



การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยโดยใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก

Lactobacillus plantarum

Development of native Thai rice drink products using probiotic bacteria

Lactobacillus plantarum

เรณู อยู่เจริญ¹ สโรชา กายเพชร² ปฐมาวดี เข็นจตุรัส² ฐาปกรณ์ ชุมพล² และ ศรัณย์ พรหมสาย^{2*}

¹ สาขาชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์

อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ 60000

² โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

*E-mail: saranpromsai@hotmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 951 และนำไปประยุกต์ในการทำผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มข้าว จากการตรวจสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตในเมล็ดข้าว 12 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตจากข้าวพื้นเมืองได้ 11 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวขาวอากาศ ข้าวหับทิมชุมแพ ข้าวขาวเจ๊ก ข้าวหอมใบเตย ข้าวเหลืองประทิว ข้าวอีเดี้ย ข้าวเล็บนก ข้าวตาแห้ง ข้าวสังข์หยด ข้าวแพรงแดง และ ข้าวอุบล เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร 10 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธี agar well diffusion พบว่า *L. plantarum* TISTR 951 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ทุกชนิด นอกจากนี้ *L. plantarum* TISTR 951 ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเมล็ดเลือดแดง เมื่อนำข้าวเหลืองประทิวและแพรงแดงไปพัฒนาเป็นคาริเออร์สำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 951 พบว่า ในเครื่องดื่มที่ใช้ข้าวเหลือง

Received: August 15, 2017

Revised: December 28, 2017

Accepted: December 28, 2017

ปะทิวชนิดน้ำนมข้าวมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 93.51 รองลงมาคือ เครื่องดื่มไข่มุกจากข้าวมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 90.98 และเครื่องดื่มไข่มุกจากข้าวผสมวุ้นมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 83.92 สำหรับเครื่องดื่มที่ใช้ข้าวแพรงชนิดเครื่องดื่มไข่มุกจากข้าวผสมวุ้นมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 98.99 รองลงมาคือ เครื่องดื่มไข่มุกจากข้าวมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 92.75 และน้ำนมข้าวมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 91.63 ในการตรวจสอบความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยาในผลิตภัณฑ์ข้าวผสมโปรไบโอติกภายหลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* แต่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ใช้อากาศประมาณ 10^3 CFU/mL และพบยีสต์และราประมาณ 10^4 CFU/mL จากการศึกษาสามารถนำไปปรับปรุง พัฒนา และนำไปปรับใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์เกิดผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกใหม่ๆ ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อให้นุชนมีสุขภาพที่ดีต่อไป

คำสำคัญ: น้ำนมข้าว โปรไบโอติก การตรึงเซลล์ คาร์เรียร์ แบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ ข้าวสายพันธุ์ไทย

Abstract

The purposes of this research were to evaluate the properties of probiotic strain *L. plantarum* TISTR 951 and the application of this strain for rice drink products. The capability of bacteria for carbohydrate utilization of Thai rice grains was then evaluated, the results showed that *L. plantarum* TISTR 951 had an ability to hydrolyze carbohydrates in 11 cultivars of rice grains i.e. Kao-Argad, Taptim-Chumpae, Kao-Jek, Hom-Baitoey, Lueng-Patiw, E-Tia, Lepnok, Tahaeng, Sangyod, Phrae Dann and U-Bon. The test of antibacterial activity using an agar well diffusion method revealed that *L. plantarum* TISTR 951 could inhibit the growth of all pathogens including *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. In probiotic-supplemented rice production using Lueng Patiw cultivars as carrier for probiotic bacteria, *L. plantarum* TISTR 951 could grow well in all beverage products. The highest survival rates (93.51%) was found in rice milk, followed by rice bubble drink (90.98%) and agar-rice bubble drinks (83.92%). Whereas in products using Phrae Dang cultivar, the highest survival rates (98.99%) was found in agar-rice bubble drinks, followed by rice bubble drink (92.75%) and rice milk (91.63%). For microbiological safety test in probiotic products, *E. coli* was not found in all products, whereas the aerobic bacteria were about 10^3 CFU/mL and molds were about 10^4 CFU/mL after storage at 4°C for 1 month. According to the data, this study can be further improved, developed and applied to new probiotic products for healthy food industries.

