ผลของข้าวเหนียวต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

Effect of Glutinous Rice on Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

จินตนา ต๊ะย่วน*

Chintana Tayuan*

คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จ. สกลนคร

Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakonnakhon Province Campus

Received : 26 July 2017

Accepted : 10 October 2017

Published online : 20 October 2017

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพได้ขึ้นกับจำนวนจุลินทรีย์มีชีวิตในผลิตภัณฑ์ ตลอดจนความสามารถในการอยู่รอดของโพรไบโอติกภายใต้สภาวะทางเดินอาหาร การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ในข้าวเหนียวระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และประเมินศักยภาพของข้าวเหนียวต่อการป้องกันเซลล์ *L. plantarum* TISTR 875 ภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร โดยบดข้าวเหนียว และเตรียมเป็นสารแขวนลอยแป้งข้าวเหนียวที่มีความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (10% w/v) เมื่อศึกษาการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ระหว่างเก็บรักษาในข้าวเหนียว (10% w/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าโพรไบโอติกมีการรอดชีวิตและมีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 6.18 เป็น 6.55 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร และมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH (6.11 เป็น 5.50) ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (0.59 เป็น 0.72 กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ (1.05 เป็น 1.17 กรัมต่อลิตร) ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา เมื่อทดสอบผลของข้าวเหนียว (10% w/v) ต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีข้าวเหนียว พบว่า *L. plantarum* TISTR 875 ในสภาวะที่มีข้าวเหนียว (10% w/v) มีการรอดชีวิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 2.02 และ 1.28 $\log_{10}$CFU ต่อมิลลิลิตร ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร (pH 2.0) เป็นเวลา 240 นาที และสภาวะจำลองลำไส้เล็ก (pH 8.0) เป็นเวลา 240 นาที ตามลำดับ

คำสำคัญ : ข้าวเหนียว โพรไบโอติก การเก็บรักษา สภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

*Corresponding author. E-mail : chobvijuk@hotmail.com

Abstract

Heath benefits of probiotics are dependent upon viable cells in the final product and their survival during transit through the gastrointestinal tract. Objectives of this research were to determine the survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in glutinous rice during storage at 4°C, and evaluate the potential of glutinous rice as substrate for protection of *L. plantarum* TISTR 875 under simulated gastrointestinal tract conditions. Glutinous rice was milled into powder and suspended in water (10% w/v). Survival of *L. plantarum* TISTR 875 during storage in 10% (w/v) glutinous rice at 4°C for 30 days was studied. The viability of *L. plantarum* TISTR 875 increased from 6.18 to 6.55 $\log_{10}$CFU/ml. There were changes in pH value (6.11 to 5.50), titratable acidity (0.59 to 0.72 g/l) and reducing sugar concentration (1.05 to 1.17 g/l) during the storage period. Protective effect of 10% (w/v) glutinous rice on viability of *L. plantarum* TISTR 875 under simulated gastrointestinal tract conditions was studied compared to control (without rice powder). Survival of *L. plantarum* TISTR 875 was significantly improved in the present of glutinous rice ($p<0.05$) in both simulated gastric juice (pH 2.0) for 240 min and simulated small intestine (pH 8.0) for 240 min by 2.02 and 1.28 $\log_{10}$CFU/ml, respectively.

Keywords : glutinous rice, probiotics, storage, simulated gastrointestinal tract, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

