



Development of pelleted feed containing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Jerusalem artichoke for Nile Tilapia and its biocompatibility studies

Unchaleeporn Sribounoy¹ · Nopadon Pirarat² · Kevin Mis Solval³ · Subramaniam Sathivel⁴ · Arranee Chotiko⁵ 

Received: 1 March 2021 / Accepted: 5 May 2021 / Published online: 20 May 2021
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2021

Abstract

Growth performance and immune systems of tilapias could be improved by *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and Jerusalem artichoke. This research aimed to determine the effects of Jerusalem artichoke on LGG viability after drying and pelleting and their subsequent exposure to simulated gastrointestinal conditions. Fresh LGG cells were added into wall material solutions, including alginate (AL), alginate + milk powder (AM), and alginate + milk powder + Jerusalem artichoke at different concentrations (AMJ). The solutions were then spray dried to obtain LGG powders. The powder with the highest cell number was then selected to mix with tilapia feed mash and pelleted using a nonthermal feed extruder to obtain pelleted feed containing LGG and Jerusalem artichoke. The LGG viability spray dried powders and pelleted feed were analyzed for their cell counts after drying and after exposure to simulated gastrointestinal conditions. The result showed that the number of viable cells in AMJ was significantly higher than AM and AL after drying. The number of viable cells under both simulated gastric and bile salt fluids was improved with the increasing of Jerusalem artichoke concentrations. The number of viable cells after pelleting process could be maintained. LGG in the pelleted feed could also survive under the simulated gastric and bile salt conditions. The study indicates that JA enhanced LGG viability after drying and exposure to simulated gastrointestinal conditions. The pelleted feed containing LGG and Jerusalem artichoke could be applied in tilapia farming, providing convenience to the farmers, and valuable effects to the fish.

Keywords Probiotics · Prebiotics · Encapsulation · Fish · Viability

Introduction

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is globally popular farm-raised fish worldwide, and one of Thailand's most important freshwater fish of economic importance. In 2018, global production of Nile tilapia was approximately 4.5 million metric tons and ranked as the one of top three finfish produced in the world (FAO 2020). With the increasing of intensification and commercialization of Nile tilapia, the fish has been cultured intensively. Undoubtedly, this has created new challenges, such as the surge of bacterial infections, which is rapidly becoming a pressing issue for tilapia farming industry. It has been reported that outbreaks of *Streptococcus agalactiae* infections in farm-raised tilapia operation has caused more than 75% of fish mortality (Amal and Zamri-Saad 2011). In the last decade, *S. agalactiae* infection has been regarded as the worst disease resulting in huge economic losses (Yi et al. 2019). It was reported that less than 10% of red tilapia could survive after two-day *S. agalactiae*

✉ Arranee Chotiko
arranee_c@rmutt.ac.th

¹ Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

² Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ Department of Food Science and Technology, The University of Georgia, Griffin, GA 30223, USA

⁴ School of Nutrition and Food Sciences, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA 70803, USA

⁵ Division of Food Science and Technology Management, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

infection (Sirimanapong et al. 2018), while the outbreak in tilapia farms in China directly caused their financial losses of 1.0–1.5 billion (Li et al. 2013). However, it has been well-documented that the use of antibiotics and vaccination in farm-raised freshwater fish results in the emergence of drug resistant microorganisms, which may affect the human population by transmitting their resistant genes to human pathogens. Antibiotics could harm to beneficial colonic microorganisms in the fish and leave the residues in the fish products, causing dangers to human consumption (Aliyu-A et al. 2019). Therefore, European Union started to ban the use of antibiotics in animal production as growth promoters since 2006 (Denev et al. 2009). This has recently created opportunities to develop alternative approaches in feeding and health management practices for Nile tilapia. The use and development of new dietary supplements as probiotics, prebiotics, synbiotics, and phytobiotics has emerged as a potential strategy that can be implemented to grow healthy farm-raised tilapia.

Probiotics are “live microorganisms in which an adequate consumption of probiotics confers many beneficial effects on the host” (FAO/WHO, 2001). There have been many studies reported that probiotics provided health benefits to a variety of fish species such as the common carp (Yanbo and Zirong 2006), rainbow trout (Denev et al. 2009), and Nile tilapia (Aliyu-A et al. 2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG, called as LGG, a probiotic found in the human gut, could promote growth performance, healthy intestinal structures, villus height, and gut mucosal production of the Nile tilapia (Pirarat et al. 2015). LGG could increase the number of mucous cells, consequently promoting secretion of mucus. This could help protect the fish from pathogenic infection, such as *Streptococcus agalactiae*, contributing to reduction of fish mortality (Pirarat et al. 2015). Besides, viable LGG could stimulate the immune systems of rainbow trout, lead to induction of inflammatory response, and increase of IgG, IgA, and IgM production, affecting enhancement of non-specific humoral response (Hirano et al. 2003). However, it has been well-known that probiotic microorganisms are susceptible to heat, ice crystals, acids, hydrogen peroxide, oxygen (Cook et al. 2012) and these have brought concerns to the applications of probiotics in Nile tilapias. The fish has the small and sac-like stomach, consisting different types of mucins include neutral mucin and acid mucin, but lack of pepsin (Klahan et al. 2009), causing a low pH (1.0–2.5) conditions (Phrompanya et al. 2019; Morrison and Wright 1999). In addition, the intestine morphology of Nile tilapias is an unadorned tube, with pyloric ceca entirely absent. The intestinal ceca have several functions, including absorption, fermentation, storage, and breeding sites for gut microbiota (Smith et al. 2000). The digestive enzyme system of tilapias includes protease, amylase, lipase, and bile salts which are mainly found and active in the intestine and alkaline

conditions (Klahan et al. 2009). Hence, retaining the high cell viability of probiotics after consumption as well as after formulation, processing, and storage is challenged for commercial productions of probiotic products. To overcome the difficulties, a well-established spray drying, technology has been applied to incorporate beneficial probiotics into wall materials to prevent the probiotics from unfavorable conditions, which could be implemented on an industrial scale (Rezvankhah et al. 2020; Rodrigues et al. 2020; Misra et al. 2021).

Beside probiotics, prebiotics, nondigestible dietary substance that can enhance the growth of probiotic microorganism, such as inulin and fructooligosaccharides (FOS) has also been considered to promote healthy fish guts. Specifically, prebiotic was defined as “a selectively fermented ingredient that allows specific changes, both in the composition and/or activity in the gastrointestinal microflora that confers benefits upon host well-being and health” (Gibson et al. 2004). Jerusalem artichoke (JA) is an inulin sources containing high level of short chain and medium chain fructan for 42–53% and 64–71%, respectively (Boonanuntanasarn et al. 2018). Although JA has been used for food or animal feed and for the past two decades, alternative uses as functional food ingredients have been discovered. JA may enhance animal growth performance, including fish, poultry, and swine, modulate their intestinal microbiota, and improve their hematological and immune systems (Mouriño et al. 2012). Some studies have mentioned that inulin could be used as a thermal protectant to prevent probiotics from thermal process. It could increase thermal resistance of *Lactobacillus casei* MTCC 1423 (Govind and Nithyalakshmi 2011). Moreover, when it was combined with high resistance maize starch, it could also improve heat resistivity to *Lactobacillus casei* (Doherty et al. 2011). As JA has a high level of both inulin and FOS, it would probably function as an effective protective agent for LGG during microencapsulation.

Probiotics and prebiotics for fish are commercially available as powders. They are generally added directly into the fish ponds or mixed them with feed ingredients. However, these approaches may drastically reduce the number of survival probiotic cells. Incorporation of probiotics and prebiotics into pelleted fish feed could better guarantee that the fish would obtain those functional ingredients. It was reported that the fingerlings fed with mixed probiotic pelleted feed had greater percentage of weight gain and specific growth rate, while feed conversion ratio was lower than mixed probiotic feed (Sivakumar et al. 2020). In addition, it could be more favorable for the farmers as the pelleted feed incorporated with probiotics and prebiotics would be convenient to use and help to reduce time and labor for feed preparation. Yuan et al. (2017) mentioned that the production costs for tilapia mainly comprised fish feed, rental fee, and labor cost accounted for approximately 66, 11, and 6% of the total cost,

respectively. The changes of those costs including the fish price certainly affected the net profit of tilapia. Moreover, it was reported that feeding tilapia with pelleted feed diets could provide higher yields and greater profits than basal feeds due to increase of growth rates and feed conversion ratio improvement (Neira et al. 2009). Therefore, the aims of this research were to develop pelleted feed containing probiotic LGG, and prebiotic JA for Nile tilapia and to investigate effects of JA on LGG viable cells after drying and their subsequent exposure to simulated gastric and intestinal fluids.

Materials and methods

Preparation of *L. rhamnosus* GG

Frozen cultures of LGG in 20% glycerol was reactivated into de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (BD Difco™, Maryland, USA) and incubated at 37 °C for 24 h (BE 500, Schwa Bach, Germany). The bacteria (50 mL) was then subsequently re-inoculated into MRS broth (1000 mL) and incubated at 37 °C for 16 h to reach its stationary phase. The cell pellets were harvested by centrifugation at $7000 \times g$, for 10 min at 4 °C (Sigma 2-16PK, Sartorius, Germany).

Spray drying of *L.rhamnosus* GG

JA powders was kindly provided by Phetchabun Research Station, Agro-Ecological System Research and Development Institute, Kasetsart University, Thailand. It contained 28 g/100 g of sugar, 39 g/100 g of inulin, and 16 g/100 g of fructo-oligosaccharide (Tientam et al. 2017). Five feed solutions containing LGG were prepared including alginate solution (18 g/L), alginate solution (18 g/L) with milk powder (200 g/L), and alginate solutions (18 g/L) with milk powder (200 g/L) and JA at different concentrations (100 g/L, 150 g/L, and 200 g/L). First, JA solution were prepared at the concentration of 100 g/L, 150 g/L, and 200 g/L by dissolving the JA powder in distilled water until the total soluble solid of the solution reached 10, 15, or 20 °Brix, respectively. The JA solutions were then centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min to remove the remained particles. After that, 200 g/L of milk powder (containing 10.8 g/100 g of protein, 25.3 g/100 g of fat, and 57 g/100 g of lactose) was then added and magnetically stirred at room temperature until homogenously. Food-grade alginate (18 g/L) was then added into the solutions prior to resuspend the LGG cell pellets ($\sim 10^9$ CFU/mL). Only alginate solution and alginate with milk powder solution were used as controls. The alginate solution was prepared by dissolving the alginate in distilled water and subsequently used to resuspend the LGG cells, while alginate with milk powder solution was prepared by adding alginate into milk powder solution

before resuspending LGG. Each feed solution was fed into in a laboratory scale spray dryer (Buchi B-290, Buchi, Germany) at inlet temperature of 125 °C and outlet temperature of 65 °C with the flow rate of 300 mL/h) to obtain encapsulated LGG powders, namely encapsulated LGG in alginate (AL), encapsulated LGG in alginate and milk powder (AM), encapsulated LGG in alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L (AMJ10, AMJ15, and AMJ20, respectively). After spray drying, the number of viable LGG in the powders was enumerated as well as under the simulated gastrointestinal tract and the cell survival (%) was calculated by the following equation, Cell survival (%) = $(N/N_0) \times 100$, where N and N_0 were the number of viable LGG in the spray dried powders (log CFU/g) and the number of viable cells before spray drying (log CFU/g), respectively.

Determination of LGG viability after drying processes and under simulated Nile tilapia gastrointestinal tract

After spray drying

One gram of each LGG powders, namely AL, AM, AMJ10, AMJ15, and AMJ20, were resuspended in 9 mL of normal saline solution (0.85 g/100 mL). The serial dilution from 10^{-1} to 10^{-8} was then conducted. A pour-plate method was used to enumerate the cell number of LGG powder on MRS agars. The samples were then incubated at 37 °C for 48 h.

In vitro simulated gastric conditions and bile salt solutions

Simulated gastric fluids (SGF) of Nile tilapia were prepared using normal saline solution, adjusted pH to 1.5, 2.0, and 3.0 using 5 M hydrochloric solution (Lab scan, Analytical, Thailand). Exactly 0.5 g of spray dried LGG powders (AL, AM, AMJ10, AMJ15, and AMJ20) were placed into separated test tubes containing 4.5 mL of SGF. One mL of each sample was taken after incubation at 25 °C in a water bath for 0, 1, and 2 h (JSGI-250 J, Schwa Bach, Germany) and enumerated for the cell counts on MRS agars using a pour-plate method.

For bile tolerance determination, 0.5 mL of LGG fresh cells as control and 0.5 g of LGG powders (AL, AM, AMJ10, AMJ15, and AMJ20) were added into 4.5 mL of SGF at pH 2.0 and incubated at 25 °C for 1 h. After the incubation, the samples were then centrifuged. SGF was removed and separately replaced with 4.5 mL of 3 mL/100 mL, 5 mL/100 mL, and 10 mL/100 mL of tilapia bile salt. One mL of each sample was taken after further incubations of 1, 2, and 3 h at 25 °C and enumerated on MRS agars using a pour-plate method to determine for the number of viable cells.

Production of Nile tilapias pelleted feed containing LGG

To prepare the pelleted feed, dry feed ingredients, including fish meal (200 g/kg of total weight), soybean meal (130 g/kg of total weight), rice bran (150 g/kg of total weight), corn meal (120 g/kg of total weight), cassava chips (120 g/kg of total weight), and premix (50 g/kg of total weight) were ground, sterilized at 121 °C for 15 min, and dried in a hot-air oven (Contherm, Thermotec 2000, Germany) at 55 °C until their moisture contents reached 12–13%. Dry feed ingredients were then mixed with starch binding agent (30 g/kg of total feed ingredients), dried coconut meal as a floating aid (200 g/kg of total feed ingredients), and the selected LGG powder, AMJ20 (100 g/kg of feed ingredients). To obtain a feed mash, tap water (300 g/kg of total feed ingredients) was then added according to a manual of fish feed formulations for local fish farmers suggested by Department of Fisheries. The mash was conveyed to a single screw extruder and proceeded at room temperature to obtain pelleted feed containing LGG (PFL). The pellets were then dried at 50 °C for 8 h. PFL was evaluated for proximate analysis and cell viability after drying and under simulated gastrointestinal tract.

Cell viability in Nile tilapia pelleted feeds containing LGG

Exactly one-gram PFL was disintegrated by soaking in 1 M phosphate buffer pH 7.0 in a stomacher bag and subsequently placing it in a stomacher (stomacher®400 Circulator, Seward, UK) for 3 min prior to perform serial dilutions in normal saline solution (0.85 g/100 mL). LGG fresh cells and the selected LGG power were used as controls. The cell counts of LGG in all samples were enumerated on MRS agars using a pour-plate method.

Proximate analysis of Nile tilapia pelleted feed containing LGG

Moisture and protein contents were analyzed using standard methods of ISO 6496:1999 and ISO 5983–2:2005, respectively. Ash and total fat were determined by following the methods of AOAC (2016) 942.05 and AOAC (2016) 954.02, respectively. The total carbohydrate was calculated by the following equation; Total carbohydrate content (%) = 100 – (moisture content + protein content + total fat content + ash content).

Statistical analysis

Means and standard deviations of all values were calculated. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics software (version 24). An one-way ANOVA and Duncan

test were conducted to indicate differences of the data at the significance level of $P \leq 0.05$.