Keywords: Rice milk, Probiotic, Cell immobilization, Carrier, Intestinal pathogenic bacteria, Thai rice cultivar

1. บทนำ

“โพรไบโอติก” หมายถึง สำหรับชีวิตหรือส่งเสริมชีวิต โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค แต่สร้างประโยชน์ต่อร่างกาย คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอ จะทำให้เกิดผล ที่เป็นประโยชน์ต่อด้านสุขภาพ [1] ในปัจจุบันโพรไบโอติกเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายไปทั่วโลก แบคทีเรียโพรไบโอติกที่รู้จักกันเป็นอย่างดี ได้แก่ กลุ่มของ *Lactobacillus* โดยจะผลิตกรดแลคติก และสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านทั้งมนุษย์และสัตว์ โพรไบโอติกจะช่วยปรับระบบความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะแตกต่างจากการทำงานของยาปฏิชีวนะที่จะทำลาย หรือยับยั้งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดทั้งที่มีโทษและไม่มีโทษ โพรไบโอติกถือเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่ดีต่อมนุษย์และสัตว์ ได้ถูกผลิตออกมาในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก ทั้งในรูปของผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม การคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับคนและสัตว์นั้น มีแนวทางหลัก คือ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้ ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ และมีอัตราการรอดชีวิตในปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ประมาณ $10^7 - 10^9$ CFU/mL ของผลิตภัณฑ์ [2] แต่เมื่อจะใช้โพรไบโอติกนั้น สำหรับมนุษย์ สิ่งที่ต้องมุ่งเน้นก็คือ เรื่องความปลอดภัย ดังนั้นหลักเกณฑ์ของการคัดเลือกโพรไบโอติกตามหลักทฤษฎีเบื้องต้น จะครอบคลุมถึงเรื่องความปลอดภัย ประโยชน์ และลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำโพรไบโอติกไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารสำหรับมนุษย์

Carrier หรือ คาริเออร์ มีความสำคัญต่อโพรไบโอติกเป็นอย่างมาก ซึ่งเปรียบได้กับโฮสต์หรือตัวพา สำหรับแบคทีเรียโพรไบโอติก เมื่อมีแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์อย่างแบคทีเรียโพรไบโอติกเข้าไปยึดเกาะหรืออาศัยอยู่นั้น ถือเป็นการเพิ่มมูลค่าให้วัตถุดิบนั้น ๆ ซึ่งมีความสำคัญมาก เพราะว่าวัตถุดิบแต่ละชนิด แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถยึดเกาะและรอดชีวิตได้ต่างกัน ดังนั้นการที่จะหาวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมนั้นจึงเป็นเรื่องค่อนข้างใหม่ และยังไม่ค่อยมีการศึกษาทางเรื่องนี้นักมากนัก คาริเออร์ จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ คาริเออร์ที่มาจากผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับนม และผลิตภัณฑ์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับนม เช่น เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ ธัญพืช รวมถึงซ็อกโกแลต เป็นต้น [3] เมื่อรับประทานแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตที่เกาะอยู่บนคาริเออร์เข้าไปจะช่วยให้งานทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในระบบทางเดินอาหาร

ข้าว เป็นธัญญาหารหลักของประชากรโลกที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ปลูกขึ้นได้ง่าย ทนทานต่อสภาพภูมิประเทศหลากหลายในโลก รวมทั้งในประเทศไทย ข้าวไทยเป็นสินค้าส่งออกที่มีมายาวนาน เมื่อกล่าวถึงผู้ผลิตข้าวรายใหญ่ของโลก ไทยจัดว่าเป็นประเทศที่มีชื่อเสียงในด้านการส่งออกข้าวติดอันดับต้นๆของโลกมาโดยตลอด นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีข้าวพื้นเมืองที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงอีกหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวขาวอากาศ ข้าวทับทิมชุมแพ ข้าวขาวเจ๊ก ข้าวหอมใบเตย ข้าวเหลืองปะทิว ข้าวอีโต้ ข้าวเล็บนก ข้าวตาแห้ง ข้าวสังข์หยด ข้าวแพรวแดง ข้าวอุบล และข้าวพญาลิมาแกง [4] ดังนั้นจึงสมควรที่จะมีการส่งเสริมข้าวไทยพื้นเมืองให้ติดตลาด ไม่เกิดการสูญหายของสายพันธุ์ พัฒนาข้าวไทยพื้นเมืองให้มีมูลค่า

สูงขึ้น อีกทั้งยังทำให้ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย มีชื่อเสียงและเป็นที่รู้จักไปทั่วโลก เป็นการส่งเสริม และรักษาสายพันธุ์ข้าวที่ดีของไทยไว้ให้ลูกหลาน สืบต่อไป จึงมีการนำสายพันธุ์ข้าวที่มีประโยชน์ และคุณค่าทางด้านโภชนาการสูง มาทำเป็น ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น พัฒนาออกมาใน รูปแบบของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผสมไข่มุก ซึ่งมี คุณค่ากับการตลาด และถือเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจของผู้บริโภคที่ได้รับผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ และ คีตต่อสุขภาพอีกด้วย

ในการวิจัยครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อทดสอบ คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *L. plantarum* TISTR 951 และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ที่มีข้าวไทยสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นวัตถุดิบหลัก

2. วัตถุประสงค์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัตถุดิบหลักและสายพันธุ์จุลินทรีย์

ตัวอย่างข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 12 สายพันธุ์คือ ข้าวขาว อากาศ ข้าวทับทิมชุมแพ ข้าวขาวเจ๊ก ข้าวหอม ไบเบย ข้าวเหลืองประทิว ข้าวอีเคี้ย ข้าวเล็บนก ข้าว ตาแห้ง ข้าวสังข์หยด ข้าวแพร่แดง ข้าวอุบล และ ข้าวพญาลิมาแก้ว ได้จากการเก็บตัวอย่างจากนาข้าว ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดนครสวรรค์และซื้อ จากตลาดต่าง ๆ ของประเทศไทย ตัวอย่างเมล็ดข้าว ได้ถูกนำมาอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (UF450, Memmert, Germany) ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดโดยใช้เครื่องบดและร่อน ด้วยตะแกรงให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

เชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 เป็นเชื้อมาตรฐานที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง

ประเทศไทย (วว.) เชื้อแบคทีเรียถูกเลี้ยงลงใน อาห 19 de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS, Merck, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค 10 ชนิดได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ถูกนำมาใช้ เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ในระบบทางเดินอาหาร ได้รับความอนุเคราะห์จาก โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์ และวิทยาศาสตร์และคณะสัตวแพทยศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตในข้าว

ทำการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตใน ข้าวโดยดัดแปลงจากวิธีของ Ratithammatorn และ คณะ [5] โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 ลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย เปปโตนร้อยละ 1 ู้นร้อยละ 1.2 และเมล็ดข้าวที่ผ่านการบดละเอียดร้อยละ 3 ซึ่งใช้ข้าว 12 สายพันธุ์ ทำการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตในข้าวโดยใช้วิธีการ point inoculation เชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน จากนั้นตรวจผลโดยการ หยดสารละลายไอโอดีนลงไปบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบความสามารถในการย่อย คาร์โบไฮเดรตจากเมล็ดข้าวจากบริเวณสีที่เกิดขึ้น รอบๆรอยการเจริญ วัดการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)

2.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดยดัดแปลงจากวิธีของ Tulumoglu และคณะ [6] นำ *L. plantarum* TISTR 951 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ $10^6 - 10^7$ CFU/mL จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย Sodium hydroxide ที่ปราศจากเชื้อ และอีกส่วนหนึ่งไม่มีการปรับ pH

นำแบคทีเรียมาทดสอบซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง 10 ชนิด เพาะลงในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI, Merck, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 0.5 ซึ่งมีจำนวนเชื้อประมาณ $10^6 - 10^7$ CFU/mL จากนั้นเกลี่ยน้ำเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร BHI agar ด้วยไม้พ่นสำลีปราศจากเชื้อ เจาะหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร ด้วย Cork borer

หยดส่วนใสที่ได้จากเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 ลงไปในหลุมที่เจาะไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็น negative control และใช้

Streptomycin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิตร เป็น positive control

2.4 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 โดยวิธี stab ลงในอาหาร Blood agar ที่ใช้เลือดวัวร้อยละ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยใช้วิธีของ Forbes และคณะ [7] โดยมี *Staphylococcus aureus* KPS01 เป็น positive control

2.5 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มข้าวผสมโปรไบโอติก

การผลิตเชื้อสด : นำเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตในข้าว ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 951 เลี้ยงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวถั่วเหลืองถั่วเขียว ซึ่งเป็นอาหารที่มีส่วนประกอบจากธรรมชาติและมีราคาถูก เหมาะสำหรับการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้เซลล์สดที่มีความชื้นประมาณร้อยละ 20-30 เพื่อนำไปใช้ผสมกับคาร์เอร์ ซึ่งเป็นข้าวไทยในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อช่วยในการยัดเกาะกับเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผสมไข่มุกจากข้าวผสมโปรไบโอติก ในรูปแบบต่าง ๆ 3 รูปแบบ ดังนี้

รูปแบบที่ 1 : เครื่องดื่มไข่มุก

นำเมล็ดข้าวเหลืองประทิวและข้าวแพรวแดงมาบดละเอียดเป็นผง จากนั้นนำไปผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วนำไป

