแลคโตสโดยจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ (Özer และ Kimaci, 2010) ผลิตภัณฑ์จากนมหมัก (fermented milk) ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และเนยแข็ง เป็นต้น (Araújo และคณะ, 2012) โดยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีรายงานความสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ แลคโตบาซิลลัส โบริโดแบคทีเรียม และ สเตรปโตคอคคัส ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับเป็นอาหารมนุษย์

สายพันธุ์	ผลิตภัณฑ์	ประเทศ
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>lactis</i> ,	aetmjolk	Scandinavian
<i>Lactococcus lactis</i> susp. <i>biovar</i>	Fimljolk	Scandinavian
<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Yoghurt	หลายประเทศ
<i>B. bifidum</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Laban ve	Egypt
<i>S. thermophilus</i>	Zabadi	Japan
<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i>	Skyr	Japan
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> ,	Aco-yoghurt	Switzerland
<i>S. thermophilus</i>	Acidophilous milk	หลายประเทศ
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> ,	AB-yoghurt	Germany
<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Biogarde	Germany

ที่มา: (Yerlikaya, 2014)

2.2.2 เครื่องดื่มโพรไบโอติกจากผักและผลไม้

เครื่องดื่มโพรไบโอติกจากพืช (plant probiotic beverages) เป็นการนำวัตถุดิบจากพืชข้าว ข้าวโพด ผัก มาสกัดและเติมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการหมัก ในปัจจุบันจึงมีการวิจัยและพัฒนา ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากผักและผลไม้ได้แก่ การศึกษาการนำหัวผักกาดแดงมาผลิตเครื่องดื่ม โพรไบโอติก โดยใช้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า *L. acidophilus* และ *L. plantarum* สามารถหมักน้ำหัวผักกาดแดง และสร้างกรดแลคติกได้เร็วที่สุด และทำให้ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.5 จากเริ่มต้น 6.3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพียง 48 ชั่วโมง (Yoon, Woodams และ Hang, 2005) ประเทศเดนมาร์กได้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ Vita Biosa ซึ่งเกิดจากการผสมสมุนไพรมีกลิ่นหอม กับพืชชนิดอื่น ไม่มีน้ำตาล ไม่เติมคาร์บอนไดออกไซด์ หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ เครื่องดื่มดังกล่าวพบว่ามีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระสูง จึงทำให้เครื่องดื่มโพรไบโอติกชนิดนี้ได้รับความสนใจ และให้การยอมรับว่ามีส่วนช่วยในการปรับสมดุลในระบบย่อยอาหารให้เป็นปกติ (Prado และคณะ, 2008)

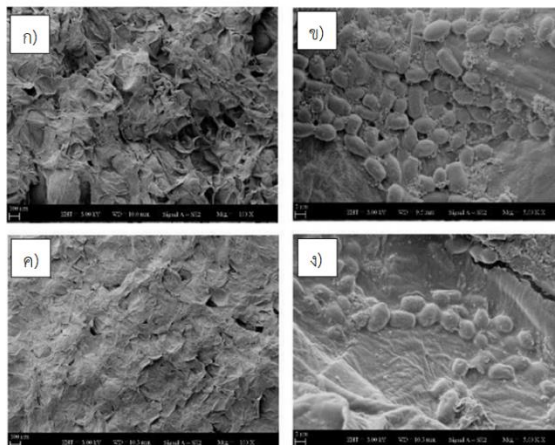
2.2.3 ธัญชาติ

ธัญชาติเป็นแหล่งสารอาหารให้กับเชื้อจุลินทรีย์ ประกอบไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่ และเส้นใย (Sharma และ Mishra, 2013) การศึกษาการผลิตเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมจากข้าวโอ๊ต ธัญพืชไม่ขัดสี และข้าวบาร์เลย์หมักด้วย *L. plantarum* B28 เป็นเวลา 8 ชั่วโมงพบว่า ชนิดของน้ำตาลไม่มีผลต่อกระบวนการหมักและการมีชีวิตรอดของเชื้อระหว่างการเก็บรักษา ผลลัพธ์พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณโพรไบโอติกอยู่ประมาณ 7.5×10^{10} CFU/ มิลลิลิตร และเก็บในตู้เย็นได้ประมาณ 21 วัน (Angelov และคณะ, 2006)

2.2.5 ผลไม้อบแห้ง

นอกจากการประยุกต์โพรไบโอติกในน้ำผลไม้แล้วยังมีงานวิจัยที่ใช้เสริมโพรไบโอติกกับผลไม้อบแห้งเช่น Betoret และคณะ (2003) ศึกษาแอปเปิลเสริม *L. casei* และทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วย air dryer เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 เดือน พบว่ายังมีจุลินทรีย์มีชีวิตคงเหลือมากกว่า 10^6 CFU/g การศึกษาของ Rößle และคณะ (2010) ศึกษาการเคลือบแอปเปิลด้วย *L. rhamnosus* GG เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส นาน 10 วันพบว่ายังคงมีปริมาณโพรไบโอติกมากกว่า 10^8 CFU/กรัม เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 10 วัน นอกจากนี้ Emser และคณะ (2017) ศึกษาขึ้นแอปเปิลที่เคลือบด้วย *L. plantarum* เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน พบว่าไม่มีปริมาณแบคทีเรียลดลงในตัวอย่างเมื่อใช้สารละลายซอร์บิทอล แต่ในตัวอย่างแอปเปิลที่ใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส 40 °Brix และ 60 °Brix มีปริมาณแบคทีเรียลดลง 0.8 log unit และ 0.7 log unit ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 วัน การศึกษาของ Cui และคณะ (2018) ได้ศึกษาการทำแห้งด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ air drying, freeze drying, freeze drying + microwave vacuum drying และ air drying + explosion puffing drying พบว่าการทำแห้งขึ้นแอปเปิลพันธุ์ Fuji ด้วยวิธี freeze drying + microwave vacuum drying เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการช่วยรักษาคุณภาพด้านสี เนื้อสัมผัส รสชาติ รวมถึงความมีชีวิตรอดของ *L. plantarum* SICC 1.376 ได้ การศึกษาของ Rodrigues และคณะ (2018) ศึกษาการทำแห้งแอปเปิลพันธุ์ Granny Smith โดยวิธี air drying ที่อุณหภูมิ 10 - 60 องศาเซลเซียสรวมกับการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ พบว่าขึ้นแอปเปิลที่ผ่านการทำแห้งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสมีปริมาณ *L. casei* NRRL 442 มากกว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Akman และคณะ (2018) ได้ศึกษาแอปเปิลเสริมโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* ที่นำไปทำแห้งด้วยวิธี Convectional drying (PCD) และ Vacuum

drying (PVD) นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อดูลักษณะและการยึดเกาะของโพรไบโอติกกับแอปเปิลดั่งแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายโครงสร้างในระดับจุลภาคที่ได้จากเครื่อง SEM ของแอปเปิลเสริมโพรไบโอติก
 ก) ตัวอย่าง PCD ที่ 100 เท่า ข) ตัวอย่าง PCD ที่ 5000 เท่า ค) ตัวอย่าง PVD ที่ 100 เท่า
 ง) ตัวอย่าง PVD ที่ 5000 เท่า
 ที่มา: Akman และคณะ (2018)

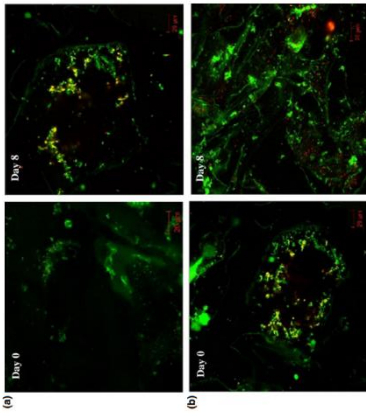
ในปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกในรูปผลิตภัณฑ์ผลไม้บ่มแห้งดังแสดงในตารางที่ 3 ในประเทศไทยมีการผลิตน้ำผลไม้เสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ยี่ห้อมาลี ในต่างประเทศมีผลิตภัณฑ์ยี่ห้อ Good Belly ซึ่งผลิตจาก *L.plantarum* 299v ดังแสดงในภาพที่ 5



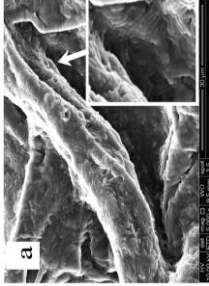
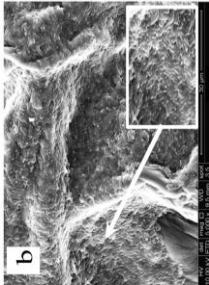
ภาพที่ 5 ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกที่จำหน่ายในปัจจุบัน

ที่มา : www.malee.com, www.goodcelly.com (เข้าถึงเมื่อ 13 พฤษภาคม 2565)

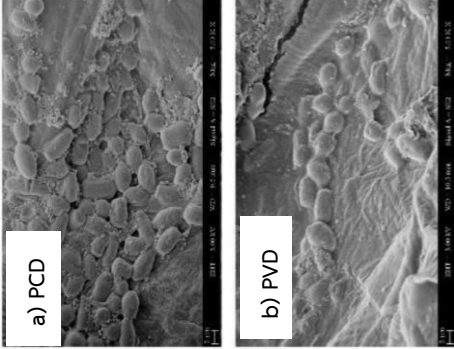
ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปเสริมโพรไบโอติก

ตัวอย่าง	ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการแทรกซึมโพรไบโอติก	ปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกคงเหลือ (logCFU/กรัม)	อ้างอิง
Minimally processed melon	<i>L. acidophilus</i> LA-3	<p>วิธีได้แก่</p> <p>1. การแช่ในสภาวะบรรยากาศ (soaking) โดยจะแช่ในสารละลายเชื้อเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำมาวางทิ้งไว้ 1 นาที</p> <p>2. การแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศ (vacuum impregnation) โดยแช่สารละลายเชื้อและลดความดันเหลือ 500 mmHg เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นกลับคืนความดันสู่สภาวะบรรยากาศนาน 2 นาที</p> <p>จากนั้นนำตัวอย่างเก็บในถุง PET และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 8 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณโพรไบโอติก และทุกๆ 2 วัน</p>	<p>ปริมาณโพรไบโอติกหลังจากแช่ 2 วิธีในวันที่ 0 ได้แก่ 9.9 และ 9.6 logCFU/กรัม ของการแช่แบบ vacuum และ soaking ตามลำดับ แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 8 วันพบว่าปริมาณโพรไบโอติกลดลงเหลือ 8.61 และ 7.98 ของการแช่แบบ vacuum และ soaking ตามลำดับ</p> 	Oliveira และคณะ (2017)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยผลิตภัณฑ์ผลไม้แบบแห้งเสริมโพรไบโอติก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการแทรกซึมโพรไบโอติก	ปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกคงเหลือ (logCFU/กรัม)	อ้างอิง
Apple slices	<i>L. paracasei</i> IMPC2.1	<p>ใช้ในสารละลายเชื้อปริมาณ 1.5×10^9 cfu/ml อัตราส่วนแอปเปิ้ลต่อสารละลายคือ 1:1.5 (w/v) แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. การแช่ในสภาวะบรรยากาศ (soaking) โดยจะแช่ในสารละลายเชื้อเป็นเวลา 60 นาที และกวนเบาๆ (150 rpm) ที่อุณหภูมิห้อง (22 องศาเซลเซียส) 2. การแทรกซึมในสภาวะสูญากาศ (vacuum impregnation) โดยลดความดันเป็น 50 mbar นาน 20 นาที จากนั้นกลับคืนความดันสู่สภาวะบรรยากาศนาน 10 นาที <p>จากนั้นนำตัวอย่างเก็บใส่ถุง polyethylene ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณโพรไบโอติก</p>	<p>ปริมาณโพรไบโอติกหลังจากแช่ 2 วิธีในวันที่ 0 ได้แก่ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วันพบว่าปริมาณโพรไบโอติกลดลงเหลือ 6.9 logCFU/กรัม เท่ากันทั้งสองวิธี</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">Vacuum impregnation soaking</p>	Valerio และคณะ (2020)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างงานวิจัยผลิตภัณฑ์ผลไม้อบแห้งเสริมโปรไบโอติก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ชนิดของจุลินทรีย์	วิธีการแทรกซึมโปรไบโอติกและการทำแห้ง	ปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกคงเหลือ (logCFU/กรัม)	อ้างอิง
Dried apples	<i>L. paracasei</i>	<p>วิธีในการแทรกซึมโปรไบโอติกและการทำแห้ง</p> <p>แช่ในสารละลายเชื้อปริมาณ 10^{10} cfu/ml อัตราส่วน แอปเปิ้ลต่อสารละลายคือ 1:5 (w/v) แช่และกวนเบาๆ เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำขึ้นบนชั้นมาวางทิ้งไว้นาน 20 นาทีจากนั้นนำไปทำแห้ง 2 วิธีได้แก่</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Vacuum drying โดยใช้ความดัน 6 kPa และความเร็วลม 2 L/s ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง 2. Convectional drying โดยใช้ความเร็วลม 1.3 mb/s ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง <p>จากนั้นเก็บในถุง LDPE นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรไบโอติก</p>	<p>ปริมาณโปรไบโอติกหลังการทำแห้ง 2 วิธีในวันที่ 0 ได้แก่ 7.99 และ 7.42 logCFU/กรัม ของการทำแห้งด้วยวิธี Convectional drying และ Vacuum drying ตามลำดับ</p> 	Akman และคณะ (2019)

2.3 ขนุน

ขนุน (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดใหญ่ ลำต้นสูงประมาณ 10-25 เมตร ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกสภาพพื้นที่ของประเทศไทย โดยสายพันธุ์ขนุนต่างๆ ในประเทศไทยมีจำนวนหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ ทองสุตใจ จำปากรอบ ทองประเสริฐ เจริญทอง และเหลืองพิชัย เป็นต้น ดินที่ปลูกควรมีค่า pH ไม่ต่ำกว่า 5.5 และ ไม่เกิน 7.5 พื้นที่ที่มีการปลูกขนุนกันมากได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ขนุนที่ปลูกกันโดยทั่วไปมีอยู่ 2 ประเภท คือ ขนุนหนังและขนุนละมุด แต่ที่นิยมปลูกกันในปัจจุบันเป็นพันธุ์ขนุนหนัง เมื่อผลสุกจะมีลักษณะเนื้อแน่น กรอบ ไม่เละ สามารถแกะเนื้อออกเป็นยวง ๆ และเอาเมล็ดตอกได้ (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2562) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2564) รายงานว่ามีการส่งออกขนุนสด 49,006 ตัน คิดเป็นมูลค่า 629 ล้านบาท ตลาดส่งออกสำคัญ ได้แก่ จีน เวียดนาม เมียนมา และ ลาว

จากการศึกษาส่วนประกอบที่มีอยู่ในเนื้อขนุนพบว่ามีสารอาหารที่เป็นประโยชน์หลายชนิดด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 4 น้ำตาลหลักที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส และวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น วิตามินเอ ไบโอฟลาเวิน แคลเซียม โซเดียม และไนอาซินรวมทั้งมีกรดอะมิโนอีกหลายชนิด (Swami และคณะ, 2012) นอกจากนี้ขนุนยังมีแคโรทีนอยด์จำนวนมากโดยอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์ที่พบในเนื้อขนุนสุกมากที่สุดคือ ลูทีน เบต้าแคโรทีน และนีโอแซนทีน (Faria, De Rosso และ Mercadante, 2009) ขนุนมีปริมาณแคลอรีต่ำ ขนุน 100 กรัมให้พลังงานเพียง 94 แคลอรี เนื้อขนุนสุกทุกๆ 100 กรัมประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 18.9 กรัม โปรตีน 1.9 กรัม ไขมัน 0.1 กรัม ความชื้น 77% เส้นใย 1.1 กรัม แร่ธาตุรวม 0.8 กรัม แคลเซียม 20 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 30 มิลลิกรัม ธาตุเหล็ก 500 มิลลิกรัม วิตามินเอ 540 I.U. วิตามินบี 30 มิลลิกรัม และ 84 แคลอรี (Swami และคณะ, 2012) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในขนุนเท่ากับ 0.36 mg GAE/100gDW (Ranasinghe, Maduwanthi และ Marapana, 2019)

การศึกษาของ Kaushal และ Sharma (2014) ศึกษาการทำแห้งเนื้อขนุนด้วยวิธีออสโมซิส โดยแช่ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่างๆ และนำไปทำแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนุนที่เตรียมด้วยความเข้มข้นของสารละลายเกลือ 15% และทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ววงที่ 1.5 เมตร/วินาที มีการยอมรับดีที่สุด และการศึกษาของ Gan และ Poh (2014) รายงานว่าจลนพลศาสตร์การทำแห้ง

แบบลมร้อนของชิ้นขนุนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำแห้งมากกว่าที่ 40, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อขนุนสุก (100 กรัมเนื้อขนุน)

ส่วนประกอบ	เนื้อขนุนสุก
คาร์โบไฮเดรต (กรัม/100 กรัม)	16.0 – 25.4
โปรตีน (กรัม/100 กรัม)	1.2 – 1.9
ไขมัน (กรัม/100 กรัม)	0.1 – 0.4
เส้นใย (กรัม/100 กรัม)	1.0 – 1.5
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	191.0 – 407.0
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/100 กรัม)	38.0 – 41.0
แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	20.0 – 37.0
เหล็ก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.50 – 1.10
วิตามินเอ (IU/100 กรัม)	175.0 – 540.0
วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม)	7.0 – 10.0

ที่มา: Swami และคณะ, (2012)

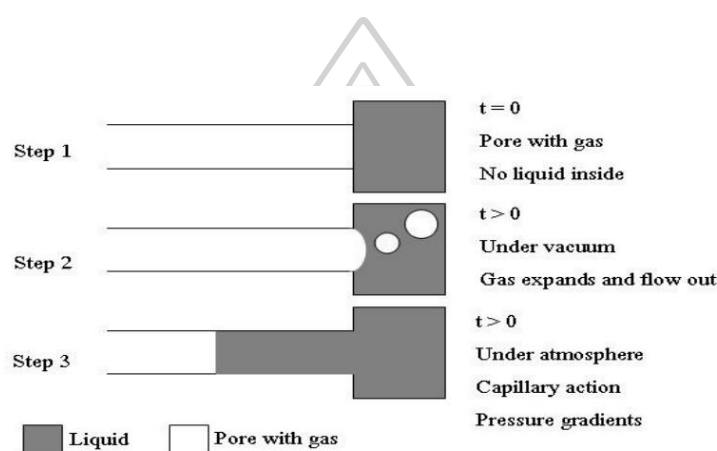
2.4 การแทรกซึมโพรไปโอดิกด้วยวิธี vacuum impregnation

การแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศเป็นวิธีที่พาสารละลายหรือสารแขวนลอยเข้าไปในตัวอย่างที่มีโครงสร้างเป็นรูพรุนด้วยการเกิดกลไก Hydrodynamic (HDM) ผักและผลไม้ประกอบไปด้วยช่องว่างระหว่างเซลล์ที่เต็มไปด้วยแก๊สและของเหลว สามารถกำจัดแก๊สและของเหลวนี้ได้ด้วยวิธีสุญญากาศและแทนที่ด้วยการแพร่กระจายของสารประกอบที่สนใจเช่นจุลินทรีย์ แร่ธาตุ หรือสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ (Díaz และคณะ, 2009) เมื่อให้ความดันบรรยากาศกลับคืนมาสารละลายจะถูกดึงเข้าไปในเนื้อเยื่อแทนที่อากาศ เป็นวิธีที่ใช้ในการปรับสภาพของเนื้อเยื่อผลไม้ก่อนที่จะเข้ากระบวนการแช่แข็งหรือการทำแห้ง (Tamer และ Çopur, 2010)

