

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**การอยู่รอดของ *Escherichia coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิต และเก็บรักษา
โยเกิร์ตโพรไบโอติกแบบเซ็ท**

**SURVIVAL OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN THE PRODUCTION AND
STORAGE OF PROBIOTIC SET YOGHURT**



1110411



ฉพ.
ศษทก

เลขหมู่..... 2553
เลขทะเบียน..... 110411
วัน,เดือน,ปี..... -2 1110 2553

b. 12252782
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขภาพอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2553
KMITL-2010-AI-M-054-091

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SURVIVAL OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN THE PRODUCTION AND
STORAGE OF PROBIOTIC SET YOGHURT**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN FOOD SANITATION
FACULTY OF ARGO-INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2010

KMITL-2010-AI-M-054-091

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2010

FACULTY OF ARGO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

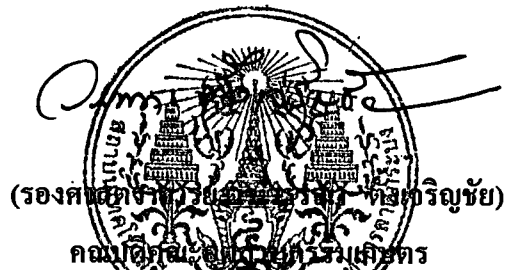
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของ *Escherichia coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษา
โยเกิร์ต โพรไบโอติกแบบเซ็ท
Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the production and storage of probiotic
set yoghurt

ชื่อนักศึกษา นางสาวสุกัญญา ไดมะนิตย์
รหัสประจำตัว 49068763
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา สาขาภิบาลอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบุลย์	

วัน/เดือน/ปีที่สอบ 17 พฤษภาคม 2553 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป
สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว



วันที่..... 4เดือน มิถุนายน พ.ศ..... 53

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
วันที่ 17 เดือน ๕๕ พ.ศ. ๕๓
ลงชื่อ.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การอยู่รอดของ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติกแบบแข็ง
นักศึกษา	นางสาวสุกัญญา โทมะนิคย์
รหัสประจำตัว	49068763
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2553
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ ABT-5 ประกอบด้วย *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ ABY-3 ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* เปรียบเทียบกับเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบแข็ง ผลการศึกษาพบว่า YC-380 สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุด คือ ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 ในขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.30 ± 0.03 ที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.25 ± 0.02 และ 4.29 ± 0.01 ตามลำดับ และโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABY-3 ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.31 ± 0.06 และ 4.31 ± 0.04 ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.34 ± 0.03

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ต พบว่าในช่วงการบ่มโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 มีการลดลงของ *E. coli* O157:H7 อย่างรวดเร็ว (อัตราการตายจำเพาะ (μ') = -1.4025 ต่อชั่วโมง) จนตรวจไม่พบภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 และ ABY-3 พบการเจริญของ *E. coli* O157:H7 เล็กน้อย (อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = 0.0980 และ 0.0750 ต่อชั่วโมง) และเวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์เป็นสองเท่า (t_d) เท่ากับ 3.07 และ 4.01 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 การเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาส่งผลให้อัตราการอยู่รอดของเอ็กสาร์นี้เป็นเอ็กสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli O157:H7 ลดลง หรือกล่าวได้ว่าอัตราการตายของ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มของอุณหภูมิในการเก็บรักษา

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 มีประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Survival of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in the production and storage of probiotic set yoghurt
Student	Miss Sukanya Tomanit
Student ID.	49068763
Degree	Master of Science
Programme	Food Sanitation
Year	2010
Thesis advisor	Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

