วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.3) September – December 2022 บทความวิจัย

ผลของสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันต่อการเหลือรอดของ *Lactobacillus plantarum* และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง

Effect of Different Coating Materials on the Survival of *Lactobacillus plantarum* and Quality of Mango Sorbet

ทิพรักษ์ วงษาดี*, เมขลา แจ้งอิ่ม, เอื้อมพร สันทนะ และ นวพร หงส์พันธุ์

Thippharak Wongsadee*, Makkala Jang-im, Auemporn Santhana and Nawaporn Hongpan

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Department of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University

Received : 20 December 2021

Revised : 6 February 2022

Accepted : 15 February 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกัน (เซลล์อิสระ, อัลจิเนต, อัลจิเนต-ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, อัลจิเนต-ไคโตซาน และอัลจิเนต-ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์-ไคโตซาน) ต่อร้อยละผลผลิตของเซลล์หลังการห่อหุ้ม ขนาดของเม็ดเจลโพรไบโอติก การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* ในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร และการป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลโพรไบโอติก นอกจากนี้ยังศึกษาคุณภาพของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่เติม *L. plantarum* (เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเป็นเม็ดเจล หรือเซลล์อิสระ) และการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่เก็บรักษาเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่ -18±2 °ซ ผลการวิจัยพบว่าการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในกระบวนการห่อหุ้มเซลล์ทำให้ขนาดเม็ดเจลอัลจิเนตใหญ่ขึ้น จาก 2.91 เป็น 3.11 มิลลิเมตร ($p<0.05$) การใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซานมีผลทำให้ *L. plantarum* รอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารสูงที่สุด ($p<0.05$) นอกจากนี้การเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานช่วยป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลได้ดีกว่าทุกกลุ่มการทดลอง การเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกทุกกลุ่มการทดลองมีผลทำให้อัตราการละลายของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้คะแนนการยอมรับด้านเนื้อสัมผัสและความโดยรวมของไอศกรีมลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เติมเซลล์อิสระ ($p<0.05$) นอกจากนี้การเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานมีผลทำให้การรอดชีวิตของ *L. plantarum* มากขึ้นในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษาที่ -18±2 °ซ โดยสรุปการใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซานมีการสูญเสียของ *L. plantarum* ทั้งหมดต่ำสุดตั้งแต่การห่อหุ้มเซลล์จนถึงสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร

คำสำคัญ : การห่อหุ้ม ; โพรไบโอติก ; ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ; ไคโตซาน ; ไอศกรีมซอร์เบท

Abstract

The objectives of this research were to study the effect of different encapsulation materials (free cell, alginate, alginate-fructooligosaccharide, alginate-chitosan, and alginate-fructooligosaccharide-chitosan) on encapsulation yield, size of probiotic beads, the survival of encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, and protection of probiotic beads from gallic acid. The qualities of mango sorbet fortified with *L. plantarum* (encapsulated or free cells) and viability of *L. plantarum* in mango sorbet during 5 weeks storage at -18±2°C were evaluated. The research results showed that the addition of fructo-oligosaccharide during microencapsulation of *L. plantarum* increased the size of the alginate beads from 2.91 to 3.11 millimeter ($p<0.05$). The beads of alginate with fructooligosaccharide and chitosan coating showed the highest survival of *L. plantarum* in simulated gastrointestinal conditions ($p<0.05$). In addition, the chitosan coating of alginate beads gave better protection of the penetration of a gallic acid within the beads than all types of beads. The addition of all types of beads significantly increased the melting rate of mango sorbet whereas the texture, and overall scores of mango sorbet decreased compared to free cells ($p<0.05$). Furthermore, the chitosan coating of alginate beads provided better *L. plantarum* survival in mango sorbet during storage at -18±2 °C. Conclusively, the beads of alginate with fructooligosaccharide and chitosan coating showed the lowest losses of the counts of total *L. plantarum* from the encapsulation to simulated gastrointestinal conditions.

Keywords : encapsulation ; probiotic ; fructooligosaccharide ; chitosan ; sorbet

***Corresponding author. E-mail** : thippharak.wo@bsru.ac.th

บทนำ

ผู้บริโภคอาหารในปัจจุบันมีความนิยมรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์อาหารในกลุ่มที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotic) จัดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่นิยมบริโภคกันอย่างต่อเนื่อง (Kandylis *et al*., 2016; Mantzourani *et al*., 2019) จุลินทรีย์โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค และเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค (FAO/WHO, 2006) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและอนุญาตให้ใช้ในอาหารสำหรับมนุษย์ เช่น *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* และ *Bifidobacterium longum* เป็นต้น (Chaiyasut 2013; Heller, 2001) สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีโพรไบโอติกโดยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต อย่างไรก็ตามผู้บริโภคบางกลุ่มไม่สามารถบริโภคนมได้ เช่น ผู้ที่แพ้โปรตีนในน้ำนมวัว ผู้ที่หลีกเลี่ยงอาหารที่มีคอเรสเตอรอลในน้ำนม รวมทั้งปัจจุบันมีผู้ที่รับประทานอาหารเจและอาหารทางเลือกที่ไม่ได้มาจากสัตว์มากขึ้น จึงมีการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโพรไบโอติกปราศจากนมมากขึ้น โดยใช้ส่วนประกอบอื่นแทน เช่น ผลไม้ ผัก และธัญพืช เป็นต้น (Kandylis *et al*., 2016) มะม่วงเป็นผลไม้เมืองร้อนที่สำคัญและนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีสีที่ดึงดูดใจ มีรสชาติและ มีกลิ่นหอมที่มีความเฉพาะตัว มะม่วงอุดมด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น คาโรทีนอยด์ (carotenoids) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่อยู่ในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ(Tharanathan *et al*., 2006) สำหรับสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญซึ่งพบในเนื้อมะม่วง เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) และแทนนิน (tannin) เป็นต้น (Pupaka, 2015) ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมมีปริมาณของแข็งสูงและมีค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงมีศักยภาพในการเป็นตัวกลางเพื่อนำส่งโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายผู้บริโภคได้ (Homayouni *et al*., 2012) ไอศกรีมซอร์เบท (sorbet) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำ น้ำตาล และมีองค์ประกอบของผลไม้อย่างน้อยร้อยละ 25 เนื้อไอศกรีมมีลักษณะเป็นเกล็ดละเอียดได้รสชาติผลไม้เข้มข้น (Goff & Hartel, 2013) จากลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงทำให้เหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมการรับประทานไขมันและได้รับประโยชน์มากขึ้นหากมีการเสริมโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ร่วมด้วย อย่างไรก็ตามการได้รับประโยชน์จากโพรไบโอติกนั้นจะต้องเหลือรอดหลังการผลิต ระหว่างการเก็บรักษา และระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภคด้วย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร กำหนดว่าต้องมีโพรไบโอติกเหลือรอดในอาหาร ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษาอาหารนั้น

จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถลดจำนวนลงได้ในระหว่างกระบวนการผลิตไอศกรีมเนื่องจากการตีปั่นอากาศที่มีปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้น รวมทั้งเซลล์ได้รับการบาดเจ็บจากการแช่แข็งที่มีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (Homayouni *et al*., 2012) นอกจากนี้องค์ประกอบในอาหารก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการลดจำนวนของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่ ค่า pH ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหาร (Champagne, 2009) รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิคที่พบในผลไม้บางชนิดมีผลต่อการต้านจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสด้วย (Radulovic *et al*., 2013) กระบวนการห่อหุ้มเซลล์หรือเอนแคปซูเลชัน (encapsulation) เป็นกระบวนการที่เซลล์โพรไบโอติกถูกห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่นเพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้บาดเจ็บและถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (extrusion) เป็นเทคนิคที่นิยมในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกที่มีชีวิตด้วยสารในกลุ่มไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloids) เช่น อัลจิเนต

(alginate) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีพิษ ราคาถูก และใช้สภาวะขึ้นรูปเป็นเม็ดเจลไม่รุนแรง (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014) อย่างไรก็ตามเม็ดเจลจากการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตมักไม่เสถียรในสภาวะที่เป็นกรดต่ำ และการมีสารคีเลต (chelating agent) ในผลิตภัณฑ์อาหาร (Nualkaekul *et al*., 2013) อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิคในอาหารสามารถซึมผ่านเข้าไปในเม็ดเจลอัลจิเนตได้ซึ่งมีผลต่อการลดลงของเซลล์โพรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษาได้ (Nualkaekul *et al*., 2013) ในการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าการเติมสารกลุ่มพรีไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตในการเป็นสารห่อหุ้มเซลล์ช่วยทำให้โพรไบโอติกรอดชีวิตได้สูงขึ้นเมื่อเทียบการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตอย่างเดียวในสภาวะอาหารที่มีค่า pH ต่ำ เช่น โยเกิร์ตและน้ำผลไม้ รวมทั้งสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและลำไส้มนุษย์ (Iyer & Kailasapathy, 2005; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014) นอกจากนี้การเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานมีผลในการช่วยปกป้องเซลล์โพรไบโอติกได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและลำไส้มนุษย์ สภาวะแช่เย็น สภาวะแช่แข็ง อีกทั้งช่วยป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลอัลจิเนตได้ (Nualkaekul *et al*., 2013; Farias *et al*., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้สารห่อหุ้มเซลล์ต่างกัน ได้แก่ 1) อัลจิเนตเพียงอย่างเดียว 2) อัลจิเนตร่วมกับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 3) อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน และ 4) อัลจิเนตร่วมกับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และการเคลือบด้วยไคโตซาน ที่มีผลต่อร้อยละผลผลิตของเซลล์หลังการห่อหุ้ม การป้องกันการซึมผ่านของสารภายนอกเข้าไปในเม็ดเจลโพรไบโอติก การเหลือรอดของโพรไบโอติก *L. plantarum* ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารมนุษย์ คุณภาพของซอร์เบทมะม่วงที่เติมเม็ดเจลโพรไบโอติก และการเหลือรอดของ *L. plantarum* ในผลิตภัณฑ์ซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่ -18±2 °ซ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก</u>

โพรไบโอติกที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 541 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อโพรไบโอติกให้มีความเข้มข้นในช่วง 10.50-11.0 log CFU/ml เพื่อทำการห่อหุ้มเซลล์โดยใช้วิธีเอ็กทรูชัน (extrution) ดัดแปลงจากวิธีของ Nualkaekul *et al*. (2013) การห่อหุ้มเซลล์แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 อัลจิเนต (ALG) กลุ่มที่ 2 อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ALG+FOS) กลุ่มที่ 3 อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน (ALG+CHI) และกลุ่มที่ 4 อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และการเคลือบด้วยไคโตซาน (ALG+FOS+CHI) การห่อหุ้มเซลล์สำหรับกลุ่มที่ 1 ทำได้โดยนำสารแขวนลอยเชื้อโพรไบโอติกมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงนำไปหยดลงในแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (แคลเซียมคลอไรด์ต้องมีอุณหภูมิ 4±2 °ซ) โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและระยะห่างระหว่างปลายเข็มจากผิวน้ำ 28 เซนติเมตร จากนั้นแช่เม็ดเจลไว้ 10 นาที ใช้ตะแกรงที่ปลอดเชื้อ กรองเม็ดเจลออกจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ส่วนกลุ่มที่ 2 เซลล์

ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ALG+FOS) เตรียมได้โดยนำโซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมกับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นรูปให้เป็นเม็ดเจลโดยใช้วิธีเอ็กทรูชันในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ตามขั้นตอนเช่นเดียวกันกับการเตรียมเม็ดเจลในกลุ่มที่ 1 ส่วนกลุ่มที่ 3 (ALG+CHI) และกลุ่มที่ 4 (ALG+FOS+CHI) ที่มีการเคลือบด้วยไคโตซานทำได้โดยนำเม็ดเจลอัลจิเนตที่เตรียมได้ตามวิธีข้างต้นมาแช่ในสารละลายไคโตซาน ร้อยละ 0.4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ใช้ตะแกรงที่ปลอดเชื้อ กรองเม็ดเจลออกมาแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็นเวลา 10 นาที กรองเม็ดเจลออกและล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ

2. <u>การวิเคราะห์คุณภาพของเม็ดเจลโพรไบโอติกหลังการห่อหุ้ม</u>

2.1 วัดขนาดของเม็ดเจล

นำเม็ดเจลที่ทำการห่อหุ้มตามข้อที่ 1 ทำการวัดขนาดของเม็ดเจลโดยการสุ่มเม็ดเจลออกมาตัวอย่างละ 10 เม็ด โดยใช้ไมโครมิเตอร์ (CSM3-13, Mitutoyo) ในการวัดขนาดเม็ดเจล