ขั้นตอนการแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน แสดงดัง

ภาพที่ 6 ขั้นตอนแรกเมื่อเริ่มแช่ชิ้นผลไม้ที่สภาวะบรรยากาศจะยังไม่มีสารละลายแทรกเข้าสู่ภายในเซลล์ ขั้นตอนที่ 2 เมื่อแช่ผลไม้ในสภาวะสุญญากาศ วัสดุที่มีรูพรุนถูกแช่ในสารละลายที่มีสารประกอบหรือความเข้มข้นแตกต่างกัน และให้ความดันสุญญากาศแก่ระบบทำให้แก๊สที่อยู่ระหว่าง

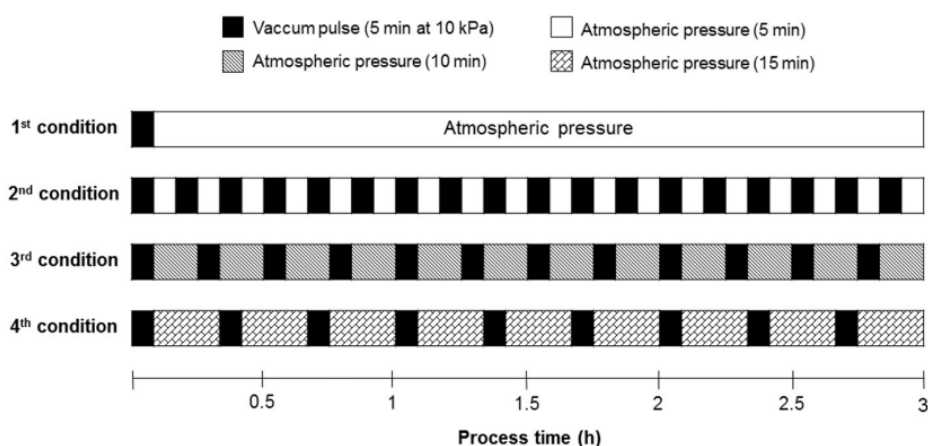
เซลล์เนื้อเยื่อขยายตัวและของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมาจนเกิดสมดุลเชิงกล ขั้นตอนที่ 3 เกิดขึ้นเมื่อให้ความดันบรรยากาศกลับคืนแก่ระบบ แก๊สที่เหลือในช่องว่างเนื้อเยื่อจะถูกบีบอัดและของเหลวจากภายนอกจะไหลเข้าไปในเนื้อเยื่อแทนที่อากาศโดยการแพร่ผ่านรูขนาดเล็ก (Capillary action) และเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงความดันบรรยากาศ (pressure gradients) ดังนั้นวิธีการแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศเป็นวิธีในการควบคุมการเข้าช่องว่างระหว่างเซลล์และเหนี่ยวนำสารประกอบต่างๆ ที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างการทำงานหรือคุณสมบัติทางโภชนาการของพืช ขึ้นอยู่กับชนิดของโมเลกุลที่เสริม (Tylewicz และคณะ, 2013)



ภาพที่ 6 การเคลื่อนที่ของสารละลายในช่องว่างระหว่างเซลล์โดยกลไก HDM
ที่มา: (Yuenyongputtakal, 2013)

จากการศึกษาของ Flores และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาผลของการแทรกซึมด้วยวิธีสุญญากาศที่อุณหภูมิเดียวกันในการแทรกซึมไมโครแคปซูล *L. rhamnosus* ในชิ้นแอปเปิลโดยใช้ osmotic dehydration พบว่าประสิทธิภาพการแทรกซึมเพิ่มขึ้นเมื่อให้พัลส์สุญญากาศเริ่มต้น 20 นาที การอยู่รอดของโพรไบโอติกลดลงตามความดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ในแอปเปิลที่ได้อยู่ในช่วง 10^6 – 10^8 CFU/กรัม นอกจากนี้ Rascón และคณะ (2018) ได้ศึกษาการใช้ความดันสุญญากาศ 50 mbar ที่จุดเริ่มต้นของกระบวนการออสโมติกเพื่อแช่สารละลายซูโครสที่มี *L. rhamnosus* ในชิ้นกล้วยพบว่ายังเหลือปริมาณจุลินทรีย์มีชีวิตมากกว่า 10^7 CFU/กรัม

งานวิจัยที่ประยุกต์ใช้การแทรกซึมสุญญากาศแบบพัลส์ (pulsed-vacuum impregnation) ได้แก่งานวิจัยของ Galvão Martins, Nunes Chada และ da Silva Pena (2019) ศึกษาการแทรกซึมสารละลายเกลือในปลาช่อนยักษ์เมซอนโดยใช้วิธี pulsed-vacuum impregnation (PVI) ที่อุณหภูมิต่างๆ (10-40 องศาเซลเซียส) สภาวะในการทดลองแบ่งเป็น 4 สภาวะด้วยกันได้แก่ 1) การใช้ความดันสุญญากาศ 10 kPa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสลับความดันบรรยากาศ จนจบการทดลอง 2) การใช้ความดันสุญญากาศ 10 kPa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสลับความดันบรรยากาศ เป็นเวลา 5 นาที สลับไปจนจบการทดลอง 3) การใช้ความดันสุญญากาศ 10 kPa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสลับความดันบรรยากาศ เป็นเวลา 10 นาที สลับไปจนจบการทดลอง 4) การใช้ความดันสุญญากาศ 10 kPa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสลับความดันบรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที สลับไปจนจบการทดลอง แสดงดังภาพที่ 7 จากการทดลองพบว่าในระหว่างการให้ความดันพัลส์สุญญากาศจะก่อให้เกิดปรากฏการณ์การเปลี่ยนรูป-การคลายตัว (DRP) ซึ่งส่งผลกระทบต่อจลนพลศาสตร์ สภาวะสมดุลของระบบ คุณสมบัติทางกายภาพ ทางกล และจุลภาคของของแข็งที่มีรูพรุน เมื่อให้ความดันสุญญากาศหลายรอบมากขึ้นจะส่งเสริมปรากฏการณ์ DRP ในเนื้อเยื่อพืชโดยจะช่วยให้การแทรกซึมเกลือเมื่อใช้อุณหภูมิในการแทรกซึมสูงขึ้นจะทำให้อัตราการถ่ายโอนมวลมากขึ้น สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแทรกซึมเกลือในปลาช่อนยักษ์เมซอนคืออุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิแช่เย็น



ภาพที่ 7 ภาพแสดงกระบวนการ pulsed-vacuum impregnation (PVI)

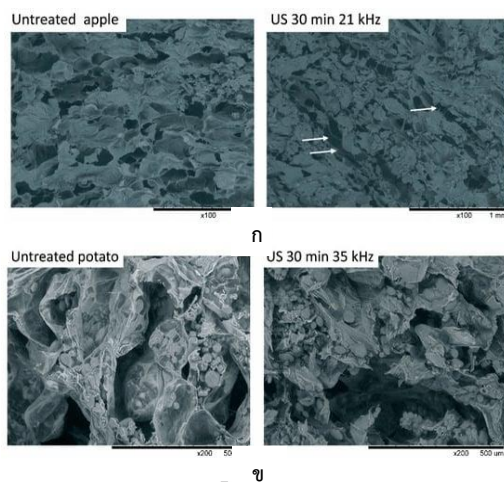
ที่มา: Galvão Martins, Nunes Chada และ da Silva Pena (2019)

2.5 การแทรกซึมโพโรโอดิกด้วยวิธี ultrasonic impregnation

การแทรกซึมโพโรโอดิกด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยเป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราซาวด์ร่วมกับสารละลายโพโรโอดิก เครื่องมือชนิดนี้มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกมี

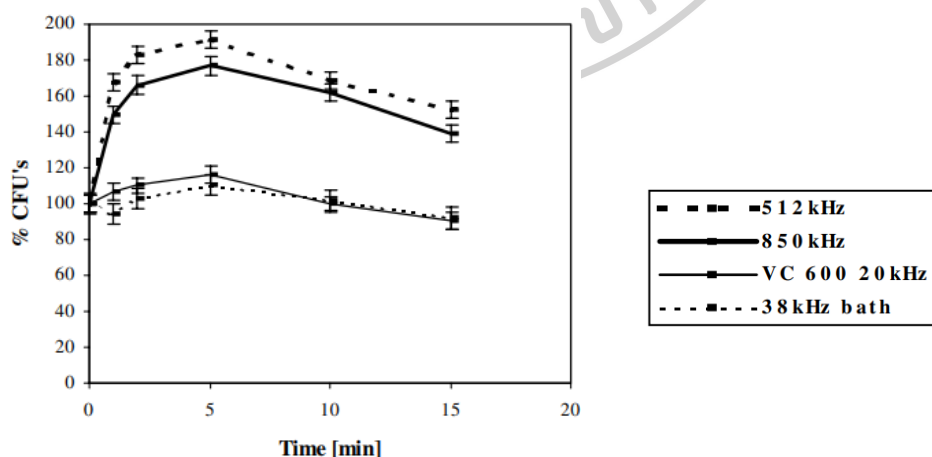
ขนาดความยาวและมีคลื่นความถี่ที่แตกต่างกันไป หรือเป็นลักษณะอ่างอัลตราซาวด์ เครื่องมือดังกล่าวจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวกลางคือสารละลายโพรไบโอติก จะเกิดปรากฏการณ์ Cavitation effect ในสารละลายที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ มีพลังงานมากพอที่ทำให้เกิดรูขนาดเล็กขึ้นในชิ้นผลไม้ ส่งผลให้สารละลายแทรกซึมเนื้อเยื่อได้มากขึ้น (Fregonesi และคณะ, 2014) แต่วิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจะยับยั้งจุลินทรีย์จากการเกิดฟองแก๊สและสร้างพลังงานทำให้ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียจนทำให้ตายในที่สุด (Joyce และคณะ, 2003)

ตัวอย่างของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพืชจากการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์แสดงดังภาพที่ 8 Nowacka และคณะ (2014) ศึกษาเนื้อเยื่อแอปเปิลและมันฝรั่งที่เตรียมตัวอย่างด้วยอ่างอัลตราซาวด์ 30 นาที ใช้คลื่น 21 kHz สำหรับแอปเปิลและ 35 kHz สำหรับมันฝรั่ง นำไปแช่แข็งเพื่อรักษาโครงสร้างของวัสดุ จากนั้นถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างหลังการเตรียมตัวอย่าง เนื้อเยื่อแอปเปิลที่ได้มีลักษณะบิดเบี้ยว และยังสามารถสังเกตการรวมตัวของเซลล์ออกเป็นกระจุกขนาดใหญ่ได้อีกด้วย (ภาพที่ 8ก) ในกรณีของเนื้อเยื่อมันฝรั่ง คลื่นอัลตราซาวด์ทำให้เกิดการสลายตัวของเนื้อเยื่อและการแตกตัวของเมล็ดแป้ง (ภาพที่ 8ข) คลื่นอัลตราซาวด์สร้างการก่อตัวของ microchannels โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเริ่มต้น และจากนั้น sonication ทำให้เกิดการบิดเบือนของโครงสร้าง ทำให้เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ นักวิจัยคนอื่น ๆ พบการก่อตัวของไมโครแชนเนลเกิดขึ้นในระหว่างการทำ sonication ในโครงสร้างของผลกีวี (Jambrak และคณะ, 2010) แอปเปิล (Nowacka และคณะ, 2014) และมันฝรั่ง (Pieczywek และคณะ, 2017) หลังการใช้คลื่นอัลตราซาวด์



ภาพที่ 8 ลักษณะของตัวอย่างที่เตรียมด้วยการใช้อ่างอัลตราซาวด์ (ก) แอปเปิล และ (ข) มันฝรั่ง โดยใช้กำลังขยาย 100x และ 200x ตามลำดับ (ลูกศรแสดงจุดเกิดไมโครซาแนล)
ที่มา: Nowacka และคณะ (2014)

จากการศึกษาการเพิ่มความถี่คลื่นอัลตราซาวด์ส่งผลต่อความคงอยู่ของ *Bacillus subtilis* โดยใช้ปริมาตรสารละลายเชื้อ 200 มิลลิลิตรใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นวางในอ่างอัลตราซาวด์ที่ความถี่ 38, 512 และ 850 kHz ส่วนความถี่ 20 kHz จะใช้หัวปั่น (probe) จุ่มในสารละลายเชื้อ เป็นเวลา 15 นาที จากการทดลองพบว่าที่ความถี่ 20 และ 38 kHz ไม่มีผลต่อการเหลือรอดของแบคทีเรีย (ภาพที่ 9) เว้นแต่จะมีการลดลงเล็กน้อยแต่สามารถตรวจพบได้ที่ 15 นาที ในทางตรงกันข้าม เมื่อเพิ่มความถี่ที่สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นทันทีในช่วง 5 นาทีแรกตามด้วยการลดลงอย่างต่อเนื่อง (Joyce และคณะ, 2003)



ภาพที่ 9 ร้อยละปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* คงเหลือหลังจากให้ความถี่ของคลื่นอัลตราซาวด์ที่แตกต่างกันได้แก่ 20, 38, 512 และ 850 kHz (100% CFU คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น)
ที่มา: Joyce และคณะ (2003)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

- Yeast extract (Himedia, India)
- MgSO₄.H₂O (Himedia, India)
- Lactobacillus MRS broth (Himedia, India)
- Lactobacillus MRS agar (Himedia, India)
- Sodium chloride 99.8% AR.grade (Qrec, Newzealand)
- Crystal violet (Mpimpex, Thailand)
- Gram iodine (mordant) (Mpimpex, Thailand)
- Safranin (counterstain) (Mpimpex, Thailand)
- สารละลายเอทานอล 95% (v/v) (Mpimpex, Thailand)
- สารละลายเอทานอล 99.99% (v/v) (Merck, Germany)
- Polypeptone (Himedia, India)
- Peptone water (Himedia, India)
- น้ำกลั่น (distilled water) (Vunique, Thailand)
- แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ aerobic count plate (Petrifilm, 3M, MN, USA)
- แผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast and mold count plates (Petrifilm, 3M, MN, USA)
- ถังบ่มไร้ออกซิเจน (AnaeroGen™ 2.5L, Thermo scientifi, USA)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ


- มาตรวัดดัชนีหักเห (refractometer) (PAL-1, Atago, Japan)
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) (TE 31025, Sartorius AG, Germany)
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบหยาบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) (BP 2215, Sartorius AG, Germany)

- เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (water activity meter) (AQUA LAB 4TE, METER Group, Inc., WA, USA)
- เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) (Vortex-Genie, Scientific Industries, Inc., NYC, USA)
- เครื่องตีบดตัวอย่าง (stomacher Lab blender) (400 Circulator, Seward, UK)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (MEM-1, Memmert, Germany)
- อ่างอัลตราซาวด์ 37 kHz, 80 W (ultrasonic cleaner) (Elmasonic S30H, Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
- เครื่องโฮโมจีไนซ์ (homogenizer) (T 25 DIGITAL Ultra-turrax®, IKA, Germany)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (PHM 210, Metro Lab. Co. Ltd., France)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (SS-325, TOMY SEIKO Co., Ltd., Japan)
- ตู้อบความร้อนสุญญากาศ (vacuum oven, HYSC, VO-64, Korea)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Binder, Germany)
- เครื่องวัดสี (hunter lab) (MiniScan EZ 4500S, Reston, VA, USA)
- เวอร์เนียคาลิเปอร์แบบดิจิตอล (digital Vernier caliper) (Sumo, บริษัท สยามโกลบอลกรุ๊ป จำกัด, ประเทศไทย)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood) (HBB 2448 Holten Laminar Air, Thermo Scientific, MA, USA)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) (IF450 449 Liters, MEMMERT, Germany)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge) (Sorvall RC 6, Thermo Scientific, MA, USA)
- ตู้อบลมร้อนแบบถาด (hot-air tray dryer) ขนาด 6 ถาด (กล้วยน้ำไทย, ประเทศไทย)
- เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer, Topolino, IKA, Germany)
- โถเพาะเชื้อจุลินทรีย์-แบบที่เรียบบนไร้ออกซิเจน (anaerobic jar)

3.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสชนิด *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (TBRC 388) ที่ได้รับรองว่ามีความสามารถเป็นโพรไบโอติกจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี โดยเชื้อจะถูกเก็บไว้ในรูปของเชื้อแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ข้อมูลของเชื้อ *L. casei* ที่ใช้แสดงดังภาพที่ 10

Collection	TBRC
Other code	S. Orla-Jensen, 7
Other collection code	BCC 36987 ; ATCC 393 ; BCRC 10697 ; CCUG 21451 ; CECT 475 ; CIP 103137 ; DSM 20011 ; IAM 12473 ; IFO 15883 ; KCTC 3109 ; LMG 6904 ; NBRC 15883 ; NCDO 161 ; NCIMB 11970 ; NRRL B-1922 ; VTT E-85225 ; BCC 4308
History	<---- BCC 36987 <---- NBRC 15883 <---- JCM 1134 <---- ATCC 393 <---- G.J. Hukcker, 03 <---- S. Orla-Jensen, 7
Microorganism group	Bacteria
Type strain	Yes [182]
LPSN	
Source	Cheese
Country of origin	Not Specified
Application detail	Acetoin acetylmethylcarbinol production (Ref 660) Diacetyl production (Ref 660) Quality control strain (Ref 660) [660] ATCC
Risk Group	1
Growth medium	MRS
Growth temperature	37 °C
Oxygen requirement	Facultative anaerobic
Distribution condition	TBRC MTA
Related link:	  