บทนำ

โพรไบโอติกหมายถึงจุลินทรีย์ที่เมื่อบริโภคในปริมาณที่เพียงพอแล้วจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ (FAO/WHO, 2000) โดยสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหาร ลดค่าพีเอชของลำไส้และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดที่ก่อโรค (Williams, 2010) ช่วยลดอาการแพ้น้ำตาลแล็กโตสและลดอาการท้องเสียได้ (Ouwehand *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดด้วย (Gill & Guarner, 2004) โพรไบโอติกจะก่อให้เกิดประโยชน์แก่สุขภาพของผู้บริโภคได้นั้นควรมีจำนวนไม่น้อยกว่า 6 ถึง 7 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร (Dave & Shah 1997; Gomes & Malcata 1999) ทั้งนี้โพรไบโอติกจะต้องสามารถรอดชีวิตจากกระบวนการผลิต ระหว่างการเก็บรักษาและสามารถอยู่รอดภายใต้สภาวะทางเดินอาหารของมนุษย์ รวมทั้งสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนในลำไส้ใหญ่ได้ (Tannock, 1998) การมีชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ ปริมาณและสัดส่วนจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในการผลิต ปัจจัยภายในอาหาร เช่น ค่า pH ค่าวอร์เตอร์แอกติวิตี้ ปริมาณออกซิเจน กรดที่ไทเทรตได้ เกลือ น้ำตาลและสารต่างๆที่พบในอาหาร เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารให้สี กลิ่น เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการแปรรูป เช่น การให้ความร้อน อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม อัตราการทำความเย็น บรรจุภัณฑ์รวมถึงวิธีการที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ยังส่งผลการรอดชีวิตของโพรไบโอติกด้วย (Tripathi & Giri, 2014) องค์ประกอบและชนิดของอาหารที่ใช้เป็นตัวกลาง (food matrix) มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษารวมทั้งเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร (Sharp *et al*., 2008; Blaiotta *et al*., 2013) Charalampopoulos & Pandiella (2010) ได้รายงานผลของสารสกัดจากมอลต์

ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 วัน พบว่าในสภาวะที่มีสารสกัดจากมอลต์แบคทีเรียโพรไบโอติกมีจำนวนที่รอดชีวิตสูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากมอลต์ ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลียังช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกและทำให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีและสภาวะกรดในกระเพาะอาหารจำลองได้มากขึ้น (Charalampopoulos *et al*., 2003; Patel *et al*., 2004) Khalf *et al.* (2010) พบว่า *Bifidobacterium lactis* Bb12 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG รอดชีวิตในน้ำเมเปิ้ลโดยมีจำนวนระหว่าง 7 ถึง 8 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 28 วัน และพบว่าการเติมอินนูลินในน้ำเมเปิ้ลช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของโพรไบโอติกภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร นอกจากนี้มีการศึกษาผลของข้าวและธัญพืชบางชนิดของไทยต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 2075 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีข้าวเจ้าพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีหมัก ทำให้โพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 144 ชั่วโมง (Savedboworn *et al*., 2014) Ashwar *et al.* (2018) ยังพบว่าเมื่อห่อหุ้มเซลล์ โพรไบโอติกด้วยแป้งต้านทานการย่อย (resistant starch) ที่ได้จากข้าวจะช่วยให้โพรไบโอติกมีการรอดชีวิตในระบบจำลองทางเดินอาหารได้ดี ข้าวเหนียว (Glutinous rice) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* var. glutinosa เป็นข้าวที่มีความสำคัญในเอเชีย (Olsen & Purugganan, 2002) รวมทั้งนิยมบริโภคในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ข้าวเหนียวมีสารอาหารครบถ้วน ได้แก่ แป้ง และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide) เช่น อะราบิโนส แรมโนส ฟิวโคส มีกรดอะมิโนหลายชนิดและชนิดที่มักพบในข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ กลูตามิค แอสพาราจีน กรดแอสพาร์ติก นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิกและกรดปาลมิติก วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ เช่น โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม โดยมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของข้าว (Kang *et al*., 2010; Saman *et al*., 2011) และยังมีสารประกอบฟีนอลิคที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย (Vichapong *et al*., 2010) ข้าวเหนียวจึงเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคและยังน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นตัวกลาง (food matrix) สำหรับโพรไบโอติกอีกด้วย โดยนอกจากจะเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกแล้วยังตอบสนองต่อความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคที่ต้องการผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่ไม่มีส่วนผสมของนม (non-dairy probiotics) ที่มีมากขึ้นในปัจจุบันด้วย ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ประเมินศักยภาพของข้าวเหนียวในด้านการช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวมทั้งผลของข้าวเหนียวต่อการป้องกันเซลล์โพรไบโอติกในสภาวะจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ ได้แก่ สภาวะจำลองของกระเพาะอาหารและสภาวะจำลองของลำไส้เล็กเพื่อจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียโพรไบโอติก

Lactobacillus plantarum TISTR 875 เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากกะหล่ำปลีดอง ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. การเตรียมข้าวเหนียวและการวิเคราะห์

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้มาจากอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร นำมาบดเป็นผงด้วยเครื่องบด (Hammer mill) ให้มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร เติมน้ำและเตรียมให้ได้สารแขวนลอยของแป้งข้าวเหนียวที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อ

ปริมาตร (% w/v) นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียว ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดย Dinitrosalicylic methods (Miller,1959) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดย Kjeldalh methods (AOAC,1995) และวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

3. การเตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติก

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *L. plantarum* TISTR 875 ในอาหารเหลว MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ปลอดเชื้อ นำเซลล์ที่ได้มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ปลอดเชื้อและเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้นที่มีจำนวนเซลล์ประมาณ 9 ถึง 10 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์จำนวนเซลล์โพรไบโอติกโดยวัดค่า optical density (O.D.) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในข้าวเหนียวระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

ปิเปตแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีจำนวนของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 9 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในข้าวเหนียวที่มีความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้จำนวนของเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6 ถึง 7 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกที่รอดชีวิต วัดค่า pH วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดย Dinitrosalicylic methods (Miller,1959) และวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดแล็กติก ตามวิธีของ AOAC (2000) ตลอดระยะเวลา 30 วันของการเก็บรักษา

5. การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

5.1 การเตรียมสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

สภาวะจำลองกระเพาะอาหาร เตรียมโดยการละลาย pepsin (Sigma) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ปลอดเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ส่วนสภาวะจำลองลำไส้เล็กเตรียมได้โดยละลาย pancreatin USP (Sigma) ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร เติม bile salt (Sigma) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.5% ปรับค่า pH ให้ได้ 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Charteris *et al*., 1998; Michida *et al*., 2006)

5.2 การศึกษาผลของข้าวเหนียวต่อการรอดชีวิตในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร

ปิเปตแบคทีเรียโพรไบโอติกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในชุดทดสอบที่มีแป้งข้าวเหนียว 10% (w/v) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรและสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร (pH 2.0) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 9 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกที่รอดชีวิตหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 180, 240 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ปลอดเชื้อ (Michida *et al*., 2006) นับจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยวิธี drop plate บนอาหารแข็ง MRS (Collins *et al*., 1989)

5.3 การศึกษาผลของข้าวเหนียวต่อการรอดชีวิตในสภาวะจำลองลำไส้เล็ก (Michida *et al*., 2006)

ปิเปตแบคทีเรียโพรไบโอติกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในชุดทดสอบที่มีแป้งข้าวเหนียว 10% (w/v) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และมีสภาวะจำลองลำไส้เล็ก (pH 8.0) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 9 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีชีวิตหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 180, 240 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ปลอดเชื้อ (Michida *et al*., 2006) นับจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกที่รอดชีวิตด้วยวิธี drop plate บนอาหารแข็ง MRS (Collins *et al*., 1989)

6. การวิเคราะห์สถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนโพรไบโอติกระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในข้าวเหนียวระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