This research is to study an inhibitory effect 2 types of commercial probiotics from starter yoghurt ABT-5 (comprised of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp.) and ABY-3 (comprised of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) compared with a traditional yoghurt YC-380 (comprised of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*) on *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and keeping yoghurt as a set product. The results showed that, YC-380 exhibited the highest inhibitory effect *E. coli* O157: H7. The pathogenic strain of *E. coli* O157: H7 could not detect after six hour of yoghurt incubation at pH 4.09±0.16, while the yoghurt which using ABT-5 as starter could not detect *E. coli* O157: H7 during storage of yoghurt at 4 °C for 5 days at pH 4.30±0.03. This pathogenic strain could not detected in the same starters yoghurt after storage time at 8 and 15 °C for 3 days at pH 4.25±0.02 and 4.29±0.01 respectively. The yoghurt fermented with ABY-3 as starters could not detect *E. coli* O157: H7 at 4 and 8 °C for 7 days at pH 4.31±0.06 and 4.31±0.04 respectively at 15 °C for 5 days at pH 4.34±0.03.

The growth kinetic of survival *E. coli* O157:H7 during the fermentation and storage period were studied. This pathogenic *E. coli* O157:H7 counts were decreased rapidly (specific death rate; $\mu' = -1.4025 \text{ h}^{-1}$) in yoghurt culture YC-380, and it was not detected after six hour of yoghurt incubation, while *E. coli* O157:H7 could grow slightly in the yoghurt with ABT-5 and ABY-3 (specific growth rate; $\mu = 0.0980$ and 0.0750 h^{-1}) with the generation time (t_g) values were 3.07 and 4.01 h, respectively. The effect of temperature on survival of *E. coli* O157:H7 in probiotic yoghurts ABT-5 and ABY-3 during storage at 4, 8 and 15 °C, the storage temperature affected on the *E. coli* O157:H7 survival in the way that increase in temperature resulted in

decrease in survival rate. In other words, the *E. coli* O157:H7 death rate increased with increase in storage temperature.

The results of this study indicate that YC-380 yoghurt culture was more effective in preventing *E. coli* O157:H7 contamination during fermentation and storage of yoghurt.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงนี้ **IV** และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี ตรวจสอบแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์และขอกราบขอบพระคุณ ไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไข รวมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปินศิริโรคม ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไข รวมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร ขอไพบูรณ์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไข รวมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแก้วขวัญ วัชโรทัย ผู้อำนวยการโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา คุณมยุรฉัตร นาทวรทัต คุณรุจา สารคุณ คุณอมรรัตน์ ตั้งสกุล คุณวราภรณ์ แซ่ลิ้ ที่ให้คำแนะนำสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่เทคนิค และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท โนวาร์ตีส จำกัด ที่ให้ทุนเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา ในการสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง พี่ๆงานเนยแข็ง และงานผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง ทุกคนที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งเพื่อนๆ และพี่ๆ นักศึกษาคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และบุคคลที่มีได้กล่าวมาทั้งหมด ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

สุกัญญา โทมะนิศย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย.....	2
1.2 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แบบที่เรียกละกติก.....	3
2.2 โพรไบโอติก.....	4
2.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร โดยแบคทีเรียแลกติก.....	8
2.4 โยเกิร์ต.....	11
2.5 <i>Escherichia coli</i>	19
2.6 กลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1 วัตถุประสงค์.....	29
3.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	29
3.3 สารเคมี.....	29
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	30
3.6 วิธีการทดลอง.....	30