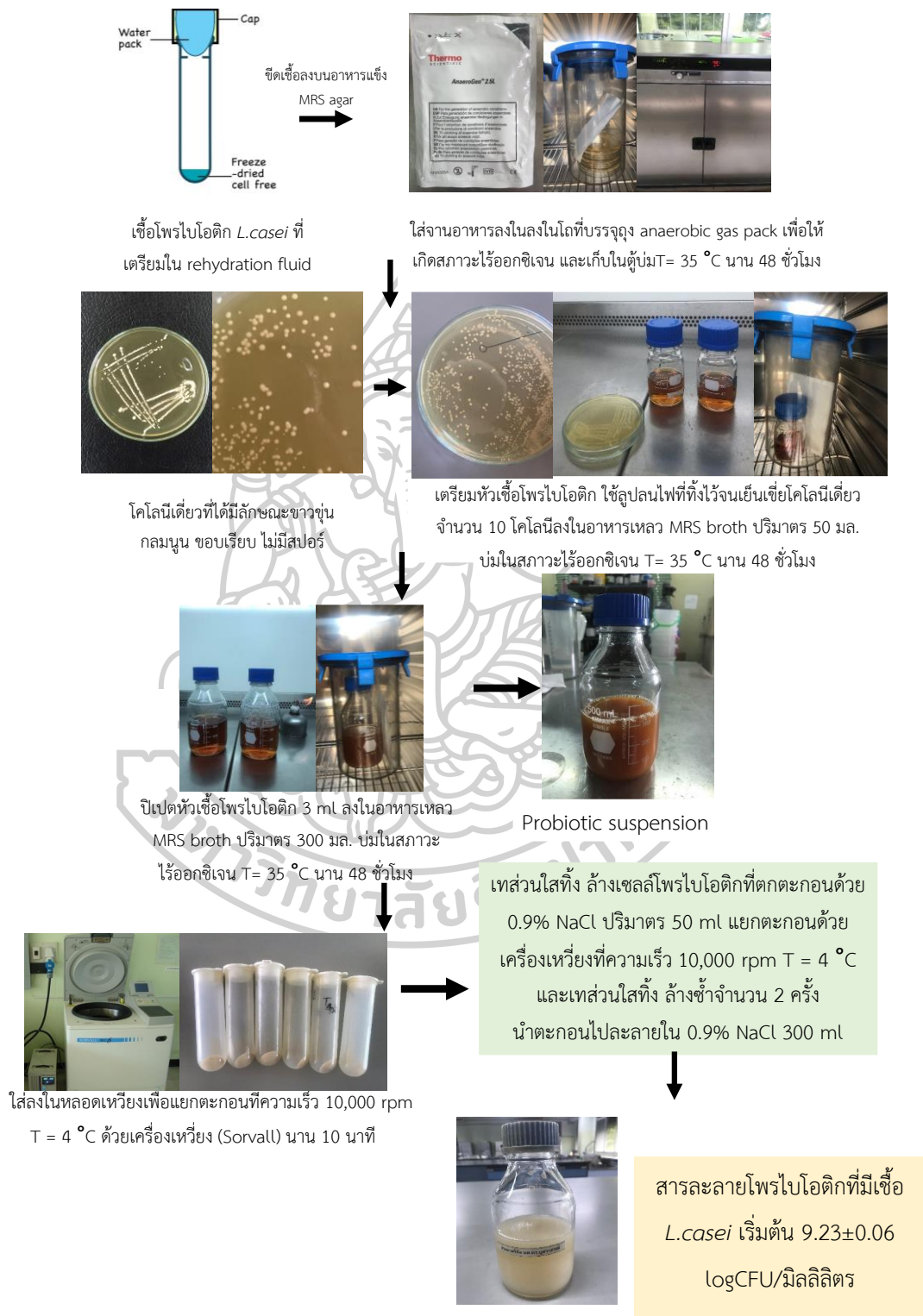
ภาพที่ 10 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (TBRC 388) ที่ใช้ในการศึกษา

ที่มา: www.tbrcnetwork.org เข้าถึงเมื่อ 3 พฤษภาคม 2565

3.3.1 การเตรียมสารละลายโพรไบโอติก

ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต้องทำการเตรียมสารละลายโพรไบโอติกโดยนำเซลล์โพรไบโอติกที่อยู่ในลักษณะผงแห้งที่ได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี มาละลายในสารละลาย rehydration fluid (การเตรียมสารละลาย rehydration fluid แสดงดังภาคผนวก ก) จากนั้นนำห้วงเชื้อที่ลนไฟและรอนกระทั่งเย็นแล้วมาจุ่มในสารละลาย rehydration fluid ที่มีเซลล์โพรไบโอติกละลายอยู่ จากนั้นนำไปเชื้อเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS agar ด้วยวิธี streak plate นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในโถที่บรรจุถุงบ่มไร้ออกซิเจนเพื่อสร้างสภาวะไร้ออกซิเจนและนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อหยุดการเจริญของแบคทีเรียและเก็บไว้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้นของการทดลองในขั้นตอนต่อไป จากนั้นใช้ห้วงเชื้อที่ลนไฟและรอนกระทั่งเย็นแล้วเชื้อโคโลนีเดี่ยวจำนวน 10 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว (MRS broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนในโถที่บรรจุถุงบ่มไร้ออกซิเจน ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลายที่มีเชื้อโพรไบโอติกหลังบ่ม ปริมาตร 3 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และนำไปบ่มอีกครั้งในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนในโถที่บรรจุถุงบ่มไร้ออกซิเจนในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตวงสารละลายหลังบ่มปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเหวี่ยง เพื่อแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง และล้างตะกอนด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (sterile NaCl) 0.9% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในการล้างตะกอนจะทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เมื่อได้ตะกอนเซลล์โพรไบโอติกแล้วนำไปละลายเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และนำไปผสมด้วยเครื่องกวนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ที่อยู่ในสารละลาย stock culture โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar โดยนำสารละลาย stock culture มาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-6} และ 10^{-7} ปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (MRS agar) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนในโถที่บรรจุถุงบ่มไร้ออกซิเจน ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์

ทั้งหมดในหน่วย CFU/ml จะได้เป็นสารละลายโพรไบโอติกที่มีจำนวนโพรไบโอติกเริ่มต้นเท่ากับ $9.23 \pm 0.06 \log\text{CFU/มิลลิลิตร}$ ขั้นตอนการเตรียมสารละลายโพรไบโอติกแสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายโพรไบโอติก

3.3.2 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. casei* โดยการตรวจดูลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการบ่ม ร่วมกับการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อส่องดูลักษณะ *L. casei* ว่ามีลักษณะแท่ง ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ และจะย้อมไม่ติดสีแดงแต่ยังคงสีม่วงของ Crystal violet เหมือนเดิม ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงลักษณะของแบคทีเรีย *Lactobacillus*

วิธีการย้อมแกรมก่อนการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

- 1 การเกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากเกินไปและปล่อยให้แห้งในอากาศ (air drying)
- 2 ตรึงเชื้อให้ติดแน่นกับสไลด์ ทำให้ไม่หลุดออกขณะย้อมสีโดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วบนเปลวไฟอย่างรวดเร็วจำนวน 3 ครั้ง
- 3 หยดสีคริสตัลไวโอเลตบนรอยเกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที และเทสีทิ้ง
- 4 หยดสารละลายไอโอดีน (lugol's iodine) บนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนทำหน้าที่เป็นมอร์แดนต์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น
- 5 ล้างสีออก (decolorize) ด้วยสารละลายเอทานอล 95% (v/v) วางทิ้งไว้ 15 วินาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ขั้นตอนการล้างน้ำนี้สำคัญมากเพราะเป็นการหยุดปฏิกิริยาการล้างสี
- 6 หยดสีซาฟรานิน (safranin) บนรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง
7. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

3.4 วัตถุดิบขนุน

3.4.1 การคัดเลือกขนุน

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เนื้อขนุนสายพันธุ์สีทอง ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวหลังจากติดดอก 4 เดือน โดยซื้อจากร้านขายผลไม้ในอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม จำนวน 7 ครั้ง เนื้อขนุนมีระดับการสุกอยู่ในระยะสุกกรอบ เนื้อสีเหลืองทั่วทั้งชิ้น มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 23.5 - 24.5 °Brix หลังจากช้อนนำมาล้างด้วยน้ำสะอาด และผึ่งให้แห้งก่อนทำการทดลองทันที ข้อมูลขนุนที่ใช้ในการศึกษาในแต่ละชุดการทดลองแสดงดังในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รายละเอียดการซื้อขนุนสายพันธุ์สีทอง สำหรับแต่ละชุดการทดลอง (ในแต่ละรุ่นจะทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)

รุ่น	เดือนและปีที่เก็บเกี่ยว	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ชุดการทดลอง
1	พฤษภาคม 2564	2	ศึกษาการเตรียมตัวอย่างขนุนให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นและศึกษาผลของการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมขนุนปราศจากเชื้อต่อปริมาณ <i>L. casei</i>
2	พฤษภาคม 2564	2	ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกที่ความดันบรรยากาศต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ในชั้นขนุน
3	มิถุนายน 2564	2	ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกที่ความดันสุญญากาศแบบพัลส์ต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ในชั้นขนุน
4	มิถุนายน 2564	2	ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกโดยวิธีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ในชั้นขนุน
5	พฤษภาคม 2565	2	ศึกษาผลของการทำแห้งขนุนเสริมโพรไบโอติกด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก
6	มีนาคม 2565	2	ศึกษาผลของการทำแห้งขนุนเสริมโพรไบโอติกด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่อปริมาณ <i>L. casei</i> ร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติก และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก
7	พฤษภาคม 2565	2	ศึกษาผลของลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale และ just about right scale ด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัส กลิ่นไม่ปรกติ และความชอบโดยรวมของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกและขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติที่ไม่เสริมโพรไบโอติก

3.4.2 การเตรียมชิ้นขนุน

นำขนุนเนื้อขนุนมาล้างด้วยน้ำสะอาด สะเด็ดน้ำและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ตัดขนุนให้มีขนาดความกว้าง 20 มิลลิเมตร ความยาว 40 มิลลิเมตร และความหนา 5 มิลลิเมตร แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การเตรียมชิ้นขนุนตัดแต่ง

3.4.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของขนุนสด

ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของขนุนสดที่นำมาใช้ในการทดลองทั้ง 7 รุ่น ดังนี้

3.4.3.1 คุณภาพทางกายภาพ

1) ขนาดชิ้นขนุนภายหลังการตัดแต่ง

ทำการสุ่มชิ้นขนุนที่ผ่านการตัดแต่งจำนวน 15 ชิ้นต่อชุดการทดลอง มาวัดความกว้าง ความยาว ความหนาด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ทำการจดบันทึกค่าที่วัดได้

2) น้ำหนักของชิ้นขนุนตัดแต่ง

ทำการสุ่มชิ้นขนุนที่ผ่านการตัดแต่งจำนวน 15 ชิ้นต่อชุดการทดลอง มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ทำการจดบันทึกค่าที่ชั่งได้

3) ค่าสี

ทำการสุ่มชิ้นขนุนที่ผ่านการตัดแต่งจำนวน 15 ชิ้นต่อชุดการทดลอง มาวัดค่าสีในระบบ CIE L*, a* และ b* ด้วยเครื่องวัดสี ซึ่งมีแหล่งกำเนิดแสงชนิด D65 ทำการวัดที่ตำแหน่งตรง

กลางด้านหน้าของชิ้นตัวอย่างชิ้นละ 1 ตำแหน่ง โดยใช้รูเปิดขนาด 1.2 เซนติเมตร จากนั้นนำค่า L^* , a^* และ b^* มาคำนวณค่า Chroma (C^*) และ hue angle (h°) ดังสมการที่ (1) – (2)

$$Chroma = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

$$hue\ angle = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2)$$

3.4.3.2 คุณภาพทางเคมี

1) ปริมาณความชื้น (Moisture content)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยใช้วิธี AOAC (1999) สุ่มตัวอย่างขนุนสดจำนวน 50 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 3-5 กรัม ใส่ลงในกระป๋องอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นบันทึกน้ำหนักตัวอย่างรวมน้ำหนักภาชนะ นำไปเข้าอบตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำภาชนะอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างหลังอบมาวางให้เย็นในโถที่บรรจุซิลิกาเจลดูความชื้นเป็นเวลา 30 นาที นำออกมาชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณความชื้น ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำต่อรุ่น

2) ค่าวอเตอร์แอกติวิตี (Water activity, pH)

ชั่งขนุนที่ปั่นละเอียดไว้แล้วในข้อ 3.4.3.2.1) จำนวน 3 กรัม ลงในถ้วยพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ในเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.2 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งการวัดดำเนินแล้วเสร็จ จึงสามารถอ่านค่าที่จอแสดงผลได้ ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

3) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids, TSS)

นำขนุนที่ปั่นละเอียดไว้แล้วในข้อ 3.4.3.2.1) มาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยกรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบาง และหยดลงบนเครื่องวัดความหวานแบบดิจิตอล จดบันทึกค่า ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

4) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นำขนุนที่ปั่นละเอียดไว้แล้วในข้อ 3.4.3.2.1) มากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อให้ได้น้ำขนุนและวิเคราะห์ค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ที่ผ่านการเทียบมาตรฐานในสารละลายกรดเบสที่ 2 4 7 และ 10 จดบันทึกค่า ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

5) วัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity, TA)

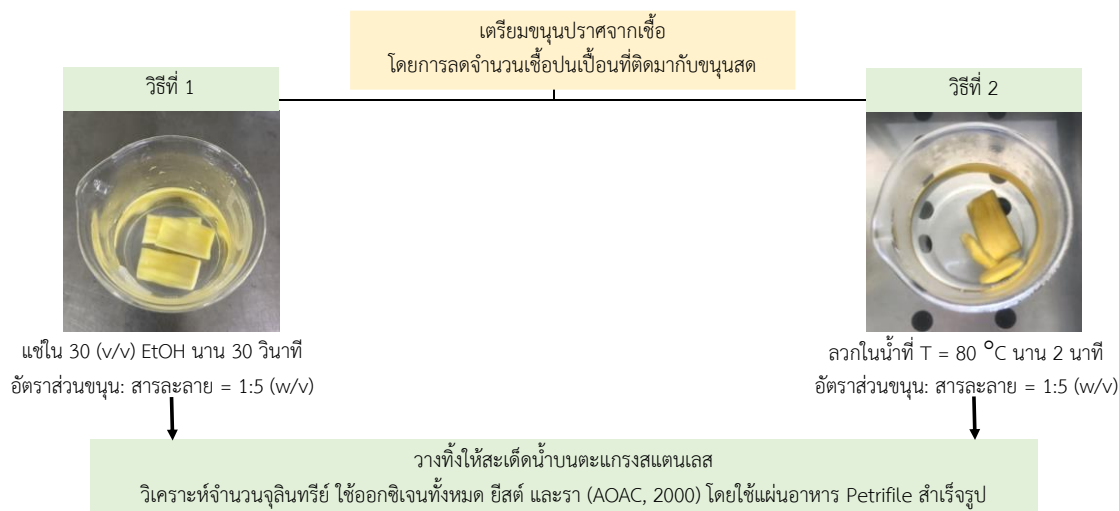
นำขุ่นที่ปั่นละเอียดไว้แล้วในข้อ 3.4.3.2.1) ชั่งน้ำหนัก 5 กรัมตัวอย่างลงใน ปีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบทัศนียม 2 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องกวนสารใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร หมุนที่ความเร็วคงที่ จุ่มพีเอชอิเล็กโทรดของเครื่องวัดความเป็นกรด - ต่าง เพื่อตรวจสอบจุดยุติ จากนั้นไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนมีค่าพีเอช เท่ากับ 8.1 นำปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาค่า TA เทียบกับกรดซิตริก ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำมาคำนวณค่า TA ได้จากสมการที่ 3

$$\text{ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (0.1N)} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times 0.064^* \times 100}{\text{ปริมาณหรือน้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิลิตร/กรัม)}} \quad (3)$$

หมายเหตุ: *milliequivalent weight of citric acid (anhydrous) = 0.064

3.4.4 การเตรียมตัวอย่างขุ่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

ทำการเตรียมตัวอย่างขุ่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน และยีสต์และรา โดยการเปรียบเทียบ 2 วิธีการ ได้แก่ 1) การแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที โดยใช้อัตราส่วนของขุ่นต่อสารละลายเอทานอลเท่ากับ 1:5 (w/v) และ 2) การลวกในน้ำร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้อัตราส่วนของขุ่นต่อ น้ำร้อนเท่ากับ 1:5 (w/v) จากนั้นทำมาวางบนตะแกรงในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อสะเด็ดน้ำ ในการทดลองจะใช้ขุ่นที่ตัดแต่ง 3 ชั้นต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ ขั้นตอนการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมขุ่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น แสดงดังภาพที่ 13 จากนั้นทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในชั้นขุ่นสดและขุ่นที่ผ่านการปลอดเชื้อ โดยการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน และปริมาณราและยีสต์ เมื่อได้วิธีการที่เหมาะสม จะนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 13 วิธีการเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างขนุนที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

3.4.4.1 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมขนุนปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นต่อปริมาณ *L. casei*

ขั้นตอนนี้เป็น การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมขนุนปราศจากเชื้อได้แก่ การแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) นาน 30 วินาทีและการลวกในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาทีว่าส่งผลต่อปริมาณ *L. casei* ในชิ้นขนุนหรือไม่ โดยนำตัวอย่างขนุนปราศจากเชื้อที่ได้จากทั้งสองวิธีมาใส่ในปิกร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารละลายโพโรไบโอติกที่มีปริมาณ *L. casei* เริ่มต้น $9.23 \pm 0.06 \log \text{CFU/มิลลิลิตร}$ อัตราส่วนขนุนต่อสารละลายโพโรไบโอติกเท่ากับ 1:5 (w/v) นำไปวางบนเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ใส่ magnetic bar และกวนที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำชิ้นขนุนมาวางบนตะแกรงในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อสะเด็ดน้ำ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei*

3.4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic plate count)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนด้วยวิธี (AOAC, 1990) โดยนำชิ้นขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธี จะใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ มาหั่นให้มีขนาดเล็กและสับละเอียด ซึ่งตัวอย่างขนุนจำนวน 10 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใช้เครื่องตีบดตัวอย่างด้วยกำลังสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} นำมาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Petrifilms ชนิด aerobic count plates ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการไล่อากาศออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปด้วยอุปกรณ์กดตัวตัวอย่าง นำไปป่มในตู้บ่ม

เชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณ จุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนในหน่วย CFU/g (wet basis)

3.4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold plate count)

โดยนำชิ้นขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธี จะใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ มาหั่นให้มีขนาดเล็กลงและสับละเอียด ชั่งตัวอย่างขนุนจำนวน 10 กรัม เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใช้เครื่องตีบดตัวอย่าง ด้วยกำลังสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} นำมาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Petrifilms ชนิด yeast and mold count plates ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการไล่อากาศออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปด้วย อุปกรณ์กดตัวอย่าง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับโคโลนี ในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณยีสต์และราในหน่วย CFU/กรัม (wet basis)

3.4.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ในตัวอย่างที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

นำตัวอย่างชิ้นขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธี ที่แช่ในสารละลายโพธิโอติก มาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ นำมาวางสะอาดน้ำบนตะแกรงในตู้ปลอดเชื้อนาน 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดย ชั่งน้ำหนักจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง ที่ระดับความแรงสูงสุด จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ ความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นนำมาทำ serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ให้มีความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-3} เลือกว่าความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} โดยปิเปิดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบไม่ใช้ออกซิเจนในโถที่มีการบรรจุ anaerobic gas pack เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตู้บ่ม นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณ *L. casei* เป็น CFU/กรัม (wet basis) การวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* แสดงดังภาพที่ 14



นำขนุนปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธีที่แช่ในสารละลาย
โพรไบโอติกมาวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงสเตนเลส
เป็นเวลา 30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ $T=32^{\circ}\text{C}$

วิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ที่คงเหลือในชั้นขนุน

ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ในตัวอย่างชั้นขนุนที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อทั้ง 2 วิธี
ที่แช่ในสารละลายโพรไบโอติก

3.5 การศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในชั้นขนุนที่เวลาต่างๆ

ก่อนการทำการทดลองจะทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย
โซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อที่ใช้ในการทดลองด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนอุปกรณ์สเตนเลสที่ไม่สามารถเข้าเครื่อง
นึ่งฆ่าเชื้อได้จะฆ่าเชื้อโดยฉีดสารละลายเอทานอล 70% (v/v)

ทำการศึกษาอิทธิพลของการแทรกซึมโพรไบโอติกต่อปริมาณ *L. casei* โดยแบ่งเป็น 3 วิธี
ได้แก่ 1) การแทรกซึมที่ความดันบรรยากาศ (Atmospheric impregnation; AI) 2) การแทรกซึมที่
สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์ (Pulsed-vacuum impregnation; PVI) และ 3) การแทรกซึมโดยใช้
คลื่นอัลตราซาวด์ (Ultrasonic impregnation; UI)