อาหารตัวกลาง หรือ food matrix เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษา เมื่อศึกษาผลของข้าวเหนียว 10% (w/v) ต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าจำนวนของโพรไบโอติกมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยเมื่อเริ่มต้นการทดลองมีจำนวนโพรไบโอติกเท่ากับ 6.18 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร และหลังจากการเก็บรักษาจำนวนของโพรไบโอติกเปลี่ยนแปลงเป็น 6.55 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 1) ซึ่งอยู่ในระดับที่มีจำนวนมากเพียงพอจะก่อให้เกิดผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคกล่าวคือควรมีจำนวนไม่น้อยกว่า 6 ถึง 7 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร (Dave & Shah, 1997; Gomes & Malcata, 1999; Shori, 2015) เช่นเดียวกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข (2555) เรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารที่ระบุให้ปริมาณโพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ควรมีจำนวนคงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 6 $\log_{10}$CFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหาร จากการศึกษาของ Srisuvor (2016) พบว่าข้าวหุงสุกพันธุ์พื้นเมือง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวธัญสิรินและข้าวหอมล้านนาเป็นอาหารตัวกลางที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในถุงลามิเนตแบบสุญญากาศในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 12 วัน โดย *L. rhamnosus* TISTR 047 มีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตเท่ากับ 7.63 และ 7.75 $\log_{10}$CFU ต่อกรัมตามลำดับ ในระหว่างการเก็บรักษาและมีจำนวนไม่แตกต่างจากจำนวนเซลล์เริ่มต้น และมีจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตสูงกว่า *L. rhamnosus* TISTR 108 และ *L. plantarum* TISTR 951 อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้การรอดชีวิตของโพรไบโอติกขึ้นกับสายพันธุ์ของโพรไบโอติก สภาวะการบ่มและสภาวะการเก็บรักษา

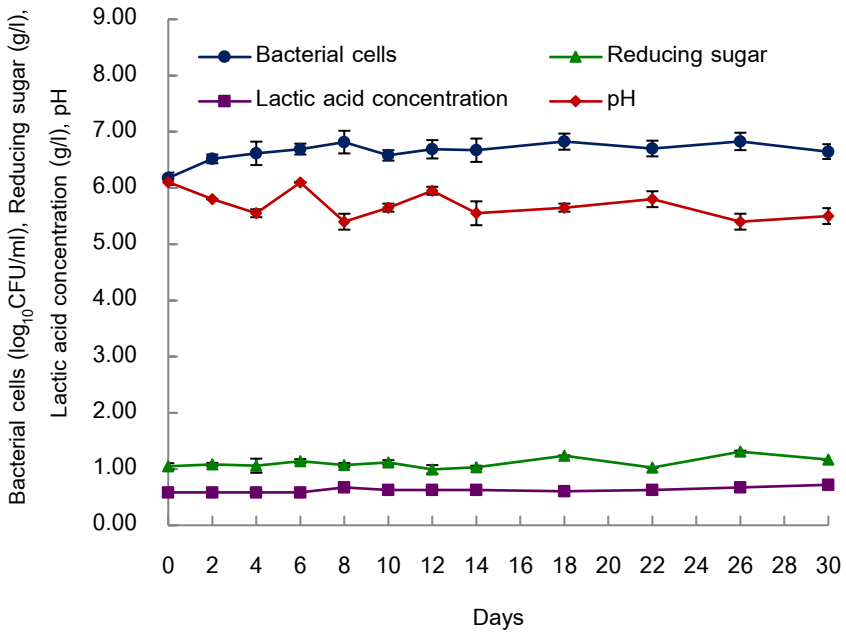
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pH ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาในข้าวเหนียวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดระยะเวลา 30 วัน พบว่าค่า pH ลดลงจาก 6.11 เป็น 5.50 และพบว่าปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ซึ่งวัดในรูปกรดแล็กติกมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจาก 0.59 เป็น 0.72 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลจากแบคทีเรียกรดแล็กติกมีการสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดอินทรีย์ ทั้งนี้ *L. plantarum* อยู่ในกลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) แล้วได้กรดแล็กติกเป็นผลผลิต นอกจากนี้มีการ

ผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโตสได้ด้วย (Salminen & Von Wright, 2004) Charalampopoulos & Pandiella (2010) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดแล็กติกต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* พบว่าโพรไบโอติกจะมีจำนวนที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อลดระดับความเข้มข้นของกรดแล็กติกลงระหว่าง 10 ถึง 4 กรัมต่อลิตร แต่การรอดชีวิตของโพรไบโอติกดังกล่าวไม่แตกต่างกันเมื่อความเข้มข้นของกรดแล็กติกอยู่ระหว่าง 0 ถึง 4 กรัมต่อลิตร

การรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ในระหว่างการเก็บรักษาอาจเป็นผลมาจากการป้องกันเซลล์โพรไบโอติกขององค์ประกอบที่พบในข้าวเหนียว ในการศึกษานี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียว 10% (ตารางที่ 1) พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 6.30±0.36% และมีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.31±0.10 กรัมต่อลิตร และในระหว่างการเก็บรักษาตลอดระยะเวลา 30 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างมีระดับความเข้มข้นระหว่าง 1.03±0.01 ถึง 1.31±0.02 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Kang *et al.* (2010) และ Saman *et al.* (2011) พบว่าข้าวเหนียวประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวส์ และพอลิแซ็คคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง เช่น น้ำตาลแรมโนส ฟิวโคส ไรโบส อะราบิโนสและไซโลส มีกรดอะมิโนทั้งหมดระหว่าง 452.61 ถึง 745.65 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม โดยกรดอะมิโนที่พบมากได้แก่ กรดกลูตามิค แอสพาราจีนและกรดแอสพาร์ติก จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าน้ำตาลและโปรตีนที่พบในอาหารตัวกลางเกี่ยวข้องกับป้องกันเซลล์และส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก เช่น Charalampopoulos & Pandiella (2010) ศึกษาการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ในสารสกัดจากมอลต์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 70 วัน พบว่าในสภาวะที่มีสารสกัดจากมอลต์ แบคทีเรียจะมีจำนวนการรอดชีวิตสูงที่สุด ถึงแม้ในสารสกัดจากมอลต์จะมีปริมาณกรดแล็กติกสูงกว่าก็ตาม ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณน้ำตาลในมอลต์มีความเข้มข้นสูงกว่าข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี และยังพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีผลต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษา โดยเซลล์แบคทีเรียมีการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 3 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 4 ถึง 20 กรัมต่อลิตรจะไม่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกดังกล่าว นอกจากนี้พบว่าโอลิโกแซ็คคาไรด์และเส้นใยอาหารเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการป้องกันเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกด้วย Nualkaekul & Charalampopoulos (2011) พบว่าโปรตีนและเส้นใยอาหารเป็นองค์ประกอบที่มีบทบาทในการช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรียทำให้ *L. plantarum* NCIMB 8826 มีการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่ออยู่ในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ตารางที่ *1* องค์ประกอบทางเคมีของข้าวเหนียว 10%

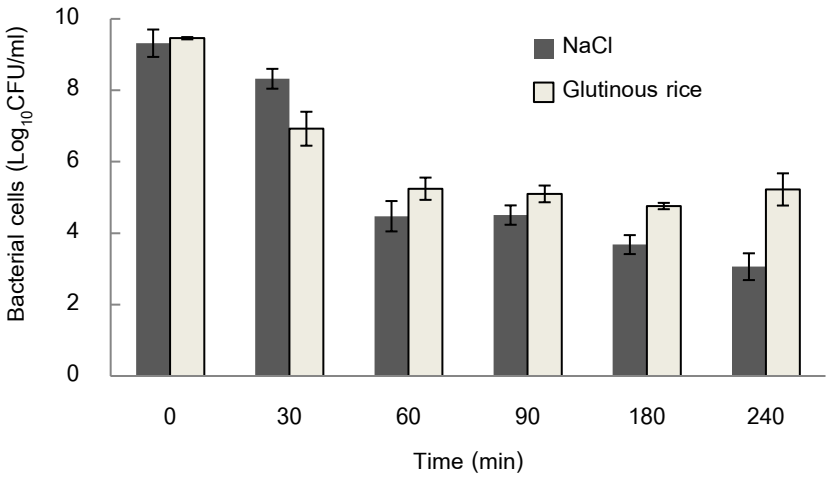
ปริมาณโปรตีน (%)	6.30 ± 0.36
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	1.31 ± 0.10
ความเป็นกรดด่าง	6.40 ± 0.00