Results and discussion

Production of spray dried LGG

After spray drying, the viability of LGG was obviously reduced. The number of viable cells in AL (4.00 ± 0.54 log CFU/g) was significantly lower than that of AM (5.87 ± 0.50 log CFU/g) and AMJ samples ($P \leq 0.05$). The cell survival of AL and AM was $42.4 \pm 5.62\%$ and $62.1 \pm 5.31\%$, respectively. The number of viable cells in AMJ samples was not significantly different, which were 7.01 ± 0.11 , 6.84 ± 0.36 , and 6.31 ± 0.16 log CFU/g for AMJ20, AMJ15, and AMJ10, respectively (Fig. 1), which was followed the suggested concentration for probiotic bacteria which should have at least 10^6 CFU/g to have an impact on the host health (Shah 2000). When compared with AM, AMJ20, and AMJ15 had significantly higher number of viable cells ($P \leq 0.05$), showing that appropriate JA concentrations were needed to enhance the cell viability. In addition, the cell survival was undergone for $74.3 \pm 1.11\%$, $72.4 \pm 3.86\%$, and $66.8 \pm 1.65\%$ for AMJ20, AMJ15, and AMJ10, respectively. The results thus indicated that milk powder and JA played important roles in the cell viability during spray drying. It has been suggested that during drying water was removed from the bacteria cells, leading to cell membrane transition, and leakage resulting in the cells death (Doherty et al. 2011). Milk protein is well known for its ability to protect the cells from dehydration processes. The proteins in skim milk accumulate within the cells, helping stabilize cell membrane constituents, and reducing the

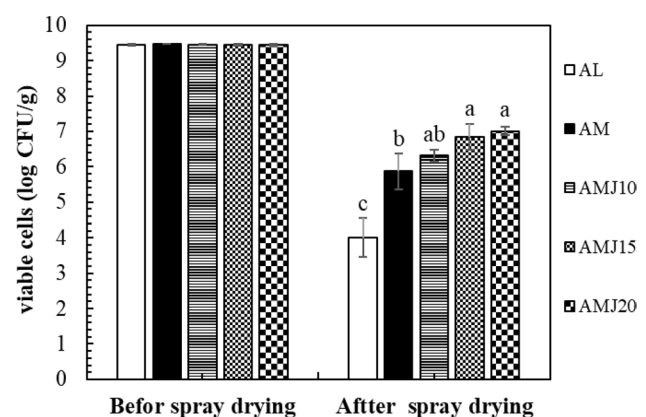


Fig. 1 Viability of LGG powders before and after spray drying; AL LGG powder with only alginate, AM LGG powder with alginate and milk powder, AMJ10, AMJ15, and AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L, respectively. ^{a–b}Means \pm standard deviation with different letters were significantly different ($P \leq 0.05$)

difference in osmotic pressure between the internal and external environments (Mille et al. 2004). In addition, leakage of the cell membrane could be avoided by interaction of lactose in milk with the phosphate groups of phospholipids as well as proteins located in the cell membrane, consequently minimizing during spray drying (Maciel et al. 2014). In addition, it was recently reported that milk calcium possibly interacted with the bacterial cell wall, while milk proteins were aggregated during heat treatment. These probably resulted in the formation of a protective barrier, providing the protection to probiotics (Zheng et al. 2016; Wang et al. 2016a). Sugars and some polysaccharides, such as fructooligosaccharides (FOS) and inulin were reported to be able to protect the cells from dehydration. JA typically contains 39 g/100 mL of inulin and 16 g/100 mL of fructooligosaccharide (Khuenpet et al. 2017). It was reported that FOS and inulin could function as a water replacer, helping stabilize the cell membrane during dehydration (Doherty et al. 2011). Romano et al. (2018) revealed that the amorphous structures of inulin could protect *L. plantarum* from spray drying and their cell stability during storage directly, resulted from stabilization of inulin structures. In contrast, it was found that co-encapsulation of LGG in acidified goat milk with agave tequilana fructans, fructose-based polymers, by spray drying did not help increase the number of viable LGG after drying. The total cell counts were from 7.7 to 7.9 log CFU/g and the survival rate was approximately 87%. However, the agave tequilana fructans could improve the cell survival during storage at -20°C for 14 days (Alvarado-Reveles et al. 2019). The effects of divalent cations (Ca^{2+}) on LGG viability during spray drying were investigated. The cells were encapsulated with lactose and trehalose containing 1 mM CaCl_2 . The results showed that the number of viable cells in the lactose/Ca and trehalose/Ca powders

were reduced for 5% and 30%, respectively, which was lower than the other results using reconstituted skim milk, whey protein isolate, and concentrated sweet whey as protective agents (Su et al. 2019). When compared our finding with these results, it could suggest that sources of fructans and milk types possibly played an important role in effectiveness of the protective agents affecting the viability of LGG after spray drying.

Viability of spray dried LGG powders in simulated gastrointestinal conditions

In vitro simulated gastric conditions

As well-known, pH in the medium played an important role in inhibiting bacterial activity by un-dissociated acid forms passing through the cell membrane, resulting in acidification of the cytoplasm and causing the cell death (Lund et al. 2014). The maintenance of probiotic viability throughout the stomach is crucial. Figure 2 showed the number of viable cells in LGG powders after 2-h exposure to simulated gastric fluids (SGF) at different pH. LGG survived in the SGF at pH 3.0 and 2.0. The number of viable cells of all treatments at pH 3.0 and 2.0 was not significantly different. However, remarkable decreases in the number of viable cells were significantly observed in SGF at pH 1.5. Regarding pH 1.5, the viable cell counts were enhanced by encapsulating LGG in milk powder and JA. The cell log reductions in AMJ20, AMJ15, and AMJ10 were 1.21, 1.67, and 2.31, respectively, while AM, having only milk powder, had 3.02 log reduction. No viable cells were detected in the control or in AL. AMJ20 and AMJ15 had survival rate at $84.10 \pm 2.43\%$ and $75.82 \pm 4.76\%$, respectively (Fig. 3), which were significantly greater than that of AMJ10 ($65.25 \pm 6.76\%$) and

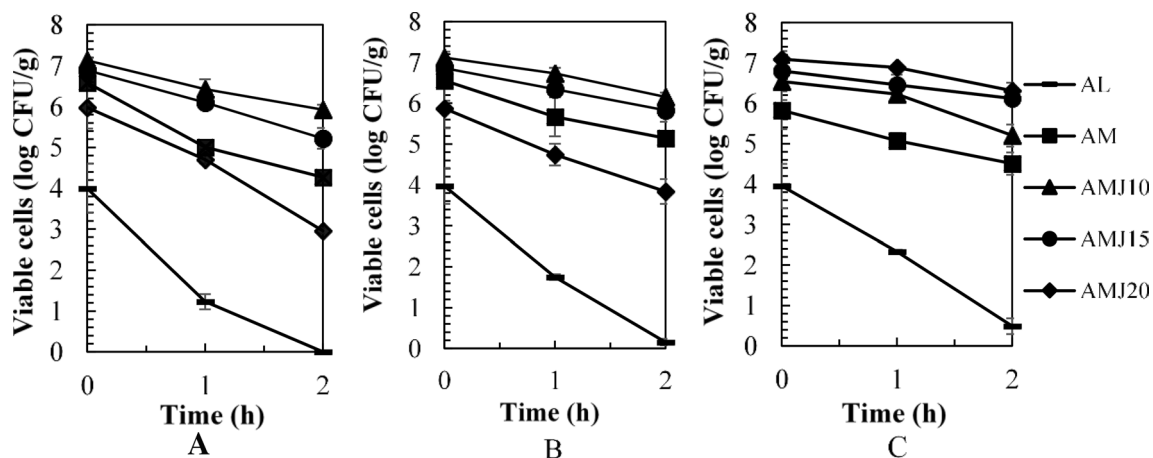


Fig. 2 Viability of LGG powders in simulated gastric fluids (pH 1.5 (A), pH 2.0 (B), and pH 3.0 (C)); AL LGG powder with only alginate, AM LGG powder with alginate and milk powder, AMJ10, AMJ15,

and AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L, respectively

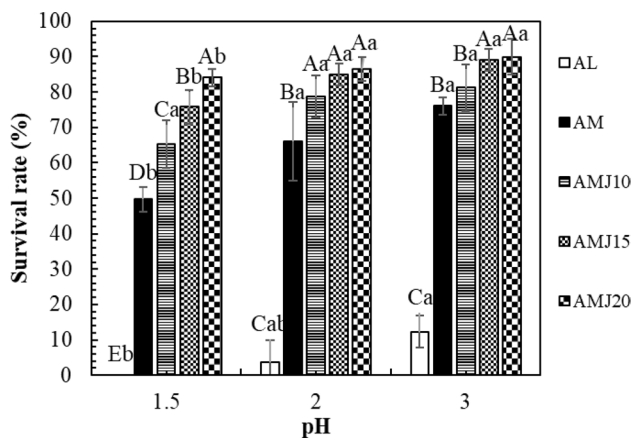


Fig. 3 Survival rates of LGG powders after incubating in low pH conditions for 2 h; AL LGG powders with only alginate, AM LGG powder with alginate and milk powder, AMJ10, AMJ15, and AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L respectively. ^{a-c}Means \pm standard deviation with different letter within the same color was significantly different ($P \leq 0.05$). ^{A,B}Means \pm standard deviation with different letters within the same pH was significantly different ($P \leq 0.05$)

AM ($49.69 \pm 3.48\%$) ($P \leq 0.05$). This finding was similar with the results reported by Pirarat et al. (2015) mentioning that unencapsulated LGG failed to survive under the simulated gastric fluids at the pH of 1.5 (SGF). Besides, it was reported that the number of viable LGG encapsulated by alginate–skim milk gel extrusion method was reduced about 1 log cycle after exposure to the SGF for 3 h. When compared the results to our study, it was suggested that the encapsulation method could interfere with the cell viability when they were under a high acidic environment.

The results also indicated that JA could protect LGG from high acid conditions. This was possibly attributed

to chemical interactions between alginate and inulin of JA. It was reported that alginate was able to create interactions with inulin by the nucleophilic attack between the COO^- group of alginate and OH^- group of inulin, which leading to alginate–inulin matrix formation. The matrix probably improved the barrier protection to the bacterial cells by mitigating the migration of acid fluids to the cells. Moreover, the presence of inulin in alginate matrix could decrease the porosity of the alginate when it was in gastric environment with low pH (Atia et al. 2016).

In vitro tilapia bile salt conditions

The viability of LGG powders after incubating in bile salt conditions (3 mL/100 mL, 5 mL/100 mL, and 10 mL/100 mL of fluids) for 3 h was shown in Fig. 4. Bile salt is as an emulsifier and fat solubilizer that could hydrolyze plasma membranes of bacteria cells. This causes the cells to lose their cell wall integrity (Bustos et al. 2018). No viable cells were detected in the control (AL) for all bile salt conditions after exposure for 1 h. The cell losses were increased with the increasing bile salt concentrations in all treatments and control. Regardless of bile salt concentrations, after 3-h incubating in bile salts, AMJ20 had the lowest cell reductions, which were 0.86, 1.10, and 1.27 log reductions for 3 mL/100 mL, 5 mL/100 mL, and 10 mL/100 mL of tilapia bile salt, respectively, followed by AMJ15, AMJ10, and AM. In regard to survival rates of LGG, at 3 mL/100 mL of fluids and 5 mL/100 mL of fluids, AMJ20 had significantly greater survival rates than AMJ15 and AMJ10, while AM had the lowest survival rate ($P \leq 0.05$). Similarly, the LGG survival rate of AMJ-20 in bile salt at the concentration of 10 mL/100 mL of fluids was $80.52 \pm 0.46\%$, which was significantly higher than AMJ15 ($62.78 \pm 7.52\%$) and AMJ10

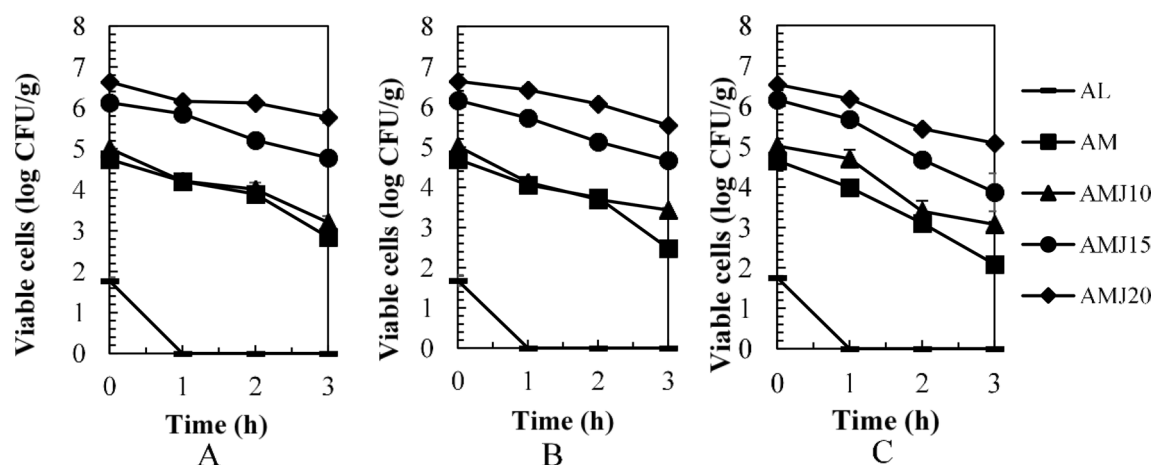


Fig. 4 Viability of LGG powders in bile salt conditions (bile salt 3 mL/10 mL (A), bile salt 5 mL/100 mL (B), and bile salt 10 mL/100 mL (C)); AL LGG powder with only alginate, AM LGG

powder with alginate and milk powder, AMJ10, AMJ15, and AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L, respectively

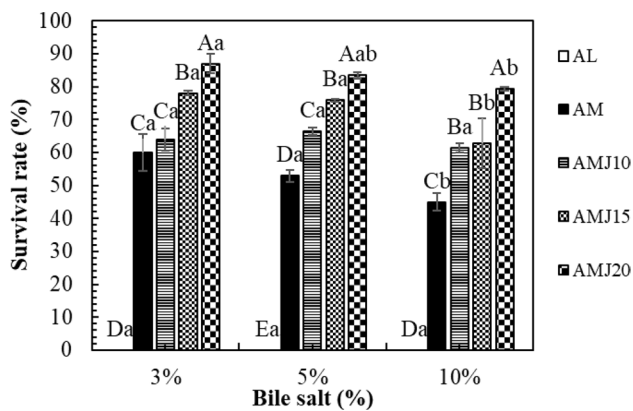


Fig. 5 Survival rates of LGG powders after incubating in bile salt conditions for 3 h; AL LGG powder with only alginate, AM LGG powder with alginate and milk powder, AMJ10, AMJ15, and AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 100, 150, and 200 g/L respectively. ^{a-c}Means \pm standard deviation with different letter within the same color was significantly different ($P \leq 0.05$). ^{A,B}Means \pm standard deviation with different letters within the same pH was significantly different ($P \leq 0.05$)

($61.26 \pm 1.39\%$) and followed by AM ($44.93 \pm 2.74\%$) ($P \leq 0.05$) (Fig. 5). Therefore, this indicated that milk powder could protect LGG in the powders from bile salt effects. JA had ability to enhance the protection of the cells during bile salt conditions. The results were compatible with those of Pirarat et al. (2015) mentioning that skim milk–alginate matrix could improve cell viability of LGG after being exposed in 10% tilapia bile when compared with only alginate matrix and fresh cells. This could be due to protein in skim milk possibly acting as an insoluble matrix protecting probiotics in the gastrointestinal tract (Ying et al. 2013). In addition, alginate and skim milk could structurally bind together increasing the matrix resistance to the effects of bile salt solutions. As mentioned earlier, JA was a rich source of inulin and FOS. After incubating in 1% bile salt solution for 2 h, *L. plantarum* that were encapsulated in skim milk coated with combined inulin and alginate beads by an extrusion method showed 1.21 log CFU/mL reduction (Wang et al. 2016b). The addition of inulin could enhance the acid and bile tolerance of encapsulated *L. acidophilus* and *L. casei* powders when they were under simulated gastric juice at pH 1.55 followed by intestinal juice containing 0.6% bile salt for 2 h and 2.5 h, respectively (Krasaekoopt and Watcharapoka 2014). Spray drying of *L. acidophilus* La-5 with 10% of inulin and 6% of FOS as coating agents could significantly reduce the number of cell reduction when they were in simulated intestinal phases. Moreover, Xavier dos Santos et al. (2019) noted that protection provided by the coating agents was further elevated by food products. This indicates another possible advantage of incorporating the probiotic into the fish feed.

Cell viability in Nile tilapia pelleted feeds containing LGG

Nile tilapia pelleted feeds containing LGG (PFL) were composed of 55.35 g of carbohydrate/100 g dry feed matter, 24.54 g of protein/100 g dry feed matter, 8.66 g of fat/100 g dry feed matter, and 11.13 g of ash/100 g dry feed matter. The moisture content of PFL was 2.71 g/100 g of PFL after drying at 50 °C for 8 h. It was recommended that crude protein levels of tilapia feeds should not under 20 g/100 g due to poor palatability. Feed containing approximately 25 g/100 g of crude protein were commonly used in Thailand as it was cost effective (Bhujel 2013). After pelleting and drying, the final cell concentration of LGG in PFL was 7.08 ± 0.04 log CFU/g, which was not significantly different with the spray dried LGG powder (7.23 ± 0.06 log CFU/g). This indicated that the pelleting and drying processes did not affect the cell viability of LGG powder. The number of viable cells in probiotic products to provide benefits to the host should have at least 10^6 CFU/g (Anal and Singh 2007).