2.2 ร้อยละของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม

ดัดแปลงจากวิธี Gandomi *et al*. (2016) ชั่งน้ำหนักเม็ดเจลโพรไบโอติก ปริมาณ 10 กรัมในแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นเติมโซเดียมซิเตรทที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ใส่ในถุงปลอดเชื้อ ทำการตีบดตัวอย่างให้เม็ดเจลแตก ทำการเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับด้วยเพปโตน ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 นำตัวอย่างที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) ด้วยเทคนิค spread plate ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้อากาศ คำนวณร้อยละของเซลล์ *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้ม ดังสมการ

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม} = (N/N_0) \times 100$$

เมื่อ N คือ จำนวน *L. plantarum* ในเม็ดเจล และ N_0 คือ จำนวน *L. plantarum* ก่อนการห่อหุ้มเซลล์

2.3 ปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดหลังผ่านสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร

ทำการทดสอบการเหลือรอดในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Chavarri *et al*. (2010) ทำได้โดยเตรียมตัวอย่างเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์แล้วในแต่ละกลุ่มการทดลอง (ปริมาณ 1 กรัม) และเซลล์อิสระ (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเพปซิน 3 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 1 ชั่วโมง (สภาวะเลียนแบบระบบกระเพาะอาหารมนุษย์) นำออกมาปรับ pH เป็น 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร

5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 1 ชั่วโมง (สภาวะเลียนแบบระบบลำไส้มนุษย์) ทำการวิเคราะห์ปริมาณ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณเป็นร้อยละของปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดหลังผ่านสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น

2.4 การทดสอบการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจล

การทดสอบดัดแปลงจากวิธีของ Nualkaekul *et al*. (2013) นำเม็ดเจลที่ต้องการทดสอบจำนวน 50 เม็ด แช่ในสารละลายกรดแกลลิก ร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเม็ดเจลออกล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เติมสารละลาย Folin–Ciocalteu reagent ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที นำเม็ดเจลมาตัดผ่าครึ่ง ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล

3. <u>การวิเคราะห์คุณภาพของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่เติมเม็ดเจลโพรไบโอติกแตกต่างกัน</u>

3.1 การผลิตไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงเสริมโพรไบโอติก

เตรียมไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kaminska-Dworznicka *et al.* (2015) ประกอบไปด้วยมะม่วงแก้วขมิ้นหั่นชิ้นแช่แข็ง น้ำตาลทราย น้ำเชื่อม เกลือ กรดซิตริก เจลาติน และน้ำ (ร้อยละ 40, 10, 10, 0.1, 0.3, 0.3 และ 39.30 ตามลำดับ) นำส่วนผสมน้ำตาลทรายและเจลาตินมาละลายกับน้ำ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเชื่อม เกลือ และกรดซิตริกคนจนส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน พักไว้ให้เย็น นำส่วนผสมที่ได้ปั่นผสมรวมกับมะม่วงแช่แข็งหั่นชิ้นที่เตรียมด้วยวิธีปลอดเชื้อ ทำการปั่นผสมในเครื่องผสมอาหารเป็นเวลา 3 นาที บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท บ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำส่วนผสมที่ผ่านการบ่ม ปริมาตร 270 กรัม มาตีปั่นด้วยเครื่องทำไอศกรีม เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเซลล์อิสระ (30 มิลลิลิตร) หรือเม็ดเจลโพรไบโอติก (30 กรัม) นำมาตีปั่นด้วยเครื่องทำไอศกรีมต่อเป็นเวลา 5 นาที บรรจุในภาชนะปิดสนิท และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง -18±2 °ซ

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงเสริมโพรไบโอติก

3.2.1 ด้านจุลินทรีย์

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงโดยทำการเจือจางตัวอย่างไอศกรีม 25 กรัม ด้วยสารละลายเพบโตน ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Escherichia coli* ตามวิธี Bacteriological Analytical Manual (2002)

3.2.2 ด้านกายภาพ

การวัดร้อยละการขึ้นฟู ตามวิธีการของ Akin *et al*. (2007) ทำการชั่งน้ำหนักส่วนผสมทำไอศกรีม และน้ำหนักของไอศกรีมหลังตีปั่นด้วยเครื่องทำไอศกรีม และคำนวณดังสมการ

ร้อยละการขึ้นฟู = [(น้ำหนักของส่วนผสมทำไอศกรีม- น้ำหนักของไอศกรีม) / น้ำหนักของไอศกรีม] x 100

การวัดอัตราการละลายของไอศกรีม ดัดแปลงจากวิธีของ Akin *et al*. (2007) นำตัวอย่างไอศกรีมที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางไอศกรีมไว้บนตะแกรงที่มีภาชนะรองรับไอศกรีมอยู่ด้านล่าง ชั่งน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที

3.2.3 ด้านเคมี

ทำการวัดคุณภาพทางเคมีของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงหลังการแช่แข็งไอศกรีมไว้ที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ไอศกรีมละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) คำนวณหาปริมาณกรดในรูปกรดซิตริกและการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิคด้วยวิธี Folin–Ciocalteu reagent ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Singleton *et al*. (1999)

3.2.4 ด้านการยอมรับทางประสาทสัมผัส

การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงใช้วิธีการทดสอบแบบให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 คะแนน (9 -Point Hedonic Scale) โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนความชอบ คือ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 = ชอบมากที่สุด สำหรับคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส การละลายในปาก และความชอบโดยรวม โดยใช้แบบสอบถามกับผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 30 คน

4. <u>การวิเคราะห์ปริมาณ L. plantarum ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษา</u>

ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่เติมเม็ดเจลโพรไบโอติกหรือเซลล์อิสระที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ ตามวิธีในข้อที่ 3.2.1 ทั้งนี้ทำการวิเคราะห์ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

5. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

ข้อมูลจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางเดียว (one way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 เปรียบเทียบข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Rage Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

1. <u>ผลของการห่อหุ้ม L. plantarum ด้วยสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันต่อคุณภาพของเม็ดเจลหลังการห่อหุ้ม</u>