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	33
4.1 สันฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์.....	33
4.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ <i>E. coli</i> O157:H7 ในกระบวนการผลิต โยเกิร์ตที่ใช้ก้านเชื้อ โยเกิร์ตชนิดต่างๆทางการค้า.....	33
4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อ การอยู่รอดของ <i>E. coli</i> O157:H7	38
4.4 จนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ <i>E. coli</i> O157:H7	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	54
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	54
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	55
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม.....	65
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์.....	68
ภาคผนวก ค ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ.....	69
ประวัติผู้วิจัย.....	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก.....	9
2.2 ส่วนประกอบของนมโคและโยเกิร์ตนมโค (100 กรัม).....	12
2.3 องค์ประกอบสำคัญที่มีในโยเกิร์ต.....	13
2.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนแก่นมที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต.....	16
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ต.....	34
4.2 ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด และการ อยู่รอดของจำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อชนิดต่างๆ ในระหว่างการ บ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....	37
4.3 สมการเส้นตรงของการเจริญและการลดลงของ <i>E. coli</i> O157:H7 กับเวลา และสัมประสิทธิ์ ของการตัดสินใจ(R^2) ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ YC-380, ABT-5 และ ABY-3.....	52
4.4 เวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 เป็น 2 เท่า (t_d) เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในระหว่างการบ่ม และเวลาการตาย (t_d) ของ <i>E. coli</i> O157:H7 ระหว่างการ เก็บรักษาที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	52
4.5 อัตราการเจริญ (k) ของ <i>E. coli</i> O157:H7 เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในระหว่างการบ่ม และอัตราการตายของ <i>E. coli</i> O157:H7 (k') ระหว่างการเก็บรักษา โยเกิร์ตที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	53
ค1 ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด ปริมาณเชื้อ แบคทีเรียแลคติก และการอยู่รอดของจำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้า เชื้อ YC-380 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน	69
ค2 ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด ปริมาณเชื้อ แบคทีเรียแลคติก และการอยู่รอดของจำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้า เชื้อ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน	70
ค3 ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด ปริมาณเชื้อ แบคทีเรียแลคติก และการอยู่รอดของจำนวน <i>E. coli</i> O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้า เชื้อ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน	71

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตธรรมชาติ.....	14
2.2 ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อ <i>E. coli</i> O157:H7.....	22
2.3 อาการและระยะเวลาของการได้รับเชื้อ <i>E. coli</i> O157:H7.....	23
2.4 การแบ่งระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....	26
4.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด, <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. และ <i>Bf. lactis</i> ในโยเกิร์ตใช้กัลาเชื้อ YC-380, ABT-5, ABY-3 ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 43±0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	35
4.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ในระหว่าง การเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	39
4.3 ปริมาณเชื้อ <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	40
4.4 ปริมาณเชื้อ <i>L. acidophilus</i> , <i>Bf. lactis</i> (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	41
4.5 ปริมาณ <i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g) ความเป็นกรดค้าง และเปอร์เซ็นต์กรด ในโยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	45
4.6 ปริมาณ <i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g) ความเป็นกรดค้าง และเปอร์เซ็นต์กรด ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	46
4.7 ปริมาณ <i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g) ความเป็นกรดค้าง และเปอร์เซ็นต์กรด ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส.....	47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ปลอดภัย และส่งผลดีต่อสุขภาพ ซึ่งอาหารแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในอาหารชนิดนั้นๆ โดยในการผลิตอาหารบางชนิดอาจมีการนำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งได้มีการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งอาหารหมักจากผักและผลไม้ เป็นต้น แต่หากการผลิตอาหารนั้นไม่มีการควบคุมในระหว่างการผลิต อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งนับว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญที่จะก่อให้เกิดความเสี่ยงของอาหารหากมีการปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์