In the simulated gastrointestinal fluids, after incubating the PFL in a low pH condition (pH 2.0) for 1 h prior to expose to bile salt solution at 10 mL/100 mL for 3 h as shown in Fig. 6, the cell viability in PFL was reduced by 0.57 log CFU/g, which was not significantly different from the spray dried LGG (0.41 log reduction), while rapid loss of LGG fresh cells was detected (3.94 log reduction). The number of viable cells after 1 h incubation in SGF at pH 2.0 was 6.51 ± 0.02 , 6.82 ± 0.02 , and 5.83 ± 0.04 log CFU/g for PFL, spray dried LGG, and fresh cells, respectively. Regarding bile salt tolerance, the results showed that the number of viable cells in PFL was 5.04 ± 0.03 log CFU/g, followed by the spray dried LGG (5.22 ± 0.04 log CFU/g), which had undergone 2.04 and 2.01 log reduction, respectively. The results were not significantly different. In contrast, there was a massive decrease in viable cells of the fresh cell, which

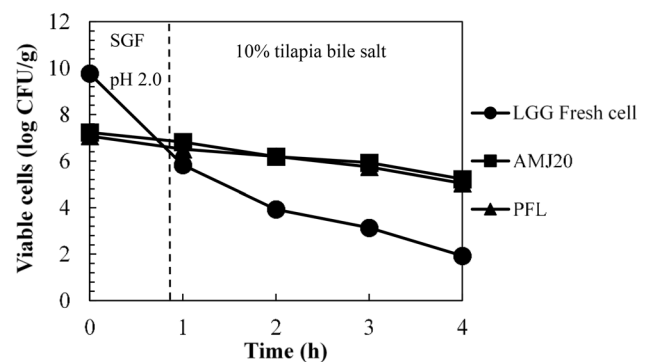


Fig. 6 Viability of LGG in Nile tilapia pelleted feeds during exposure to simulated gastrointestinal condition; Fresh cell LGG grown in MRS broth for 24 h, AMJ20 LGG powder with alginate, milk powder, and JA at 200 g/L, PLF pelleted feed containing LGG

was 7.84 log cycles. There were only 1.93 ± 0.02 log CFU/g survived. The survival rates after 3 h in the bile salt solution were $77.42 \pm 0.43\%$, $76.53 \pm 0.44\%$, and $33.1 \pm 0.05\%$ for PFL, spray dried LGG, and fresh cells, respectively. The addition of spray dried LGG into the pelleted feed could potentially provide not only high nutritional and functional values, but also convenience of use as well as decrease of feed preparation times and labor.

Conclusion

In conclusion, the results indicated that combination of JA with alginate and milk powder significantly improved viability of LGG under spray drying and under simulated gastrointestinal fluids. The spray dried LGG with JA could be incorporated into the feed ingredients to be pelleted and be maintained during nonthermal pelleting process and hot air drying. The result suggests that JA could be used as a potential protective agent for probiotic powders and pelleted LGG powder with feed ingredients could be applied in Nile tilapia farming, providing convenience to the farmers and valuable effects to the fish.

Acknowledgements This work was financially supported by Thailand Research Fund (MRG6080108).

Declarations

Conflict of interest The authors declared that there were no potential conflicts of interest with respect to authorship or research publication of this article.

References

- Aliyu-A A, Aliyu-Paiko M, Abafi J, Abdul-Malik A, Adamu K, King M (2019) Fermentation of feed ingredients as potential strategy to improve health status and reduce opportunistic pathogens in fish farming. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 5:1–17
- Alvarado-Reveles O, Fernández-Michel S, Jiménez-Flores R, Cueto-Wong C, Vázquez-Moreno L, Montfort GR-C (2019) Survival and goat milk acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulated with agave fructans in a buttermilk protein matrix. *Probiotics Antimicro* 11(4):1340–1347. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9475-y>
- Amal M, Zamri-Saad M (2011) Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J Trop Agric Sci* 34(2):195–206
- Anal AK, Singh H (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol* 18(5):240–251
- Atia A, Gomaa A, Fliss I, Beyssac E, Garrait G, Subirade M (2016) A prebiotic matrix for encapsulation of probiotics: physicochemical and microbiological study. *J Microencapsul* 33(1):89–101. <https://doi.org/10.3109/02652048.2015.1134688>
- Bhujel RC (2013) On-farm feed management practices for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand, On-farm feeding and feed management in aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 038, Rome, Italy.
- Boonanutanasarn S, Tiengtam N, Pitaksong T, Piromyong P, Teamroong N (2018) Effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) on intestinal microbiota community and morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquac Nutr* 24(2):712–722
- Bustos AY, de Valdez GF, Fadda S, Taranto MP (2018) New insights into bacterial bile resistance mechanisms: the role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Res Int* 112:250–262
- Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release* 162(1):56–67
- Denev S, Beev G, Staykov Y, Moutafchieva R (2009) Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res* 1(1):1–29
- Doherty S, Gee V, Ross R, Stanton C, Fitzgerald G, Brodtkorb A (2011) Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocoll* 25(6):1604–1617
- FAO (2020) The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. FAO, Rome, Italy. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>. Accessed 24 April 2021.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17(2):259–275
- Govind B, Nithyalakshmi V (2011) Influence of prebiotic composition on probiotic survivability in calcium alginate coated synbiotic microcapsules at thermal incubation. *Agric Res J* 6(5):231–236
- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T (2003) The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Med Microbiol* 47(6):405–409
- Khuenpet K, Jittanit W, Sirisansaneeyakul S, Srichamnong W (2017) Inulin powder production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber powder and its application to commercial food products. *J Food Process Preserv* 41(4):e13097
- Klahan R, Areechon N, Yoonpundh R, Engkagul A (2009) Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Agric Nat Resour* 43(1):143–153
- 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. *LWT* 57(2):761–766. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.037>
- Li L, Wang R, Liang W, Gan X, Huang T, Huang Y, Li J, Shi Y, Chen M, Luo H (2013) Rare serotype occurrence and pfge genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. *Vet Microbiol* 167(3):719–724. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.001>
- Lund P, Tramonti A, De Biase D (2014) Coping with low pH: Molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 38(6):1091–1125. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076>
- Maciel G, Chaves K, Grosso C, Gigante M (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. *J Dairy Sci* 97(4):1991–1998
- Mille Y, Obert JP, Beney L, Gervais P (2004) New drying process for lactic bacteria based on their dehydration behavior in liquid medium. *Biotechnol Bioeng* 88(1):71–76
- Misra S, Pandey P, Mishra HN (2021) Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: a

- review. Trends Food Sci Technol 109:340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>
- Morrison CM, Wright JR Jr (1999) A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. J Fish Biol 54(3):597–606. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00638.x>
- Mouriño J, Do Nascimento Vieira F, Jatobá A, Da Silva B, Jesus G, Seiffert W, Martins M (2012) Effect of dietary supplementation of inulin and w. Cibarina on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). Aquac Nutr 18(1):73–80
- Neira I, Engle CR, Ngugi C (2009) Economic and risk analysis of tilapia production in Kenya. J Appl Aquac 21(2):73–95. <https://doi.org/10.1080/10454430902892842>
- Phrompanya P, Saenphet K, Saenphet S (2019) Comparative histochemical study of the gastrointestinal tracts of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the hybrid catfish (*Clarias batrachus* × *Clarias gariepinus*). Acta Histochem 121(3):261–267. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.01.003>
- Pirarat N, Pinpimai K, Rodkhum C, Chansue N, Ooi EL, Katagiri T, Maita M (2015) Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against streptococcus agalactiae. Anim Feed Sci Technol 207:93–103. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.002>
- Rezvankhah A, Emam-Djomeh Z, Askari G (2020) Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: a review. Dry Technol 38(1–2):235–258. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- Rodrigues FJ, Cedran MF, Bicas JL, Sato HH (2020) Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—a narrative review. Food Res Int 137:109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Romano N, Mobili P, Zuñiga-Hansen ME, Gómez-Zavaglia A (2018) Physico-chemical and structural properties of crystalline inulin explain the stability of *Lactobacillus plantarum* during spray-drying and storage. Food Res Int 113:167–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.007>
- Shah NP (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci 83(4):894–907. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74953-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74953-8)
- Sirimanapong W, Thompson KD, Shinn AP, Adams A, Withyachumnarnkul B (2018) *Streptococcus agalactiae* infection kills red tilapia with chronic francisella noatunensis infection more rapidly than the fish without the infection. Fish Shellfish Immunol 81:221–232. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.022>
- Sivakumar K, Rama MS, Janani R, Muthupriya P, Magesh R (2020) Effect of probiotic dietary on growth performances and feed utilization of cyprinus carpio fingerlings. Bull Pure Appl Sci Zool 39(2):463
- Smith BJ, Smith SA, Tengjaroenkul B, Lawrence TA (2000) Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). Cells Tissues Organs 166(3):294–303. <https://doi.org/10.1159/000016743>
- Su Y, Zheng X, Zhao Q, Fu N, Xiong H, Wu WD, Chen XD (2019) Spray drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG with calcium-containing protectant for enhanced viability. Powder Technol 358:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.082>
- Tiengtam N, Paengkoum P, Sirivoharn S, Phonsiri K, Boonanutanasarn S (2017) The effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber on the growth performance, haematological, blood chemical and immune parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Aquac Res 48(10):5280–5288
- Wang J, Huang S, Fu N, Jeantet R, Chen XD (2016a) Thermal aggregation of calcium-fortified skim milk enhances probiotic protection during convective droplet drying. J Agric Food Chem 64(30):6003–6010
- Wang L, Yu X, Xu H, Aguilar ZP, Wei H (2016b) Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. LWT 68:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.001>
- Xavier dos Santos D, Casazza AA, Aliakbarian B, Bedani R, Saad SMI, Perego P (2019) Improved probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microencapsulated with inulin by spray drying. LWT 99:404–410. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.010>
- Yanbo W, Zhirong X (2006) Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim Feed Sci Technol 127(3–4):283–292
- Yi M, Wang M, Li Z, Liu Z, Song C, Zhang D, Gao F, Ke X, Cao J, Lu M (2019) An investigation into the effects of streptococcus agalactiae on the 5-HT system and the behavior of gift tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquac Rep 15:100232. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100232>
- Ying D, Schwander S, Weerakkody R, Sanguansri L, Gantenbein-Demarchi C, Augustin MA (2013) Microencapsulated lactobacillus rhamnosus gg in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. J Funct Foods 5(1):98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.08.009>
- Yuan Y, Yuan Y, Dai Y, Gong Y (2017) Economic profitability of tilapia farming in China. Aquac Int 25(3):1253–1264. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0111-8>
- Zheng X, Fu N, Huang S, Jeantet R, Chen XD (2016) Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique. Food Res Int 90:226–234



Effect of using riceberry flour and xanthan gum on physical properties and estimated glycemic index of steamed rice cakes: optimization by D-optimal mixture design approach

Natcha Laokuldilok¹ · Siriluck Surin² · Nanthina Damrongwattanakool³

Revised: 19 March 2018 / Accepted: 2 April 2018
© Association of Food Scientists & Technologists (India) 2021

Abstract Riceberry, a Thai black rice variety (*Oryza Sativa L.*) has been developed with the aim to provide high iron and low glucose to consumers. Therefore, riceberry could potentially be used to produce healthier processed foods. In this regard, a D-optimal mixture design was employed for the optimization of the steamed rice cakes which included ten combinations of riceberry flour (RF), xanthan gum (XG) and glutinous rice flour (GRF). The influence of RF substitution for GRF with XG addition on the texture, physicochemical and sensory properties, as well as the estimated glycemic index (*eGI*) of the steamed rice cakes, were studied. The results demonstrated that RF, XG, and GRF had a noticeable effect on *eGI*, textural, and sensory properties of the steamed rice cakes. XG was the variable that most affected hardness, adhesiveness, cohesiveness, and gumminess of the steamed rice cakes by the positive effect. XG had a negative effect on hydrolysis index and *eGI*. The optimum mixture obtained on a basis of overall liking, hardness, adhesiveness, gumminess, and *eGI* value contained 39% RF, 1% XG, and 60% GRF with desirability equal to 0.673. For filling, the red bean paste with 100% isomaltulose substitution for sucrose indicated

the lowest value of *eGI* and the highest score of the overall liking. The optimum steamed rice cakes stuffed with the red bean paste used isomaltulose as a sucrose replacer were classified as the medium GI food.

Keywords Riceberry · Glycemic index · Steamed rice cakes · Optimization

Introduction

Rice has been a source of carbohydrate widely consumed for more than half of the world's population, especially in Asia Pacific region. Apart from cooked rice consumption, rice-based products have gained much popularity due to the benefits of the gluten-free diet. As the rice grain can be ground into powder, it advantages to produce many kinds of foods, including several types of cakes. Rice cake is one of the common foods usually consumed in Asia with numerous types depending on eating habits and cultural diversity of people from different regions. Mochi has been one of the most popular rice cakes originated from Japan. The product generally consists of high moisture with soft, slightly sticky, and some elastic properties. Conventionally, it was prepared by washing glutinous rice which was then cooked with water and pounded to get rid of the integrity of rice kernel to form the viscoelasticity. However, there are variations in the manufacturing process and the proportion of ingredients. The study summarized that the production process and the composition of basic ingredients contributed to the physicochemical properties of the mochi. Nagashima et al. (1987) revealed that the mochi prepared by the mixer type machine possessed minimum hardness and lower resistance to extension, and required lower shearing strength when compared to that

✉ Natcha Laokuldilok
nutchal@live.lpru.ac.th

¹ Division of Food and Business Innovation, Faculty of Agricultural Technology, Lampang Rajabhat University, Lampang 52100, Thailand
² Division of Food Science and Technology Management, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Khlong Luang, Pathumthani 12110, Thailand
³ Division of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology, Lampang Rajabhat University, Lampang 52100, Thailand

prepared by the pounding type machine. Moreover, the mochi containing waxy corn starch was tender and required a lower shearing strength. On the other hand, the mochi containing cassava starch possessed more hardness and adhesiveness. The hardness, cohesiveness, and the extension of mochi were increased when potato starch was increasingly added (Yamamoto et al. 2001).

In recent years, health food markets have risen because consumers require the foods with novel and desired nutritional quality. However, the consumption of carbohydrate-based foods as a major source of daily diets has an effect on the rapid increase in the blood glucose level after ingestion associated with the occurrence of metabolic diseases. Since the main ingredient for the mochi is polished rice or white rice, it was easily digested in the human body which led to a rapid increase of postprandial glucose concentration. To improve the nutritional quality of this product, the application of ingredients which benefit health and meet the consumer's acceptability should be taken into the consideration.

Riceberry, a black-purple rice variety, has been newly developed by the Rice Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, Thailand with the aim to provide beneficial nutrients to consumers. It is suitable for anaemic and diabetes mellitus patients since it contains high iron and low glucose. In the present study, we applied riceberry flour obtained from the whole grain rice to prepare rice cakes. Research investigation reported that the blood glucose response of healthy and type 2 diabetic volunteers consuming brown rice was lower than those consuming milled rice as it contains the higher amount of phytic acid, polyphenol, dietary fiber, and oil (Panlasigui and Thompson 2006). Moreover, the riceberry bran oil could have health effects in diabetic rats by enhancing the amount of hepatic antioxidant defense mechanism and reducing oxidative stress (Posuwan et al. 2013).

In this research, the riceberry flour was applied in the mochi production which might lead to the loss of viscosity properties. Due to the reduction of amylopectin content, a food additive was incorporated to obtain the desired quality. Xanthan gum, an extracellular polysaccharide produced by a bacterium *Xanthomonas campestris*, was selected to improve mouthfeel and to change the viscosity due to its high polymeric nature and the interactions among polymer chains. The research of Kim and Yoo (2006) exhibited that the consistency index and apparent viscosity of rice starch-xanthan gum mixtures increased when there was an increase in gum concentration. Thus, this research was aimed to investigate the effect of the tertiary combination, i.e. riceberry flour (RF), xanthan gum (XG), and glutinous rice flour (GRF) on the physicochemical properties, glycemic index, and sensory qualities of the

riceberry-glutinous rice cakes. The response surface methodology was used in order to optimize the formulation. In addition, the sweetened bean fillings used isomaltulose as a sugar replacer were also investigated for their glycemic index (*eGI*) and sensory properties. The rice cakes stuffed with red bean filling were also tested for consumer acceptance.