ผลของการใช้สารห่อหุ้มเซลล์ต่างกันในการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก *L. plantarum* จากตารางที่ 1 ผลพบว่าขนาดของเม็ดเจลโพรไบโอติกจากการใช้อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานมีขนาดไม่แตกต่างกับการใช้อัลจิเนตเป็นสารห่อหุ้มเพียงอย่างเดียว ($p>0.05$) โดยมีขนาดของเม็ดเจลอยู่ในช่วง 2.91-2.93 มิลลิเมตร แต่ขนาดของเม็ดเจลโพรไบโอติกจากสารห่อหุ้มเซลล์ 2 แบบ คือ แบบที่ใช้อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และแบบที่ใช้อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน มีขนาดของเม็ดเจลประมาณ 3.11-3.12 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดของเม็ดเจลโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้อัลจิเนตเป็นสารห่อหุ้มเพียงอย่างเดียว ($p<0.05$)

ร้อยละของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มเป็นการวัดปริมาณ *L. plantarum* ที่มีชีวิตที่ถูกกับเก็บไว้ภายในเม็ดเจลหลังกระบวนการห่อหุ้มเซลล์เทียบกับปริมาณ *L. plantarum* เริ่มต้น ผลพบว่าการใช้สารห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* ที่ต่างกันนั้นมีผลต่อผลผลิต

ของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งมีผลผลิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มประมาณ ร้อยละ 95 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ *L. plantarum* ถูกห่อหุ้มอยู่ในเม็ดเจลในปริมาณสูง

การทดสอบประสิทธิภาพของสารห่อหุ้มในการปกป้องเซลล์ *L. plantarum* จากสภาวะจำลองที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและสภาวะด่างในลำไส้เล็กแบบต่อเนื่อง ผลพบว่าการใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซาน มีปริมาณเซลล์ *L. plantarum* ที่เหลือรอดในระบบย่อยอาหารได้สูงกว่าสารห่อหุ้มแบบอื่น ($p<0.05$) โดยมีเซลล์ *L. plantarum* ที่เหลือรอด ร้อยละ 94.82 รองลงมา จำนวน *L. plantarum* ในเม็ดเจลที่ผ่านการห่อหุ้มแบบที่ใช้อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน (ร้อยละ 90.48) แบบที่ใช้อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ร้อยละ 83.71) และแบบที่ใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 78.30) ตามลำดับ โดยเซลล์ในกลุ่มที่ไม่ถูกห่อหุ้มมีจำนวนเหลือรอดน้อยที่สุด (ร้อยละ 70.33)

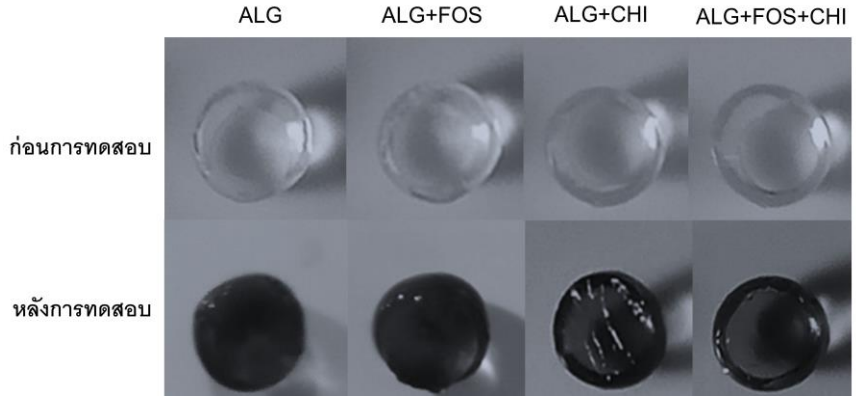
ตารางที่ 1 ขนาดของเม็ดเจลโพรไบโอติก ร้อยละของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม และการเหลือรอดหลังผ่านสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารของ *L. plantarum* ที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์ด้วยสารต่างกัน

คุณภาพหลังการห่อหุ้ม	สารที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์				
	FREE	ALG	ALG+FOS	ALG+CHI	ALG+FOS+CHI
ขนาดของเม็ดเจล (มิลลิเมตร)	-	2.91 ± 0.02^{b}	3.11 ± 0.03^{a}	2.93 ± 0.01^{b}	3.12 ± 0.01^{a}
ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (ร้อยละ) ^{ns*}	-	95.46±0.50	95.10±0.54	95.16±1.04	95.91±0.82
ปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดหลังผ่านระบบย่อยอาหาร (ร้อยละ)*	70.33 ± 2.38^{e}	78.30 ± 1.31^{d}	83.71 ± 0.90^{c}	90.48 ± 0.66^{b}	94.82 ± 0.36^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีตัวอักษร $^{a-e}$ ในแนวนอนต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), ^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$), * เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น 9.80-10.00 log CFU/g, FREE คือ เซลล์อิสระ (ไม่ห่อหุ้มเซลล์), ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบไคโตซาน

จากการศึกษาผลของสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันต่อการป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกซึ่งจำลองสภาวะในอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งอาจมีผลต่อการเหลือรอดของเซลล์ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษาได้ ซึ่งผลจากตารางที่ 2 ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงมีปริมาณฟีนอลิคอยู่ในช่วง 11.03-11.31 mg GAE/100 g sample จากการทดสอบประสิทธิภาพโดยนำเม็ดเจลแช่ในสารละลายกรดแกลลิกและเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับกรดแกลลิกและเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม ผลแสดงดังภาพที่ 1 ผลพบว่าเม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วยด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีการซึมผ่านของกรดแกลลิก

เข้าไปในเม็ดเจลมากที่สุด ส่วนเม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานมีการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่ไม่ได้เคลือบด้วยไคโตซาน



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มเซลล์ต่างกัน, ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน

2. ผลของการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มเซลล์ต่างกันต่อคุณภาพของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง

จากผลในตารางที่ 2 พบว่าการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มแตกต่างกันมีผลต่อปริมาณ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งมีปริมาณ *L. plantarum* อยู่ในช่วง 9.15-9.22 log CFU/g และไม่พบ *Escherichia coli* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงทุกกลุ่มการทดลอง สำหรับคุณภาพด้านกายภาพของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง ผลพบว่าการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มแตกต่างกันมีผลต่ออัตราการขึ้นฟูในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งมีร้อยละการขึ้นฟูอยู่ในช่วง 10.95-11.02 ส่วนอัตราการละลายของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง ผลพบว่าการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มทุกแบบมีผลต่ออัตราการละลายเพิ่มขึ้น (0.62-0.63 กรัม/นาที) เมื่อเทียบกับไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงกลุ่มควบคุมที่เติมโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์อิสระ (0.40 กรัม/นาที) ($p<0.05$) ส่วนคุณภาพด้านเคมีของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง ผลพบว่าการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มแตกต่างกันมีผลต่อค่า pH ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ และปริมาณฟีนอลิคในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เติมเซลล์อิสระ($p>0.05$) โดยค่า pH ของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงมีค่าอยู่ในช่วง 3.41-3.43 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ อยู่ในช่วงร้อยละ 0.30-0.33 และปริมาณฟีนอลิค อยู่ในช่วง 11.03-11.31 mg GAE/100 g

จากตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบทางประสาทสัมผัส ผลพบว่าการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มแตกต่างกันมีผลต่อคะแนนความชอบทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ และการละลายในปากของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เติมเซลล์อิสระ ($p>0.05$) โดยคะแนน

ความชอบด้านลักษณะปรากฏอยู่ในช่วง 7.76-7.96 (ชอบปานกลาง) ด้านกลิ่นอยู่ในช่วง 7.70-7.96 (ชอบปานกลาง) ด้านรสชาติอยู่ในช่วง 8.00-8.26 (ชอบมาก) และด้านการละลายในปากอยู่ในช่วง 7.50-7.73 (ชอบปานกลาง) แต่การเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มทุกแบบมีผลทำให้คะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมลดลงเมื่อเทียบกับไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงกลุ่มควบคุมที่เติมโพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์อิสระ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 คุณภาพด้านจุลินทรีย์ กายภาพและเคมีของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงโพรไบโอติกจากสารห่อหุ้มต่างกัน

คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไอศกรีม	สารที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์				
	FREE	ALG	ALG+FOS	ALG+CHI	ALG+FOS+CHI
<u>ด้านจุลินทรีย์</u>					
L. plantarum (log CFU/g) ^{ns}	9.22±0.10	9.16±0.06	9.15±0.06	9.16±0.15	9.17±0.08
E. coli (ในตัวอย่าง 0.1 กรัม)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
<u>ด้านกายภาพ</u>					
การขึ้นฟู (ร้อยละ) ^{ns}	11.02±0.55	10.95±0.62	10.99±0.56	10.95±0.62	10.96±0.64
อัตราการละลาย (กรัม/นาที)	0.40±0.01^{a}	0.63±0.01^{b}	0.63±0.02^{b}	0.62±0.02^{b}	0.62±0.01^{b}
<u>ด้านเคมี</u>					
ค่า pH ^{ns}	3.43±0.01	3.42±0.02	3.42±0.02	3.41±0.01	3.43±0.02
ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (ร้อยละ) ^{ns}	0.33±0.02	0.30±0.02	0.31±0.02	0.33±0.01	0.33±0.02
ปริมาณฟีนอลิค ^{ns}(mg GAE/100 g)	11.20±0.68	11.07±0.60	11.03±0.76	11.31±0.60	11.16±0.63

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีตัวอักษร $^{a-b}$ ในแนวนอนต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), ^{ns}ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$), FREE คือ เซลล์อิสระ (ไม่ห่อหุ้มเซลล์), ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน

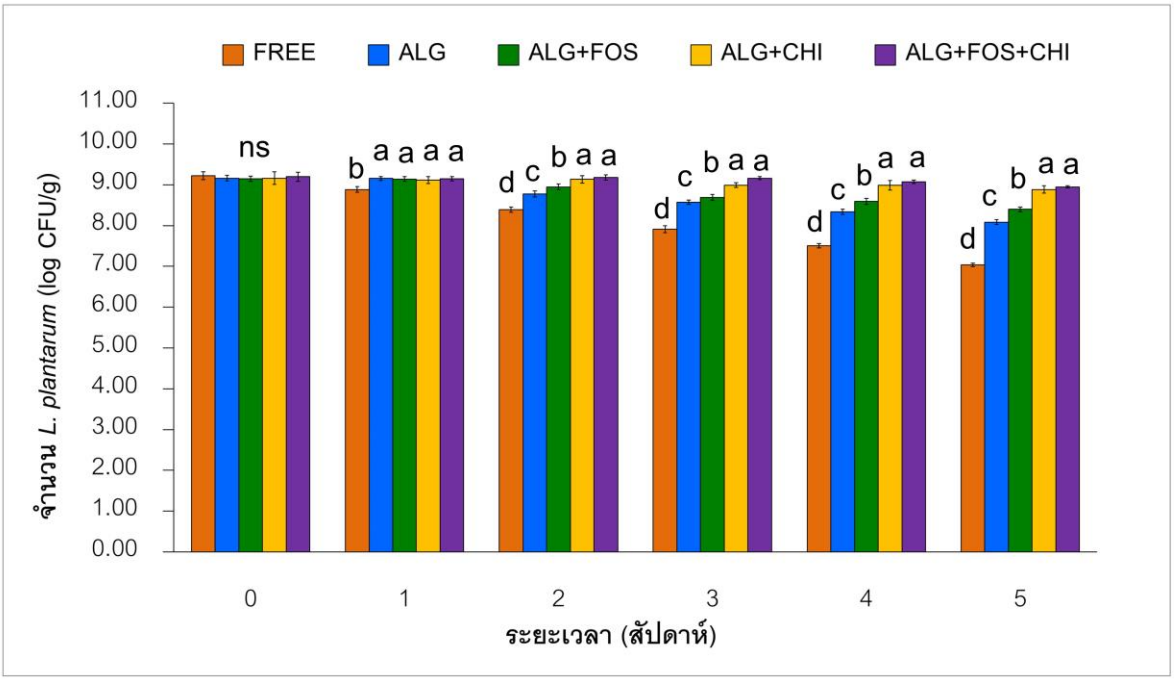
ตารางที่ 3 คะแนนความชอบทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงโพรไบโอติกจากสารห่อหุ้มต่างกัน

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	สารที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์				
	FREE	ALG	ALG+FOS	ALG+CHI	ALG+FOS+CHI
ลักษณะปรากฏ[ns]	7.93±0.58	7.86±0.68	7.96±0.71	7.76±0.56	7.80±0.61
กลิ่น[ns]	7.96±0.61	7.83±1.01	7.86±0.57	7.90±1.09	7.70±0.53
รสชาติ[ns]	8.26±0.44	8.13±0.68	8.10±0.54	8.00±0.69	8.23±0.56
เนื้อสัมผัส	8.10±0.54[a]	7.36±0.66[b]	7.03±0.66[b]	7.20±0.61[b]	7.30±0.46[b]
การละลายในปาก[ns]	7.73±0.44	7.53±0.50	7.50±0.50	7.63±0.49	7.60±0.49
ความชอบโดยรวม	8.23±0.62[a]	7.30±0.59[b]	7.23±0.56[b]	7.26±0.69[b]	7.20±0.55[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีตัวอักษร [a-b] ในแนวนอนต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), [ns] ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$), FREE คือ เซลล์อิสระ (ไม่ห่อหุ้มเซลล์), ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน

3. <u>ผลของสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันต่อการเหลือรอดของ L. plantarum ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษา</u>

ผลของการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกที่ใช้สารห่อหุ้มเซลล์ต่างกันในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง แสดงผลดังภาพที่ 2 พบว่าหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ จำนวน *L. plantarum* ที่เติมในรูปแบบเซลล์อิสระในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงมีจำนวนเหลือรอดน้อยกว่าในไอศกรีมที่เติมในรูปแบบเม็ดเจลโพรไบโอติกจากทุกสารห่อหุ้ม ($p<0.05$) และหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 2, 3 ,4 และ 5 สัปดาห์ พบว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน และการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานส่งผลให้จำนวน *L. plantarum* รอดชีวิตในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงสูงกว่ากลุ่มอื่น ($p<0.05$) รองลงมา คือ การห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ การห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเซลล์อิสระ ตามลำดับ



ภาพที่ 2 จำนวน *L. plantarum* ที่เหลือรอดในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่เติมเม็ดเจลจากสารห่อหุ้มเซลล์ต่างกันระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ เป็นเวลา 5 สัปดาห์, ตัวอักษร $^{a\text{-}d}$ ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน ($p < 0.05$), ^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเดียวกัน ($p > 0.05$), FREE คือ เซลล์อิสระ (ไม่ห่อหุ้มเซลล์), ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน

4. <u>ผลของสารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันต่อการสูญเสีย L. plantarum ในระหว่างกระบวนการห่อหุ้ม การเก็บรักษา และในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร</u>

จากตารางที่ 4 แสดงผลค่าเฉลี่ยการสูญเสียเซลล์ *L. plantarum* ในระหว่างจุดเริ่มต้นจากการผลิตถึงจุดสิ้นสุดที่สภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร ผลพบว่าในกระบวนการห่อหุ้มเซลล์มีการสูญเสียเซลล์ *L. plantarum* ในปริมาณที่ต่ำประมาณ ร้อยละ 4 เท่านั้น เมื่อเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกลงในไอศกรีมซอร์เบทพบว่ามีการสูญเสียของเซลล์ *L. plantarum* น้อยลงเมื่อเทียบกับการเติมในรูปแบบเซลล์อิสระ โดยการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานช่วยทำให้เซลล์ *L. plantarum* มีการสูญเสียน้อยลง ทั้งนี้การใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซานมีผลทำให้การสูญเสียเซลล์ *L. plantarum* น้อยที่สุด ในสภาวะระบบย่อยอาหารและการสูญเสียโดยรวมทั้งหมด

ตารางที่ 4 ปริมาณ *L. plantarum* ที่สูญเสียไประหว่างการห่อหุ้มเซลล์ การเก็บรักษาในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ ณ เวลา 5 สัปดาห์ และหลังผ่านสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร (แสดงค่าเฉลี่ย)

กระบวนการ	ปริมาณ *L. plantarum* ที่สูญเสีย (ร้อยละ)				
	FREE	ALG	ALG+FOS	ALG+CHI	ALG+FOS+CHI
การห่อหุ้มเซลล์	-	4.54	4.90	4.84	4.09
การเก็บรักษา ที่ -18±2 °ซ 5 สัปดาห์	23.64	11.80	8.20	2.94	2.71
หลังผ่านสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร	29.67	21.70	16.29	9.52	5.18
การสูญเสียรวม	53.31	38.04	29.40	17.30	11.98

หมายเหตุ FREE คือ เซลล์อิสระ (ไม่ห่อหุ้มเซลล์), ALG คือ อัลจิเนต, ALG+FOS คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ALG+CHI คือ อัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน, ALG+FOS+CHI คือ อัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซาน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการวิจัยการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานไม่มีผลต่อขนาดเม็ดเจล ในขณะที่การเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีผลทำให้ขนาดของเม็ดเจลอัลจิเนตเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Krasaekoopt & Watcharapoka (2014) ที่พบว่าการเติมพรีไบโอติก คือ อินนูลินและกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยอัลจิเนต มีผลทำให้ขนาดของเม็ดเจลใหญ่ขึ้น ซึ่งการเติมพรีไบโอติกบางชนิดมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความหนืดของส่วนผสมทำให้ขนาดหยดของสารผสมเพิ่มขึ้นนำไปสู่การก่อตัวเป็นเม็ดเจลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Serrano-Casas *et al*., 2017) ส่วนการใช้สารห่อหุ้มเซลล์ที่ต่างกันไม่มีผลต่อร้อยละของเซลล์ *L. plantarum* ที่ถูกห่อหุ้ม ซึ่งมีผลผลิตของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มประมาณ ร้อยละ 95 จัดว่า *L. plantarum* ถูกห่อหุ้มในเม็ดเจลปริมาณสูงเนื่องจากในกระบวนการขึ้นรูปเม็ดเจลมีการควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 10 °ซ และใช้เวลาสั้นทำให้ช่วยชะลอความเสียหายของเซลล์ เมื่อพิจารณาคุณสมบัติการเหลือรอดของ *L. plantarum* ในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารจะเห็นได้ว่าการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตมีผลทำให้ *L. plantarum* เหลือรอดมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้อัลจิเนตเพียงอย่างเดียวเช่นเดียวกันกับการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานก็มีผลทำให้ *L. plantarum* เหลือรอดมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์กับการเคลือบไคโตซาน ผลพบว่าการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานมีผลทำให้ *L. plantarum* เหลือรอดในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารมากกว่าการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนต สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen *et al*. (2005) ที่พบว่าการการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถปกป้องเซลล์โพรไบโอติก *B. longum, L. casei* subsp. *rhamnosus, B. bifidum* และ *L. acidophilus* ให้รอดชีวิตหลังจากผ่านสภาวะเลียนแบบระบบกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีได้มากขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าพรีไบโอติกจะเข้าไปปิดรูพรุนของเม็ดเจลไว้ ทำให้การแพร่ผ่านของกรดเข้าไปในเม็ดเจลได้น้อยลง อีกทั้งสารที่อยู่ในกลุ่มพรีไบโอติกมีคุณสมบัติไม่ถูกย่อยในสภาวะย่อยอาหารทำให้เป็นที่ยึดเกาะและปกป้องเซลล์โพร