Escherichia coli O157:H7 เป็น Enterohemorrhagic *E. coli* หรือ EHEC จัดอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เป็นสาเหตุให้เกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบ มีเลือดออก (hemorrhagic colitis) โรคเม็ดเลือดแดงแตกและไตถูกทำลาย (hemolytic uremic syndrome) พบว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษภายหลังจากการรับประทานแฮมเบอร์เกอร์ที่มีการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7 ในมลรัฐ Washington, Idaho, California และ Nevada ประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นสาเหตุให้เด็กเสียชีวิต 3 ราย (สิริพร สรณเสาวภาคย์, 2536) การก่อให้เกิดโรคของ *E. coli* O157:H7 เกิดในทุกช่วงอายุ แต่ในเด็กและผู้สูงอายุ พบว่ามีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคและอาการรุนแรงมากกว่า ซึ่งการได้รับเชื้อน้อยกว่า 10 เซลล์สามารถทำให้เกิดโรคได้ (อัจฉรา เพิ่ม, 2550) ในอดีตมีความเข้าใจว่าอาหารประเภทครีมีความปลอดภัยสูงจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค แต่จากรายงานของสถาบัน Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanita ประเทศอิตาลี พบว่า *E. coli* O157:H7 สามารถมีชีวิตรอดได้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (Tozzi, 1997) Bachrouri และคณะ (2002) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 3.6 และ 1.6 Log CFU/g ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ Massa และคณะ (1997) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 0.32-1.67 CFU/ml ในโยเกิร์ต ที่ความเป็นกรดต่าง 4.6-5.2 หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์โดยจะทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมระดับคลอโรสเตอร์อลในกระแสเลือด เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยการย่อยน้ำตาลแลคโตสในคนที่ไม่สามารถย่อยได้ และยังช่วยลดการเกิดมะเร็งอีกด้วย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. (Carey และคณะ, 2008) อาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติกส่วนใหญ่พบในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม โยเกิร์ตและเนยแข็ง และพบรายงานว่า โพรไบโอติกสามารถใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ได้แก่ *Clostridium tyrobutyricum* ในเนยแข็ง (Rilla และคณะ, 2003) *Staphylococcus aureus* ในไส้กรอกหมัก (Wood และ Hodge, 1985) รวมทั้ง *E. coli* O157:H7 ในเนยแข็ง (Arocha และคณะ, 1992) และผลิตภัณฑ์นมหมัก (Halil และคณะ, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกทางการค้าต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต และผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษารายการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อทางการค้าชนิดต่างๆ คือ YC-380 (ประกอบด้วย *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) ABT-5 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp.) และ ABY-3 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) โดยทำการบ่มโยเกิร์ต ที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษารายการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการหมักโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าชนิดต่างๆ

1.3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าชนิดต่างๆ และผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ทำให้สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการควบคุม *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ สามารถข่มติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม และรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเลส (Axelsson, 1993) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดค่า (pH) ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.58-6.20 (Salminen และ Wright, 1993) ซึ่งแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้ดังนี้

2.1.1 แบ่งตามรูปร่างและการเรียงตัว คือ (Axelsson, 2004)

2.1.1.1 รูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*

2.1.1.2 รูปร่างกลม ได้แก่ *Aerococcus*, *Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

2.1.1.3 รูปร่างกลม เป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Leuconostoc*

2.1.2 แบ่งตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ (สุมฉา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.1.2.1 โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative)

เป็นแบคทีเรียพวกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway: EMP) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii*

2.1.2.2 เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative)

เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก และเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* และ *L. brevis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือแร่ในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (นวลจันทร์ พาร์กษา, 2533) นอกจากนี้ สุญาณี พงษ์ธนาภิกร (2549) ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่า หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์และสัตว์ แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยจุลินทรีย์ทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ สร้างเอนไซม์ช่วยย่อยอาหาร ลดอาหารท้องอืด ท้องเฟ้อ และลดคลอเรสเตอรอล รวมถึงทำลายจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง (สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์, 2552) โพรไบโอติกถูกนำมาใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1965 โดย Liley และ Stillwell อธิบายว่า เป็นสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด จนกระทั่ง Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า เป็นสิ่งมีชีวิตและเป็นสารเคมีที่มีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์ในลำไส้มีความสมดุล และ Fuller (1989) ได้อธิบายคำว่า โพรไบโอติก ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสภาพของจุลินทรีย์ในลำไส้ให้มีความสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติก สามารถป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง ท้องผูก และการอักเสบของลำไส้ เป็นต้น เมื่อมนุษย์บริโภคเข้าไป จะเป็นตัวช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ร่างกายไม่ต้องการ ให้อยู่ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดโรค หรือก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ให้กับร่างกาย และยังช่วยปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2548) ซึ่งอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักต่างชนิดต่างๆ (Coeuret และคณะ, 2004) เนยแข็ง (Stantan และคณะ, 1998) ไอศกรีม (Christiansen และคณะ, 1996) และอาหารเข้าธัญพืชแบบแห้ง (Ouwehand และคณะ, 2004)