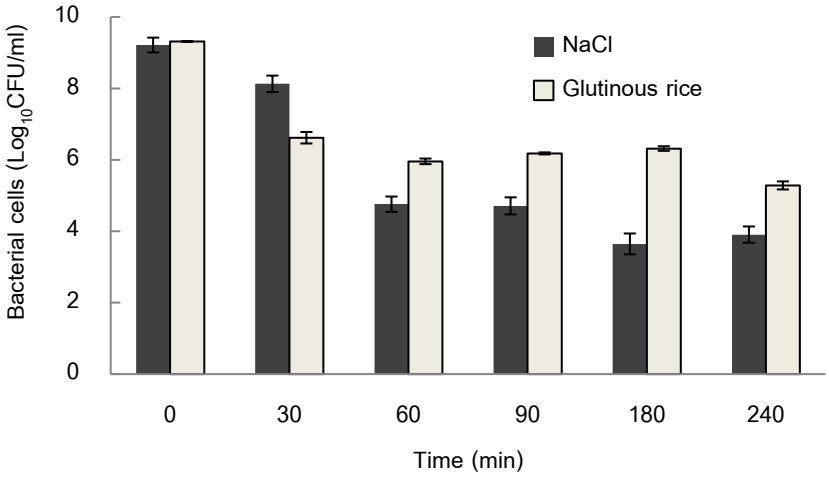
ภาพที่ 1 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ความเข้มข้นของกรดแล็กติกและน้ำตาลรีดิวส์ในข้าวเหนียว 10% (w/v) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน

2. การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกภายใต้สภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

โพรไบโอติกจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้ นอกจากความสามารถในการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาแล้ว โพรไบโอติกยังต้องมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารด้วย โดยต้องสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรด (acidic conditions) ในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กตอนต้นด้วย (Saarela *et al*., 2000) อาหารตัวกลางมีบทบาทสำคัญต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก เมื่อศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร (pH 2.0) เป็นเวลา 240 นาที พบว่าในสภาวะที่มีข้าวเหนียว 10% (w/v) แบคทีเรียโพรไบโอติก *L. plantarum* TISTR 875 มีการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีข้าวเหนียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยในสภาวะที่มีข้าวเหนียวจำนวนโพรไบโอติกลดลงจาก 9.46 เหลือ 5.22 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร หรือมีการรอดชีวิตเท่ากับ 55.23% ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์มีจำนวนโพรไบโอติกลดลงจาก 9.32 เหลือ 3.06 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร หรือมีการรอดชีวิตเพียง 32.85% (ภาพที่ 2) เมื่อทดสอบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในสภาวะจำลองลำไส้เล็กเป็นเวลา 240 นาที พบว่าในสภาวะที่มีข้าวเหนียว 10% (w/v) จำนวน *L. plantarum* TISTR 875 ที่รอดชีวิตมีจำนวนเท่ากับ 5.28 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร หรือมีการรอดชีวิตเท่ากับ 56.73% โดยมีการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งมีจำนวนโพรไบโอติกรอดชีวิตเพียง 3.90 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร หรือการรอดชีวิตเท่ากับ 42.39% (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ในแป้งข้าวเหนียว 10% (w/v) เมื่ออยู่ในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5%



ภาพที่ 3 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ในแป้งข้าวเหนียว 10% (w/v) เมื่ออยู่ในสภาวะจำลองลำไส้เล็ก เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5%

ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์และเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แบคทีเรียที่เจริญในระยะ stationary phase จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า logarithmic phase นอกจากนี้ยังขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ เช่น ปริมาณคาร์โบไฮเดรต แหล่งไนโตรเจน ปริมาณเกลือแร่ น้ำและออกซิเจน เป็นต้น (Heller, 2001) Curto *et al.* (2011) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสายพันธุ์ทางการค้า 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* subsp. *shirota*, *L. casei* subsp. *immunitas*, *Lactobacillus acidophilus* subsp. *johnsonii* ในระบบ