ให้ความร้อนจนมีความหนืดประมาณ 5 นาที นำไป cooling ที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที ให้ อุณหภูมิลดลงเพื่อที่จะสามารถนำเซลล์สดผสมลงไปได้ เมื่อผสมเซลล์สดลงไปแล้ว นำช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ pasteurization แล้วนำมาตักใส่ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการ pasteurization แล้วบีบใส่ลงบีกเกอร์ที่มี CaCl_2 อยู่ ทั้งไว้สักครู่ แล้วบรรจุใส่ภาชนะที่มีน้ำสะอาดอยู่และปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สังเกตอัตราการรอดชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน (Control ของเครื่องต้มไข่มุก คือผลิตภัณฑ์เครื่องต้มไข่มุกที่ไม่ผสมเซลล์สดลงไป)

รูปแบบที่ 2 : เครื่องต้มไข่มุกผสมผงวุ้น

นำเมล็ดข้าวเหลืองปะทิวและข้าวแพรวแดงมาบดละเอียดเป็นผง จากนั้นนำไปผสมกับน้ำและวุ้นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 0.5 (น้ำหนักต่อน้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วนำไปให้ความร้อนจนมีความหนืดประมาณ 3-5 นาที นำไป cooling ที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ใส่เซลล์สดผสมลงไป คนให้เข้ากัน จากนั้นนำช้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาตักใส่ในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วบีบใส่ลงบีกเกอร์ที่มี CaCl_2 อยู่ ทั้งไว้สักครู่ แล้วบรรจุใส่ภาชนะที่มีน้ำสะอาดอยู่และปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สังเกตอัตราการรอดชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน (Control ของเครื่องต้มไข่มุกผสมวุ้น คือผลิตภัณฑ์เครื่องต้มไข่มุกผสมวุ้นที่ไม่ผสมเซลล์สดลงไป)

รูปแบบที่ 3 : น้านมข้าว

นำเมล็ดข้าวเหลืองปะทิวและข้าวแพรวแดงมาบดละเอียดเป็นผง จากนั้นนำไปผสมกับน้ำ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) นำไปให้ความร้อนจนเดือด นำไป cooling ที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที ใส่เซลล์สดผสมลงไป

แล้วเขย่าให้เข้ากัน บรรจุใส่ภาชนะและปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สังเกตอัตราการรอดชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน (Control ของน้านมข้าว คือผลิตภัณฑ์เครื่องต้มน้านมข้าวที่ไม่ผสมเซลล์สดลงไป)

2.6 การตรวจสอบความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ข้าวไทย

ตรวจสอบความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 โดยการนับจำนวนเชื้อ ในผลิตภัณฑ์ข้าวไทยในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยวิธี dilution plate count บนอาหาร MRS โดยทำการนับจำนวนเชื้อทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นคำนวณอัตราการรอดชีวิต (ร้อยละ) ดังสมการที่ดัดแปลงจาก Bao และคณะ [8]

Survival rate (ร้อยละ)

$$= \text{Log CFU N1} / \text{Log CFU N0} \times 100$$

โดย

N1= จำนวนเชื้อรอดชีวิตสุดท้าย (CFU/g หรือ CFU/ml),

N0 = จำนวนเชื้อเริ่มต้น (CFU/g หรือ CFU/mL)

2.7 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์และการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาหลังการผลิต 1 เดือน ตามมาตรฐาน the United States Pharmacopeia–National Formulary (USP–NF) recommendation

2.7.1 สังเกตลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น สี กลิ่น

2.7.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter

2.7.3 ทดสอบ heating-cooling โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ

นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อีก 48 ชั่วโมงและประเมินลักษณะทางกายภาพ

2.7.4 ตรวจสอบเชื้อ *Escherichia coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (EMB) ซึ่งมาตรฐานที่ยอมรับได้คือจำนวน *E. coli* ต้องไม่เกิน 10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.7.5 ตรวจสอบเชื้อยีสต์และรา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose (PDA) ซึ่งมาตรฐานที่ยอมรับได้คือจำนวนยีสต์และราต้องไม่เกิน 10^2 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.7.6 ตรวจปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในอากาศในการเจริญ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ซึ่งมาตรฐานที่ยอมรับได้คือจำนวนต้องไม่เกิน 10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตในข้าว

เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตในเมล็ดข้าวจากเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 พบว่าเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตจากเมล็ดข้าวได้ 11 สายพันธุ์ คือ ข้าวขาวอากาศ ข้าวทับทิมชุมแพ ข้าวขาวเจ๊ก ข้าวหอมใบเตย ข้าวเหลืองประทิว ข้าวโอ๊ต ข้าวเล็บนก ข้าวตาแห้ง ข้าวสังข์หยด ข้าวแพรแดง และข้าวอุบล (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาพบว่า *L. plantarum* TISTR 951 จัดเป็นเชื้อในกลุ่มของ Amyolytic lactic acid bacteria เป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรต [9] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thomsen และคณะ [10] ที่ได้ศึกษาการหมักอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลและแป้ง พบว่า *Lactobacillus plantarum* A6 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี และสามารถใช้แป้งในอาหารโดยมีอัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตกรดแลคติก

เท่ากับ 0.7 กรัมต่อข้าวโม่ง ในการวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวเหลืองประทิวและข้าวแพรแดง ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและกำลังการผลิตในภาคการเกษตรสูง เหมาะสำหรับการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรม โดยข้าวแพรแดงเป็นข้าวเจ้ามีลักษณะเป็นสีแดงเป็นข้าวที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงเข้ม ข้าวสุกนุ่มเหนียวและมีกลิ่นหอมเหมือนข้าวดอกมะลิ 105 ด้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในสภาพธรรมชาติได้ดี และค่อนข้างต้านทานโรคไหม้สำหรับข้าวเหลืองประทิวมีสารอาหารในอะซินหรือวิตามินบี 3 สูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ เป็นข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง และช่วยในระบบหมุนเวียนของเลือดได้ดี อีกทั้งยังลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ [11] จะเห็นได้ว่าเป็นอาหารที่มีการผลิตในระบบอินทรีย์ที่ได้รับการควบคุมการผลิตที่ดี ซึ่งข้าวเหลืองประทิวเป็นข้าวที่มีคุณภาพดี และนิยมนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เส้นเนื่องจากเส้นไม่ขาด มีความคงตัวของแป้งดี ดังนั้นข้าวเหลืองประทิวจึงเป็นข้าวที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาและพัฒนาต่อยอด ใช้เป็นคาร์โบไฮเดรตสำหรับเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อช่วยในเรื่องของการปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และให้สามารถอยู่รอดได้นานขึ้นอีกด้วย [11].

3.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในทางเดินอาหารทั้ง 10 ชนิด โดยเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 พบว่าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 9 ชนิด (ตารางที่ 2) แต่เมื่อทำการปรับ pH ของ supernatant ให้เป็นกลาง พบว่ามีเพียง *V. cholerae* เท่านั้น ที่ถูกยับยั้งโดย *L. plantarum* TISTR 951 โดยมีขนาดของโซนใส

11.0±1.0 มิลลิเมตร ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* TISTR 951 น่าจะเป็นสารในกลุ่มกรดแลคติกและสารกลุ่มอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลุ่มของกรดแลคติกได้ อาทิ สารปฏิชีวนะ สารกลุ่มแบคทีเรียโอซิน สารกลุ่มอัลดีไฮด์ สารกลุ่มแอลกอฮอล์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น [12] ถือได้ว่าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ดี เมื่อเข้าไปสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์แล้ว จะมีแนวโน้มในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ดีอีกประการหนึ่ง ในการวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ผ่านมา อาทิ Duangjitcharoen และคณะ [13] พบว่าเชื้อ *L. plantarum* SS2 ซึ่งแยกได้จากกระบวนการผลิตจากเครื่องดื่มนมจากพืช แล้วตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อ *L. plantarum* SS2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. vulgaris* PSSCMI 0041, *P. rettgeri* PSSCMI 0044, *E. cloacae* PSSCMI 0040, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ได้ นอกจากนี้ส่งศรี และคณะ [14] ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Lactobacillus* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Vibrio* พบว่ามีการยับยั้งเชื้อ *Vibrio* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ในการ

ป้องกันการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนได้ในระดับหนึ่ง จากการวิจัยในครั้งนี้ จะเห็นว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียแลคติกนี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาให้เกิดประโยชน์เพื่อให้มีประสิทธิภาพต่อไปได้มากยิ่งขึ้น

3.3 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในอาหารที่มีเลือดวัวเป็นองค์ประกอบ พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง สังเกตจากการไม่พบโซนใสรอบๆ โคลนินของเชื้อดังกล่าว การทดลองดังกล่าวเป็นการทดสอบเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า เชื้อชนิดนี้จะไม่ก่อโรคหรือทำอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ เมื่อถูกนำเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ โดยควรทำการยืนยันด้วยการทดลองอื่น ๆ เพิ่มเติม อาทิ การทดสอบเนื้อเยื่อ การทดสอบใน cell line หรือ การทดสอบกับสัตว์ทดลอง เป็นต้น