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็น โพรไบโอติกมีหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแต่ละชนิดมีหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้ มีดังนี้คือ (กิจการ สุภมาตย์, 2544)

2.2.1.1 กลุ่มแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก

- 1) *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *B. coagulan*, *B. subtilis*, *B. toysi*, *B.licheniformis* และ *B. stearothermophilus*
- 2) *Bacteroides* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Bt. amylophilus*, *Bt. suis*, *Bt. capillosus* และ *Bt. ruminocola*

- 3) *Bifidobacterium* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Bf. thermophilum*, *Bf. dolescentis*, *Bf. anamalis*, *Bf. bifidum*, *Bf. infantis* และ *Bf. Longum*
- 4) *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. brevis*, *L. bugarius*, *L. casei*, *L. reuterii*, *L. cellobiosus*, *L. colinoides*, *L. corvatus*, *L. lactis*, *L. delbruekii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. ruminis* และ *L. vitulinus*
- 5) *Leuconostoc* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Luc. cremoris* และ *Luc. dextranicum*
- 6) *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *P. halophilus* และ *P. pentosaecus*
- 7) *Propionibacterium* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *Pb. Fredemreichii* และ *Pb. shermanii*
- 8) *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. faecium* และ *S. intermedius*

2.2.1.2 กลุ่มยีสต์ที่เป็นโพรไบโอติก

- 1) *Saccharomyces cerevisiae*
- 2) *Candida pentoiepepsi* (*Torulopsis bovina*)

2.2.1.3 กลุ่มราที่เป็นโพรไบโอติก

- 1) *Aspergillus oryzae*
- 2) *Aspergillus niger*

2.2.2 แบคทีเรียที่มีการนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญ

2.2.2.1 Lactobacilli

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปท่อนยาว มักเรียงตัวเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตส มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (facultative anaerobe) อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถแยกได้จากทางเดินอาหารในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ และเป็นจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่ออาหาร ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญเติบโต (Gerald, 2005) นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอดอีกด้วย เจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด โดย Lactobacilli สามารถใช้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ หรือได้กรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติก ในการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟ ความเป็นกรดค้างที่เหมาะสมของอาหารอยู่ที่ 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 45 องศาเซลเซียส (วราวุฒิ ครุสง และรุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

2.2.2.2 Bifidobacteria

Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเลส ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีสีผิวหน้าเกลี้ยงนูน โค้ง ขอบเรียบ ไม่ว่าจะไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างหลายแบบ มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา ไม่ต่อกันเป็นสายยาว (Gerald, 2005) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส และ 43-45 องศาเซลเซียส ส่วนความเป็นกรดค้างที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 5.5-8.0 (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยใช้ Bifidobacteria จะมีกลิ่นรสที่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่นคือ จะมีกลิ่นรสของน้ำส้มสายชู เนื่องจากมีการผลิตอะซิเตท และแลกเตทจากเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Tamime, 1990)

2.2.3 การเลือกจุลินทรีย์มาใช้เป็นโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ควรได้รับการพิจารณา เพื่อใช้มาเป็นโพรไบโอติกควรมีลักษณะดังนี้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.2.3.1 ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย ต่อมนุษย์และสัตว์

2.2.3.2 มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่มีหลักฐานเป็นเอกสารที่เชื่อถือได้

2.2.3.3 มีคุณสมบัติคล้ายกับเชื้อที่ใช้หมักนมแบบพื้นบ้าน เช่น เกิดกรดแลกติกเร็วโดยแบคทีเรียชนิดนั้นๆเอง หรือเกิดร่วมกับเชื้ออื่นๆ

2.2.3.4 ควรเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ง่ายในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2.2.3.5 สามารถสร้างกรดแลกติกทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพกรดมากขึ้น เกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น (กิจการ สุภมาตย์, 2544) ปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533) และทนต่อเกลือน้ำดีขณะอยู่ในลำไส้เล็กส่วนปลาย