จากขั้นตอนที่ 3.4.3 พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างขนุนปราศจากเชื้อที่เหมาะสมคือการลวกใน
น้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จึงเลือกใช้วิธีการลวกมาใช้ทำการทดลอง หลังจาก
ทำการลวกชั้นขนุนเพื่อให้ปราศจากเชื้อเรียบร้อยแล้วจะนำชั้นขนุนมาผึ่งบนตะแกรงให้เย็นนาน 5
นาทีในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายโพรไบโอติกโดยใช้อัตราส่วนชั้นขนุนต่อสารละลาย
โพรไบโอติกเท่ากับ 1:5 (w/v) ในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตรแบบกันแหลม ขนาด $28.32 \times$
 113.26 มิลลิเมตร แต่ละหลอดจะบรรจุขนุนจำนวน 1 ชิ้น ปริมาณ *L. casei* ในสารละลายเริ่มต้น
เท่ากับ 9.23 ± 0.06 logCFU/มิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างชุดควบคุมทำโดยการนำชั้นขนุนที่ผ่านการลวก
มาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* ว่ามีปนเปื้อนมาหรือไม่ โดยกำหนดเป็นเวลาที่ 0 นาที และแช่ตัวอย่าง
ขนุนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แทนการแช่ในสารละลายโพรไบโอติก
ขั้นตอนการเตรียมชั้นขนุนในสารละลายโพรไบโอติกแสดงดังภาพที่ 15



- Sterile อุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลองด้วยเครื่อง Autoclave T=121 °C แรงดันไอน้ำ 15 lb/inch² นาน 15 นาที
- อุปกรณ์สแตนเลสฆ่าเชื้อโดยฉีดยึด 70% alcohol

ลวกชิ้นขนุนตัดแต่งที่ T= 80°C นาน 2 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

แช่ชิ้นขนุนในสารละลายโพรไบโอติก อัตราส่วนขนุนต่อสารละลายโพรไบโอติก = 1:5 (w/v) ในหลอดเหวี่ยงปริมาตร 50 ml

ภาพที่ 15 การเตรียมชิ้นขนุนในสารละลายโพรไบโอติก

นำหลอดบรรจุชิ้นขนุนในสารละลายโพรไบโอติกไปศึกษาวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกในชิ้นขนุนที่เวลาต่างๆ ดังนี้

3.5.1 การแทรกซึมที่ความดันบรรยากาศ

นำหลอดบรรจุชิ้นขนุนที่แช่สารละลายโพรไบโอติกมาวางในตู้ปลอดเชื้อที่ความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที (ภาพที่ 16) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างชิ้นขนุนที่แช่สารในละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แทนการแช่ในสารละลายโพรไบโอติก (จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)



ภาพที่ 16 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยที่ความดันบรรยากาศโดยแช่ในสภาวะบรรยากาศที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

3.5.2 การแทรกซึมที่สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์

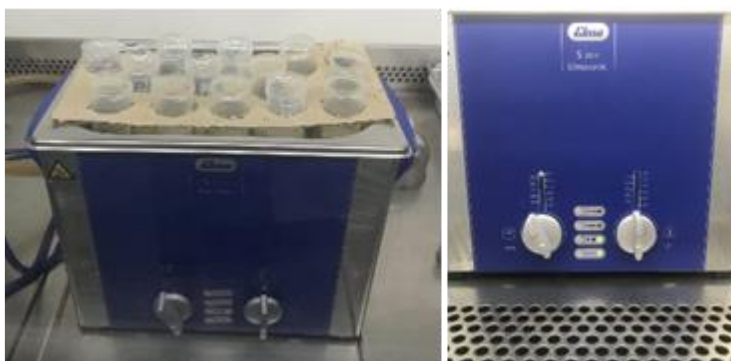
นำหลอดบรรจุขึ้นขุนที่แช่สารละลายโพรไบโอติกมาวางในตู้อบความร้อนสุญญากาศ (ภาพที่ 17) ที่ความดัน 0.02 MPa อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส โดยกดเปิดปั๊มเพื่อลดความดันจนถึง 0.02 MPa เมื่อความดันถึงแล้วให้ปิดปั๊ม โดยจับเวลา 10 นาทีตั้งแต่กดเปิดปั๊ม จากนั้นเพิ่มความดันกลับมาสู่ความดันบรรยากาศ จับเวลา 5 นาที กดเปิดปั๊มอีกครั้งเพื่อให้ความดันกลับไป 0.02 MPa ทำซ้ำเช่นนี้จนกระทั่งครบเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นนำมาวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงสเตนเลสในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างขึ้นขุนที่แช่สารในละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แทนการแช่ในสารละลายโพรไบโอติก (จำนวน 3 ซีนต่อ 1 ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)



ภาพที่ 17 การแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมที่สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์ที่ความดัน 0.02 MPa อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส

3.5.3 การแทรกซึมโดยวิธีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์

นำหลอดบรรจุขึ้นขุนที่แช่สารละลายโพรไบโอติกมาวางในอ่างอัลตราซาวด์ที่มีความถี่ 37 kHz โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 34-36 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำแข็ง ทำการจับเวลาที่ 15, 30, 45 และ 60 นาที นำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ มาวางให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงสเตนเลสในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที นำมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างขึ้นขุนที่แช่สารในละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แทนการแช่ในสารละลายโพรไบโอติก (จำนวน 3 ซีนต่อ 1 ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) แสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การแทรกซึมโพโรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในอ่างอัลตราซาวด์

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* คงเหลือภายหลังการแทรกซึม

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยนำขนุนที่ผ่านการแทรกซึมด้วยวิธีต่างๆ ที่ระยะเวลา 15, 30 45, และ 60 นาที โดยแต่ละเวลาการแทรกซึมจะมีจำนวน 3 ชั้นต่อ 1 ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ นำมาวางสะอาดน้ำบนตะแกรงในตู้ปลอดเชื้อนาน 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยชั่งน้ำหนักจำนวน 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปตีบดด้วยเครื่องตีบดตัวอย่าง ที่ระดับความแรงสูงสุด จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นนำมาทำ serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ให้มีความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-6} เลือกว่าความเข้มข้น 10^{-5} และ 10^{-6} โดยปิเปตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบไม่ใช้ออกซิเจนในโถที่มีการบรรจุ anaerobic gas pack เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตู้บ่ม นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณ *L. casei* เป็น CFU/กรัม (wet basis) และคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตจากสมการที่ (4)

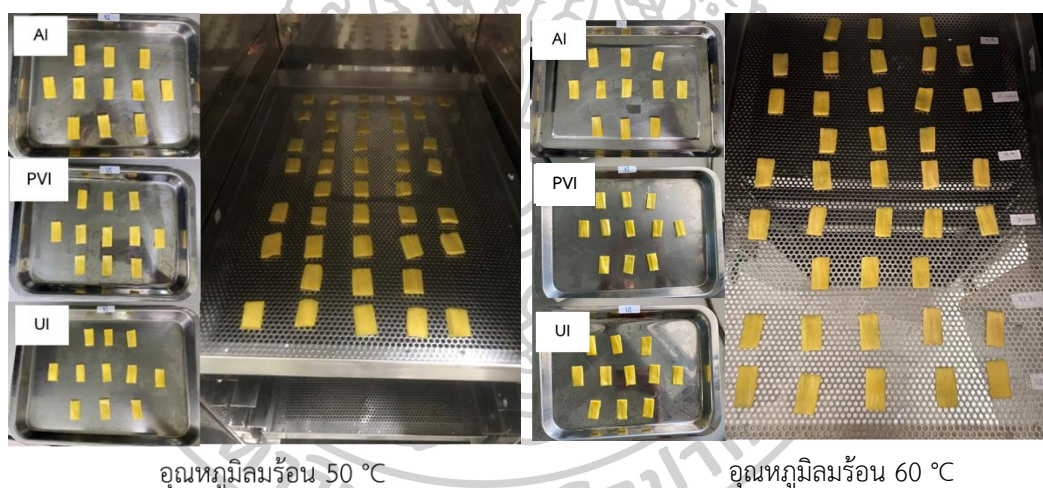
$$\text{ร้อยละการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทดลอง (logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb))}}{\text{ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb))}} \times 100 \quad (4)$$

3.6 การศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพโรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* ร้อยละการรอดชีวิตของโพโรไบโอติก และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพโรไบโอติก

3.6.1 การทำแห้ง

เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมในการแทรกซึมโพโรไบโอติกจากแต่ละวิธีตามข้อ 3.5 จึงนำเวลาที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อในขั้นตอนนี้ โดยจะศึกษาอิทธิพลของการทำแห้งทั้ง 2 ระดับได้แก่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส จนขึ้นขนุนอบแห้งมีค่า a_w น้อยกว่า 0.65

ทำการเตรียมตัวอย่างขึ้นขนุนตามวิธีในข้อ 3.4.2 และทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในข้อ 4.4.3 ซึ่งใช้วิธีการลวกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเสริมโพรไบโอติกโดยใช้วิธีการแทรกซึมที่ความดันบรรยากาศ เป็นเวลา 60 นาที การแทรกซึมที่สภาวะสุญญากาศแบบพัลส์เป็นเวลา 45 นาที และการแทรกซึมโดยวิธีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 45 นาที (ตามข้อ 3.5) ตัวอย่างที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกมาวางเรียงในถาดสแตนเลส จากนั้นนำไปทำแห้งในตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 19 ทำแห้งจนกระทั่งขึ้นขนุนมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.65 ในแต่ละทริทเมนต์จะมีตัวอย่างควบคุมคือขนุนที่แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9%(w/v) แทนการเติมสารละลายโพรไบโอติก เพื่อเปรียบเทียบว่าตัวอย่างที่เสริมโพรไบโอติกกับไม่เสริมโพรไบโอติกจะส่งผลต่อคุณภาพของตัวอย่างแห้งหรือไม่ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ



ภาพที่ 19 การเรียงตัวอย่างขนุนเสริมโพรไบโอติกสำหรับการทำแห้งด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส

นำขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ ค่าสี ปริมาณ *L. casei* ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic plate count) และปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count)

3.6.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก

3.6.2.1 คุณภาพทางกายภาพ

1) ค่าสี ระบบ CIE

ทำการสุ่มขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติกจำนวน 5 ชิ้น ต่อทริทเมนต์มาวัดค่าสีมาวัดค่าสีในระบบ CIE L*, a* และ b* ด้วยเครื่องวัดสี ซึ่งมีแหล่งกำเนิดแสงชนิด D65 ทำการวัดที่ตำแหน่งตรงกลางด้านหน้าของชิ้นตัวอย่างชิ้นละ 1 ตำแหน่ง โดยใช้รูเปิดขนาด 1.2 เซนติเมตร จากนั้นนำค่า L*, a* และ b* มาคำนวณค่า Chroma (C*), hue angle (h°) ดังสมการที่ (1) – (2) และค่าความแตกต่างของสีทั้งหมด (total color difference, ΔE) ดังสมการที่ (5)

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^*{}^2 + \Delta a^*{}^2 + \Delta b^*{}^2} \quad (5)$$

เมื่อ ΔE เปรียบเทียบความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างขนอบสดและขนอบแห้ง

3.6.2.2 คุณภาพทางเคมี

1) ปริมาณความชื้น

ทำการสุ่มขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติกในแต่ละทริทเมนต์มาหั่นให้มีขนาดเล็ก ซั่งตัวอย่างจำนวน 1-2 กรัม ใส่ลงในกระป๋องอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นบันทึกน้ำหนักตัวอย่างรวมน้ำหนักภาชนะ นำไปเข้าอบตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำภาชนะอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างหลังอบมาวางให้เย็นในโถที่บรรจุซิลิกาเจลดูดความชื้นเป็นเวลา 30 นาที นำออกมาชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณความชื้น ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำต่อทริทเมนต์

2) ค่าวอเตอร์แอกติวิตี

ซั่งตัวอย่างขนอบที่หั่นไว้ในข้อ 3.6.2.2.1) จำนวน 1-2 กรัม ลงในถ้วยพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ในเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตีที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 0.2 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งการวัดดำเนินแล้วเสร็จ จึงสามารถอ่านค่าที่จอแสดงผลได้ ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในขนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก

3.6.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic plate count)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนด้วยวิธี (AOAC, 1990) จะใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยนำขนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกมาหั่นให้มีขนาดเล็กลงและสับละเอียด ซั่งตัวอย่างขนอบจำนวน 2 กรัม เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ใช้เครื่องตีบดตัวอย่างด้วยกำลังสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} นำมาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแผ่นอาหาร

เลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Petrifilms ชนิด aerobic count plates ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการใส่อากาศออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปด้วยอุปกรณ์กดตัวตัวอย่างให้ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนในหน่วย CFU/g (wet basis)

3.6.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold plate count)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราด้วยวิธี (AOAC, 1990) จะใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ซ้ำต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยนำขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกมาหั่นให้มีขนาดเล็กและสับละเอียด ชั่งตัวอย่างขนุนจำนวน 2 กรัม เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ใช้เครื่องตีบดตัวอย่างด้วยกำลังสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} นำมาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปิดสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Petrifilms ชนิด yeast and mold count plates ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการใส่อากาศออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปด้วยอุปกรณ์กดตัวตัวอย่างให้ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณยีสต์และราในหน่วย CFU/g (wet basis)

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* คงเหลือภายหลังการทำแห้ง

นำขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกมาวิเคราะห์ปริมาณ *L. casei* โดยใช้ตัวอย่างแต่ละทริทเมนต์จำนวน 3 ซ้ำต่อ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยนำขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกมาหั่นให้มีขนาดเล็กและสับละเอียด ชั่งตัวอย่างขนุนจำนวน 2 กรัม เติมน้ำละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ใช้เครื่องตีบดตัวอย่างด้วยกำลังสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที จะได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นนำมาทำ serial dilution dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) ให้มีความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-5} เลือกที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} โดยปิเปิดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบไม่ใช้ออกซิเจนในโถที่มีการบรรจุ anaerobic gas pack เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตู้บ่ม นับโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีคำนวณหาปริมาณ *L. casei* เปน CFU/กรัม (wet basis) และคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตจากสมการที่ (4)

3.7 การทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสขนมอบแห้งที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีที่เหมาะสม

หลังจากที่ได้วิธีการเสริมโพรไบโอติกและอุณหภูมิในการทำแห้งที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการเลือกสภาวะดังกล่าวมาผลิตผลิตภัณฑ์ขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติก และนำมาใช้ในการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation) การประเมินจะประกอบไปด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลและสเกลความชอบ 9 ระดับ (9-Point hedonic scale) เพื่อวัดระดับความชอบของผู้ตอบแบบสอบถามต่อตัวอย่าง และการทดสอบสเกลวัดความพอดี (Just about right scale) โดยประเมินค่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ (appearance) สี (color) รสชาติ (flavor) เนื้อสัมผัส (texture) กลิ่นผิดปกติ (off-flavor) และความชอบโดยรวม (overall liking) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนด้านการทดสอบชิมจำนวน 15 คน ซึ่งเป็นนักศึกษาจากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ แสดงดังภาพที่ 20

เครื่องมือ

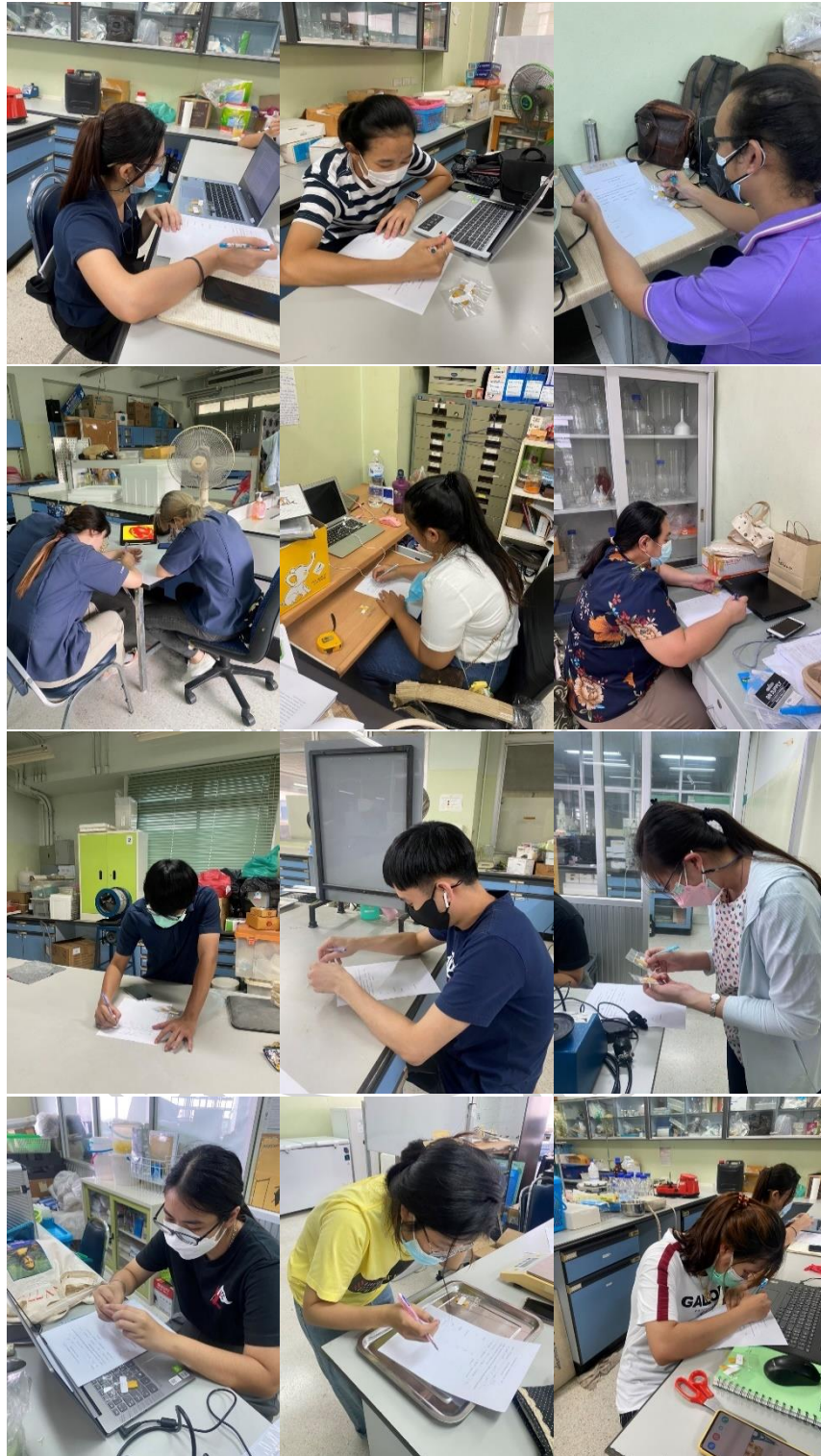
เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล คือแบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติก (ภาคผนวก ค) โดยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 แบบสอบถามคัดเลือกผู้ทำการทดสอบ (Screen question) ประกอบไปด้วยทั้งหมด 2 ตัวอย่างได้แก่ ขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติกและขนมอบแห้งแบบธรรมดา

ส่วนที่ 2 แบบสอบถามความชอบและความพอดีต่อผลิตภัณฑ์ขนมอบแห้งเสริมโพรไบโอติก ใช้วิธีการกำหนดทดสอบความชอบของผู้บริโภคโดยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ (9-point hedonic scale) ในคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ก่อนการทดสอบชิม ผู้ทดสอบทุกคนจะรับทราบขั้นตอน วิธีการทดสอบชิม และการให้คะแนนในแบบประเมินเป็นอย่างดีโดยมีคะแนนความชอบจาก 1- 9 คะแนน (9 points hedonic scale)