ทางเดินอาหารมนุษย์ส่วนบน พบว่าเมื่อใช้น้ำเป็นอาหารตัวกลางจะทำให้จำนวนโพรไบโอติกที่รอดชีวิตเหลือเพียง 1.0 ถึง 43.8% เท่านั้น แต่การรอดชีวิตจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 80.5 ถึง 197% เมื่อใช้นมเป็นอาหารตัวกลาง อย่างไรก็ตามผู้บริโภคต้องการโพรไบโอติกที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นมเพิ่มขึ้น โดยเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคที่แพ้นมรวมทั้งกลุ่มผู้บริโภคมังสวิรัติด้วย (Granato *et al*., 2010) จากรายงานพบว่าธัญพืชชนิดต่างๆ มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร เช่น สารสกัดจากมอลต์ ข้าวสาลีและข้าวบาเลย์มีต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum*, *L. acidophilus* และ *L. reuteri* ในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารจำลอง (pH 2.5) โดยเมื่อไม่มีสารสกัดของธัญพืชพบว่าโพรไบโอติกมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ *L. plantarum* มีการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นกว่า 4 $\log_{10}$cycle ในสารสกัดจากมอลต์และเพิ่มขึ้น 3 $\log_{10}$cycle เมื่ออยู่ในสารสกัดจากข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์ ส่วน *L. acidophilus* และ *L. reuteri* มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.5 และ 0.7 $\log_{10}$cycle ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลขององค์ประกอบของธัญพืชที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก พบว่าน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสช่วยในการป้องกันเซลล์จากสภาวะกรดในแบบจำลองกระเพาะอาหาร (Charalampopoulos *et al*., 2003) เมื่อศึกษาผลของสารสกัดจากธัญพืชดังกล่าวต่อการรอดชีวิตเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในเกลือน้ำดี พบว่าการเติมสารสกัดจากพืชทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทุกชนิดสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้เพิ่มขึ้น การที่เซลล์แบคทีเรียทนต่อเกลือน้ำดีได้มากขึ้นเกี่ยวข้องกับปริมาณของน้ำตาลและ free amino nitrogen ที่มีอยู่ในธัญพืชนั้น (Patel *et al*., 2004) เช่นเดียวกับ Michida *et al*. (2006) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากมอลต์และบาร์เลย์ต่อ *L. plantarum* ในสภาวะของระบบทางเดินอาหาร โดยประเมินการรอดชีวิตของแบคทีเรียนี้ในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี พบว่าสารสกัดจากธัญพืชช่วยให้โพรไบโอติกทนต่อสภาวะดังกล่าวมีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Lapsiri & Wanchaitanawong (2012) ได้รายงานผลของถั่วเหลือง งาและลูกเดือยต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติก *L. plantarum* ภายใต้สภาวะจำลองทางเดินอาหาร ซึ่งพบว่าถั่วเหลือง งาและลูกเดือยสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ในสภาวะแบบจำลองกระเพาะอาหาร (pH 2.0) เป็นเวลา 180 นาที และในแบบจำลองลำไส้เล็ก (pH 8.0) เป็นเวลา 240 นาทีได้

สรุปผลการวิจัย

L. plantarum TISTR 875 มีการรอดชีวิตระหว่างการเก็บรักษาในข้าวเหนียว 10% (w/v) เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีจำนวนคงเหลือเท่ากับ 6.55 $\log_{10}$CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นจำนวนที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ เมื่อ *L. plantarum* TISTR 875 อยู่ในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารที่มีข้าวเหนียว 10% (w/v) มีการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีข้าวเหนียวอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร (pH 2.0) เป็นเวลา 240 นาทีและในสภาวะจำลองลำไส้เล็ก (pH 8.0) เป็นเวลา 240 นาที ข้าวเหนียวจึงเป็นอาหารตัวกลางที่ช่วยป้องกันเซลล์โพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษาและจากสภาวะกรดและเกลือน้ำดีในแบบจำลองของระบบทางเดินอาหาร

เอกสารอ้างอิง

Ashwar, B.A., Gani, A., Gani, A., Shah, A. & Masoodi, F.A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*, *239*, 287-294.