Materials and methods

Raw materials

Paddy rice (*Oryza sativa* L.) cultivar riceberry was purchased from a local rice-milling factory in Lampang Province, Thailand, and was ground by a hammer mill (Brook Crompton Series, 2000; Christy Hunt Agriculture Ltd., Scunthorpe, UK) with 1.0 mm sieve. Grain composition was determined in duplicate with standard methods (AOAC 2000). The moisture content of grain was $10.74 \pm 0.01\%$ on a dry weight basis (d.b.), crude protein $8.13 \pm 0.09\%$ (d.b.), crude lipid $0.56 \pm 0.06\%$ (d.b.), crude fiber $8.66 \pm 0.33\%$ (d.b.), crude ash 1.05% (d.b.), and the calculated carbohydrate $70.86 \pm 0.37\%$ (d.b.).

Xanthan gum (XG) was purchased from a Union Science Co. Ltd. (Chiang Mai Province, Thailand). Glutinous rice flour (Fish Brand, ETC International Trading Co., Ltd., Thailand) and red bean were purchased from a local market. Isomaltulose was obtained from Rajburi sugar Co., Ltd., Thailand.

Chemicals

Porcine pancreatic alpha-amylase, amyloglucosidase, and pepsin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). A total starch kit was purchased from Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd.).

Experimental design

The glutinous rice flour used for producing the steamed rice cakes was replaced by RF and XG. A D-optimal design with three components was employed. The mixture components (a sum of 100%) consisted of riceberry (RF), xanthan gum (XG), and glutinous rice flour (GRF) which were in the ranges of 60.0–89.0, 1.0–10.0, and 10.0–39.0, respectively. Design-Expert software designed ten formulations which eight formulations were different and two formulations were replicate as shown in Table 1.

Table 1 Mixture composition in the steamed rice cakes formulated with riceberry flour (RF), xanthan gum (XG), and glutinous rice flour (GRF) in a three-component constrained D-optimal mixture design

Formulation No	Ingredients		
	RF (%w/w)	XG (%w/w)	GRF (%w/w)
1	70.0	10.0	20.0
2	60.0	5.5	34.5
3	89.0	1.0	10.0
4	60.0	1.0	39.0
5	89.0	1.0	10.0
6	74.5	1.0	24.5
7	60.0	10	30.0
8	60.0	1.0	39.0
9	84.5	5.5	10.0
10	80.0	10.0	10.0

Preparation of the steamed rice cakes

The control formulation consisted of 100% glutinous rice flour. The steamed glutinous rice cakes were made by dispersing the dried ingredients (300 g) in 400 g of water. The mixture was steamed (100 °C) for 20 min. The obtained cakes were immediately kneaded in the kneading machine for five minutes and were cut into small pieces (10 g). The rice cakes were stored in the hermetically sealed bags after cooling to prevent moisture loss. All samples were measured for their qualities within the day of production.

Physicochemical properties

The water activity of the rice cakes was measured using a Water Activity Meter (AquaLab 4TE, Decagon, USA). The moisture content was determined by overnight oven drying at 105 °C. The color was measured in terms of L*, a*, and b* (Konica Minolta CR-400, Japan). The Texture Profile Analyzer (TA.XTPlus, Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England) was used to measure the force-time curve. The equipment was automatically set to zero lowering the plate until its bottom surface reached and contacted the sample table. The load cell was calibrated with a 1.0 kg weight. All experiments were conducted at room temperature (35 ± 2 °C). The 15 g sample, having a round shape, was carefully placed on the center of the TPA instrument's platform and compressed twice to 75% of the original height at the compression rate of 1 mm/s. When the compression stroke was completed, a plunger reversed direction and started its upward stroke at 10 mm/s. Then, a second compression-decompression cycle was performed

on the same sample. All operations were automatically controlled by the texture analyzer. The instrument automatically recorded the force-time curve. Ten replicates were conducted for each sample.

Sensory analysis

In this study, thirty untrained panelists were randomly recruited from students and staffs (aged 18–45 years) from the Division of Food Science and Food Technology, Lampang Rajabhat University, Thailand. Ten formulations, each coded with a 3-digit random number, were served at ambient temperature. For each formulation, a piece of the steamed rice cake was served in a hermetically sealed plastic bag. A 15 min compulsory break was enforced after the first set of five formulations had been completed. The sample order of presentation was fully rotated to minimize bias. Four quality parameters (color, stickiness, softness, and overall liking) were evaluated using a 9-point hedonic scale, wherein 1 referred to extremely dislike, 5 referred to neither dislike nor like, and 9 referred to extremely like.

Determination of total starch (TS) content of SRCs

The TS content of rice cakes was determined using the Megazyme Total Starch method (AACC Method 76.13) as per the manufacturer's procedure (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland). The content of starch obtained from this section was then used for calculating the Eq. (1) as shown below.

In vitro digestion test

The rapid in vitro starch digestion assay described by Mahasukhonthachat et al. (2010) was used. About 500 mg of the sample (concerning dry material content) was treated with 1 mL of artificial saliva containing porcine α -amylase (Sigma A-3176 Type VI-B; 250 U per mL of carbonate buffer) for 10–15 s. Five milliliters of pepsin (Sigma P-6887, from porcine gastric mucosa) solution were added and incubated at 37 °C for 30 min in a water bath. The digesta was neutralized (5 mL, 0.02 M NaOH) before being adjusted the pH with 25 mL of 0.2 M sodium acetate buffer (pH 6) prior to adding 5 mL of a mixture of pancreatin (Sigma P1750) and amyloglucosidase (Sigma 10,115, ~ 70 U per mL of acetate buffer) in the acetate buffer. The mixture was incubated for four hours, during which the glucose concentration in the digesta was measured at intervals (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 min) with an Accu-Check® Performa® glucometer (Roche Diagnostics Aust. Pty. Ltd., Caste Hill NSW 2154, Australia). The glucose concentration in the digesta was measured within the range (0.6–33 mM L⁻¹) of the

glucometer. Digested starch (1 g per 100 g dry starch) at a measurement time (minute), was calculated as:

$$DS = \frac{0.9 \times G_G \times 180 \times V}{W \times S[100 - M]} \quad (1)$$

where G_G = glucometer reading (mM/L), V = volume of digesta (mL), 180 = molecular weight of glucose, W = weight of sample (g), S = starch content of sample (1 g per 100 g dry sample), M = moisture content of sample (1 g per 100 g sample), and 0.9 = stoichiometric constant for starch from glucose contents.

Estimated glycemic index (eGI)

Among the empirical models, the first-order exponential model was applied to describe the enzymatic hydrolysis (Goni et al. 1997) as shown in the following equation:

$$C = C_{\infty}(1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

where C , C_{∞} , and k were the concentration (digested starch) at time t , the equilibrium concentration, and the kinetic constant, respectively. Due to the experimental data (C and t) of the enzymatic hydrolysis, the regression curve formulated by Eq. (2) along with the hydrolytic parameters (C_{∞} and k) resulted. Further, the area under the curve (AUC) could be integrated by:

$$AUC = C_{\infty}t + \frac{C_{\infty}}{k}(1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

Based on the AUC, the hydrolysis index (HI) was evaluated as the percentage of total glucose released from the samples with respect to that released from the white bread (Goni et al. 1997). Because of the linear relationship between the hydrolysis index (HI) and the glycemic index (GI), the estimated glycemic indices (eGI) were calculated on a basis of the equations suggested by Goni et al. (1997):

$$eGI = 39.71 + 0.549HI \quad (4)$$

Preparation of red bean filling

The red bean fillings used isomaltulose as a sucrose replacer at different percentages (50 and 100 coded as I50 and I100, respectively) were prepared by a hot stirring method. The filling without isomaltulose replacement was used as control (0%). The red bean was washed with tap water and soaked overnight. The red bean was then boiled (100 °C) for 45 min and ground in a grinder until it was smooth. The filling preparation was started by adding sucrose (300 g) into 50 g of water and heating to 70 °C with continuous stirring for three minutes before adding the ground red bean. The temperature was then increased to 90 °C while keeping stirring for further ten minutes. The

samples were stored in the hermetically sealed containers after cooling to prevent moisture loss.

Three formulations of red bean filling were analyzed for the total starch content and in vitro digestion with the methods described above. The water activity was measured using an AquaLab Water Activity Meter, and the moisture content was determined by overnight oven drying at 105 °C. The sensory evaluation was carried out by 30 untrained panelists (aged 18–45 years). The 9-point hedonic scale was utilized for all liking ratings. Liking scores of all the attributes (color, aroma, sweetness, and overall acceptability) for each formulation were rated before proceeding to the next one.

Consumer acceptance test for the steamed rice cakes stuffed with red bean filling

The optimal formula of the steamed rice cakes was stuffed with selected red bean filling in a ratio of 10 g of shell per 20 g of filling and then covered with starch to prevent the samples from sticking to each other. The consumer acceptance test, a central location test (CLT), was conducted. As for this study, a consumer panel consisted of 60 people (aged from 18 to 50 years) who used to consume this kind of sweet. The 9-point hedonic scale was used for acceptability ratings of all attributes (appearance, aroma, sweetness, softness, taste acceptability, and overall acceptability).

Statistic analysis

The mean and the standard deviation values of all results were calculated. ANOVA and Duncan's multiple range test were performed to determine the difference between the means, and the significance was defined at $p < 0.05$.

Fitting response value was done using the linear and quadratic models.

$$Y = \lambda_1 X_1 + \lambda_2 X_2 + \lambda_3 X_3 \text{ (linear)}$$

$$Y = \lambda_1 X_1 + \lambda_2 X_2 + \lambda_3 X_3 + \lambda_1 \lambda_2 X_1 X_2 + \lambda_1 \lambda_3 X_1 X_3 + \lambda_2 \lambda_3 X_2 X_3 \text{ (quadratic)}$$

Y is the predictive dependent variable, namely starch hydrolysis parameter (k and C_{∞}), sensory properties (color, stickiness, softness, and overall acceptability), texture profile analysis, color (L^* , a^* , b^*), water activities, and moisture content. λ is constant coefficients for linear and non-linear terms, and X is the proportion of actual components.

Results and discussion

Physical properties of the steamed rice cakes

The moisture content and a_w of the steamed rice cakes were in the ranges of 58.19–61.52% on the wet weight basis and 0.954–0.984, respectively (Table 2). The results were higher than those of Ji et al. (2007) who reported that the moisture content and a_w of freshly steamed rice cakes were 39.5% and 0.92, respectively. This might be caused by the different content of water used for formulation. The high content of free water present in the freshly steamed rice cakes was probably bound to the hydrophilic constituents, e.g. starch.

The constraints of acceptable regression were the p -value of the model which was less than 0.05 and the p -value of the lack of fit which was higher than 0.05. Thus, the linear model of the moisture content and a_w could not be generated ($p > 0.05$) though the significant differences of these responses were found among ten formulations.

The results of the color measurement in terms of L^* , a^* , and b^* values are presented in Table 2. The regression coefficient exhibited that the amount of GRF had the greatest influence on the L^* value (Table 4). The response plot for the L^* value with respect to the mixture proportion is presented in Fig. 1a. The response plot expressed that the L^* value increased when there was an increase in the GRF amount. This probably related to the original color of GRF which was quite light. The a^* values of the steamed rice cakes were varied from 10.48 to 13.68 indicating the red direction while the b^* values were in the range of 1.35–4.35 denoted as yellowness (Table 2). The amount of mixture proportion was significantly affected the a^* and b^* values of the steamed rice cakes. The highest value of redness was obtained when the high amount of RF was used (Formulation No. 3). This results might be affected the natural color of RF which possessed anthocyanin pigment leading to dark reddish color. However, the correlation among the responses of the a^* , b^* values and the experimental levels of each factor could not be generated at the linear model ($p > 0.05$).

Sensory analysis of the steamed rice cakes

In this study, we proposed to substitute GRF with RF in order to reduce the GI of the steamed rice cakes. There was a report indicating that riceberry oil extracted from a bran part of riceberry grain could significantly improve blood glucose, insulin levels, and GLUT4 transporter as well as lipid profiles in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats fed a high-fat diet (Kongkachuichai et al. 2013). Since riceberry grain was graded as a medium

amylose rice with 20.92% of amylose content (Popluechai et al. 2012), the texture of the steamed rice cakes might exhibit harder and less sticky. XG, the thickening agent widely used in combination with starch in foods, was thus used for physical properties improvement and ameliorating glycemic control.

The mean values of the hedonic ratings for sensory attributes of the steamed rice cake sample obtained from ten formulations are shown in Table 2. The scores for all sensory properties were rated from 6 to 7, and there were no significant differences among samples for each sensory attribute.

The correlation between the mean values of the sensory scores (softness and overall liking) and the mixture proportion are presented in Table 4. Coefficients of regression equation showed that the amount of GRF was the variable that most affected the scores of softness. The response surface contour plots (Fig. 2b) indicated that the GRF increase provided higher scores of softness. The previous finding confirmed that GRF consisted exclusively of amylopectin which contributed to soft and sticky (Lu et al. 2013). As shown in Table 2, the highest score of overall liking was obtained when the low amount of RF and XG was used (Formulation No. 8). The response plot of overall liking (Fig. 2c) was explained by a quadratic model (Table 4) with significant interaction effects among functional ingredients.

Texture properties of the steamed rice cakes

The instrument TPA attributes (hardness, adhesiveness, cohesiveness, springiness, chewiness, and gumminess) of the steamed rice cakes obtained from ten formulations are shown in Table 3. The results indicated that hardness, adhesiveness, and gumminess values for ten formulations were higher than those of the control sample while the values of cohesiveness and springiness attributes for ten formulations were similar to those of the control sample. However, the chewiness value of the control sample was extremely higher than that of ten formulations.

The hardness of the steamed rice cake samples varied from 3.141 to 6.854 N depending on the mixture proportion (Table 3). Coefficients of regression equation showed that the XG content had a major influence on the hardness as it increased when there was an increase in the XG amount (Table 4). The similar results were reported by Cai et al. (2016) who revealed that there was an increase in the hardness of gluten-free noodle when XG was incorporated. Xanthan gum could enhance the stiffness of the mixture due to its rigid and randomly oriented molecules which reduced the mobility and diffusion of the co-solute (Mandala et al. 2002; Mandala and Palogou 2003). In this study, the properties of the system might be governed by mixed

Table 2 Experimental results of moisture content, water activity, color parameters, and sensory analysis of the steamed rice cakes

Formulation No ^c	Moisture ^a (% on wet weight basis)	a _w ^a	Color parameter ^a		Sensory score ^b				
			L*	a*	b*	Color	Stickiness	Softness	Overall liking
1	60.32 ± 0.24b	0.973 ± 0.001bc	25.57 ± 0.26b	12.74 ± 0.32abc	1.38 ± 4.48a	6.23 ± 1.55a	5.97 ± 1.67a	6.03 ± 1.54a	6.00 ± 1.58a
2	58.19 ± 1.01d	0.962 ± 0.003def	29.65 ± 0.20c	11.84 ± 0.24bcde	2.29 ± 0.22a	6.00 ± 1.58a	6.27 ± 1.44a	6.17 ± 1.72a	6.37 ± 1.45a
3	58.35 ± 0.25d	0.954 ± 0.003 g	24.48 ± 0.38ef	13.68 ± 0.74a	3.66 ± 0.53a	6.47 ± 1.46a	6.40 ± 1.67a	6.17 ± 1.88a	6.63 ± 1.54a
4	58.38 ± 0.35d	0.975 ± 0.005b	24.77 ± 0.12def	13.63 ± 0.46a	3.57 ± 0.35a	6.53 ± 1.41a	6.13 ± 1.59a	6.63 ± 1.38a	6.47 ± 1.31a
5	60.23 ± 0.36bc	0.968 ± 0.003bcd	31.35 ± 0.80b	10.79 ± 1.52de	4.02 ± 0.61a	6.23 ± 1.59a	6.10 ± 1.52a	6.00 ± 1.49a	6.10 ± 1.42a
6	61.52 ± 0.07a	0.964 ± 0.002cde	29.22 ± 0.93c	11.48 ± 0.48cde	4.35 ± 0.61a	6.33 ± 1.58a	6.07 ± 1.70a	6.10 ± 1.60a	6.33 ± 1.45a
7	59.28 ± 1.29bcd	0.966 ± 0.004bcd	24.29 ± 0.09f	13.23 ± 0.44ab	3.99 ± 0.20a	6.13 ± 1.55a	6.07 ± 1.87a	6.10 ± 1.71a	6.27 ± 1.60a
8	59.00 ± 0.59 cd	0.984 ± 0.002a	32.28 ± 1.03a	10.48 ± 1.33e	3.99 ± 0.20a	6.40 ± 1.38a	6.50 ± 1.63a	6.57 ± 1.57a	6.73 ± 1.39a
9	59.34 ± 1.01bcd	0.968 ± 0.005bcd	25.37 ± 0.19de	13.68 ± 0.63a	3.21 ± 0.13a	6.03 ± 1.64a	6.23 ± 1.68a	6.17 ± 1.53a	6.47 ± 1.53a
10	56.99 ± 0.55e	0.955 ± 0.006 fg	25.72 ± 0.20d	11.94 ± 0.21bcd	1.35 ± 4.58a	6.33 ± 1.52a	6.07 ± 1.53a	6.03 ± 1.43a	6.37 ± 1.25a
Control	60.11 ± 0.89	0.958 ± 0.006	97.56 ± 0.36	0.55 ± 0.11	9.69 ± 0.76	7.23 ± 1.23	7.04 ± 1.38	7.98 ± 1.76	7.66 ± 1.57

^aMean ± standard deviation based on triplicate measurements. Means within each column (except for 'Control') followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) using DMRT^bMean ± standard deviation based on 30 consumer responses and on a 9-point hedonic scale, wherein 1 = dislike extremely, 5 = neither dislike nor like, and 9 = like extremely^cFormulation numbers corresponds to the numbers shown in Table 1

components. According to the research of Russ et al. (2016), it showed that the addition of XG into a pure starch gel contributed to a micro-phase separation as visualized by confocal laser scanning microscopy. Due to the fact that the XG molecules separated into local domains for the whole system, the interactions of the starch-XG did not occur.