นอกจากนี้ยังให้กลุ่มผู้ทดสอบให้คะแนนความพอดี (Just about right scale) ต่อคุณลักษณะด้าน สี ลักษณะปรากฏด้านการหัดตัว ลักษณะปรากฏด้านความสม่ำเสมอของสี รสชาติ เนื้อสัมผัส กลิ่นผิดปกติ

จากนั้นจะนำข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ได้มาเข้าโปรแกรมของภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยศิลปากร เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูล



ภาพที่ 20 บรรยากาศการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ (9-point hedonic scale) และการคะแนนความพอดี (Just about right scale) นักศึกษาจากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 17.0 (IBM, Chicago, IL, USA) ทำการเปรียบเทียบคุณภาพทางกายภาพและเคมีของขนุนสดจำนวน 7 ชุดการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p = 0.05$) หาความแตกต่างของตัวอย่างสดในแต่ละชุดการทดลอง

เปรียบเทียบวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกของแต่ละวิธีที่เวลาต่างๆ ต่อปริมาณ *L. casei* และผลของอุณหภูมิต่อการทำแห้งของแต่ละที่หมั้นต่อคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี ปริมาณ *L. casei* และร้อยละการรอดชีวิตในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* และร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติกโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Paired-Samples T-Test

การวิเคราะห์การทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ข้อมูลจะใช้สถิติเชิงพรรณนาได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (SuSen 2013) เวอร์ชัน 2013 (3.660) ของภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของขนุนสด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการควบคุมขนาดชิ้นตัวอย่างให้มีขนาดเท่ากัน โดยทำการตัดชิ้นขนุนให้มีขนาดกว้าง 23.68 ± 0.23 มิลลิเมตร ความยาว 43.17 ± 0.27 มิลลิเมตร ความหนา 5.07 ± 0.08 มิลลิเมตร และน้ำหนัก 3.43 ± 0.11 กรัม ทำการทดลองกับขนุนจำนวน 7 รุ่น พบว่าคุณภาพด้านสี ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดง (a^*) ค่าสีเหลือง (b^*) Hue angle และ Chroma ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 6) แสดงว่าตัวอย่างขนุนสดในแต่ละรุ่นที่นำมาใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติด้านสีเริ่มต้นใกล้เคียงกัน ค่าความเป็นสีแดง (a^*) อยู่ในช่วง 9.09 ถึง 10.13 ค่า Hue angle อยู่ในช่วง 77.19 ถึง 78.52 แสดงทิศทางของสีเหลือง โดยค่า Hue angle มีความสำคัญในการบ่งบอกปริมาณที่เพิ่มขึ้นของแคโรทีนอยด์ในระหว่างกระบวนการสุกของผลไม้ (Ong และคณะ, 2006)

ค่าคุณภาพทางเคมีของชิ้นขนุนสดที่นำมาใช้ในการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids, TSS) และปริมาณความชื้นของตัวอย่างทั้ง 7 รุ่นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการวิเคราะห์คุณภาพของขนุนสดพบว่า ค่า pH ประมาณ 5 ซึ่งต่ำกว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับ *L. casei* ในการเจริญเติบโต (pH 6.0-6.5) (Panesar และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตาม *L. casei* สามารถทน pH ได้ถึง 3 โดย pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ *L. casei* คือ pH ต่ำกว่า 2 (Mishra และ Prasad, 2005) ดังนั้นในเนื้อขนุนสุกจึงยังมี pH ที่ *L. casei* จะมีการรอดชีวิตอยู่ได้ โดยค่า pH และ TSS (23.57 ถึง 23.89 °Brix) ในการศึกษาที่มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Shamsudin และคณะ (2009) รายงานว่าค่า pH ของขนุนสดสายพันธุ์ J33 มีค่า $4.70 - 5.72$ และ TSS มีค่า $19.03 - 32.53$ °Brix นอกจากนี้ Goswami และคณะ (2011) รายงานค่า TSS ของขนุนสายพันธุ์ Khaja, Dorasha และ Ghila ที่สุกงอมอยู่ในช่วง $19.3 - 27.0$ °Brix ค่าปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (titratable acidity, TA) คือ $0.25 \pm 0.01\%$ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ranasinghe และคณะ (2019) ซึ่งรายงานค่า TA ของขนุนสุกอยู่ในช่วง $0.17 - 0.29\%$ (เทียบกับกรดซิตริก) สำหรับปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ของขนุนสุกในการศึกษานี้อยู่ในช่วง $75.32 - 75.91$ และ $0.9734 - 0.9812$ ตามลำดับ

ตารางที่ 6 คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของชิ้นขนมสดที่ใช้ในการทดลองแต่ละรุ่น (n=7)

คุณภาพ	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	รุ่นที่ 5	รุ่นที่ 6	รุ่นที่ 7
ความกว้าง ^{ns} (มิลลิเมตร)	23.22±1.58	23.93±0.33	23.71±0.42	23.67±0.49	23.88±1.00	23.60±0.37	23.78±1.27
ความยาว ^{ns} (มิลลิเมตร)	42.89±1.38	43.24±0.72	43.56±1.58	43.50±2.12	43.02±1.07	42.89±0.42	43.09±0.59
ความหนา ^{ns} (มิลลิเมตร)	5.03±0.24	5.09±0.38	5.05±0.19	5.03±0.20	5.02±0.19	5.08±0.19	5.02±0.13
น้ำหนัก (กรัม)	3.32±0.23	3.37±0.23	3.51±0.24	3.37±0.23	3.43±0.26	3.37±0.23	3.43±0.22
L ^{*ns}	67.76±1.79	67.79±2.23	68.02±2.11	67.98±3.54	68.81±1.77	68.94±2.00	68.35±2.51
a ^{*ns}	9.58±0.67	9.62±0.91	9.47±1.19	9.52±1.23	9.73±1.53	9.74±0.91	9.81±1.03
b ^{*ns}	58.96±3.45	57.64±2.21	58.77±3.30	58.44±2.82	58.82±3.33	58.58±1.61	58.66±2.54
Hue angle ^{ns}	80.73±0.96	80.50±1.06	80.80±1.44	80.71±1.38	80.55±0.89	80.56±0.88	80.49±1.04
Chroma ^{ns}	59.74±3.38	58.45±2.13	59.55±3.17	59.23±2.72	59.64±3.34	59.38±1.62	59.49±2.52
pH	5.13±0.00 ^{cd}	5.14±0.01 ^{bc}	5.17±0.01 ^a	5.13±0.01 ^d	5.17±0.01 ^a	5.16±0.00 ^a	5.15±0.01 ^b
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ^{ns} (°Brix)	23.74±0.05	23.67±0.17	23.72±0.08	23.77±0.14	23.73±0.23	23.74±0.10	23.78±0.09
ปริมาณกรดที่เตรตไรต์ (%)	0.26±0.02 ^a	0.23±0.01 ^c	0.25±0.02 ^{ab}	0.26±0.01 ^a	0.26±0.01 ^a	0.26±0.00 ^a	0.24±0.01 ^{bc}
ปริมาณความชื้น ^{ns} (%w.b.)	75.53±1.83	75.63±0.70	75.34±1.46	75.70±2.20	75.79±1.70	75.26±1.30	75.27±0.42
ค่าออร์แอคติวิตี (a _w)	0.9783±0.00 ^{ab}	0.9803±0.00 ^a	0.9785±0.00 ^{ab}	0.9768±0.00 ^b	0.9768±0.00 ^b	0.9789±0.00 ^{ab}	0.9782±0.00 ^{ab}

a, b, c,... แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) เปรียบเทียบในแถวเดียวกัน

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.05)

4.2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษา

จากการสังเกตโคโลนีของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการทดลองด้วยตาเปล่าพบว่าลักษณะโคโลนีที่ได้มีสีขาวขุ่น มันวาว กลมมน ขอบเรียบ ซึ่งแสดงคุณลักษณะเด่นของสายพันธุ์ *Lactobacillus* (Hui และคณะ, 2022) นอกจากนี้การส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่าพบว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีรูปร่างเป็นท่อนยาว ไม่มีสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และย้อมติดสีแกรมบวกจึงสามารถยืนยันได้ว่าเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ *lactobacillus* (Hui และคณะ, 2022) แสดงดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ลักษณะของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. casei subsp. casei* ก) ลักษณะโคโลนี ข) รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียแลคติกเมื่อย้อมด้วยสีแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40 เท่า

4.3 ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างขนุนให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมเริ่มต้น

การลดเชื้อจุลินทรีย์ในชั้นขนุนสดเพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมเริ่มต้น ในการศึกษาแบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ 1) การแช่ขนุนในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที และ 2) การลวกในน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที พบว่าขนุนสดก่อนการลดเชื้อมีจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ใช้อากาศทั้งหมด และยีสต์และราน้อยกว่า 25 โคโลนี หลังจากทำการลดเชื้อด้วยวิธีการแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) และการลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าไม่พบจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนและยีสต์และราซึ่งหมายความว่าทั้งสองวิธีสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนและปริมาณยีสต์และราเริ่มต้นในชั้นขนุนสดได้ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (aerobic bacteria count) ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count) ที่พบในขนุนสดและขนุนที่ผ่านการลดเชื้อด้วยวิธีการแช่ในสารละลายเอทานอล 30% (v/v) และการลวกในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และปริมาณ *L. casei* คงเหลือที่พบในขนุนที่ผ่านการลดเชื้อจุลินทรีย์จากทั้ง 2 วิธี (n=2)

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน	ปริมาณยีสต์และรา	ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือในตัวอย่าง
ขนุนสด	จำนวน (CFU/กรัม) พบน้อยกว่า 25 โคโลนี	ภาพการเจริญเติบโต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน (logCFU/กรัม) ตัวอย่าง (wet basis) ไม่พบ
ขนุนที่แช่ในสารละลาย เอทานอล 30% (v/v)	ไม่พบ	พบน้อยกว่า 25 โคโลนี ไม่พบ	4.64±0.01 ^b
ขนุนที่ผ่านการลวกใน น้ำอุณหภูมิ 80 องศา เซลเซียส	ไม่พบ	ไม่พบ	5.77±0.02 ^a

a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบระหว่างวิธีการลดเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง

Mazzotta (2001) รายงานว่าการลวกสามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *L. monocytogenes* ที่พบในถั่ว เห็ด หอมหัวใหญ่ บล็อกโคลี และพริกหวาน โดยยับยั้งปริมาณของจุลินทรีย์ได้ถึง 5 logCFU เมื่อลวกตัวอย่างข้างต้นในน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วินาที หรือลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 82 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที และการศึกษาของ Gabler และคณะ (2004) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของสปอร์ของราสายพันธุ์ *R. stolonifera*, *A. niger*, *B. cinerea* และ *A. alternata* ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อราในหลอดทดลอง เพอร์เซ็นต์การเจริญของราเท่ากับ 100% นำตัวอย่างไปใส่สารละลายเอทานอล 10, 20 และ 30% ปริมาตร 9 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 25, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที พบว่าการใช้สารละลายเอทานอล 30% (v/v) เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสามารถป้องกันการเจริญของ *B. cinerea* และ *A. alternata* โดยเปอร์เซ็นต์การเจริญของสปอร์มีค่าเท่ากับ 0 ถ้าเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียสจะสามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ *L. casei* คงเหลือพบว่าตัวอย่างขนุนปราศจากเชื้อที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการลวกมีปริมาณ *L. casei* คงเหลือมากกว่าการใช้สารละลายเอทานอล 30% (v/v) จากปริมาณ *L. casei* ในสารละลายโพรไบโอติกเริ่มต้นมีเชื้อ *L. casei* เท่ากับ 9.23 ± 0.06 logCFU/มิลลิลิตร เนื่องจากการลวกเป็นวิธีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืช (Biekman, Kroese-Hoedeman และ Schijvens, 1996) ทั้งนี้ข้อจำกัดของการแทรกซึมแบคทีเรียผ่านช่องว่างของเนื้อเยื่อพืชคือการจำกัดขนาดของโมเลกุลที่สามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อพืช โดยเซลล์เนื้อเยื่อจะยอมให้เกลือ น้ำตาลและกรดอะมิโนผ่านได้ง่าย แต่ขนาดของแบคทีเรียมีขนาดเท่ากับ 0.1 ถึง 5 ไมครอน จึงต้องใช้วิธีการที่ปรับปรุงความแน่นของเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้แบคทีเรียสามารถแทรกซึมในรูพรุนของเนื้อเยื่อได้ การลวกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืชโดยการบวมของผนังเซลล์ และทำลายผนังเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการขนส่งผ่านรูพรุน (Alzamora และคณะ, 1997)

4.4 ผลของวิธีการแทรกซึมจุลินทรีย์โพรไบโอติกและเวลาในการแทรกซึมต่อปริมาณ *L. casei* ในชั้นขนุนที่ผ่านการลวก

ปริมาณ *L. casei* ในสารละลายโพรไบโอติกเริ่มต้นคือ 9.23 ± 0.06 logCFU/มิลลิลิตร และไม่พบปริมาณ *L. casei* ในชั้นขนุนตัวอย่างควบคุมในแต่ละทริทเมนต์

จากการทดลองพบว่าวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและระยะเวลาในการแทรกซึมที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณ *L. casei* คงเหลือในตัวอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ปริมาณ *L. casei* ที่คงเหลือในชั้นขนุนหลังจากการแทรกซึมโพรไปโอติกด้วยวิธี AI, PVI และ UI ที่เวลาต่าง ๆ (n=2)

วิธีการแทรกซึม	เวลา (นาทีก)	ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือในตัวอย่าง (logCFU/กรัมตัวอย่าง (wet basis))
Atmospheric impregnation (AI)	15	6.04 ± 0.01 ^d
	30	6.12 ± 0.00 ^c
	45	6.17 ± 0.01 ^b
	60	6.22 ± 0.01 ^a
Pulsed-vacuum impregnation (PVI)	15	7.77 ± 0.02 ^c
	30	8.11 ± 0.01 ^b
	45	8.16 ± 0.00 ^a
	60	8.14 ± 0.02 ^{ab}
Ultrasonic impregnation (UI)	15	7.44 ± 0.01 ^c
	30	7.53 ± 0.05 ^b
	45	7.62 ± 0.03 ^a
	60	7.51 ± 0.01 ^{bc}

a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบระหว่างวิธีการแทรกซึมเดียวกัน

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นปริมาณ *L. casei* ภายหลังจากการเสริมโพรไปโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมที่ต่างกัน 3 วิธีที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ระยะเวลาที่ให้ปริมาณ *L. casei* คงเหลือสูงสุดในชั้นขนุนสำหรับวิธี AI คือ 60 นาที ซึ่งมีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 6.76 ± 0.02 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) ส่วนวิธี PVI คือ 45 นาที มีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 8.13 ± 0.02 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) และวิธี UI คือ 45 นาที มีปริมาณ *L. casei* เท่ากับ 7.62 ± 0.05 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) และจากการแทรกซึมทั้ง 3 วิธี พบว่าที่เวลาข้างต้นในชั้นขนุนเสริมโพรไปโอติกมี *L. casei* มากกว่า 6 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2561) ที่ระบุว่าอาหารที่มีโพรไปโอติกต้องมีจำนวนจุลินทรีย์โพรไปโอติกที่มีชีวิตคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 6 logCFU/กรัมตัวอย่าง








เมื่อพิจารณาผลของระยะเวลาการแทรกซึมเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกแต่ละวิธีพบว่า การแทรกซึมด้วยวิธี AI ใช้เวลานานกว่าวิธีอื่นๆ เพราะวิธี AI เป็นการแช่ในภาวะบรรยากาศจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพืช แต่แบคทีเรียจะค่อยๆ แทรกซึมผ่านช่องว่างของเนื้อเยื่อพืชอย่างช้าๆ ในขณะที่วิธี PVI มีปริมาณ *L. casei* เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 15 นาทีแรก จากนั้นมีปริมาณสูงสุดที่ 45 นาที เนื่องจากการให้ความดันสุญญากาศแบบพัลส์จะทำให้แก๊สที่อยู่ในชั้นโครงสร้างของผลไม้ถูกบีบอัดทำให้เกิดการแพร่และเคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อในขั้นตอนการให้ความดันสุญญากาศ เมื่อกลับคืนความดันบรรยากาศ สารละลายแบคทีเรียจะเข้ามาในเนื้อเยื่อของผลไม้แทน (Tylewicz และคณะ, 2013) จนถึงจุดที่ช่องว่างรูพรุนของเนื้อเยื่อไม่เหลือให้แบคทีเรียได้แทรกซึม ทำให้หน้าที่ที่ 60 มีปริมาณ *L. casei* ใกล้เคียงกับหน้าที่ที่ 45 และวิธี UI มีปริมาณ *L. casei* คงเหลือมากที่สุดที่เวลา 45 นาที และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อใช้เวลาในการทดลองนานขึ้นเนื่องจากการเกิดปรากฏการณ์ cavitation effect ที่ทำให้เกิดฟองอากาศในสารละลายที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ จนถึงจุดหนึ่งฟองอากาศนี้จะเกิดการยุบตัวและมีพลังงานมากพอที่จะทำให้ลายเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้เคียง อีกทั้งยังเกิดการก่อตัวของ H และ OH ระหว่างการเกิดควิเทชันในตัวกลางที่เป็นน้ำ อนุมูลเหล่านี้จะทำลายโครงสร้างทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้ผนังเซลล์อ่อนแอลงจนแบคทีเรียตายในที่สุด (Joyce และคณะ, 2003)

4.5 ผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อคุณภาพ ปริมาณ *L. casei* และร้อยละการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก

4.5.1 ลักษณะปรากฏและค่าสี

ลักษณะปรากฏและค่าสีของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธี AI, PVI และ UI ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 9 พบว่าค่า hue angle อยู่ในช่วง 77.82° - 79.80° บ่งบอกถึงคุณลักษณะของสีเหลือง

ตารางที่ 9 ค่าสีของขนมอบแห้งเสริมโปรไบโอติกด้วยวิธีต่างๆ ที่ผ่านการทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบปิด (n=2)

วิธีการแทรกซึม	ขนมอบสด	วิธี AI		วิธี PVI		วิธี UI	
		50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
ภาพถ่าย							
อุณหภูมิในการทำให้แห้ง		50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
L*	68.24 ± 0.48	62.92±0.79 ^b	62.51±0.28 ^b	65.98±0.83 ^a	63.83±0.07 ^b	65.55±0.71 ^a	63.51±0.44 ^b
a*	9.65 ± 0.13	10.91±0.76 ^{bc}	12.37±0.36 ^a	9.77±0.26 ^d	12.17±0.11 ^a	10.22±0.01 ^{cd}	11.72±0.44 ^{ab}
b*	58.55 ± 0.44	55.17±1.20 ^a	52.19±0.22 ^c	54.32±0.98 ^{ab}	54.34±0.72 ^{ab}	53.95±0.62 ^{abc}	52.77±0.21 ^{bc}
Hue	80.62 ± 0.12	78.15±1.18 ^{ab}	77.82±0.88 ^b	79.80±0.10 ^a	79.00±0.55 ^{ab}	79.29±0.12 ^{ab}	78.74±0.50 ^{ab}
Chroma	59.35 ± 0.44	56.40±1.47	53.40±0.04 ^b	55.20±1.01 ^{ab}	55.36±0.84 ^{ab}	54.91±0.61 ^{ab}	53.91±0.12 ^b
ΔE	-	7.47±0.27 ^b	8.83±0.47 ^a	5.24±0.12 ^d	6.49±0.59 ^c	5.67±0.18 ^{cd}	7.72±0.04 ^b

a, b, c,... แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05) เปรียบเทียบในแถวเดียวกัน

จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำแห้งสูงขึ้นจะทำให้ค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีเหลือง ($+b^*$) ลดลง แต่ค่าสีแดง ($+a^*$) เพิ่มขึ้นทั้งนี้อาจจะเนื่องจากการปฏิกิริยาออกซิเดชันของแคโรทีนอยด์ (Boon และคณะ, 2010) โดยเบต้าแคโรทีนเป็นเม็ดสีหลักที่พบมากในขนุน (Setiawan และคณะ, 2001) มีคุณสมบัติที่ไวต่อแสงและความร้อน ดังนั้นการทำแห้งจะเพิ่มอัตราการออกซิเดชันของโครงสร้างทางเคมีไม่อิ่มตัวของเบต้าแคโรทีน (Jayaraman และ Gupta, 2020) นอกจากนี้ Saxena และคณะ (2012) รายงานว่าการทำแห้งขนุนที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสส่งผลให้ค่า non-enzymatic browning index เพิ่มขึ้น และมีค่าสีเหลือง (b^*) ลดลง

ค่า ΔE ใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพสีและใช้สำหรับการประเมินความแตกต่างของสีโดยรวมระหว่างตัวอย่างแห้งและชิ้นขนุนสด ถ้าค่า ΔE มากหมายความว่ามีความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างแห้งและตัวอย่างสดมาก ทั้งนี้ตัวอย่างที่มีค่า ΔE น้อยที่สุดคือขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่ใช้วิธีการแทรกซึมแบบ PVI ที่ทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่มีค่า ΔE มากที่สุดคือขนุนอบแห้งที่ใช้วิธีการเสริมโพรไบโอติกแบบ AI ทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที

4.5.2 ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

ปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 10 พบว่าทุกตัวอย่างมีค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ต่ำกว่า 0.65 ซึ่งอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ ขนุนอบแห้งในการศึกษานี้มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 17.75 – 18.81%

ตารางที่ 10 ปริมาณความชื้น และค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ ของขนุนอบแห้งที่เสริมโพรไบโอติกด้วยวิธี AI, PVI และ UI ที่ทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับ (n=2)

วิธีการแทรกซึม/ ระยะเวลาการ แทรกซึม	ปริมาณความชื้น (%wet basis)		ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w)	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
AI (60 นาที)	18.81 ± 0.04 ^a	18.69 ± 0.03 ^a	0.6467 ± 0.00 ^a	0.6468 ± 0.00 ^a
PVI (45 นาที)	17.65 ± 0.16 ^b	17.58 ± 0.13 ^b	0.6406 ± 0.00 ^b	0.6408 ± 0.01 ^c
UI (45 นาที)	17.94 ± 0.18 ^b	18.03 ± 0.24 ^b	0.6413 ± 0.00 ^b	0.6421 ± 0.01 ^b

a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

วิธีการแทรกซึมโพโรไบโอติกที่ระยะเวลาต่างๆ ในการศึกษานี้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตี ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิทำแห้งเดียวกัน โดยพบว่าวิธี PVI และ UI ทำให้ขนมอบแห้งเสริมโพโรไบโอติกมีปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตีน้อยกว่าวิธี AI เนื่องจากวิธี PVI เป็นวิธีที่ทำให้แก๊สภายในรูพรุนไหลออกได้ง่ายขึ้นส่งผลให้น้ำภายในเนื้อเยื่อขนมอบระเหยออกได้ง่ายเมื่อนำไปทำแห้ง (Yuenyongputtakal, 2013) สอดคล้องกับการศึกษาของ Oliveira และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพโรไบโอติกในเมล่อนตัดแต่งด้วยวิธีการแทรกซึมในสภาวะสุญญากาศและการแช่ในสภาวะบรรยากาศต่อปริมาณความชื้นและจัดเก็บเป็นเวลา 8 วันพบว่าเมล่อนตัดแต่งที่เสริมในสภาวะสุญญากาศมี weight loss (%) มากกว่าการแทรกซึมด้วยการแช่ในสภาวะบรรยากาศตลอดอายุการเก็บรักษา

เช่นเดียวกับกับวิธีการแทรกซึมด้วยวิธี UI ที่สามารถลดปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตีของตัวอย่างเมื่อนำไปทำแห้ง เนื่องจากวิธี UI เป็นวิธีที่ทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อขนมอบเกิดการเสียรูปเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์ทำให้เกิดโพรงอากาศและสร้างช่องไมโครในเนื้อเยื่อของผลไม้ ช่องไมโครนี้จะช่วยลดชั้นขอบเขตการแพร่และเพิ่มการถ่ายเทมวลการพาความร้อนในตัวอย่าง (Dadan และคณะ, 2021) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fernandes และ Rodrigues (2007) รายงานว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ของน้ำได้ถึง 39.3% หลังจากใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 30 นาที และ 14.5% หลังจากใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 20 นาทีของตัวอย่างกล้วย (เมื่อเทียบกับประสิทธิภาพการกระจายน้ำของผลไม้สด) (ที่ความถี่ 25 kHz และความเข้มเท่ากับ 4870 W/m^2) ในขณะที่วิธี AI ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณความชื้นและค่าวอเตอร์แอกติวิตีสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้น้ำแพร่ออกจากเนื้อเยื่อได้อย่างจำกัด

4.5.3 ปริมาณ *L. casei* ในชั้นขนมอบแห้ง

ปริมาณ *L. casei* ในตัวอย่างก่อนและหลังการทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับ และร้อยละการรอดชีวิตในขนมอบแห้งเสริมโพโรไบโอติกด้วยวิธีต่างๆ แสดงดังตารางที่ 11 พบว่าอุณหภูมิในการทำแห้งมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ต่อปริมาณ *L. casei* โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำแห้งเป็น 60 องศาเซลเซียสส่งผลให้มีปริมาณ *L. casei* และร้อยละการรอดชีวิตในขนมอบแห้งเสริมโพโรไบโอติกลดลงทุกวิธีการแทรกซึมเมื่อเทียบกับการทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเนื่องจาก *L. casei* เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อความร้อน (Rodrigues และคณะ, 2018) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. casei* คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำแห้งเกินกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะทำให้เซลล์เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Mansouripour, Esfandiari และ Nateghi, 2013)

เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิทำแห้งเดียวกันพบว่าการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี PVI มีปริมาณ *L. casei* และร้อยละการรอดชีวิตสูงสุด โดยปริมาณ *L. casei* คงเหลือในชั้นขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธี PVI ของการทำแห้งที่ 50 องศาเซลเซียสคือ 7.76 ± 0.06 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ $89.08 \pm 0.13\%$ และการทำแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสมีปริมาณ *L. casei* คงเหลือเท่ากับ 5.90 ± 0.07 logCFU/กรัมตัวอย่าง (wb) และมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ $68.63 \pm 0.08\%$ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้เกิดกลไก hydrodynamic mechanism (HDM) สามารถพาสารละลายโพรไบโอติกเข้าไปแทนที่แก๊สในช่องว่างได้ (Radziejewska-Kubzdela, Bieganska-Marecik และ Kidon, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Oliveira และคณะ (2017) รายงานว่าการแทรกซึมโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* ในเมล่อนตัดแต่งในสภาวะสุญญากาศมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกคงเหลือมากกว่าการแช่ในสภาวะบรรยากาศ (8.61 และ 7.98 Log CFU/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับวิธี UI เป็นวิธีที่จะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในสารละลายโพรไบโอติก ทำให้เกิดปรากฏการณ์ Cavitation effect สามารถสร้างฟองอากาศที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดรูขนาดเล็กขึ้นในชั้นผลไม้ และเกิดการสร้างช่องไมโครในเนื้อเยื่อผลไม้ (Dadan และคณะ, 2021) ในขณะที่วิธี AI มีปริมาณ *L. casei* และ ร้อยละการรอดชีวิตน้อยที่สุดเนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่พบบนพื้นผิวของตัวอย่าง จึงมีโอกาสสัมผัสกับอากาศที่ร้อนมากกว่าทำให้แบคทีเรีย *L. casei* ตายได้ง่ายขึ้น (Rodrigues และคณะ, 2018)



ตารางที่ 11 ปริมาณ *L. casei* คงเหลือในชิ้นขนมอบแห้งที่เสริมโปรไบโอติกด้วยวิธีต่างๆ หลังการทำแห้งด้วยตู้อบแบบลมร้อนแบบภาตที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสและร้อยละการรอดชีวิตของโปรไบโอติก *L. casei* (n=2)

วิธีการ แทรกซึม	ปริมาณ <i>L. casei</i> ในตัวอย่างก่อนทำแห้ง (logCFU/กรัมตัวอย่าง (wet basis))	ปริมาณ <i>L. casei</i> คงเหลือในตัวอย่าง หลังทำแห้ง (logCFU/กรัมตัวอย่าง (wet basis))	การรอดชีวิตของโปรไบโอติก (%)			
	50°C	60°C	50°C			
	60°C	60°C	60°C			
AI	7.48 ± 0.02 ^c	7.42 ± 0.04 ^c	6.06 ± 0.01 ^{Ac}	4.45 ± 0.08 ^{Bc}	81.06 ± 0.07 ^{Ac}	59.89 ± 0.15 ^{Bb}
PVI	8.73 ± 0.12 ^a	8.60 ± 0.00 ^a	7.76 ± 0.06 ^{Aa}	5.90 ± 0.07 ^{Ba}	89.08 ± 0.13 ^{Aa}	68.63 ± 0.08 ^{Ba}
UI	7.76 ± 0.06 ^b	7.75 ± 0.01 ^b	6.56 ± 0.04 ^{Ab}	4.72 ± 0.05 ^{Bb}	84.63 ± 1.17 ^{Ab}	60.95 ± 0.11 ^{Bb}

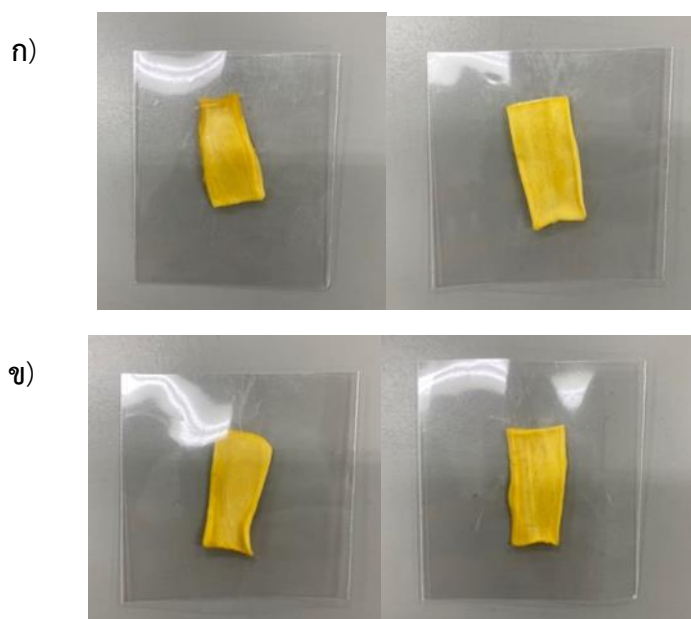
a, b, c,... แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

A และ B แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบตัวอย่างหลังทำแห้งที่อุณหภูมิต่างกัน

4.6 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสขนุนอบแห้งที่ผ่านการเสริมโพรไบโอติก

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสขนุนเสริม *L.casei* ด้วยวิธีการแทรกซึมแบบ PVI เป็นเวลา 45 นาที ทำแห้งด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับขนุนอบแห้งที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งที่สภาวะเดียวกันแสดงดังภาพที่ 22 เมื่อเปรียบเทียบความชอบของทั้ง 2 ตัวอย่างลักษณะคุณภาพด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 12) ซึ่งหมายความว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันตามลักษณะคุณภาพต่าง ๆ ผลการทดสอบด้วยวิธี Just about right scale ในลักษณะคุณภาพด้านสี ลักษณะปรากฏด้านการหัดตัว ลักษณะปรากฏด้านความสม่ำเสมอของสี เนื้อสัมผัส รสชาติ และกลิ่นผิดปกติ แสดงดังตารางที่ 13 และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบคุณภาพด้านสีและทางเคมีจากตารางที่ 14 พบว่าคุณภาพด้านสีมีความพอดีร้อยละ 73.33 โดยค่า hue angle ของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกเท่ากับ 80.12 ± 0.22 ซึ่งอยู่ในช่วงสีเหลือง ลักษณะปรากฏด้านการหัดตัวและด้านความสม่ำเสมอของสีมีความพอดีร้อยละ 73.33 เท่ากัน เมื่อสังเกตด้านการหัดตัวของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกพบว่าการหัดตัวด้านขอบของตัวอย่างเพียงเล็กน้อย และอาจจะมีสีที่ไม่สม่ำเสมอ สำหรับเนื้อสัมผัสมีความพอดีร้อยละ 73.33 เนื่องจากเมื่อทำแห้งเสร็จแล้วขอบของขนุนจะมีความหัดตัวและทำให้มีความแข็งมากกว่าเนื้อด้านใน รสชาติมีความพอดีร้อยละ 60 โดยความชอบนี้จะขึ้นอยู่กับความชอบของแต่ละบุคคล และผู้ทดสอบมีความคิดเห็นว่าตัวอย่างมีความเค็มเล็กน้อย ซึ่งเป็นสาเหตุจากสารละลายโพรไบโอติกที่มีส่วนประกอบของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แนวทางแก้ไขคือเปลี่ยนสารละลายโพรไบโอติกเป็นตัวอื่นที่ไม่มีรสชาติ และกลิ่นแทน ด้านความชอบโดยรวมอยู่ในระดับชอบเล็กน้อย และกลิ่นผิดปกติพบว่าไม่มีกลิ่นผิดปกติร้อยละ 80 ส่วนอีกร้อยละ 20 บอกว่ากลิ่นของตัวอย่างมีความพอดีแล้ว

เมื่อเปรียบเทียบค่าสีและค่าทางเคมีของขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติและแบบเสริมโพรไบโอติก (ตารางที่ 14) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งหมายความว่าผลิตภัณฑ์ทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสีและคุณภาพทางเคมี จึงทำให้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี hedonic scale ไม่มีความแตกต่างกันของทั้งสองตัวอย่าง



ภาพที่ 22 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยที่ ก) ขนุนอบแห้งธรรมชาติที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติก ข) ขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก

ตารางที่ 12 คะแนนความชอบ (Liking score) จากวิธี 9-point hedonic scale ของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกและขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งสภาวะเดียวกัน (n=15)

ลักษณะคุณภาพ	คะแนนความชอบ	
	ขนุนอบแห้งแบบธรรมชาติ	ขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก
สี ^{ns}	6.93 ± 1.03	7.20 ± 1.26
ลักษณะปรากฏ ^{ns}	7.07 ± 0.96	6.73 ± 1.33
เนื้อสัมผัส ^{ns}	5.73 ± 1.10	5.93 ± 1.71
รสชาติ ^{ns}	6.13 ± 1.46	5.47 ± 1.92
ความชอบโดยรวม ^{ns}	6.20 ± 1.32	5.87 ± 1.46

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 13 คะแนนร้อยละของผู้ทดสอบที่ให้คะแนนความพอดีจากวิธี just about right scale ของขงนอบแห่งเสริมโพรไปเอติก (n=15)

การทดสอบ	ระดับความพอดี (%)	
	น้อยเกินไป	พอดี
สี	0 (สีเหลืองจาง)	73.33 (สีเหลืองพอดี)
ลักษณะปรากฏด้านการหดตัว	6.67 (ไม่มีการหดตัว)	73.33 (หดตัวปานกลาง)
ลักษณะปรากฏด้านความสม่ำเสมอของสี	0 (สีมีความสม่ำเสมอ)	73.33 (สีมีความสม่ำเสมอพอดี)
เนื้อสัมผัส	6.67 (เนื้อสัมผัสนุ่มไป)	73.33 (เนื้อสัมผัสแข็งไป)
รสชาติ	20 (รสชาติหวานน้อย)	60 (รสชาติหวานพอดี)
กลิ่นผิดปกติ	80 (ไม่มี)	20 (ปานกลาง)
		20 (มากที่สุด)

มากเกินไป

(สีเหลืองเข้มเกินไป)

20
(หดตัวมากที่สุด)

26.67
(สีมีความสม่ำเสมอมากที่สุด)

20
(เนื้อสัมผัสแข็งไป)

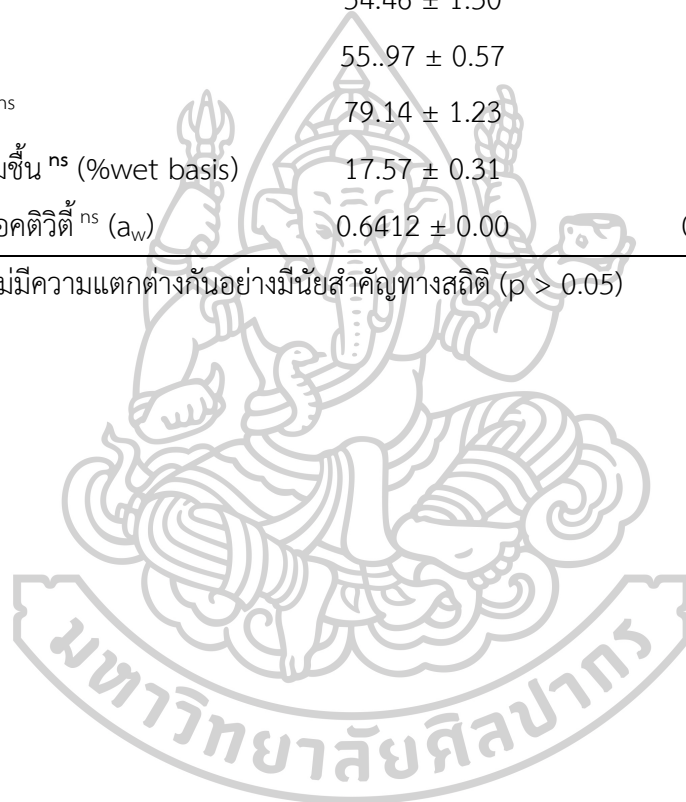
20
(รสชาติหวานมาก)

0 (มากที่สุด)

ตารางที่ 14 คุณภาพด้านสีและคุณภาพทางเคมีของขุ่นอบแห้งแบบธรรมชาติที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติก และขุ่นอบแห้งเสริมโพรไบโอติกที่ทำแห้งในสภาวะเดียวกันที่นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส (n=5)

พารามิเตอร์	ขุ่นอบแห้งแบบธรรมชาติ	ขุ่นอบแห้งเสริมโพรไบโอติก
L* ^{ns}	64.81 ± 1.20	64.52 ± 0.41
a* ^{ns}	10.44 ± 0.36	10.14 ± 0.23
b* ^{ns}	54.46 ± 1.30	53.90 ± 0.98
Chroma ^{ns}	55.97 ± 0.57	53.90 ± 0.98
Hue angle ^{ns}	79.14 ± 1.23	79.34 ± 0.35
ปริมาณความชื้น ^{ns} (%wet basis)	17.57 ± 0.31	17.81 ± 0.20
ค่าวอเตอร์แอกติวิตี ^{ns} (a _w)	0.6412 ± 0.00	0.6409 ± 0.00