ไบโอติกให้รอดชีวิตในสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้ได้มากขึ้น (Chandramoulia, *et al*., 2004; Iyer & Kailasapathy, 2005) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Chavarri *et al*. (2010) รายงานว่าการห่อหุ้มเซลล์ *B. bifidum* และ *L. gasseri* ด้วยอัลจิเนตร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานมีผลทำให้ *B. bifidum* และ *L. gasseri* รอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบกระเพาะอาหารและสภาวะเลียนแบบลำไส้ได้มากกว่าเซลล์อิสระซึ่งไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกซึ่งสามารถประกอบเป็นสารเชิงซ้อนพอลิอิเล็กโทรไลต์กับประจุลบของอัลจิเนตทำให้ได้เม็ดเจลที่มีความแข็งแรงมากขึ้น (Silva *et al*., 2005; Nualkaekul *et al*., 2013) รวมทั้งการที่อัลจิเนตมีประจุเป็นลบทำให้ส่วนที่ห่อหุ้มมีคุณสมบัติสามารถให้สารบางประเภทผ่านเข้าออกภายในเม็ดเจลได้ แต่เมื่อเคลือบด้วยไคโตซานที่มีประจุบวกมีผลทำให้เม็ดเจลมีคุณสมบัติให้สารที่ละลายในน้ำสามารถซึมผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้น้อยลงส่งผลให้การห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานช่วยปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ได้มากขึ้น (Koo *et al*., 2001) นอกจากนี้ผลการเหลือรอดของเซลล์ *L. plantarum* ในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารมีความสอดคล้องกับผลการทดสอบการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลที่พบว่าการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และการเคลือบไคโตซานทำให้กรดแกลลิกซึมผ่านเข้าไปในเม็ดเจลน้อยลงเมื่อเทียบกับเม็ดเจลที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว ซึ่งกรดแกลลิกจัดเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิคที่พบในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง ปริมาณ 11.03-11.31 mg GAE/100 g sample ดังนั้นการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และเคลือบด้วยไคโตซานสามารถป้องกันการซึมผ่านของสารภายนอกเข้าไปภายในเม็ดเจลได้ ซึ่งจะมีผลต่อการป้องกันเซลล์ *L. plantarum* ให้เหลือรอดในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงระหว่างการเก็บรักษามากขึ้น

ปริมาณโพรไบโอติก *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงทุกกลุ่มการทดลองหลังการผลิตอยู่ในช่วง 9.15-9.22 log CFU/g ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ามาตรฐานกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร กำหนดว่าต้องมีโพรไบโอติกเหลือรอดในอาหาร ไม่น้อยกว่า 6 log CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษา อาหารส่วนคุณภาพด้านจุลชีววิทยาตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 354 พ.ศ. 2556 เรื่อง ไอศกรีมที่กำหนดว่าไอศกรีมจะต้องไม่พบ แบคทีเรียชนิด *E. coli* ในไอศกรีม 0.01 กรัม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์บ่งชี้สุขลักษณะที่ดีในการผลิต จากผลการทดสอบในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงมีผลว่าไม่พบ *E. coli* ในทุกกลุ่มการทดลอง นอกจากนี้การเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกจากสารห่อหุ้มที่ต่างกันในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงไม่มีผลต่อค่า pH ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ และร้อยละการขึ้นฟู แต่การเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกทุกแบบมีผลทำให้อัตราการละลายของไอศกรีมเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไอศกรีมที่เติมเซลล์อิสระ สำหรับอัตราการละลายของไอศกรีมขึ้นอยู่กับขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในไอศกรีมโดยผลึกที่มีขนาดใหญ่จะมีการหลอมละลายสูงกว่าผลึกที่มีขนาดเล็ก (Akalin & Erisir, 2008) อาจเป็นไปได้ว่าไอศกรีมที่เสริมโพรไบโอติกในรูปแบบเม็ดเจลทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งใหญ่กว่าไอศกรีมที่เติมเซลล์อิสระ นอกจากนี้การเติมโพรไบโอติกในรูปแบบเม็ดเจลทำให้ไอศกรีมมีเนื้อสัมผัสไม่เรียบเนียนซึ่งมีผลทำให้การยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมของไอศกรีมที่เติมโพรไบโอติกในรูปแบบเม็ดเจลลดลงเมื่อเทียบกับไอศกรีมที่เติมเซลล์อิสระ อย่างไรก็ตามคะแนนยังอยู่ในระดับชอบปานกลาง (ประมาณ 7)

การเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตมีผลทำให้การรอดชีวิตของ *L. plantarum* ในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงได้มากขึ้นเช่นเดียวกันกับการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานก็มีผลทำให้เซลล์เหลือรอดมากขึ้น เมื่อเทียบกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียวและเซลล์อิสระ อย่างไรก็ตามการใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และการเคลือบด้วยไคโตซานจะมีเซลล์เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาไม่ต่างกับกลุ่มที่เคลือบไคโตซานอย่างเดียว สำหรับ

การลดลงของจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกในไอศกรีมมีผลมาจากในขั้นตอนการแช่แข็ง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เซลล์บางส่วนบาดเจ็บและตาย รวมไปถึงการมีอยู่ของออกซิเจน ปริมาณกรดและสารอาหารอื่นๆ (Champagne, 2009; Homayouni *et al*., 2012) สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานว่าการเติมพรีไบโอติกร่วมกับอัลจิเนตในการเป็นสารห่อหุ้มเซลล์ช่วยทำให้โพรไบโอติกรอดชีวิตในอาหารที่มีค่า pH ต่ำระหว่างการเก็บรักษาได้สูงขึ้น ตามรายงานวิจัยของ Krasaekoopt & Watcharapoka (2014) ที่พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* ด้วยอัลจิเนตที่เติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีผลทำให้ *L. casei* รอดชีวิตในโยเกิร์ตและน้ำส้มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้สูงกว่ากลุ่มที่ใช้อัลจิเนตห่อหุ้มอย่างเดียว อีกทั้งการศึกษาของ Nualkaekul *et al*. (2013) รายงานว่าการห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* ด้วยอัลจิเนตและเคลือบไคโตซานช่วยป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลอัลจิเนตได้ทำให้เซลล์ *L. plantarum* รอดชีวิตในน้ำทับทิมและน้ำแครนเบอร์รี่ที่อุดมด้วยสารประกอบฟีนอลิกได้มากขึ้นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับการใช้อัลจิเนตอย่างเดียวและเซลล์อิสระ นอกจากนี้การศึกษาของ Farias *et al*. (2019) พบว่าการห่อหุ้มเซลล์ *L. casei* และ *L. rhamnosus* ด้วยอัลจิเนตและเคลือบไคโตซานมีผลในการช่วยปกป้องเซลล์ให้รอดชีวิตในไอศกรีมจากผลมอมบิน (mombin) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °ซ เป็นเวลา 150 วัน ได้สูงกว่ากลุ่มที่เติมเซลล์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามจำนวนโพรไบโอติกที่เหลือรอดในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงทุกกลุ่มการทดลอง ที่อุณหภูมิ -18±2 °ซ ณ 5 สัปดาห์ มีปริมาณมากกว่ามาตรฐานกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2554 เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารที่กำหนดว่าต้องมีโพรไบโอติกเหลือรอดในอาหาร ไม่น้อยกว่า 6 log CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษาอาหารนั้น