Adhesiveness is a primary function of a surface characteristic that depends on the viscoelastic property. It is one of the undesirable characteristics of the steamed rice cakes, which is an extent measure of the steamed rice cake attachment to teeth. The adhesiveness values of the steamed rice cakes obtained from ten experiment runs were varied between -0.159 and -3.199 N·sec which were higher than those of the control sample (Table 3). The regression coefficient showed that XG was the variable that most affected adhesiveness by the positive effect (Table 4) indicating that the steamed rice cakes containing high XG amount had a higher surface stickiness when compared to those with low XG amount. Han et al. (2011) reported that the adhesiveness of the rice noodle was increased when XG was incorporated. It seemed that XG residing on the rice cake surface directly affected the adhesiveness.

Cohesiveness is an index indicating how well the product withstands a second deformation related to its behavior under the first deformation. As seen in Table 3, the cohesiveness values obtained from ten formulations were similar to those obtained from the control sample. The low structure of cohesiveness was obtained when high RF amount and low XG content were employed (Formulations No. 3, 5 and 6). The XG addition could improve the cohesiveness explained by the relationship between mixture proportion and cohesiveness values as shown in Table 4. The regression coefficient showed that XG was the variable that most affected cohesiveness by the positive effect indicating that the cohesiveness of the steamed rice cakes increased with the XG increase. Similar results were found by Mandala and Bayas (2004), who reported that the starch gel strength increased with the increase of XG concentrations. It could be suggested that more compact network might be formed in the steamed rice cakes containing XG.

Springiness or elasticity is a sensitivity of gel rubberiness in the mouth and is a measure of how much the gel structure is broken down by the initial compression. High springiness appears when the gel structure is broken into a few large pieces during the first texture profile analyzer compression, whereas low springiness results from the gel breaking into many small pieces. Less springy gels more easily break down during mastication than firm and spring gels. In this study, the springiness values obtained from ten formulations were in the range of 0.169 – 0.269 which were slightly lower than those of the control sample. The

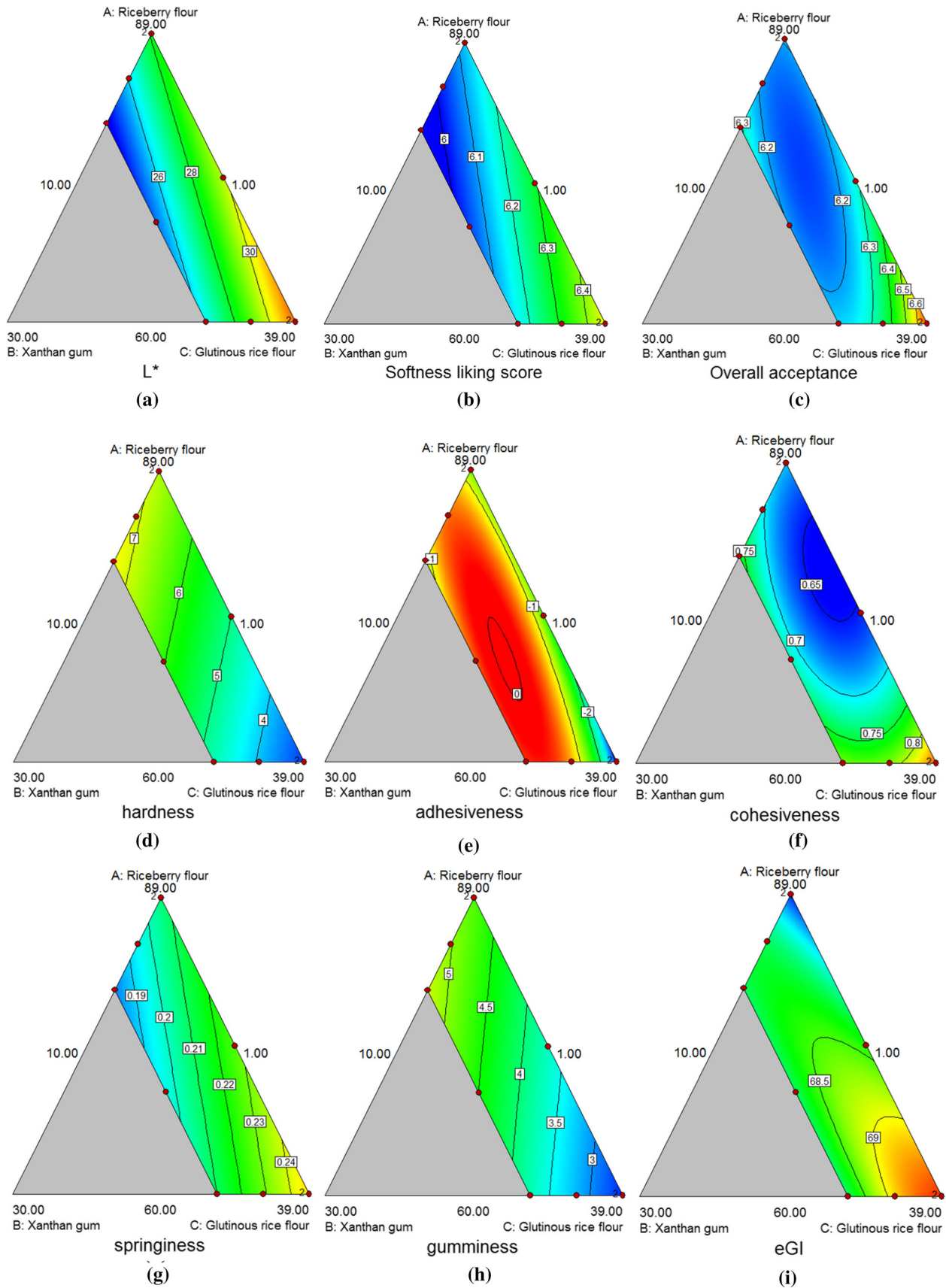


Fig. 1 The 3D response of the softness liking score (a), overall acceptance (b), L* value (c), hardness (d), adhesiveness (e), cohesiveness (f), springiness (g), gumminess (h), and estimated GI (i) affected by riceberry flour (X1), xanthan gum (X2) and glutinous rice flour (X3)

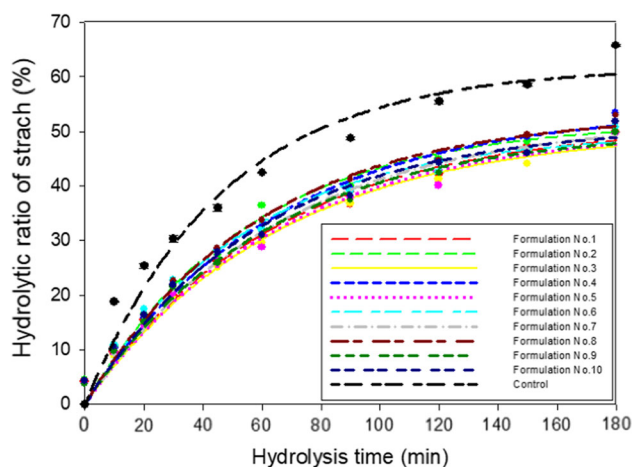


Fig. 2 Enzymatic hydrolysis curves of the steamed rice cakes

coefficients of regression equation showed that the GRF amount was the variable that most affected springiness (Table 4). As seen in Fig. 2g, the higher amount of GRF was used and the higher springiness values were obtained. This indicated a high recovery of gel height after the first compression. This is also in accordance with the studies of Guo et al. (2003) who reported that the substitution of wheat flour with glutinous flour in noodle exhibited a higher springiness.

Gumminess represents the amount of energy required to disintegrate a semisolid food to a state of readiness for swallowing. As can be observed, the gumminess values of the steamed rice cakes obtained from ten formulations were in the range of 2.435–6.460 N which were higher than those obtained from the control sample (Table 3). The values of gumminess had an increasing trend with the increase of XG concentration which was similar to the trend shown for hardness. The gumminess value is determined by hardness multiplied by cohesiveness; the higher value of hardness led to the greater value of gumminess. As shown in Table 4, the regression coefficient showed that XG was the variable that most affected gumminess by the positive linear effect indicating that XG is the most important influence on this parameter. The similar trend was obtained by Sanguinetti et al. (2015) indicating that the fresh pasta's dough made with a higher amount of xanthan gum resulted in a more gummy dough when compared to that made with the lower amount of XG.

Chewiness is a quantity to simulate the energy required for masticating a semisolid sample to a steady state before

the swallowing process. The chewiness values of the steamed rice cakes were varied from 0.594 to 1.454 N·s which were extremely lower than those of the control sample (Table 3). The amount of mixture proportion was significantly affected chewiness values of the steamed rice cakes; however, the correlation between the response and the experimental levels of each factor could not be generated at the linear model ($p > 0.05$).

Enzymatic hydrolysis of the steamed rice cakes

The hydrolysis curves of the steamed rice cakes were illustrated in Fig. 2. All regression curves were coincident to the experimental data with the R^2 in 0.977–0.986 as listed in Table 3, and the equilibrium concentration (C_∞), kinetic constant (k), and the area under the curve (AUC) were evaluated accordingly. A higher C_∞ showed that the samples were easily digestible, and a lower C_∞ implied the presence of indigestible components in the sample. In this study, the steamed rice cakes containing high GRF amount (Formulation No. 4) performed higher C_∞ than the other samples ($p \leq 0.05$). The relationship of mixture proportion on C_∞ could be generated and the coefficients of the regression equation are shown in Table 4. It was found that the amount of GRF was the variable that most affected C_∞ which predicted to be digested in a short duration by the gastrointestinal system of the human body after consumption. The research of Noda et al. (2003) showed that the apparent amylose content in raw rice starches was negatively correlated with digestibility. A higher amylose content generally resulted in a more regular molecular arrangement in the structure along with a higher crystallinity (Chung et al. 2011) which was resistant to digestion by enzymes.

The kinetic constants (k) value displayed a slope of the hydrolytic curve, and this mathematically denoted as a rate of hydrolysis. Generally, a steep slope of the hydrolytic curve represented that the sample contained a definite portion of rapidly digestible starch. On the contrary, a gentle slope denoted the existence of slowly digestible starch in starchy food. In this experiment, the k values of the steamed rice cakes were in the range of 0.015–0.019 min^{-1} . The formulation containing the high amount of GRF (Formulation No. 8) exhibited the highest value of k . This was in accordance with the study of Ferng et al. (2016) who reported that the k value of chiffon cakes made from glutinous rice was higher than that of the cakes made from indica and japonica rice.

Estimated glycemic index, eGI

The hydrolysis index (HI) and the estimated glycemic index (eGI) were listed in Table 3. The correlation equation

Table 3 Experimental results of texture profile analysis, hydrolysis parameters, hydrolysis indices, and estimated glycemic indices of the steamed rice cakes

Formulation no. ^b	Texture profile analysis ^a			Hydrolysis parameter ^a					AUC ^a	HI ^a	eGI ^a	
	Hardness (N)	Adhesiveness (N·sec)	Cohesiveness (s)	Springiness	Chewiness (N·sec)	Gumminess (N)	C _∞ (%)	k (min ⁻¹)				Adj. R ²
1	4.835 ± 1.145 cd	- 0.159 ± 0.071a	0.737 ± 0.046bcd	0.169 ± 0.018e	0.600 ± 0.155c	3.524 ± 0.642ef	49.72 ± 0.06 h	0.016 ± 0.000ef	0.984	6166.45 ± 4.56 g	50.79 ± 0.06f	67.59 ± 0.03f
2	5.355 ± 1.698 cd	- 0.747 ± 0.302ab	0.766 ± 0.046bc	0.231 ± 0.039bc	0.962 ± 0.400b	4.045 ± 1.047cde	52.00 ± 0.10d	0.018 ± 0.000b	0.983	6579.14 ± 5.09b	54.28 ± 0.04b	69.51 ± 0.02b
3	6.336 ± 0.688bc	- 1.735 ± 1.035d	0.687 ± 0.038d	0.209 ± 0.035bcd	0.915 ± 0.208b	4.345 ± 0.437bcd	50.45 ± 0.05 g	0.015 ± 0.000f	0.984	5983.75 ± 5.84i	49.45 ± 0.05 h	66.86 ± 0.03 h
4	3.141 ± 0.464 fg	- 2.978 ± 1.633e	0.854 ± 0.093a	0.269 ± 0.065a	0.750 ± 0.333bc	2.692 ± 0.558 g	54.40 ± 0.10a	0.016 ± 0.000e	0.984	6520.55 ± 5.42c	53.80 ± 0.04c	69.24 ± 0.02c
5	6.817 ± 0.723b	- 0.894 ± 0.184abc	0.687 ± 0.044d	0.207 ± 0.023bcd	0.971 ± 0.161b	4.671 ± 0.401bc	50.97 ± 0.10f	0.015 ± 0.000f	0.981	6049.19 ± 4.20 h	49.91 ± 0.03 g	67.11 ± 0.02 g
6	5.230 ± 0.824d	- 1.593 ± 0.592 cd	0.646 ± 0.044bcd	0.215 ± 0.032bcd	0.839 ± 0.197bc	3.878 ± 0.472de	51.50 ± 0.38e	0.017 ± 0.000c	0.977	6392.75 ± 5.92d	52.59 ± 0.06d	68.58 ± 0.04d
7	3.886 ± 1.039ef	- 0.405 ± 0.085a	0.793 ± 0.040b	0.205 ± 0.025 cd	0.637 ± 0.194c	3.075 ± 0.801 fg	52.55 ± 0.20c	0.015 ± 0.000f	0.983	6248.75 ± 5.86f	51.55 ± 0.05e	68.01 ± 0.03e
8	2.807 ± 0.319 g	- 3.199 ± 1.354e	0.875 ± 0.114a	0.243 ± 0.039ab	0.594 ± 0.123c	2.435 ± 0.242 g	53.49 ± 0.06b	0.019 ± 0.000a	0.986	6633.83 ± 2.07a	54.73 ± 0.02a	69.76 ± 0.01a
9	6.854 ± 1.392b	- 0.414 ± 0.256a	0.727 ± 0.038 cd	0.178 ± 0.122de	0.895 ± 0.257b	4.966 ± 0.943b	50.41 ± 0.05 g	0.016 ± 0.000d	0.985	6169.92 ± 9.99 g	50.90 ± 0.08f	67.66 ± 0.05f
10	8.744 ± 1.767a	- 1.382 ± 0.944bcd	0.741 ± 0.026bcd	0.221 ± 0.032bc	1.454 ± 0.405a	6.460 ± 1.288a	51.37 ± 0.33e	0.017 ± 0.000c	0.978	6355.97 ± 4.50e	52.44 ± 0.04d	68.50 ± 0.02d
Control	1.002 ± 0.117	- 0.031 ± 0.026	0.726 ± 0.045	0.327 ± 0.055	5.846 ± 0.628	1.964 ± 0.385	61.81 ± 0.56	0.021 ± 0.000	0.984	8294.69 ± 17.38	68.43 ± 0.14	77.27 ± 0.079

^aMean ± standard deviation based on triplicate measurements. Means within each column (except for 'Control') followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) using DMRT^bFormulation numbers corresponds to the numbers shown in Table 1

between HI and GI resulted from Goni et al. (1997) was applied to predict the eGI. The steamed rice cakes containing the high amount of GRF (Formulation No. 8) expressed a higher eGI due to the fact that it had a higher value of HI. The regression coefficient (Table 4) showed that XG was the variable that most affected HI and eGI by the negative effect indicating that the steamed rice cakes containing the high XG amount had lower values of HI and eGI than those with low XG amount.