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p > 0.05)



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการแทรกซึมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. casei* ในขนุนเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธี atmospheric impregnation (AI), pulsed-vacuum impregnation (PVI) และ ultrasonic impregnation (UI) ที่เวลาต่างๆ พบว่าระยะเวลาในการแทรกซึมที่ทำให้ขนุนมีปริมาณ *L. casei* สูงสุดสำหรับวิธี AI, PVI และ UI เท่ากับ 60, 45 และ 45 นาที ตามลำดับ จากนั้นใช้เวลาการแทรกซึมดังกล่าวนี้ศึกษาผลของวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติกและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* และคุณภาพของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกโดยทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง 30 นาที ตามลำดับด้วยตู้อบแห้งลมร้อนแบบถาด พบว่าขนุนอบแห้งที่ผ่านการแทรกซึมโพรไบโอติกด้วยวิธี PVI มีค่าความแตกต่างของสีเปรียบเทียบกับขนุนสด (ΔE) น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแทรกซึมอื่นๆ และ AI ทำให้ตัวอย่างมีค่า ΔE มากที่สุดสำหรับผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่อปริมาณ *L. casei* ที่เหลืออยู่ในชั้นขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกทั้งสามวิธีพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อปริมาณ *L. casei* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และการแทรกซึมด้วยวิธี PVI ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสทำให้ขนุนอบแห้งมีปริมาณ *L. casei* คงเหลือมากที่สุดเท่ากับ 7.76 ± 0.06 logCFU/กรัม และมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ $89.08 \pm 0.13\%$ โดยปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาที่ระบุว่าอาหารที่มีโพรไบโอติกต้องมีจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 6 logCFU/กรัม ในขณะที่การทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทำให้มีปริมาณ *L. casei* คงเหลือในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐานสำหรับทุกวิธีการแทรกซึมโพรไบโอติก และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีการแทรกซึมแบบ PVI เปรียบเทียบกับขนุนอบแห้งที่ไม่ผ่านการเสริมโพรไบโอติกพบว่าลักษณะคุณภาพด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาโดยวิธีการระเหยแห้ง

ควรเก็บหลอดในที่มีอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส หากเก็บหลอดที่อุณหภูมิห้องอายุการเก็บจะสั้นลง

สารเคมี

- | | |
|--|--------|
| 1. Polypeptone | 10 g |
| 2. Yeast extract | 2 g |
| 3. MgSO ₄ ·7·H ₂ O | 1 กรัม |
| 4. Distilled water | 1 L |

pH 7.0

การเตรียม rehydration fluid

ชั่ง polypeptone จำนวน 10 กรัม yeast extract 2 กรัม MgSO₄·H₂O 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักแบบหยาบทัศนียม 2 ตำแหน่ง นำสารเคมีมาผสมกันในบีกเกอร์ จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วยเครื่อง pH meter

วิธีการเพาะเลี้ยง

1. ใช้ตะไบหรือ ampoule cutter กรีดหลอดบริเวณกลางลำลิ แล้วใช้ตรอบหลอดลำลิชุบด้วยสารละลายเอทานอล 70% (v/v) (ใช้ลำลิหมด)
2. ใช้ผ้าหรือสำลีหนาปราศจากเชื้อหุ้มหลอดแล้วหักหลอด ห้ามใช้ผ้าหรือสำลีที่ชุบสารละลายเอทานอล กำจัดส่วนปลายหลอดที่หักเช่นเดียวกับกับวัสดุติดเชื้ออื่นๆ
3. ดึงจุกสำลีนอกแล้วลนปากหลอดผ่านไฟ แล้วเติม rehydration fluid ที่เหมาะสมประมาณ 0.3-0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดจุลินทรีย์
4. พักจุลินทรีย์ประมาณ 1-2 นาที แล้วผสมเบาๆให้เข้ากัน
5. ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงบนอาหารแข็งและ/หรืออาหารเหลว



ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ค่าทางกายภาพและทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นด้วยวิธี Hot air oven (AOAC, 1999)

1. อบกระป๋องหาความชื้นพร้อมฝาที่ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำมาชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นประมาณ 2 กรัม ใส่กระป๋องหาความชื้นที่อบจนน้ำหนักคงที่แล้ว บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

3. นำไปอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมกับตัวอย่าง

4. อบซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม จากนั้นคำนวณปริมาณความชื้นตามสมการที่ 6

$$MC(\%) = \frac{w_i - w_f}{w_i} \times 100 \quad (6)$$

เมื่อ	MC	หมายถึง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
	w_i	หมายถึง	น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
	w_f	หมายถึง	น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้

วิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ นำตัวอย่างสดและแห้งที่ปั่นละเอียด โดยใช้ประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในถ้วยสำหรับวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ ที่บรรจุตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่าง และวางหัววัดลงด้านบนของช่องใส่ตัวอย่าง รอจนกระทั่งเครื่องประมวลผลเสร็จ จะส่งสัญญาณดัง ซึ่งสามารถบันทึกผลที่ได้จากเครื่อง โดยควบคุมสภาวะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

ชั่งผง MRS broth 55.15 กรัมด้วยเครื่องชั่งแบบหยาดทัศนียม 2 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนิ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

ชั่งผง MRS agar 67.15 กรัมด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบทัศนียม 2 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสารละลายโดยปรับให้อุณหภูมิอยู่ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนิ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำออกไปมาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้เจลแข็งตัวก่อนเทใส่จานเพาะเชื้อ

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v)

ชั่งผง NaCl 9 กรัมด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบทัศนียม 2 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องนิ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

6. โซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.10 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบทัศนียม 2 ตำแหน่ง นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น คนให้เข้ากันจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร

7. สารละลายเอทานอล 30% (v/v)

ตวง ethanol 99.99% ปริมาตร 30 มิลลิลิตรด้วยกระบอกตวงจากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายเอทานอล 70% (v/v)

ตวง ethanol 99.99% ปริมาตร 70 มิลลิลิตรด้วยกระบอกตวงจากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

9. การคำนวณ CFU/g (dry basis)

นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วคำนวณหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็น CFU/g หรือ CFU/ml ได้จากสมการที่ 7

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้}}{\text{ปริมาตรที่ปิเปตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ} \times \text{dilution factor}} \quad (7)$$

เมื่อ dilution factor หมายถึง ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 25-250 โคโลนี



ภาคผนวก ค

ใบรายงานการทดสอบทางประสาทสัมผัส (Sensory Test)

เรื่อง การให้คะแนนความชอบ (9-point hedonic scale)

ผลิตภัณฑ์.....ชุดที่.....

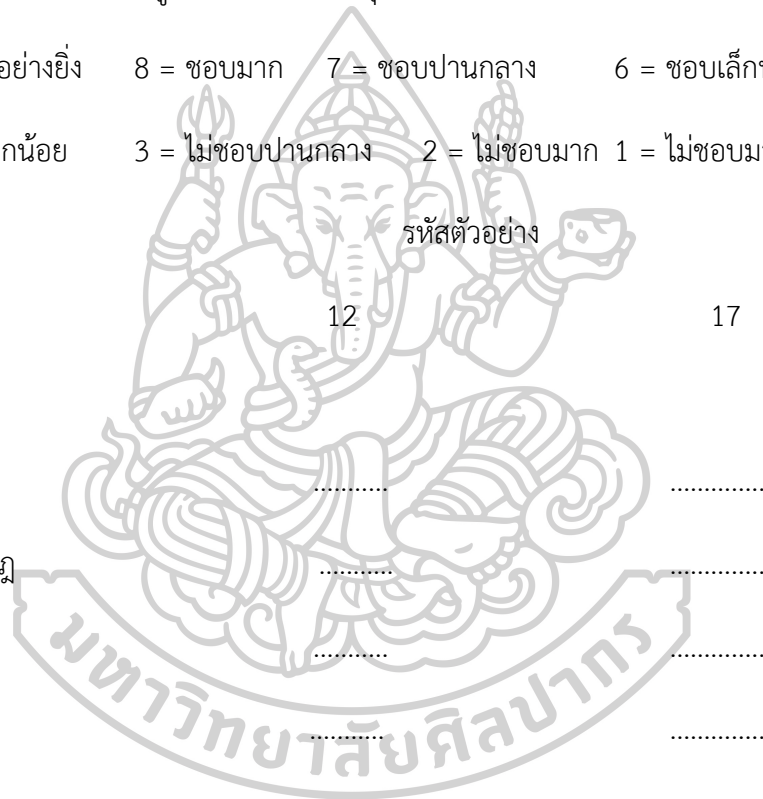
ชื่อ.....วันที่.....เวลา.....

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนตามความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9 = ชอบมากอย่างยิ่ง 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง 6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากอย่างยิ่ง

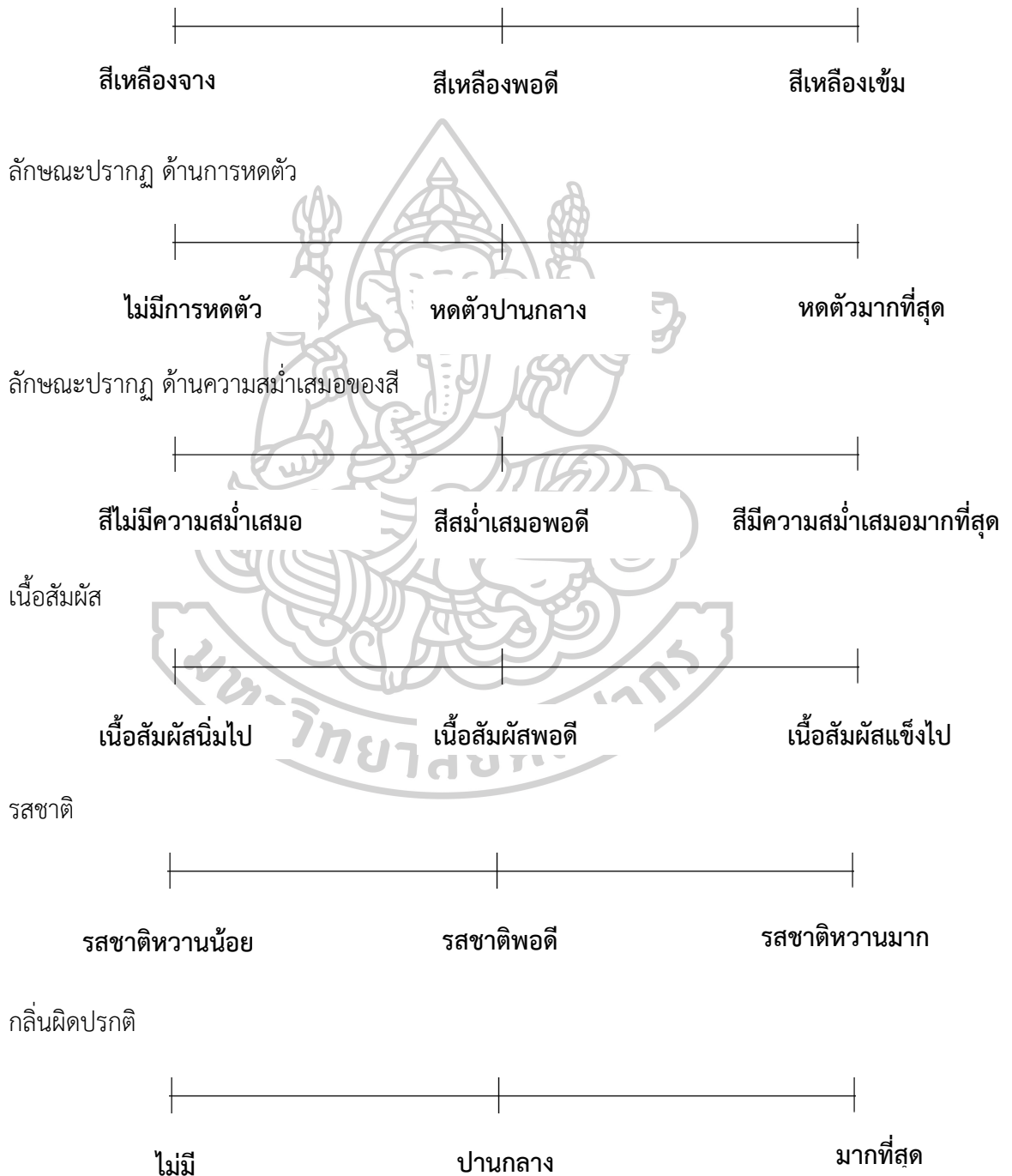
ปัจจัย	12	17
สี
ลักษณะปรากฏ
เนื้อสัมผัส
รสชาติ
ความชอบโดยรวม



เรื่อง การให้ระดับความเข้ม (Just about right scale)

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้เขียนรหัสตัวอย่างใต้สเกลที่กำหนดไว้ในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด (รหัสตัวอย่าง: 12, 17)

สี



ข้อเสนอแนะ

.....

.....







.....





ภาคผนวก ง

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงสีของขนมอบแห้งชุดควบคุมด้วยวิธีต่างกันได้แก่วิธี AI, PVI และ UI ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส (n=2)

วิธีการแพรรกซิม	วิธี AI		วิธี PVI		วิธี UI	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
ภาพถ่าย						
อุณหภูมิในการทำแห้ง	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
L*	64.38±0.24 ^b	62.38±0.26 ^c	66.14±1.02 ^a	64.09±0.02 ^b	65.98±0.68 ^a	63.64±0.49 ^{bc}
a*	10.83±0.79 ^b	13.14±0.12 ^a	9.30±0.66 ^c	10.76±0.52 ^b	10.17±0.30 ^{bc}	12.25±0.22 ^a
b*	53.58±0.52 ^{cd}	52.20±0.32 ^e	55.55±0.24 ^a	54.24±0.13 ^{bc}	54.35±0.01 ^b	53.35±0.05 ^d
Hue	78.57±0.69 ^{bc}	77.74±0.09 ^c	80.83±1.18 ^a	78.77±0.52 ^{bc}	79.61±0.07 ^{ab}	77.79±0.08 ^c
Chroma	54.67±0.67 ^{ab}	53.42±0.34 ^b	56.32±0.35 ^a	55.31±0.23 ^{ab}	56.73±2.08 ^a	54.59±0.03 ^{ab}
ΔE	6.88±0.11 ^{bc}	8.89±0.37 ^a	4.43±0.32 ^e	6.27±0.10 ^c	5.32±0.10 ^d	7.31±0.41 ^b

a, b, c,... แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบในแถวเดียวกัน

ตารางที่ 16 ปริมาณความชื้น (%wet basis) และค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) ของขนุนอบแห้งชุดควบคุมที่ใช้วิธี AI, PVI และ UI ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส (n=2)

วิธีการแทรกซึม/ ระยะเวลาการ แทรกซึม	ปริมาณความชื้น (%wet basis)		ค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w)	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
control AI (60 นาที)	18.89 ± 0.01 ^a	18.71 ± 0.03 ^a	0.6458 ± 0.00 ^a	0.6456 ± 0.00 ^a
control PVI (45 นาที)	16.16 ± 0.07 ^c	16.42 ± 0.07 ^b	0.5865 ± 0.01 ^c	0.5841 ± 0.00 ^c
control UI (45 นาที)	16.69 ± 0.16 ^b	16.72 ± 0.16 ^b	0.5962 ± 0.00 ^b	0.5969 ± 0.00 ^b

a, b, c,... แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

Control คือ ขันขนุนที่แช่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ 0.9% (w/v) แทนสารละลายโพรไบโอติก

ตารางที่ 17 ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจนและปริมาณยีสต์และราที่พบในขนุนอบแห้งเสริมโพรไบโอติก (n=2)

วิธีการแทรกซึม	ปริมาณจุลินทรีย์ใช้ออกซิเจน (CFU/กรัม)		ปริมาณยีสต์และรา (CFU/กรัม)	
	50 °C	60 °C	50 °C	60 °C
AI ^{ns}	7.33 ± 1.25 × 10 ¹	7.00 ± 0.82 × 10 ¹	0.00	0.00
PVI ^{ns}	7.33 ± 1.25 × 10 ¹	7.00 ± 1.63 × 10 ¹	0.00	0.00
UI ^{ns}	7.67 ± 1.25 × 10 ¹	7.33 ± 0.93 × 10 ¹	0.00	0.00

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รายการอ้างอิง

- Akman, P., Uysal, E., Ucak Ozkaya, G., Tornuk, F., & Durak, M. (2018). Development of probiotic carrier dried apples for consumption as snack food with the impregnation of *Lactobacillus paracasei*. *LWT*, *103*.
doi:10.1016/j.lwt.2018.12.070
- Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis*, *32*(11), 1567-1576.
doi:10.1086/320518
- Alzamora, S. M., Gerschenson, L. N., Vidales, S. L., & Nieto, A. (1997). Structural changes in the minimal processing of fruits: some effects of blanching and sugar impregnation. Retrieved from
<https://www.semanticscholar.org/paper/Structural-changes-in-the-minimal-processing-of-of-Alzamora-Gerschenson/310ed727e88a589defb8baf966ea7121bd81de63>
- Amara, A. A., & Shibl, A. (2015). Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, *23*(2), 107-114.
doi:10.1016/j.jsps.2013.07.001
- Anatriello, E., Cunha, M., Nogueira, J., Carvalho, J. L., Sá, A. K., Miranda, M., . . . Aimbire, F. (2019). Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet. *Cell Immunol*, *341*, 103928.
doi:10.1016/j.cellimm.2019.103928
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., & Hristozova, T. (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, *112*(1), 75-80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.015>
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC. (1999). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC

International, Gaithersburg, Maryland.