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis. (16thed). Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.

AOAC. (2000). Official Method of Analysis. (17thed). Association of Official Analytical Chemists. Maryland, USA.

Blaiotta, G., La Gatta, B., Capua, M., Luccia, A., Coppola, R., & Aponte, M. (2013). Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. *Food Microbiology, 36*(2), 161-169.

Charalampopoulos, D., & Pandiella, S.S. (2010). Survival of human derived *Lactobaillus plantarum* in fermented cereal extrats during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, *43*, 431-435.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., & Webb, C. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology, 82*, 133-141.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. & Collins, J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 759-768.

Collins, C.H., Lyne, P.M., & Grange, J.M. (1989). Counting microorganism. In Collins, C.H., Lyne, P.M., & Grange, J.M. (Eds.). *Microbiological Methods*. (p. 127-140). UK: Butterworth-Heinemann, Oxford.

Curto, A.L., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., & Wickham, M.S.J. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiology*, *28*(7), 1359-1366.

Dave, R.I., & Shah, N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, *7*(1), 31-41.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. In Report of a Joint FAO/WHO Working Group report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. (pp.1-10). London Ontario, Canada.

Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, José de A.F. & Shah, N.P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods comprehensive. *Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 455-470.

Gerald, W.T. (1998). Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. *International Dairy Journal*, *8*(5–6), 527-533.

Gill, H.S., & Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, *80*(947), 516-526.

Gomes, A.M.P., & Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, *10*, 139-157.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W., & Fleet, G.H. (2004). Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT-Food Science and Technology*, *37*(4), 461-466.

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

Kang, M.Y., Rico, C. & Lee, S.C. (2010). Physicochemical properties of eight popular glutinous rice varieties in Korea. *Plant Production Science*, *13*(2), 177-184.

Khalf, M., Dabour, N., & Fliss, I. (2010). Viability of probiotic bacteria in maple sap products under storage and gastrointestinal conditions. *Bioresource technology*, *101*(20), 7966-7972.

Lapsiri, W., & Wanchaitanawong, P. (2012). Protective effects of soybean, sesame and Jobs Tears on the survival of fermented vegetable *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(14), 3380-3389.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2006). Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *28*(1), 73-78.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*, 426-428.

Nualkaekul, S., & Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, *146*(2), 111-117.

Olsen, K.M., & Purugganan, M.D. (2002). Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice. *Genetics*, *162*(2), 941-950.

Ouwehand, A.C., Salminen, S.C. & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, 82*, 279-289.

Patel, H.M., Pandiella, S.S., Wang, R.H., & Webb, C. (2004). Influence of malt, wheat and barley extracts on the bile tolerance of selected strains of lactobacilli. *Food Microbiology*, *21*, 83-89.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, *84*(3), 197-215.

Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.

Saman, P., Fucino, P., Vazquez, J.A. & Pandiella S.S. (2011). Fermentibility of brown rice and rice bran for growth of human *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. *Food Technology and Biotechnology, 49*, 128-132.

Savedboworn, W., Charoen, R., & Phattayakorn, K. (2014). Growth and survival rates of *Lactobacillus plantarum* in Thai cereal cultivars. *International Journal Applied Science and Technology*, *7*(3), 49-61.

Sharp, M.D., McMahon, D.J., & Broadbent J.R. (2008). Comparative evaluation of yogurt and low-fat cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science*, *73*(7), M375-377.

Shori, A.B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *4*(4), 423-431.

Srisuvor, N. (2016). Use of cooked rice (*Oryza sativa* L.) of indigenous cultivars as food matrices for probiotics. *KMUTT Research and Development Journal, 39*(1), 55-65. (in Thai)

Tripathi, M.K. & Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*, 225-241.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., & Srijaranai, S. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(9), 1325-1330.

Williams, N.T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *67*(6), 449-458.