The research of Osilesi et al. (1985) showed that the blood glucose of diabetic subjects was lowered after feeding muffin containing xanthan gum for six weeks. Edible gums might slow gastric emptying by impeding the mixing of intestinal contents, thus restricting the access of food to hydrolytic enzymes and particularly to intestinal glucosidases. As shown in Table 3, the eGI values of the steamed rice cakes obtained from this experiment were ranged in 66.86–69.76 which were lower than those of the control sample. If the white bread was designated as the reference food, the criteria of low GI and high GI foods were defined as $GI \leq 60$ and $GI > 85$, respectively. Thus, the steamed rice cakes were classified as the medium GI food based on the prediction relation by Goni et al. (1997).

Multivariable optimization

Finally, a multiple optimization was performed by maximizing the sensory scores for softness and overall acceptability and, at the same time, minimizing hardness, adhesiveness and gumminess, and the eGI value. The resulting optimum composition was 60% sticky rice flour, 39% riceberry flour, and 1% of xanthan gum (desirability = 0.673).

The predicted and observed values for all parameters of the chosen model were similar to those of small discrepancies. The experimental errors of ten parameters were ranged from 3.18 to 15.94% (data not shown).

Properties of red bean filling using isomaltulose as a sucrose replacer

The moisture contents of filling isomaltulose as a sucrose replacer at the levels of 50 and 100% were 31.58% (on wet basis) and 35.79% (on wet basis), respectively, while the filling with 100% sucrose (control, 0% of isomaltulose) was 27.09% (on wet basis). The water activity values of filling with 0, 50, and 100% of isomaltulose were 0.906, 0.914, and 0.925, respectively. It was found that the sample with a high content of isomaltulose exhibited higher moisture content and a_w . The similar results were reported by Periche et al. (2015) who found that the moisture content and a_w of marshmallows with 60 g of glucose syrup and 40 g of isomaltulose were higher than those with 60 g

Table 4 Regression coefficients and correlation of the adjusted model to experimental data in D-optimal mixtures design for physical properties, texture profile analysis, hydrolysis parameters, hydrolysis indices, and estimated glycemic indices of the steamed rice cakes

Variable	λ_1 (RF)	λ_2 (XG)	λ_3 (GRF)	$\lambda_1\lambda_2$	$\lambda_1\lambda_3$	$\lambda_2\lambda_3$	Adj. R^2
<i>Physical property</i>							
L*	0.274	− 0.181	0.391	−	−	−	0.593
<i>Sensory analysis</i>							
Softness	0.060	0.038	0.072	−	−	−	0.570
Overall liking	0.063	0.392	0.122	-3.401×10^{-3}	-7.891×10^{-4}	-5.692×10^{-3}	0.757
<i>Texture profile analysis (TPA)</i>							
Hardness (N)	0.081	0.131	− 0.047	−	−	−	0.721
Adhesiveness (N·sec)	0.024	3.606	0.278	− 0.039	-3.699×10^{-3}	− 0.051	0.888
Cohesiveness (s)	8.567×10^{-3}	0.118	0.043	1.140×10^{-3}	-5.668×10^{-4}	-1.651×10^{-3}	0.890
Springiness (s)	1.956×10^{-3}	-8.106×10^{-4}	3.358×10^{-3}	−	−	−	0.466
Gumminess (N)	0.055	0.106	− 0.021	−	−	−	0.609
<i>Hydrolysis parameters</i>							
C_∞ (%)	0.499	0.434	0.592	−	−	−	0.626
HI	0.468	− 3.339	0.626	0.047	5.781×10^{-4}	0.028	0.765
eGI	0.654	− 1.436	0.741	0.026	3.174×10^{-4}	0.016	0.765

of glucose syrup and 40 g of sucrose. It could be concluded that the samples contained isomaltulose exhibiting the high moisture content and a_w . This indicated that there was more water susceptibility than microbiology spoilage reactions.

The liking scores obtained from the sensory evaluation were in the range of six to seven for all attributes. The overall liking of filling with 100% of isomaltulose corresponded to “like slightly” on the hedonic scale (data not shown). Although the sweetness of filling with 100% of isomaltulose was scored lower than the others, the significant difference was not found among three formulas ($p > 0.05$).

The red bean filling with 100% of isomaltulose exhibited the lowest C_∞ and k values ($p \leq 0.05$) which denoted the existing slow digestibility. The structure of isomaltulose was composed of glucose and fructose which was similar to sucrose but joined by a stronger glycoside bond type α -(1, 6) which was slowly hydrolyzed by intestinal disaccharidases thus caused an attenuated blood glucose and insulin response, a property which might be particularly favorable for diabetics (Lina et al., 2002). On the whole, the eGI values of filling were lower when the substitute levels with isomaltulose were higher. In case of 100% of substitution, the eGI value was lowest to 52.75.

As the differences of liking scores obtained from the sensory evaluation between filling with 100% of isomaltulose and the control sample were practically non-existent, the samples which had the highest levels of isomaltulose were chosen on a basis of the advantages to consumer health.

Consumer acceptance of the steamed rice cakes with red bean filling

The steamed rice cakes composed of 60% sticky rice flour, 39% riceberry flour, and 1% of xanthan gum were stuffed with red bean filling prepared from 100% replacement of total sucrose content with isomaltulose. The mean acceptability ratings were 6.60, 6.73, 7.23, 7.62, 7.43, and 7.34 for appearance, aroma, sweetness, softness, taste acceptability, and overall liking, respectively (data not shown). This indicated that the steamed rice cakes with red bean filling were generally acceptable to consumers who participated in this study. Finally, the eGI value of this product was 70.90 classified as the medium GI food.

Conclusion

The in vitro hydrolysis showed that the substitution of glutinous rice flour with riceberry flour and xanthan gum contributed to the lowering eGI values of the steamed rice cakes. The number of ingredients used also had an impact on the texture properties present in this work. If compared to the control sample, the substitution with riceberry flour and xanthan gum extremely increased hardness, adhesiveness as well as gumminess in which xanthan gum was the variable that had the most effect on those attributes. The optimized ingredient parameters were found to be 60%, 39%, and 1% for glutinous rice flour, riceberry flour, and xanthan gum, respectively, which resulted in “like moderately” for overall acceptability. Further, the red bean

filling used isomaltulose as a sucrose replacer showed that the substitution level at 100% resulted in the lowering *e*GI value (52.75) when compared to that of the control sample (65.77) while the scores of sensory acceptance were not significantly different among them. Lastly, the optimum steamed rice cakes stuffed with the red bean filling with 100% isomaltulose substitution for sucrose expressed that the *e*GI value equal to 70.90 was classified as the medium GI food.

Acknowledgements The authors would like to thank the Institute of Research and Development, Lampang Rajabhat University for the financial support.

References

- AOAC (2000) Official methods of analysis of AOAC international, 17th edn. Arling, VA
- Cai J, Chiang JH, Tan MYP, Saw LK, Xu Y, Ngan-Loong MN (2016) Physicochemical properties of hydrothermally treated glutinous rice flour and xanthan gum mixture and its application in gluten-free noodles. *J Food Eng* 186:1–9
- Chung HJ, Liu Q, Lee L, Wei D (2011) Relationship between the structure, physicochemical properties and in vitro digestibility of rice starches with different amylose contents. *Food Hydrocoll* 25(5):968–975
- Feng LH, Liou CM, Yeh R, Chen SH (2016) Physicochemical property and glycemic response of chiffon cakes with different rice flours. *Food Hydrocoll* 53(2):172–179
- Goffi I, Bravo L, Larrauri JA, Calixto FS (1997) Resistant starch in potatoes deep-fried in olive oil. *Food Chem* 59(2):269–272
- Guo GM, Jackson DS, Graybosch RA, Parkhurst AM (2003) Asian salted noodle quality: impact of amylose content adjustments using waxy wheat flour 1. *Cereal Chem* 80(4):437–445
- Han JA, Seo TR, Lim ST, Park DJ (2011) Utilization of rice starch with gums in Asian starch noodle preparation as substitute for sweet potato starch. *Food Sci Biotechnol* 20(5):1173–1178
- Ji Y, Zhu K, Qian H, Zhou H (2007) Microbiological characteristics of cake prepared from rice flour and sticky rice flour. *Food Control* 18(12):1507–1511
- Kim C, Yoo B (2006) Rheological properties of rice starch–xanthan gum mixtures. *J Food Eng* 75(1):120–128
- Kongkachuichai R, Prangthip P, Surasiang R, Posuwan J, Charoensiri R, Kettawan A, Vanavichit A (2013) Effect of riceberry oil (deep purple oil; *Oryza sativa* Indica) supplementation on hyperglycemia and change in lipid profile in Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats fed a high fat diet. *Int Food Res J* 20(2):873–882
- Lina BAR, Jonker D, Kozianowski G (2002) Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol* 40(10):1375–1381
- Lu S, Cik TT, Lii CY, Lai P, Chen HH (2013) Effect of amylose content on structure, texture and α -amylase reactivity of cooked rice. *LWT Food Sci Technol* 54(1):224–228
- Mahasukhonthachai K, Sopade PA, Gidley MJ (2010) Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size. *J Food Eng* 96(1):18–28
- Mandala IG, Bayas E (2004) Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocoll* 18(2):191–201
- Mandala IG, Palogou ED (2003) Effect of preparation conditions and starch/xanthan concentration on gelation process of potato starch systems. *Int J Food Prop* 6(2):311–328
- Mandala IG, Palogou ED, Kostaropoulos AE (2002) Influence of preparation and storage conditions on texture of xanthan–starch mixtures. *J Food Eng* 53(1):27–38
- Nagashima N, Kawabata A, Nakamura M (1987) Physicochemical properties of “Mochi” prepared by various methods and with various additives. *J Jpn Soc Starch Sci* 34(3):179–185 ((in Japanese))
- Noda T, Nishiba Y, Sato T, Suda I (2003) Properties of starches from several low-amylose rice cultivars. *Cereal Chem* 80(2):193–197
- Osilesi O, Trout DL, Glover EE, Harper SM, Koh ET, Behall KM, O’Dorisio TM, Tartt J (1985) Use of xanthan gum in dietary management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 42(4):597–603
- Panlasigui LN, Thompson LU (2006) Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *Int J Food Sci Nutr* 57(3–4):151–158
- Periche A, Heredia A, Escriche I, Andrés A, Castello ML (2015) Potential use of isomaltulose to produce healthier marshmallows. *LWT Food Sci Technol* 62(1):605–612
- Popluechai S, Laosat N, Sasanatayart R, Kespechara K (2012) Appear amylose content and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *Wx* genes in some Thai rice (*Oryza sativa* L. var indica). In: Mae Fah Luang University 1st international conference, pp 1–4
- Posuwan J, Prangthip P, Leardkamolkarn V, Yamborisut U, Surasiang R, Charoensiri R, Kongkachuichai R (2013) Long-term supplementation of high pigmented rice bran oil (*Oryza sativa* L.) on amelioration of oxidative stress and histological changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet; Riceberry bran oil. *Food Chem* 138(1):501–508
- Russ N, Zielbauer BI, Ghebremedhin M, Vilgis TA (2016) Pregelatinized tapioca starch and its mixtures with xanthan gum and *i*-carrageenan. *Food Hydrocoll* 56:180–188
- Sanguinetti AM, Secchi N, Del Caro A, Fadda C, Fenu PAM, Catzeddu P, Piga A (2015) Gluten-free fresh filled pasta: The effects of xanthan and guar gum on changes in quality parameters after pasteurization and during storage. *LWT Food Sci Technol* 64(2):678–684
- Yamamoto S, Kuriyama N, Komiyama F (2001) Physical properties and sensory evaluation of “Imo-Mochi” with added potato starch. *J Home Econ Jpn* 52(1):17–22 ((in Japanese))

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



การพัฒนาผลิตภัณฑ์บราวนี่เพื่อสุขภาพจากถั่วสามสี

Development of Healthy Brownie from Three Colored Beans

สุภาณี บุญเสน¹ ณัฐสิมา บุญใบ¹ สุมณา พูลย์ม¹ อัญชิสร สิริทรัพย์เจริญ¹ พีรพงศ์ งามนิคม² และ ศิริลักษณ์ สุรินทร์^{3*}
 Suwaphanee Boonsean¹, Nutsima Boonbai¹, Sumana Poonyim¹, Auntisorn Sirisubjareon¹,
 Peerapong Ngamnikom² and Siriluck Surin^{3*}

¹สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

²สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (ศูนย์รังสิต) อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12130

³สาขาวิทยาศาสตร์และการจัดการเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12110

¹Division of Food and Nutrition, Faculty of Science, Chandrakasem Rajabhat University, Chatuchak, Bangkok 10900, THAILAND

²Division of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi (Rangsit Campus), Thanyaburi, Pathumthani 12130, THAILAND

³Division of Food Science and Technology Management, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Khlong Luang, Pathumthani, 12110

*Corresponding author e-mail: siriluck_s@rmutt.ac.th

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received: 23 June, 2020

Revised: 6 August, 2020

Accepted: 31 August, 2020

Available online: 15 February, 2021

DOI: 10.14456/rj-rmutt.2021.4

Keywords: brownie, beans, sensory evaluation, nutrition, physical properties

Brownie is a bakery product with the main composition of wheat flour. Therefore, this research was to develop brownie made from three colors of bean (black-, white-, and red kidney beans) to replace wheat flour and to add nutritional value to the brownie. Based on the results of the selection of basic brownie recipes, consumers rated the most preference recipe from The Health and Cuisine magazine (S3). The score was in the range of 7.2-7.9 (moderate preference) due to its higher chocolate and cocoa composition than the basic S1 and S2 recipes. Therefore, the S3 recipe was a prototype in the development of three-colored bean brownie, which was a 100%

substitute for wheat flour. In the study of bean ratio (black: white: red), the ratio was 50:25:25 (M1), 25:50:25 (M2) and 25:25:50 (M3). From sensory evaluation, it was found that consumers rated the highest preference recipe for M2 in taste and overall liking, significantly ($p < 0.05$). The score was in the range of 6.8-7.5 (slight to moderate preference). For the physical properties of M2, its color showed L^* , a^* and b^* as 6.75, 2.24 and 1.18, respectively. Its water activity (a_w) was 0.75. The nutritional value of 3 recipes of three-colored bean brownie products in comparison with S3 (50 grams of weight per serving was used in the calculation) showed that all three-colored bean brownies contained protein and fiber with the increased average volume by 14.31 and 67.72%, respectively. According to customer acceptance testing (100 persons), it was found that 88% of consumers accepted and were willing to purchase brownie M2.