- Araújo, E., Pires, A. C., Pinto, M., Jan, G., & Carvahlo, A. (2012). *Probiotics in Dairy Fermented Products*. doi: 10.5772/51939
- Bethke, C., Sanford, R., Kirk, M., Jin, Q., & Flynn, T. (2011). The Thermodynamic ladder in Geomicrobiology. *American Journal of Science*, 311, 183-210. doi:10.2475/03.2011.01
- Betoret, N., Díaz, L., Díaz, M., Pagán, M., García, M., Gras, M. L., . . . Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56, 273-277. doi:10.1016/S0260-8774(02)00268-6
- Biekman, E. S. A., Kroese-Hoedeman, H. I., & Schijvens, E. P. H. M. (1996). Loss of solutes during blanching of mushrooms (*Agaricus bisporus*) as a result of shrinkage and extraction. *Journal of Food Engineering*, 28(2), 139-152. doi:[https://doi.org/10.1016/0260-8774\(95\)00030-5](https://doi.org/10.1016/0260-8774(95)00030-5)
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 50(6), 515-532. doi:10.1080/10408390802565889
- Cerdó, T., García-Santos, J. A., G. Bermúdez, M., & Campoy, C. (2019). The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. *Nutrients*, 11(3), 635. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/3/635>
- Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., Supraditareporn, W., Chokiatirote, E., & Van der Wiele, T. (2013). Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2229-2238. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6030>
- Chandrika, U. G., Jansz, E. R., & Warnasuriya, N. D. (2005). Analysis of carotenoids in ripe jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) kernel and study of their bioconversion in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 186-190. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.1918>
- Cui, L., Niu, L.-y., Li, D.-j., Liu, C.-q., Liu, Y.-p., Liu, C.-j., & Song, J.-f. (2018). Effects of different drying methods on quality, bacterial viability and storage stability of

- probiotic enriched apple snacks. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 247-255. doi:[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61742-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61742-8)
- Dadan, M., Nowacka, M., Wiktor, A., Sobczynska, A., & Witrowa-Rajchert, D. (2021). 4 - Ultrasound to improve drying processes and prevent thermolabile nutrients degradation. In F. J. Barba, G. Cravotto, F. Chemat, J. M. L. Rodriguez, & P. E. S. Munekata (Eds.), *Design and Optimization of Innovative Food Processing Techniques Assisted by Ultrasound* (pp. 55-110): Academic Press. doi:[10.1016/B978-0-12-818275-8.00010-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818275-8.00010-6)
- de la Fuente-Blanco, S., Riera-Franco de Sarabia, E., Acosta-Aparicio, V. M., Blanco-Blanco, A., & Gallego-Juárez, J. A. (2006). Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, 44, e523-e527. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ultras.2006.05.181>
- De, S., Pramanik, A., Das, A. K., Paul, S., Jana, S., & Pramanik, P. (2017). Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from curd and its pharmacological application in probiotic chocolate. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 335-339. doi:[10.31254/phyto.2017.6605](https://doi.org/10.31254/phyto.2017.6605)
- Díaz, L., Betoret, N., & Cortés Rodríguez, M. (2009). Evolution of probiotic content and color of apples impregnated with lactic acid bacteria. *Vitae*, 16, 297-303. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/260511651_Evolution_of_probiotic_content_and_color_of_apples_impregnated_with_lactic_acid_bacteria
- Dijkstra, A. R., Setyawati, M. C., Bayjanov, J. R., Alkema, W., van Hijum, S. A., Bron, P. A., & Hugenholtz, J. (2014). Diversity in robustness of *Lactococcus lactis* strains during heat stress, oxidative stress, and spray drying stress. *Appl Environ Microbiol*, 80(2), 603-611. doi:10.1128/aem.03434-13
- Dong, H., Rowland, I., & Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 459-470. doi:10.1017/S0007114511005824
- Emser, K., Barbosa, J., Teixeira, P., & Morais, A. M. M. B. (2017). *Lactobacillus plantarum* survival during the osmotic dehydration and storage of probiotic cut apple. *Journal of Functional Foods*, 38. doi:10.1016/j.jff.2017.09.021

- FAO/WHO. (2002). In: *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report Retrieved from https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Faria, A., De Rosso, V., & Mercadante, A. (2009). Carotenoid composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64, 108-115. doi:10.1007/s11130-009-0111-6
- Fernandes, F., & Rodrigues, S. (2007). Ultrasound as pre-treatment for drying of fruits: Dehydration of banana. *Journal of Food Engineering - J FOOD ENG*, 82, 261-267. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.02.032
- Fito, P., Chiralt, A., Barat, J., & Martínez-Monzó, J. (2000). Vacuum impregnation fruit processing. *Trends in Food Engineering*, 149-164. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/223202039_Practical_applications_of_vacuum_impregnation_in_fruit_and_vegetable_processing
- Flores, E., Pascual-Pineda, L. A., Alarcón-Elvira, F. G., Rascón-Díaz, M. P., Pimentel-González, D., & Beristain, C. (2017). Effect of vacuum on the impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* microcapsules in apple slices using double emulsion. *Journal of Food Engineering*, 202. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.02.005
- Fregonesi, R. P., Portes, R. G., Aguiar, A. M. M., Figueira, L. C., Gonçalves, C. B., Arthur, V., . . . Trindade, M. A. (2014). Irradiated vacuum-packed lamb meat stored under refrigeration: Microbiology, physicochemical stability and sensory acceptance. *Meat Science*, 97(2), 151-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.026>
- Gabler, F. M., Mansour, M. F., Smilanick, J. L., & Mackey, B. E. (2004). Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 96(6), 1354-1360. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02280.x>

- Galvão Martins, M., Nunes Chada, P. S., & da Silva Pena, R. (2019). Application of pulsed-vacuum on the salt impregnation process of pirarucu fillet. *Food Research International*, 120, 407-414.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.016>
- Gan, P., & Poh, P. E. (2014). INVESTIGATION ON THE EFFECT OF SHAPES ON THE DRYING KINETICS AND SENSORY EVALUATION STUDY OF DRIED JACKFRUIT. *International Journal of Science and Engineering*, 7. doi:10.12777/ijse.7.2.193-198
- Gobbetti, M., & Minervini, F. (2014). LACTOBACILLUS | Lactobacillus casei. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 432-438). Oxford: Academic Press. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001804>
- Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (1992). Probiotics for humans. In R. Fuller (Ed.), *Probiotics: The scientific basis* (pp. 355-376). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-2364-8_13
- Goswami, C., Hossain, M., Kader, H. A., & Islam, R. (2011). Assessment of Physicochemical Properties of Jackfruits' (*Artocarpus heterophyllus* Lam) Pulps. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 15, 26-31. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/317713927_Assessment_of_Physicochemical_Properties_of_Jackfruits'_Artocarpus_heterophyllus_Lam_Pulps
- Goyal, D., Swaroop, S., Prakash, O., & Pandey, J. (2022). Survival Strategies in Cold-Adapted Microorganisms. In (pp. 173-186). doi:10.1007/978-981-16-2625-8_8
- Hoover, D. G. (2014). Bifidobacterium. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 216-222). Oxford: Academic Press. doi:[10.1006/rwfm.1999.0170](https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0170)
- Hui, W., Zhang, W., Li, J., Kwok, L.-Y., Zhang, H., Kong, J., & Sun, T. (2022). Functional analysis of the second methyltransferase in the bacteriophage exclusion system of *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Dairy Science*, 105. doi:10.3168/jds.2021-21000
- Hung, M. N., Xia, Z., Hu, N. T., & Lee, B. H. (2001). Molecular and biochemical analysis of two beta-galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl Environ Microbiol*, 67(9), 4256-4263. doi:10.1128/aem.67.9.4256-4263.2001

- International food information council. (2020). 2020 Food & health survey. Retrieved from <https://foodinsight.org/wp-content/uploads/2020/06/IFIC-Food-and-Health-Survey-2020.pdf>
- Jagadeesh, S. L., Reddy, B. S., Swamy, G. S. K., Gorbali, K., Hegde, L., & Raghavan, G. S. V. (2007). Chemical composition of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) selections of Western Ghats of India. *Food Chemistry*, *102*(1), 361-365. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.027>
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(2), 254-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.001>
- Jayaraman, K., & Gupta, D. D. (2020). Drying of fruits and vegetables. In *Handbook of industrial drying* (pp. 643-690): CRC Press. Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780429289774-21/drying-fruits-vegetables-jayaraman-das-gupta>
- Joyce, E., Phull, S. S., Lorimer, J. P., & Mason, T. J. (2003). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem*, *10*(6), 315-318. doi:10.1016/s1350-4177(03)00101-9
- K P, S., Sbabu, P., & Bindu, J. (2012). Optimization of blanching process for tender jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.). *Indian Journal of Dairy & Biosciences*, *23*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/255722981_Optimization_of_blanching_process_for_tender_jackfruit_Artocarpus_heterophyllus_L
- Kaushal, P., & Sharma, H. K. (2014). Osmo-Convective dehydration kinetics of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *2*. doi:10.1016/j.jssas.2014.08.001
- Kothari, D., Patel, S., & Kim, S.-K. (2019). Probiotic supplements might not be universally effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 537-547. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.104>

- Lehtinen, M. J., Kumar, R., Zabel, B., Mäkelä, S. M., Nedveck, D., Tang, P., . . . Budinoff, C. R. (2022). The effect of the probiotic consortia on SARS-CoV-2 infection in ferrets and on human immune cell response in vitro. *iScience*, *25*(6), 104445. doi:<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104445>
- Li, P., & Gu, Q. (2018). Antimicrobial Effects of Probiotics and Novel Probiotic-Based Approaches for Infectious Diseases. In. doi:[10.5772/intechopen.72804](https://doi.org/10.5772/intechopen.72804)
- Lin, W. H., Hwang, C. F., Chen, L. W., & Tsen, H. Y. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol*, *23*(1), 74-81. doi:10.1016/j.fm.2005.01.013
- Mackie, R. I., Sghir, A., & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*, *69*(5), 1035s-1045s. doi:10.1093/ajcn/69.5.1035s
- Mahmoudi, R., Fakhri, O., Farhoodi, A., Kaboudari, A., Mahalleh, R., Tahapour, K., . . . Chegini, R. (2015). A Review on Probiotic Dairy Products as Functional Foods Reported from Iran. *International Journal of Food Nutrition and Safety*. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/283421436_A_Review_on_Probiotic_Dairy_Products_as_Functional_Foods_Reported_from_Iran
- Mansouripour, S., Esfandiari, Z., & Nateghi, L. (2013). The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation: a review. *Annals of Biological Research*, *4*, 83-87. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/310670796_The_effect_of_heat_process_on_the_survival_and_increased_viability_of_probiotic_by_microencapsulation_a_review
- Markowiak-Kopeć, P., & slizewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, *12*(4), 1107. doi:10.3390/nu12041107
- Mazzotta, A. S. (2001). Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Vegetables: Evaluation of Blanching Processes. *Journal of Food Protection*, *64*(3), 385-387. doi:10.4315/0362-028X-64.3.385

- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *103*(1), 109-115.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(8), 1255. doi:10.3390/molecules22081255
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in microbiology*, *9*, 757-757. doi:10.3389/fmicb.2018.00757
- Munekata, P. E., Pateiro, M., Tomasevic, I., Domínguez, R., da Silva Barretto, A. C., Santos, E. M., & Lorenzo, J. M. (2021). Functional fermented meat products with probiotics—A review. *Journal of Applied Microbiology*. doi:[10.1111/jam.15337](https://doi.org/10.1111/jam.15337)
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett*, *334*(1), 1-15. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). LACTIC ACID BACTERIA. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 3465-3472). Oxford: Academic Press. doi: [10.1016/B0-12-227055-X/00673-8](https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8)
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*, *15*(2), 300-310. doi:10.1002/ibd.20602
- Nissen, L., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2005). Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiology Letters*, *249*(1), 177-183. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.010
- Nowacka, M., Tylewicz, U., Laghi, L., Dalla Rosa, M., & Witrowa-Rajchert, D. (2014). Effect of ultrasound treatment on the water state in kiwifruit during osmotic dehydration. *Food Chemistry*, *144*, 18-25.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.129>

- Nualkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chem*, *129*(3), 1037-1044.
doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.071
- Oliveira, P., Ramos, A., Martins, E., Vieira, É., Soares, A., & Noronha, M. (2017). Comparison of vacuum impregnation and soaking techniques for addition of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* to minimally processed melon. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*. doi:10.1111/ijfs.13540
- Ong, B. T., Hamid, N., Osman, A., Quek, S. Y., Voon, Y. Y., Hashim, D., . . . Kong, Y. W. (2006). Chemical and flavour changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J3 during ripening. *Postharvest Biology and Technology*, *40*, 279-286.
doi:10.1016/j.postharvbio.2006.01.015
- ÖZER, B. H., & KIRMACI, H. A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, *63*(1), 1-15. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00547.x>
- Panesar, P., Kennedy, J., Knill, C., & Kosseva, M. (2010). Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology - BRAZ ARCH BIOL TECHNOL*, *53*. doi:10.1590/S1516-89132010000100027
- Parracho, H., McCartney, A., & Gibson, G. (2007). Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *66*, 405-411.
doi:10.1017/S0029665107005678
- Piecznywek, P. M., Koziół, A., Konopacka, D., Cybulska, J., & Zdunek, A. (2017). Changes in cell wall stiffness and microstructure in ultrasonically treated apple. *Journal of Food Engineering*, *197*, 1-8.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.10.028>
- Prado, F., Parada, J., Pandey, A., & Soccol, C. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*, 111-123.
doi:10.1016/j.foodres.2007.10.010
- Radziejewska-Kubzdela, E., Bieganska-Marecik, R., & Kidon, M. (2014). Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive

- characteristics of plant origin products--a review. *Int J Mol Sci*, 15(9), 16577-16610. doi:10.3390/ijms150916577
- Ranasinghe, S., Maduwanthi, T., & Marapana, R. (2019). Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. *International Journal of Food Science*, 2019, 1-12. doi:10.1155/2019/4327183
- Rascón, M., Huerta-Vera, K., Pascual-Pineda, L. A., Contreras-Oliva, A., Flores, E., Castillo-Morales, M., . . . González-Morales, I. (2018). Osmotic dehydration assisted impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* in banana and effect of water activity on the storage stability of probiotic in the freeze-dried product. *LWT*, 92. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.074
- Ribeiro, C., Freixo, R., Silva, J., Gibbs, P., Morais, A. M. M. B., & Teixeira, P. (2014). Dried Fruit Matrices Incorporated with a Probiotic Strain of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Studies*, 3, 69-73. doi:10.7455/ijfs/3.1.2014.a6
- Rodrigues, S., Silva, L., Mulet, A., Cárcel, J., & Fernandes, F. (2018). Development of dried probiotic apple cubes incorporated with *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Journal of Functional Foods*, 41, 48-54. doi:10.1016/j.jff.2017.12.042
- Rößle, C., Auty, M., Brunton, N., Gormley, T., & Butler, F. (2010). Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 203-209. doi:10.1016/j.ifset.2009.08.016
- Saarela, M. (2007). *Functional dairy products* (Vol. 2): Woodhead publishing limited. Retrieved from .<https://www.elsevier.com/books/functional-dairy-products/saarela/978-1-84569-153->
- Sahadeva, R., Leong, S., Chua, K., Tan, C., Chan, H., Tong, E., . . . Chan, H. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4). Retrieved from. <https://www.semanticscholar.org/paper/Survival-of-commercial-probiotic-strains-to-pH-and/709891b8b0c94a213fc90f433d4a9fb098c0aabb>
- Saxena, A., Bawa, A. S., & Srinivas Raju, P. (2008). Use of modified atmosphere packaging to extend shelf-life of minimally processed jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.)

- bulbs. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 455-466.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.020>
- Saxena, A., Maity, T., Raju, S. P., & Bawa, A. (2012). Degradation Kinetics of Colour and Total Carotenoids in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Bulb Slices During Hot Air Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 672-679. doi:10.1007/s11947-010-0409-2
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.013>
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., . . . Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14422-14427. doi:10.1073/pnas.212527599
- Setiawan, B., Sulaeman, A., Giraud, D. W., & Driskell, J. A. (2001). Carotenoid Content of Selected Indonesian Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(2), 169-176. doi:<https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0969>
- Shamsudin, R., Ling, C., Chin, N., Muda, N., & Osman, H. (2009). Chemical Compositions of the Jackfruit Juice (*Artocarpus*) Cultivar J33 During Storage. *Journal of Applied Sciences*, 9. doi:10.3923/jas.2009.3202.3204
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2013). Non dairy probiotic beverages. *International Food Research Journal*, 20, 7-15. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/286109887_Non_dairy_probiotic_beverages
- Singh, K., & Rao, A. (2021). Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. *Nutr Res*, 87, 1-12. doi:10.1016/j.nutres.2020.12.014
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology (Basel)*, 9(12). doi:10.3390/biology9120423
- Sperry, M. F., Silva, H. L. A., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Verruck, S., Prudencio, E. S., . . . Cruz, A. G. (2018). Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01:

- Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, 45, 435-443. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.015>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*, 36(1), 1-29. doi:10.1016/s0168-1605(96)01233-
- Swami, S. B., Thakor, N. J., Haldankar, P. M., & Kalse, S. B. (2012). Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 565-576. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00210.x>
- Tamer, C., & Çopur, Ö. U. (2010). Use of vacuum impregnation for minimally processed fruits and vegetables. *Acta Horticulturae*, 877, 577-582. doi:10.17660/ActaHortic.2010.877.75
- Tarleton, E. S. (1992). The role of Field-assisted techniques in solid/liquid separation. *Filtration & Separation*, 29(3), 246-238. doi:[https://doi.org/10.1016/0015-1882\(92\)80255-H](https://doi.org/10.1016/0015-1882(92)80255-H)
- Tham, C. S.-C., Peh, K.-K., Bhat, R., & Liong, M.-T. (2012). Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Annals of Microbiology*, 62(3), 1079-1087. doi:10.1007/s13213-011-0349-8
- Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prévost, H., & Dousset, X. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17(1), 23-31. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.01.004
- Tylewicz, U., Romani, S., Widell, S., & Gomez Galindo, F. (2013). Induction of Vesicle Formation by Exposing Apple Tissue to Vacuum Impregnation. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1099-1104. doi:10.1007/s11947-011-0644-1
- Valerio, F., Maria, G., Santagata, G., Boscaino, F., Barbarisi, C., Di Biase, M., . . . Lavermicocca, P. (2020). The viability of probiotic *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 coating on apple slices during dehydration and simulated gastro-intestinal digestion. *Food Bioscience*, 34, 100533. doi:10.1016/j.fbio.2020.100533

- Vasconcelos, F. M., Silva, H. L. A., Poso, S. M. V., Barroso, M. V., Lanzetti, M., Rocha, R. S., . . . Valença, S. S. (2019). Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. *Food Research International*, 123, 697-703. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.06.001>
- Vinderola, G., Burns, P., & Reinheimer, J. (2017). 44 - Probiotics in Nondairy Products. In F. Mariotti (Ed.), *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (pp. 809-835): Academic Press. Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/vegetarian-and-plant-based-diets-in-health-and-disease-prevention/mariotti/978-0-12-803968-7>
- Wang, Y., Corrieu, G., & Béal, C. (2005). Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 21-29. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72658-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72658-8)
- Worku, K., Kurabachew, H., & Umar, Y. (2021). Probiotication of Fruit Juices by Supplemented Culture of *Lactobacillus acidophilus*. 45-48. doi:10.5923/j.food.20190902.03
- Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34, 221-229. doi:10.1590/fst.2014.0050
- Yoon, K., Woodams, E., & Hang, Y. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 73-75. doi:10.1016/j.lwt.2004.04.008
- Yuenyongputtakal, W. (2013). Factors Influencing on Dewatering by Osmotic Dehydration of Fruits and Vegetables. *Burapha Sci. J.*, 18(1), 226-233.
- ศูนย์วิจัยระยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. (2564). เทรนด์ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพปี 2022. เข้าถึงเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2565. เข้าถึงได้จาก <http://fic.nfi.or.th/MarketOverviewWorldDetail.php?id=350>
- สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. (2562). ข้อมูลเพื่อการวางแผนพัฒนาการเกษตรรายสินค้าของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ประจำปีงบประมาณ 2562. เข้าถึงเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2565. เข้าถึงได้จาก <https://www.opsmoac.go.th/prachuapkhirikhan-dwl-files-412791791842>

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2561). หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร. เข้าถึงเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2565. เข้าถึงได้จาก http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_fda/61_Probiotic_Bacteria.pdf

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2564). เข้าถึงเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2565. เข้าถึงได้จาก <https://www.oae.go.th/view/รายละเอียดข่าว/ข่าวทั้งหมด/37105/TH-TH>





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จิตาภา นพพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	16 มิถุนายน 2539
สถานที่เกิด	กาญจนบุรี
วุฒิการศึกษา	สาขาเทคโนโลยีอาหาร วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	34/8 หมู่ 1 ต.ดอนชะเอม อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี 71130
ผลงานตีพิมพ์	Jidapa Nopphan, Pramote Khuwjitjaru, and Busarakorn Mahayothee. 2021. Effect of impregnation methods on cell viability of Lactobacillus casei and quality of probiotic-fortified dehydrated jackfruit. Silpakorn International Conference on Total Art and Science 2021 in conjunction with the 2nd International Conference on Engineering and Industrial Technology 2021 (ICEIT 2021) The International Virtual Conference on Art, Science & Technology, and Social Science. Online Conference Thailand. 3 November 2021 - 5 November 2021. pages 42-48.