3.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวผสมโปรไบโอติก

จากผลการทดลองการใช้ข้าวเหลืองปะทิวมาใช้เป็นคาร์ริเออร์สำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อทดสอบความสามารถในการรอดชีวิต เป็นระยะเวลา 1 เดือน เมื่อนำปริมาณเชื้อไปคำนวณอัตราการรอดชีวิต พบว่าน้ำนมข้าวมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเครื่องดื่มนมจากข้าว และเครื่องดื่มนมจากข้าวผสมวุ้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 การใช้คาร์โบไฮเดรตในข้าว 12 สายพันธุ์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951

สายพันธุ์ข้าว	ขนาดของโซนใน±SD (มิลลิเมตร)
ข้าวขาวเจ๊ก	8.30±2.90 ^b
ข้าวหับทิมชุมแพ	8.00±1.00 ^b
ข้าวเหลืองประทิว	8.00±2.00 ^b
ข้าวหอมใบเตย	10.70±3.80 ^b
ข้าวอีแต๋ย	10.70±1.20 ^b
ข้าวขาวอากาศ	8.00±2.00 ^b
ข้าวเล็บนก	10.80±0.26 ^b
ข้าวขาวตาแห้ง	10.90±0.20 ^b
ข้าวอุบล	10.87±0.12 ^b
ข้าวสังข์หยด	11.07±0.12 ^b
ข้าวแพร่แดง	11.00±0.10 ^b
ข้าวพญาลิมาแกง	00.00±0.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในกลุ่มนี้ แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH ของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951

แบคทีเรียก่อโรค	ขนาดของโซนใน±SD (มิลลิเมตร)	
	<i>L. plantarum</i> TISTR 951	Streptomycin
<i>Aeromonas hydrophila</i>	11.23±0.15 ^{bc}	0
<i>Bacillus cereus</i>	10.93±0.11 ^{bc}	0
<i>Escherichia coli</i>	12.70±2.50 ^c	14.00±3.50
<i>Proteus vulgaris</i>	9.30±1.20 ^b	16.00±3.60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.30±1.20 ^{bc}	14.00±0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	11.16±0.15 ^{bc}	14.00±3.50
<i>Serratia marcescens</i>	11.70±1.50 ^{bc}	17.00±1.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.10±0.10 ^{bc}	20.00±0.00
<i>Vibrio cholerae</i>	8.30±1.50 ^b	9.30±1.20
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	00.00±0.00 ^a	14±0.00

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในกลุ่มนี้ 2 แสดงถึงค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของสิริสา [15] ที่ศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034 ที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมักตามลำดับ จากการนำไปทดสอบการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตสูงสุด คือร้อยละ 83.57 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะที่เป็นกรดสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระและการศึกษาการทนต่อกรด ของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร่วมการเติมสารสกัดและเส้นใย อาหารจากพืชหัว 3 ชนิด พบว่า *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจาก หัวบีทรูทร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตสูงสุดคือร้อยละ 86.12 ซึ่งการใช้เส้นใยบีทรูทนี้จะช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 ได้

จากผลการทดลองการใช้ข้าวแพรแดงมาใช้เป็นคาร์ริเออร์สำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อทดสอบความสามารถในการรอดชีวิต เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มไข่มุกไม่ผสมวุ้น พบอัตราการอยู่รอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 951 มีปริมาณของเชื้อสูงสุดคือ 10.86 ($\log_{10}$ CFU/g) เครื่องดื่มที่ผสมไข่มุกจะมีอัตราการรอดชีวิตของปริมาณเชื้อสูงถึงอยู่ที่ 10.97 ($\log_{10}$ CFU/g) และผลิตภัณฑ์น้ำนมข้าวมีอัตราการ

รอดชีวิตของเชื้อสูงสุดคือ 10.44 ($\log_{10}$ CFU/g) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ประเภท จากการทดลองพบว่า เครื่องดื่มไข่มุกที่มีการผสมผงวุ้นลงไป มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อสูงที่สุดถึง 98.99 % จากตารางที่ 3 พบว่า เมื่อใช้ข้าวแพรแดงเป็นคาร์ริเออร์จะมีการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกสูงกว่าข้าวเหลืองปะทิว ทั้งนี้อาจเกิดจากลักษณะของเมล็ดข้าวแพรแดงที่มีเยื่อ (dietary fiber) สูงกว่าข้าวเหลืองปะทิว นอกจากนี้เมล็ดข้าวเหลืองปะทิวมีลักษณะเลื่อมมัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการเกาะติดของเชื้อโปรไบโอติกได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาลักษณะของเมล็ดข้าวต่าง ๆ ว่ามีผลต่อการเกาะติดของเชื้อโปรไบโอติกต่อไป การทดลองนี้จึงสอดคล้องกับจากการทดลองของ จุฬาลักษณ์ [16] ได้นำเชื้อ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่แยกจากตัวอย่างของมนุษย์มาทำการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 โดยจะมีการห่อหุ้มเซลล์ด้วย Alginate จากการทดลองพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงถึง 71.11% เมื่อเพิ่มการห่อหุ้มอีกชั้นด้วยเส้นใยอาหารจากพืช พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น 84.39% จากผลการทดลองที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าเส้นใยช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *L. plantarum* CIF17 A5 ให้สูงขึ้น Finney [17] รายงานเป็นครั้งแรกว่าการแช่เมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี และ ถั่วเหลืองในน้ำทำให้คุณค่าทางอาหารเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบข้าวกล้องกับข้าวขาว การบริโภคข้าวกล้องทำให้ร่างกายได้รับสังกะสีและธาตุเหล็กมากกว่า 3 และ 1.7 เท่าตามลำดับ [18].

ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 951 ในผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่ม ไข่มุกจากข้าว เครื่องดื่ม ไข่มุกจากข้าวผสมวุ้น และน้ำนมข้าว เป็นระยะเวลา 1 เดือน

ผลิตภัณฑ์ข้าวผสมโปรไบโอติก	สายพันธุ์ข้าว	
	เหลืองประทิว	แพรวแดง
เครื่องดื่ม ไข่มุกจากข้าว	90.98%	92.75%
เครื่องดื่ม ไข่มุกจากข้าวผสมวุ้น	83.92%	98.99%
น้ำนมข้าว	93.51%	91.63%

3.5 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์และการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาหลังการผลิต 1 เดือน

จากการทดลองพบว่าทั้งเครื่องดื่ม ไข่มุก เครื่องดื่ม ไข่มุกผสมวุ้นและน้ำนมข้าว เมื่อเวลาผ่านไปครบ 8 สัปดาห์ พบกลิ่นหมักเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด และมี pH ลดต่ำลง จาก pH 5.5-7.5 $\pm$ 0.4-0.5 ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ซึ่งเมื่อเทียบกับลักษณะทางกายภาพของ control พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน ในการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ โดยวิธี heating-cooling cycle จากผลิตภัณฑ์ข้าวผสมโปรไบโอติก ก่อนการทดสอบและหลังการทดสอบ ของ *L. plantarum* TISTR 951 พบว่า ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เปลี่ยนรูปร่างไปจากเดิมคือไม่จับตัวเป็นก้อนกลม มีลักษณะหนืดข้นมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บผลิตภัณฑ์ในตู้เย็นตลอดเวลาเพราะจะทำให้คงสภาพได้ดังเดิม และอาจมีการพัฒนาต่อไปให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวสูงขึ้น

เมื่อตรวจสอบความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยา ซึ่งทำการตรวจเชื้อ *E. coli* แบคทีเรียที่ใช้อาหาร และยีสต์ รา พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียใช้อาหารประมาณ 10^3 CFU/mL และพบยีสต์และราประมาณ 10^4 CFU/mL ซึ่งเป็นตัวเลขที่เกินมาตรฐาน ตามมาตรฐานของ the United States Pharmacopeia–National Formulary (USP–NF)

recommendation ดังนั้นต้องมีการปรับปรุง พัฒนาต่อไปให้ผลิตภัณฑ์ข้าวผสมโปรไบโอติกมีเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในระดับยอมรับได้ อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบความปลอดภัยในทางจุลชีววิทยานั้นเป็นการทดสอบหลังการผลิตนาน 1 เดือน แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาสำหรับเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จะมีระยะเวลาไม่ถึง 1 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีจุลินทรีย์มีชีวิต ที่ส่วนใหญ่แล้วจะมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นและต้องเก็บในที่อุณหภูมิต่ำเสมอ นอกจากนี้จากการทดสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาทั้งก่อนการผลิตและหลังการผลิต ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ซึ่งถือว่ามีความปลอดภัยปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่พบในอุจจาระ เชื้อ *E. coli* โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ถูกใส่เข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะบางสายพันธุ์สามารถก่อโรคอุจจาระร่วงได้ โดยจะมีกลไกการก่อโรคและสามารถสร้างสารพิษได้แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น เชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ enterotoxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วงแบบเฉียบพลัน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ [19] นับได้ว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเหล่านี้เหมาะสมแก่การบริโภคและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมได้

4. สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตในเมล็ดข้าว พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 951 สามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตจากข้าว 11 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 12 สายพันธุ์ นอกจากนี้เชื่อดังกล่าวยังมีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้เป็นอย่างดีและไม่แสดงผลการย่อยเม็ดเลือดแดง จากการทดลองพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวไทย พบว่า มีอัตราการรอดของเชื้อในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำข้าวรูปแบบต่าง ๆ ในอัตราที่สูง โดยความคงตัวของผลิตภัณฑ์และการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาหลังการผลิต พบว่า ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ มีอายุในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำไม่นานมาก ควรเก็บรักษาในตู้เย็นไม่เกิน 1 เดือน สำหรับในการวิจัยต่อไป ควรหาวิธีที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวได้นาน โดยอาจจะหาสารอื่นมาทดแทนผงวุ้น หรืออาจเติมผงวุ้นในปริมาณที่มากกว่าผู้วิจัยใช้ และควรหาวิธีที่จะทำให้ไข่มุกเป็นก้อนกลม กล่าวคือ มีมาตรฐานเหมือนกัน เช่น ก้อนกลมขนาดเท่ากัน หรืออาจจะเป็นลักษณะเป็นท่อน ๆ เป็นต้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพราะปัจจุบันไข่มุกเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคกัน ในหลายกลุ่ม เช่น วัยเด็ก วัยรุ่น รวมไปถึงวัยทำงานอีกด้วย ซึ่งการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะช่วยให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังควรหาวิธีการอบข้าวที่อุณหภูมิสูงขึ้น หรือวิธีการ pasteurization ในระดับที่สูงขึ้น เพื่อความปลอดภัยของอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏ

นครสวรรค์ และโครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] วินัย แก้วมณีวงศ์. โปรไบโอติกจุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ. สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 2556.
- [2] Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G.C., Shanahan F. and Collins J.K. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. 73: 386S-392S.
- [3] Saarela M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A. and Mäntö, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 2006.112: 171-178.
- [4] อรอนงค์ นัยวิกุล. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2560
- [5] Ratithammatom T., Thongwai N., Yotsawimonwat S., Sirithunyalug B. and Sirithunyalug J. Adhesion and utilization of native starch granules by *Lactobacillus amylovorus*. *Chiang Mai Univ. J. Nat. Sci.* 2012. 11: 29-42.
- [6] Tulumoglu S., Yuksekdog Z., Beyatli Y., Simsek O., Cinar B. and Esra Y. Probiotic

- properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*. 2013, 24: 36-42.
- [7] Forbes B.A., Sahm D.F. and Weissfeld, A.S. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th Ed. Mosby Inc., St. Louis. 2002.
- [8] Bao Y., Zhang Y., Zhang Y., Liu Y., Wanga A., Dong, X., Wang Y. and Zhang H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*. 2010; 21: 695-701.
- [9] สมกิต ดิจจริง และอรุณี คงดี. การแยกและคัดเลือกลูซิโนทรีที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรงเพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 2556.
- [10] Thomsen M.H., Guyot, J.P. and Kiel, P. Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amylolytic lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2007. 74: 540-546.
- [11] สำนักพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าว กรมการข้าว. เอกลักษณ์ข้าวเหลืองปะทิว. แคมป์สนุกคิดกับอินเทอร์เน็ต. แหล่งที่มา : <http://www.intouchstation.com/view.php>, 27 ธันวาคม 2559.
- [12] Chukeatirote, E. Potential use of probiotics. Songklanakarin *J. Sci. Technol*. 2003. 25(2): 275-282.
- [13] Duangjitcharoen Y. , Kantachote D. , Ongsakul M., Poosaran N. and Chaiyasut C. Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages. *Pakistan J. Biol*. 2008. 11: 652-655.
- [14] ส่องศรี มหาสวัสดิ์, วรณัฐ อนันตศิลป์, นนทวิทย์ อารีชาน และ ลัดดาวัลย์ รัศมีทนต์. ผลของ *Lactobacillus* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Vibrio* spp. และความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน, รายงานสืบเนื่องจากการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาประมง). กรุงเทพฯ, ประเทศไทย. 3-7 กุมภาพันธ์ 2546. 336-343.
- [15] สรिता สุ่มงคล. การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยใช้วิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2556.
- [16] จุฬาลักษณ์ ชูพรหม. การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติคร่วมกับพรีไบโอติกและศึกษาการรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและเกลือแร่ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2553.
- [17] Finney P.L. Potential for the use of germinated wheat and soybeans to enhance human nutrition. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 105 *Nutr. Improv. Food Feed Proteinsm*. 1978. 681- 701.
- [18] Liang J., Han B.Z., Nout M.J.R. and Hamer R.J. Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and *in vitro* soluble zinc in brown rice. *Food Chem*. 2008. 110: 821-828.

-
- [19] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. *Escherichia coli*. แหล่งที่มา: http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet. 25 ธันวาคม 2559.