บทคัดย่อ

บราวนี่ เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่มีองค์ประกอบของแป้งสาลีเป็นหลัก อาจไม่เหมาะกับผู้ที่แพ้กลูเตนในแป้งสาลี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาบราวนี่จากถั่วสามสี ได้แก่ ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดง เพื่อทดแทนแป้งสาลีในการผลิตบราวนี่ และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์บราวนี่ จากผลการคัดเลือกสูตรพื้นฐานในการผลิตบราวนี่ พบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบบราวนี่สูตรพื้นฐานจากนิยสารแฮลแอนคลูซิน (S3) สูงสุด คะแนนอยู่ในช่วง 7.2-7.9 (ชอบปานกลาง) เนื่องจากมีส่วนประกอบของช็อกโกแลตและโกโก้สูงกว่าสูตรพื้นฐาน S1 และ S2 ดังนั้นจึงได้นำบราวนี่สูตร S3 ไปเป็นต้นแบบในการพัฒนา บราวนี่จากถั่วสามสี ซึ่งทดแทนแป้งสาลีร้อยละ 100 สำหรับการศึกษาการผันแปรอัตราส่วน เลือกใช้เป็น ถั่วดำ:ถั่วขาว:ถั่วแดง ร้อยละ 50:25:25 (M1) 25:50:25 (M2) และ 25:25:50 (M3) ของปริมาณแป้งสาลี จากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส พบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบบราวนี่อัตราส่วนสูตร M2 สูงสุด ในคุณลักษณะรสชาติและความชอบโดยรวม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าคะแนน

ความชอบอยู่ในช่วง 6.8 - 7.5 (ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง) สำหรับบราวนี่ถั่วสามสีอัตราส่วนสูตร M2 นั้น มีค่า L^* , a^* และ b^* เท่ากับ 6.75 2.24 และ 1.18 ตามลำดับ และปริมาณน้ำอิสระ เท่ากับ 0.75 เมื่อคำนวณคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสี ทั้ง 3 สูตร เปรียบเทียบกับสูตรพื้นฐาน (S3) กำหนดน้ำหนักต่อหนึ่งหน่วยบริโภคเท่ากับ 50 กรัม พบว่า บราวนี่จากถั่วสามสีมีปริมาณโปรตีน และใยอาหารเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 14.31 และ 67.72 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสี อัตราส่วนสูตร M2 กับ ผู้บริโภคจำนวน 100 คน พบว่า ผู้บริโภคทั่วไปให้การยอมรับและตัดสินใจซื้อร้อยละ 88

คำสำคัญ: บราวนี่ ถั่ว การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ คุณภาพทางกายภาพ

บทนำ

ในปัจจุบันสังคมไทยมีวิถีการดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสังคมเมืองที่ผู้คนมีความเร่งรีบมากขึ้น ผู้บริโภคต่างให้ความสำคัญกับการ

ทำอาหารเองน้อยลง ดังนั้นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่จึงเป็นส่วนหนึ่งที่ผู้บริโภคสามารถเลือกรับประทานเป็นอาหารว่าง รวมไปถึงอาหารมื้อหลักได้ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ส่วนใหญ่ทำมาจากแป้งสาลี มีองค์ประกอบของกลูเตนที่ส่งผลให้ผู้บริโภคบางกลุ่มที่แพ้กลูเตนไม่สามารถรับประทานได้ โดยผู้บริโภคกลุ่มนี้ คิดเป็นร้อยละ 1 ของประชากรทั่วโลก ดังนั้นในหลายประเทศจึงหันมาให้ความสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ปลอดจากกลูเตน (Gluten-free Foods) วางจำหน่ายมากขึ้น โดยเฉพาะในอเมริกา ออสเตรเลีย และประเทศในฝั่งยุโรป (1)

บราวนี่เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่อย่างหนึ่งที่รู้จักกันทั่วไปและรับประทานง่าย โดยมีลักษณะคล้ายเค้ก ช็อกโกแลตเข้มข้น แต่เนื้อแน่นกว่าเค้ก เพราะมีปริมาณผงฟูน้อย บราวนี่นิยมอบในถาดแบนรูปสี่เหลี่ยมสูง 1 นิ้ว แล้วตัดแบ่งเป็นชิ้นลักษณะสี่เหลี่ยม ทั้งนี้มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาการทดแทนการใช้แป้งสาลีในผลิตภัณฑ์ บราวนี่ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่รักสุขภาพและผู้บริโภคที่แพ้กลูเตน ตัวอย่างเช่น การทดแทนแป้งสาลีด้วยแป้งกล้วยน้ำว้าที่ปริมาณร้อยละ 50 และการใช้แป้งข้าวไรซ์เบอร์รี่ในปริมาณร้อยละ 100 ทดแทนการใช้แป้งสาลีในการผลิตบราวนี่ ผลิตภัณฑ์บราวนี่ที่พัฒนาได้ทั้ง 2 ผลิตภัณฑ์นั้น มีใยอาหารที่เพิ่มขึ้น และยังได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าร้อยละ 80 (2, 3) นอกจากนี้ มีงานวิจัยศึกษาการใช้มันเทศสีส้ม (orange sweet potato) ทดแทนแป้งสาลีในการผลิตบราวนี่เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร ซึ่งสามารถทดแทนแป้งสาลีได้สูงถึงร้อยละ 50-75 โดยไม่ส่งผลต่อลักษณะปรากฏและการประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค (4)

ถั่วเป็นวัตถุดิบอย่างหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเฉพาะตัวบางอย่าง เช่น ถั่วขาวมีคุณสมบัติการช่วยควบคุมน้ำหนัก เนื่องจากมีสารฟาซีโอลามีน (phaseolamin) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α -amylase) ทำให้ไม่สามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ ร่างกายจึงได้รับพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตลดลง (5) ถั่วดำช่วยบำรุงหัวใจ บำรุง

สายตา บำรุงไต ลดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ขับเหงื่อ กระตุ้นการขับถ่าย และเพิ่มประสิทธิภาพระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) โพลีฟีนอล แมกนีเซียม วิตามินบี6 วิตามินบี1 และวิตามินบี2 ในปริมาณสูง (6) ส่วนถั่วแดงช่วยต้านอนุมูลอิสระ ชะลอการเกิดโรคไขมันอุดตันในหลอดเลือด ลดโรคหลอดเลือดหัวใจ แข็งตัว และบำรุงเลือด เนื่องจากอุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน และธาตุเหล็กสูง (7) โดยถั่วทั้งสามชนิดนี้ สามารถใช้ทดแทนแป้งสาลีในการทำผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงพัฒนาผลิตภัณฑ์บราวนี่โดยใช้ถั่วสามสี ได้แก่ ถั่วขาว ถั่วดำ และถั่วแดง มาทดแทนการใช้แป้งสาลี เพื่อเพิ่มทางเลือกผลิตภัณฑ์ให้กับผู้บริโภคที่แพ้กลูเตน และกลุ่มผู้บริโภคที่รักสุขภาพ อีกทั้งงานวิจัยนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศ ลดการนำเข้าแป้งสาลีจากต่างประเทศ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาอัตราส่วนถั่วสามสีที่เหมาะสมในการผลิตบราวนี่ โดยศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส คุณสมบัติทางกายภาพ คุณค่าทางโภชนาการ และศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบและอุปกรณ์

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตบราวนี่ ได้แก่ ถั่วสามสี แบบแห้ง คือ ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดง (ตราไร้ทิพย์) ช็อกโกแลตและผงโกโก้ (ตราทิวลิป) แป้งอเนกประสงค์ (ตราว่าว) แป้งเค้ก (ตราพัดโบก) น้ำตาลทรายขาว (ตราลิน) น้ำตาลทรายแดง (ตรามิตรผล) ไข่ไก่ (ตราซีพี) เนยจืด (ตราอลาวรี) เกลือ (ตราปรุงทิพย์) เบกกิ้งโซดา (ตราแม็กกาแรต) และกลิ่นวานิลลา (ตราวินเนอร์) สำหรับอุปกรณ์ในการผลิตบราวนี่ ใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตขนมอบ

การคัดเลือกบราวนี่สูตรพื้นฐาน

คัดเลือกสูตรบราวนี่พื้นฐาน 3 สูตร จากแหล่งที่มาดังต่อไปนี้ หนังสือถั่วและธัญพืชเมล็ดพันธุ์เพื่อสุขภาพ (S1)

(8) หนังสือ Chocolate Lover (S2) (9) และ นิตยสารแฮล แอนคลูซีน (S3) (10) ส่วนผสมของแต่ละสูตรดังตารางที่ 1 นำบรานี้สูตรพื้นฐานทั้ง 3 สูตร ไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ซึ่งประเมินด้วยวิธี 9-Point Hedonic Scale (คะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด ถึง 9 = ชอบมากที่สุด) โดยใช้ผู้ทดสอบชิมบุคคลทั่วไป จำนวน 50 คน

ตารางที่ 1 สูตรของบรานี้พื้นฐานทั้ง 3 สูตร

ส่วนผสม	ปริมาณ (ร้อยละ)		
	สูตรที่ S1*	สูตรที่ S2**	สูตรที่ S3***
ช็อกโกแลต	19.6	20.1	28.2
ผงโกโก้	-	2.2	6.1
เนยจืด	11.8	19.0	14.1
แป้งอเนกประสงค์	18.3	-	13.4
แป้งเค้ก	-	12.8	-
ไข่ไก่	16.4	16.7	18.8
น้ำตาลทราย	32.7	20.1	16.9
น้ำตาลทรายแดง	-	7.8	-
เบกกิ้งโซดา	-	-	0.4
เกลือป่น	0.3	0.2	0.4
กลิ่นวานิลลา	0.8	1.1	1.9

ขั้นตอนการทำบรานี้สูตรพื้นฐาน

สำหรับวิธีการทำบรานี้เริ่มจากการละลายเนยจืด ช็อกโกแลต และผงโกโก้ด้วยไอน้ำแล้วพักไว้ จากนั้นตีไข่ไก่ น้ำตาล เกลือ เบกกิ้งโซดา และกลิ่นวานิลลาให้เข้ากัน ผสมแป้งสาลีและช็อกโกแลตที่ละลายไว้คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำส่วนผสมที่ได้เทใส่ถาดและอบด้วยเตาอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-35 นาที จากนั้นพักไว้ในเตาอบ นาน 15 นาที นำตัวอย่าง บรานี้ ออกจากเตาอบ เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติในขั้นตอนต่อไป

อัตราส่วนส่วนผสมที่เหมาะสมในการผลิตบรานี้

เลือกสูตรบรานี้พื้นฐานที่ได้คะแนนทางด้านประสาทสัมผัสมากที่สุดมาศึกษาอัตราส่วนของส่วนผสม

ได้แก่ ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดง โดยใช้ทดแทนแป้งสาลีร้อยละ 100 ในสูตรบรานี้พื้นฐาน และกำหนดอัตราส่วนของถั่วทั้ง 3 ชนิด ดังตารางที่ 2 นำตัวอย่างไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยผู้ทดสอบจำนวน 50 คน

ตารางที่ 2 อัตราส่วนถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดงในการผลิตบรานี้

ชนิดของถั่ว	อัตราส่วน (ร้อยละ)		
	สูตรที่ M1	สูตรที่ M2	สูตรที่ M3
ถั่วดำ	50	25	25
ถั่วขาว	25	50	25
ถั่วแดง	25	25	50

ขั้นตอนการเตรียมถั่วสามสีในการผลิตบรานี้จากถั่วสามสี

สำหรับขั้นตอนการเตรียมถั่ว นำถั่วแต่ละชนิด ต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดจนถั่วสุก จากนั้นนำถั่วมาพักไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เมื่อถั่วมีอุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำถั่วทั้ง 3 ชนิด มาบดด้วยเครื่องบดอาหาร (HR1399, Philips) จนละเอียด แล้วนำมาผัดผ่านตะแกรงร่อนแป้ง ความถี่ 60 เมช นำถั่วที่ได้มาชั่งตามอัตราส่วนที่กำหนดในตารางที่ 2 และนำไปทำบรานี้ด้วยขั้นตอนการผลิตแบบเดียวกับบรานี้สูตรพื้นฐาน

การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของบรานี้

นำผลิตภัณฑ์บรานี้มาทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสในคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม แบบ 9-Point Hedonic Scale โดยผู้ทำการทดสอบเป็นบุคคลทั่วไป จำนวน 50 คน ทำการทดสอบในโรงอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม สำหรับวิธีการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส ตัวอย่างบรานี้ถูกตัดให้มีขนาด 3×3 เซนติเมตร และบรรจุในถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิด แต่ละตัวอย่างจะติดรหัสสุ่ม 3 ตัว ตัวอย่างจะถูกเสิร์ฟทีละตัวอย่างแบบสุ่ม โดยระหว่างการทดสอบชิมผู้ทดสอบชิมจะต้องดื่มน้ำคั้นระหว่างตัวอย่าง

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบในการผลิตบรวนี่จากถั่วสามสี

วัตถุดิบ	พลังงาน (กิโลแคลอรี)	โปรตีน (กรัม)	คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	ไขมัน (กรัม)	ใยอาหาร (กรัม)	แคลเซียม (มิลลิกรัม)	ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	เหล็ก (มิลลิกรัม)	วิตามินเอ (ไมโครกรัม)
เนยจืด	725	0.5	1.4	81.6	-	15	16	1.1	3300
ซีอิ๊วขาว	331	-	53.4	28.1	2.2	92	455	2.7	60
โกโก้	281	-	51.7	21.2	-	90	558	7.4	30
ถั่วดำ	357	-	70	1.4	6.7	59	347	6.5	10
ถั่วขาว	359	22.3	61.1	2.8	3.1	-	-	6.8	-
ถั่วแดง	352	-	64.5	3.1	7.3	397	285	4	55
น้ำตาล	387	-	96.8	-	-	-	-	-	-
ไข่ไก่	169	12.7	1.7	11.9	-	76	186	3.5	1140
เกลือ	-	-	-	-	-	253	-	0.1	-

ที่มา: หนังสือตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย

ตารางที่ 4 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของบรวนี่สูตรพื้นฐาน

สูตรพื้นฐาน	คุณลักษณะ				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
สูตรที่ S1	6.6 ^b ±1.3	6.8 ^b ±1.2	7.1 ^a ±1.3	7.0 ^a ±1.6	7.5 ^a ±1.2
สูตรที่ S2	7.6 ^{ab} ±1.2	7.1 ^a ±1.2	7.6 ^a ±1.1	7.3 ^a ±1.6	7.8 ^a ±1.1
สูตรที่ S3	7.8 ^a ±1.2	7.5 ^a ±1.2	7.5 ^a ±1.2	7.2 ^a ±1.3	7.9 ^a ±1.3

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

ตารางที่ 5 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของบรวนี่จากถั่วสามสี

ถั่วดำ : ถั่วขาว : ถั่วแดง (สูตรที่)	คุณลักษณะ				
	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
50 : 25 : 25 (สูตรที่ M1)	6.6 ^a ±1.3	6.6 ^a ±1.2	6.2 ^b ±1.2	6.8 ^a ±1.7	6.2 ^b ±1.3
25 : 50 : 25 (สูตรที่ M2)	6.8 ^a ±1.4	6.8 ^a ±1.2	7.2 ^a ±1.5	6.9 ^a ±1.6	7.5 ^a ±1.0
25 : 25 : 50 (สูตรที่ M3)	6.3 ^a ±1.8	6.6 ^a ±1.2	5.8 ^b ±1.5	6.7 ^a ±1.7	6.2 ^b ±1.5

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพของบรวนี่จากถั่วสามสี

นำตัวอย่างบรวนี่จากถั่วสามสี วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพภายใน 24 ชั่วโมง โดยคุณภาพทางกายภาพที่วิเคราะห์ ได้แก่ ค่าสีในระบบ CIELAB (L^* a^* b^*) ด้วยเครื่องวัดค่าสี (ColorFlex EZ, HunterLab,

USA) และ ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ด้วยเครื่อง Novasina (AW Sprint TH-500, Switzerland)

คุณค่าทางโภชนาการของบรวนี่จากถั่วสามสี

คุณค่าทางโภชนาการของบรวนี่ถั่วสามสี ใช้วิธีการคำนวณโดยเทียบบัญญัติไตรยางค์กับข้อมูลจากหนังสือตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย

(11) โดยคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบ 100 กรัม ที่ใช้ในการคำนวณ แสดงดังตารางที่ 3

การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้

นำผลิตภัณฑ์บราวนี่ที่พัฒนาได้ มาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคกับผู้ทดสอบจำนวน 100 คน โดยเตรียมตัวอย่างบราวนี่ขนาด 3×3 เซนติเมตร และถูกบรรจุในถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิดให้ซีม พร้อมทั้งนำเสนอผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ โดยการบรรจุในกล่องพร้อมจำหน่ายเชิงพาณิชย์ จำนวน 1 ชิ้น น้ำหนัก 50 กรัม และกำหนดราคาขาย 35 บาทต่อกล่อง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

งานวิจัยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำข้อมูลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสและสมบัติทางกายภาพ ถูกนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (PAWS Statistics 18.0, IBM) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับคุณค่าทางโภชนาการและการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค นำไปคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) หรือร้อยละ (Percentage) ด้วยโปรแกรม MS Office (Microsoft)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ผลการคัดเลือกบราวนี่สูตรมาตรฐาน

นำบราวนี่สูตรพื้นฐานทั้ง 3 สูตร ไปประเมินทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม แบบ 9-Point Hedonic Scale กับผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ในโรงอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนสูตรพื้นฐาน S3 จาก