สรุปผลการวิจัย

การห่อหุ้มเซลล์ *L. plantarum* ด้วยสารห่อหุ้มเซลล์ต่างกันมีผลต่อขนาดของเม็ดเจล โดยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีผลทำให้ขนาดเม็ดเจลใหญ่ขึ้น การห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจิเนตที่เติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเคลือบด้วยไคโตซานมีผลทำให้ *L. plantarum* รอดชีวิตในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารได้มากที่สุด อีกทั้งการเคลือบเม็ดเจลอัลจิเนตด้วยไคโตซานช่วยป้องกันการซึมผ่านของกรดแกลลิกเข้าไปในเม็ดเจลได้มากที่สุด เมื่อทำการเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกทุกกลุ่มการทดลองในไอศกรีมซอร์เบทมะม่วง ผลพบว่าไม่มีผลต่อค่า pH ร้อยละปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ และร้อยละการขึ้นฟู แต่การเติมเม็ดเจลโพรไบโอติกทุกแบบมีผลทำให้อัตราการละลายของไอศกรีมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมลดลงเมื่อเทียบกับไอศกรีมกลุ่มควบคุมที่เติมเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาไอศกรีมซอร์เบทมะม่วงเสริมโพรไบโอติกในสภาวะแช่แข็งเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าการใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซานจะมีเซลล์ *L. plantarum* เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาไม่ต่างกับกลุ่มที่เคลือบไคโตซานอย่างเดียว แต่การใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และการเคลือบด้วยไคโตซานสามารถปกป้องเซลล์ *L. plantarum* ในระหว่างการผ่านสภาวะระบบย่อยอาหารได้ดีมากกว่า สรุปโดยรวมการใช้ร่วมกันระหว่างการเติมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเม็ดเจลอัลจิเนตและการเคลือบด้วยไคโตซานมีการสูญเสียเซลล์ *L. plantarum* ทั้งหมดตั้งแต่จุดเริ่มต้นจากการผลิตถึงจุดสิ้นสุดที่สภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหารน้อยที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

เอกสารอ้างอิง

Akalin, A. S. & Erisir, D. (2008). Effect of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of Food Science*, *73*(4), 184-188.

Akin, M. B., Akin, M. S. & Kirmaci, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chemistry, 104* (1), 93-99.

Bacteriological Analytical Manual. (2002). Chapter 4 Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. Retrieved May 1, 2015, from https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4.

Champagne, C. P. (2009). Prebiotics and probiotics science and technology. (1). New York : Springer.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods, 56*(1), 27–35.

Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F., & Villaran, M. d. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology, 142*(1–2), 185–189.

Chen, K.-N., Chen, M.-J., Liu, J.-R., Lin, C.-W., & Chiu, H.-Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science, 70*(5), 260–266.

Chaiyasut, C. (2013). Probiotic alternative microorganism for health. (1). Nonthaburi : Department of Thai traditional and alternative medicine, Ministry of public health. (in Thai)

FAO/WHO. (2006). Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. (85) Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Farias, T. G. S. de, Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Costa Medeiros, J. A., Mendonca Soares, B. L., Stamford Arnaud, T. M., & Stamford, T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. *LWT - Food Science and Technology, 100*, 391-396.

Gandomi, H., Abbaszadeh, S., Misaghi, A., Bokaie, S., & Noori, N. (2016). Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology, 69,* 365–371.

Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2013). Ice cream. (7). New York : Springer.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(2), 374–379.

Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S., & Ejtahed, H. (2012). Factors influencing probiotic survival in ice cream: A review. *International Journal of Dairy Science, 7*(1), 1–10.

Iyer, C., & Kailasapathy, K. (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science, 70*(1), 18-23.

Kaminska-Dworznicka, A., Matusiak, M., Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., Gondek, E., Jakubczyk, E., & Antczak, A. (2015). The influence of kappa carrageenan and its hydrolysates on the recrystallization process in sorbet. *Journal of Food Engineering, 167*, 162–165.

Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science, 7*, 58–63.

Krasaekoopt, W. & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *Food Science and Technology, 57*, 761-766.

Koo, S. M., Cho, Y. H., Huh, C. S., Baek, Y. J., & Park, J. (2001). Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 11*, 376–383.

Mantzourani, I., Kazakos, S., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A., & Plessas, S. (2019). Potential of the probiotic *Lactobacillus Plantarum* ATCC 14917 strain to produce functional fermented pomegranate juice. *Foods, 8*(1), 4.

Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International, 53*(1), 304–311.

Pupaka, D. (2015). The evaluation of phytochemical content, antioxidant activity and total phenolic content of the native mango in Chachoengsao province. *KKU Science Journal, 43*(2), 267-283. (in Thai)

Serrano-Casas, V., Perez-Chabela, M. L., Cortes-Barberena, E., & Totosaus, A. (2017). Improvement of latic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. *Journal of Functional Foods, 38*, 293-297.

Silva, C. M., Ribeiro, A. J., Figueiredo, M., Ferreira, D., & Veiga, F. (2005). Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *The AAPS Journal, 7*, 903–913.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, (299),* 152–178.

Tharanathan, R. N., Yashoda, H. M., & Prabha, T. N. (2006). Mango (*Mangifera indica* L.), "The King of fruits" —An overview. *Food Reviews International, 22*(2), 95–123.