นิตยสารแอลแอนคลูซินสูงที่สุด ดังตารางที่ 4 โดยคะแนนคุณลักษณะในด้านสีและกลิ่นอยู่ในช่วง 7.5–7.8 (ชอบปานกลาง) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากสูตรที่ S1 เนื่องจากสูตรบราวนี่พื้นฐาน S3 นั้นมีส่วนผสมของช็อกโกแลตและผงโกโก้ในปริมาณที่มากกว่าสูตรพื้นฐานสูตร S1 ทำให้บราวนี่สูตร S3 มีกลิ่นหอมของช็อกโกแลตมากกว่า จึงส่งผลให้คะแนนความชอบทางด้านกลิ่นได้คะแนนสูงกว่าสูตรพื้นฐาน S1 ส่วนทางด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมทั้ง 3 สูตร ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) ซึ่งอยู่ในช่วง 7.0–7.8 (ชอบปานกลาง) ดังนั้นผลิตภัณฑ์บราวนี่พื้นฐานสูตรที่ S3 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีต่อไป

ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของบราวนี่ถั่วสามสี

จากสูตรการทำบราวนี่พื้นฐาน สูตรบราวนี่ S3 ได้คะแนนสูงสุด จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาการทดแทนแป้งสาลีในสูตรพื้นฐานร้อยละ 100 ด้วยถั่วสามสี ได้แก่ ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดง โดยสัดส่วนของถั่วแต่ละชนิด ดังตารางที่ 5 บราวนี่ที่ถูกทดแทนแป้งสาลีด้วยถั่วสามสี มีลักษณะสีดำ กลิ่นหอมช็อกโกแลต และรสหวาน ไม่แตกต่างจากสูตรบราวนี่พื้นฐานสูตร S3 แต่คุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสมีความแตกต่าง โดยบราวนี่จากถั่วสามสีจะมีลักษณะเนื้อแน่นและหนืด ซึ่งต่างจากบราวนี่สูตรพื้นฐานที่มีส่วนผสมของแป้งสาลีที่จะนุ่มฟู เนื่องจากในแป้งสาลีสามารถเกิดโครงสร้างของกลูเตนที่ช่วยกักเก็บแก๊สที่เกิดจากการขึ้นฟู ทำให้โครงสร้างของบราวนี่หลังจากการอบไม่ยุบตัว (12)

สำหรับการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม แบบ 9-Point Hedonic Scale กับผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน พบว่า บราวนี่ถั่วสามสีทั้ง 3 สูตร ให้คุณลักษณะในด้านสี กลิ่น และเนื้อสัมผัส ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6.3 – 6.9 (ชอบเล็กน้อย) ดังตารางที่

5 ส่วนรสชาติและความชอบโดยรวมของสูตรที่ M2 มีค่าสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นสูตร M2 จึงมีความเหมาะสมในการผลิตบราวนี่จากถั่วสามสี

ผลการทดสอบทางด้านกายภาพของบราวนี่ถั่วสามสี

สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพของบราวนี่สูตรที่ใช้ถั่วสามสีที่นำมาทดแทนแป้งสาลี (สูตรที่ M1 M2 และ M3) นั้น พบว่า เมื่อใช้ถั่วสามสีแทนแป้งสาลีในการผลิตบราวนี่ทั้ง 3 สูตร ค่า L^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรบราวนี่ถั่วสามสี M2 จะมีค่า L^* สูงกว่าอัตราส่วนของถั่วสามสีสูตร M1 และ M3 ดังตารางที่ 6 เนื่องจากมีการใช้ถั่วขาวในอัตราส่วนร้อยละ 50 ซึ่งส่งผลให้สีของ บราวนี่เป็นสีค่าที่สว่างกว่าสูตร M1 และ M3 นอกจากนี้ บราวนี่อัตราส่วนของถั่วสูตร M2 ยังส่งผลค่า a^* และ b^* ค่อนข้างสูงด้วยเช่นกัน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระ พบว่า ผลิตภัณฑ์ บราวนี่จากถั่วทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า a_w อยู่ในช่วง 0.75 - 0.79

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางกายภาพของบราวนี่สูตรที่ใช้ถั่วสามสี (M1 M2 และ M3)

สูตรบราวนี่	คุณลักษณะ			ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)
	ค่าความสว่าง (L^*)	ค่าสีแดง (a^*)	ค่าสีเหลือง (b^*)	
50 : 25 : 25 (สูตรที่ M1)	4.89 ^b ± 1.51	0.92 ^c ± 0.01	0.57 ^b ± 0.17	0.78 ^a ± 0.03
25 : 50 : 25 (สูตรที่ M2)	6.75 ^a ± 1.52	2.24 ^a ± 0.45	1.18 ^a ± 0.35	0.75 ^a ± 0.02
25 : 25 : 50 (สูตรที่ M3)	3.39 ^c ± 0.16	1.21 ^b ± 0.67	0.67 ^b ± 0.03	0.79 ^a ± 0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันในแนวดิ่ง หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

ตารางที่ 7 คุณค่าทางโภชนาการที่ได้จากผลิตภัณฑ์บราวนี่สูตรพื้นฐาน S3 และบราวนี่จากถั่วสามสี (1 หน่วย, 50 กรัม)

คุณค่าทางโภชนาการ	สูตรบราวนี่			
	พื้นฐาน (สูตรที่ S3)	50 : 25 : 25 (สูตรที่ M1)	25 : 50 : 25 (สูตรที่ M2)	25 : 25 : 50 (สูตรที่ M3)
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	181.16	182.44	182.03	181.81
โปรตีน (กรัม)	4.53	5.35	5.29	5.22
ไขมัน (กรัม)	11.77	11.87	11.88	11.87
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	23.21	22.49	22.42	22.46
ใยอาหาร (กรัม)	0.34	0.96	0.92	1.28
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	31.09	35.38	33.54	35.50
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	109.84	117.07	113.93	121.03
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.92	1.37	1.28	1.17
วิตามินเอ (ไมโครกรัม)	59.46	59.49	59.47	59.47

คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสี

คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์บราวนี่ โดยใช้ข้อมูลคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทยในการ

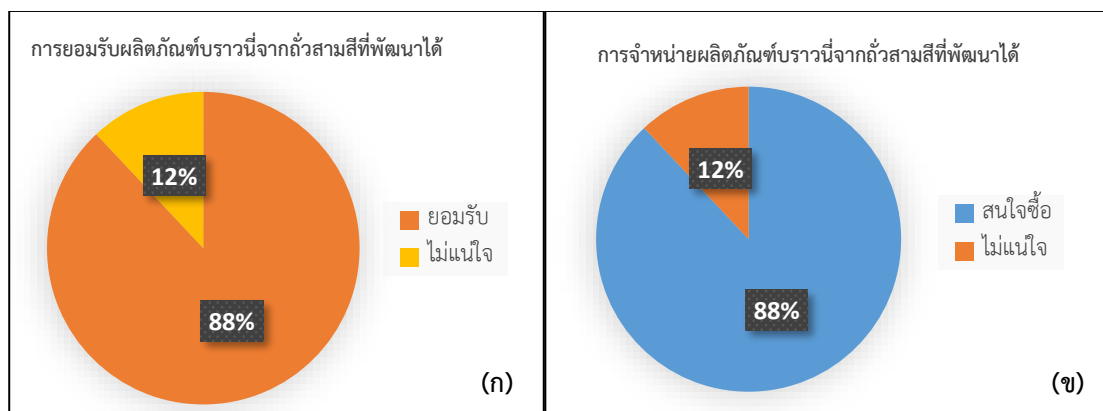
คำนวณโดยการเทียบบัญญัติตารางค์ แสดงดังตารางที่ 7 จากการเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของบราวนี่สูตรพื้นฐาน S3 และบราวนี่จากถั่วสามสีทั้ง 3 สูตร (M1 M2

และ M3) โดยการคำนวณอ้างอิงจากหนังสือคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทยและตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม (11) พบว่า ผลิตภัณฑ์บราวนี่ทั้ง 4 สูตร ที่มีหน่วยการบริโภคเท่ากับ 50 กรัม มีปริมาณพลังงาน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และวิตามินเอ ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีทั้ง 3 สูตร พบว่า ปริมาณโปรตีน และเส้นใยมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 14.31 และ 67.72 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับบราวนี่สูตรพื้นฐานที่ใช้แป้งสาลี เนื่องจากถั่วเป็นธัญพืชที่เป็นแหล่งของโปรตีน ซึ่งมีสูงถึงร้อยละ 20–30 นอกจากนี้ในถัวยังอุดมไปด้วยใยอาหาร และสารที่ทนต่อการย่อย (Resistance Starch) ดังนั้นการใช้ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดงทดแทนแป้งข้าวสาลีนี้ สามารถกล่าวอ้างว่าผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสี เป็นแหล่งของโปรตีน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนมากกว่าร้อยละ 10 ของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (Thai Recommended Daily Intakes) และยังสามารถกล่าวอ้างว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีใยอาหารสูง โดยมีมากกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน (12) นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่ว โดยเฉพาะถั่วดำและถั่วแดง ยังสามารถพบสารประกอบฟีนอลิกประเภทสารแอนโทไซยานิน ที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความดันโลหิต รวมทั้งป้องกัน

โรคเมเร็ง โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน (13, 14) การพัฒนาผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งให้กับผู้บริโภคที่แพ้งูเตนในแป้งสาลีและกลุ่มผู้บริโภครักสุขภาพ เพราะมีปริมาณโปรตีนและใยอาหารมากกว่าบราวนี่ทั่วไปตามท้องตลาด

การยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้

จากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ จำนวน 100 คน ในโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ส่วนใหญ่ผู้ประเมินเป็นเพศหญิง ร้อยละ 73 และเพศชาย ร้อยละ 27 และมีอายุในช่วง 18–25 ปี ร้อยละ 75 โดยนำเสนอผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ต่อผู้บริโภค โดยนำบราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้บรรจุในกล่อง จำนวน 1 ชั้น น้ำหนัก 50 กรัม ราคา 35 บาท พบว่าผู้บริโภคทั่วไปให้การยอมรับ ร้อยละ 88 และไม่แน่ใจ ร้อยละ 12 นอกจากนี้ยังมีการสอบถามความคิดเห็นด้านการตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ พบว่าผู้บริโภคมีความสนใจที่จะซื้อสูงร้อยละ 88 และไม่แน่ใจที่จะซื้อ ร้อยละ 12 ดังรูปที่ 1 สรุปได้ว่า ถ้าหากผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ออกมาจำหน่าย ผู้บริโภคมีความสนใจที่จะซื้อผลิตภัณฑ์



รูปที่ 1 (ก) ผลการทดสอบด้านการยอมรับผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้ และ (ข) ผลการทดสอบด้านการจำหน่ายผลิตภัณฑ์บราวนี่จากถั่วสามสีที่พัฒนาได้

สรุปผล

จากการศึกษาบรวานี้สูตรพื้นฐาน 3 สูตร พบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบสูตรพื้นฐานที่ได้มาจาก นิตยสารเฮลธแอนคลูซัน (S3) สูงสุด ในคุณลักษณะสีและ กลิ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า คะแนนอยู่ในช่วง 7.2 - 7.9 (ชอบปานกลาง) จึงเหมาะ สำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บรวานี้จากถั่วสามสีที่ใช้ทดแทนแป้งสาลีในสูตรพื้นฐาน ร้อยละ 100 ซึ่งถั่วที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ถั่วดำ ถั่วขาว และถั่วแดง และผัสดรอปตราส่วน ถั่วดำ:ถั่วขาว:ถั่วแดง เป็นร้อยละ 50:25:25 (M1) 25:50:25 (M2) และ 25:25:50 (M3) จากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส พบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบบรวานี้จากถั่วสามสีในอัตราส่วนสูตร M2 สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6.8 - 7.5 (ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง) สำหรับบรวานี้ถั่วสามสีอัตราส่วนสูตร M2 นั้น มีค่าสี L^* , a^* และ b^* เท่ากับ 6.75 2.24 และ 1.18 ตามลำดับ และปริมาณน้ำอิสระ เท่ากับ 0.75 เมื่อทดสอบคุณค่าทางโภชนาการผลิตภัณฑ์บรวานี้จากถั่วสามสี ทั้ง 3 สูตร กำหนดน้ำหนักต่อหนึ่งหน่วยบริโภคเท่ากับ 50 กรัม พบว่า ปริมาณโปรตีนและใยอาหารมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับบรวานี้สูตรพื้นฐาน เฉลี่ยร้อยละ 14.31 และ 67.72 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์บรวานี้จากถั่วสามสี สูตรอัตราส่วน M2 นั้นกับผู้บริโภคจำนวน 100 คน พบว่า ผู้บริโภคทั่วไปให้การยอมรับและตัดสินใจซื้อ ร้อยละ 88

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ และสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม และคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ และห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านอาหาร

เอกสารอ้างอิง

1. จิระนาถ รุ่งเรือง, นภศรพี เหลืองสกุล. การพัฒนาผลิตภัณฑ์คุกกี้จากแป้งปราศจากกลูเตนบางชนิด. วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2561;13(2):34-45.
2. พรรัตน์ สิ้นชัยพานิช, กุลรภัส บุตรพงษ์, ศศพินทุ ดิษนิล, เรณู ทวีชาติวิทยากุล. ผลของแป้งข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ใช้ทดแทนแป้งสาลีในบรวานี้. วารสารวิจัย มสธ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2551;10(2):69-79.
3. ณนันท แดงสังวาลย์, นื่องนุช ศิริวงศ์, ศิริพร เรียบร้อย. การใช้แป้งกล้วยน้ำว้าทดแทนแป้งสาลีในบรวานี้. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49; 1-4 ก.พ. 2554; กรุงเทพฯ. กรุงเทพฯ: สำนักมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2554.
4. Selvakumaran L, Shukri R, Ramli NS, Pak Dek MS, Wan Ibadullah WZ. Orange sweet potato (Ipomoea batatas) puree improved physicochemical properties and sensory acceptance of brownies. J Saudi Soc. 2019;18(3):332-6.
5. บุศรินทร์ จงเจริญยานนท์. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วขาวและการประยุกต์แป้งถั่วขาวในผลิตภัณฑ์ขนมอบ. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 2559;11(1):1-12.

6. มาฤดี ผ่องพิพัฒน์พงศ์, อำนาจ คูตะคุ, ดวงจันทร์ เสงส์สวัสดิ์, กรุณา วงษ์กระจำง, ชมดาว สิกขะมณฑล. การผลิตอาหารเพื่อสุขภาพจากถั่ว 5 สีสำหรับผู้สูงวัยด้วยกรรมวิธีเอ็กซ์ทรูชัน. การประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย ระดับชาติ ครั้งที่ 14 และระดับนานาชาติ ครั้งที่ 6; มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรญาณบุรี. ปทุมธานี: 2556.
7. หรรษา เวียงวะลัย, กานติมา ภูวงษ์. ผลของแป้งถั่วแดงที่ทดแทนแป้งสาลีต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหมั่นโถว. Thai Journal of Science and Technology. 2561;7(5 ฉบับเสริม):534-43.
8. ทัทยา อนุสร. ถั่วและธัญพืชเมล็ดพันธุ์แห่งสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มติชน; 2555.
9. วราภา ปวงเงิน. Chocolatelover. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อมรินทร์; 2552.
10. Martha Stewart. นิตยสารแฮตแอนคลูชั่น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อมรินทร์; 2552.
11. กลุ่มงานวิเคราะห์อาหารและโภชนาการ กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: องค์การทหารผ่านศึก; 2544.
12. กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 182) พ.ศ. 2541 เรื่อง ฉลากโภชนาการ [อินเทอร์เน็ต]. 2541 [สืบค้นเมื่อ 15 ก.พ. 2563].
จ า ก : <http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2541/D/047/23.PDF>
13. ไชยสิทธิ์ พันธ์ฟูจินดา, เลอลักษณ์ เสถียรรัตน์, อรวัลย์ อุปลัมภานนท์. การพัฒนาผลิตภัณฑ์บราวนี่โดยใช้แป้งข้าวเหนียวดำทดแทนแป้งสาลี. วารสาร มทร. อีสาน ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560;10(1):106-19.
14. กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์, อโนชา สุขสมบูรณ์, อาภัสรา แสงนาค. การพัฒนาผลิตภัณฑ์พาสต้าข้าวเจ้าเพื่อสุขภาพเสริมแป้งถั่ว. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2560. 173196.