2.2.3.6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ควรเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรส คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.2.3.7 มีความคงทนระหว่างกระบวนการผลิต เช่น การทำแห้งแบบแช่แข็ง การใช้ความร้อน และการใช้ความดันสูง เป็นต้น

2.2.3.8 สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไคอะเซทิล หรือแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

2.2.4 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กล่าวว่า โพรไบโอติกช่วยปรับปรุงจุลินทรีย์ท้องถิ่น (indigenous microflora) และมีประโยชน์กับร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (Wood, 1992) ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ การบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีโพรไบโอติกทำให้อาหารจะได้รับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์หลายประการ เช่น ช่วยในระบบย่อยอาหาร และสร้างภูมิคุ้มกัน (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2548)

2.2.4.1 เพิ่มการดูดซึมเกลือแร่และธาตุเหล็ก

เนื่องจากคุณค่าทางอาหาร ไม่ได้ขึ้นอยู่กับอาหารที่บริโภคเท่านั้น แต่เกี่ยวข้องกับความสามารถของร่างกายในการนำเอาธาตุอาหารไปใช้ โดย Rusoff (1987) กล่าวว่า การดูดซึมของแคลเซียมจะดีขึ้นหากมีแลคโตส ในกรณีของผู้สูงอายุที่ต้องการแคลเซียมเพิ่มขึ้น แต่มีการหลั่งน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การบริโภคนมหมักจะช่วยเพิ่มการละลายและการดูดซึมของแคลเซียมและเหล็ก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.2.4.2 มีผลต่อระบบการย่อยอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์นมจะช่วยให้ผู้ที่มีเอนไซม์แลคเตสไม่ปกติ คือ มีปริมาณเอนไซม์แลคเตสต่ำ จึงทำให้แลคโตสไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร ทำให้เมื่อดื่มนมเกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องเดิน ปวดท้อง หรือผู้ที่แพ้นมสามารถบริโภคนมได้ง่ายขึ้น เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กลูโคสกับกาแลคโตส ซึ่งร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งสองชนิดไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น วิตามินบี1 บี2 บี6 บี12 ในอะซิน กรดโฟลิก กรดแพนโททีนิก และสังเคราะห์เอนไซม์มาช่วยย่อยสลายโปรตีนให้เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้มากขึ้น (วิเชียร ติลาวัชรมาศ, 2542) นอกจากนี้มีรายงานว่าผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ มีส่วนช่วยในการลดการเจ็บป่วย ประกอบด้วย โรคท้องร่วง โรคท้องผูก กรดในกระเพาะอาหาร ลำไส้อักเสบ โรคภาวะที่มีไขมันในเส้นเลือดสูง (hypercholesterolemia) และโรคมะเร็ง ช่วยลดความอ่อนแอของร่างกายจากการติดเชื้อโรคต่างๆ (สุญาณี พงษ์ธนาภิกร, 2549)

2.2.4.3 ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย

เมแทบอลิซึมของโพรไบโอติกมีผลต่อการควบคุมการติดเชื้อในลำไส้ ลดปริมาณคลอเรสเตรอลในเลือด และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Gilliland, 1990; Fooks และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *Bifidobacterium* มีอิทธิพลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการชักนำให้เกิดสารแอลฟาอินเทอเฟอรอน (interferon) ขึ้น ซึ่งสารนี้ทำหน้าที่ด้านการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์เพคพลอม จึงมีคุณสมบัติเป็นผู้ทำลาย

2.2.4.4 ควบคุมจุลินทรีย์ในลำไส้และยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ

แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่เรียกกันว่าแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นสารที่เกิดเองจากธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนซิน (nisin) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ขอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร (สารโจน์ สิริสัน สนิชกุล, 2547) โดยเมื่อปี ค.ศ. 1988 U.S. Food and Drug Administration (US.FDA) ได้ขอมรับไนซินเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) ซึ่งลักษณะการทำลายแบคทีเรียของไนซินเป็นแบบทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และสามารถทำลายเชื้อหุ้มภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด

นอกจากนี้การสร้างกรดของแบคทีเรียในบริเวณลำไส้ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดต่ำลง ส่งผลให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค แบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติยับยั้งพืชที่จุลินทรีย์อื่นสร้างขึ้น ซึ่งประโยชน์ของโพรไบโอติก ส่วนนี้จะช่วยให้ผู้ที่บริโภคอาหารที่มีโพรไบโอติกมีโอกาสเกิดโรคต่าง ๆ ได้น้อยลง (สุมฉา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.2.4.5 ยับยั้งปฏิกริยาการเกิดสารพิษหรือสารก่อมะเร็ง

จากข้อมูลทางระบาดวิทยา พบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารที่มีไขมันสูง ซึ่งไขมันในอาหารจะกระตุ้นให้มีการหลั่งกรดน้ำดีในลำไส้ใหญ่มากขึ้น ร่วมกับกรดน้ำดีอีกส่วนหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียเอง ซึ่งทำให้มีส่วนส่งเสริมให้เกิดมะเร็ง นอกจากนี้เอนไซม์ของแบคทีเรียบางชนิดก็จะเปลี่ยนสารบางอย่างในลำไส้ไปเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นกลไกในการต้านมะเร็งของโพรไบโอติก ได้แก่ ลดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ควบคุมหรือเหนี่ยวนำการเจริญของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ในการทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการเคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น และมีการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการลดไนโตรซามีนในอาหาร จึงลดความเสี่ยงจากไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2542; สุมฉา วัฒนสินธุ์, 2545; Fuller, 1992; Kalanzopoulos, 1997)

2.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารโดยแบคทีเรียแลคติก

ในกระบวนการหมักแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารหลายชนิด ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติกชนิดโฮโมเฟออร์เมนเททิฟ (homofermentative) และในกลุ่มของเฮเทโรโพรเฟอร์เมนเททิฟ (heterofermentative) พบว่ามีการสังเคราะห์กรดอะซีติกและกรดฟอร์มิกพร้อมอยู่ด้วย การสะสมของกรดส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารลดลง มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยปกติแล้วเชื้อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยวิธีการแพร่ผ่าน เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวและปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโทพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ และทำลายความสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลาย ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ ยับยั้งกลไกการขนส่งอาหาร และกระบวนการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอด (สุมนงา วัฒนสินธุ์, 2545) และ Tomiani และคณะ (1997) รายงานว่าการใช้กรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ และการใช้กรดแลคติก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผักสลัดได้

กรดอะซิติก (acetic acid) ที่ได้จากการหมักแบบเฮเทอโรเฟอโรเมนเททีฟ (heterofermentative) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังตารางที่ 2.1 โดย Jay (1996) พบว่าสามารถทำลาย *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella* Typhimurium ในน้ำสลัด โดยตรวจไม่พบเชื้อหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 2.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก

จุลินทรีย์	ความเป็นกรดต่าง ที่มีผลในการยับยั้ง	ความเข้มข้นต่ำสุดของกรด อะซิติกที่มีผลต่อการยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)
<i>Salmonella</i> Aerttryke	4.9	0.04
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.0	0.03
<i>Phytomonas phaseoli</i>	5.2	0.02
<i>Bacillus cereus</i>	4.9	0.04
<i>Bacillus mesentericus</i>	4.9	0.04
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.9	0.59
<i>Aspergillus niger</i>	4.1	0.27

ที่มา : Edward (1980)

2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีคุณสมบัติเป็นพิษทางวิทยา โปรไบโอติกบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ได้แก่ Lactobacilli, Lactococci, Pediococci และ Leuconostoc (Hoover, 2000) แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น และจุลินทรีย์ผู้ผลิตจะทนได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (สุมนงา วัฒนสินธุ์, 2545)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นโดยการออกซิไดซ์อย่างแรงบนเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่หมู่ซัลไฮไดรล (sulfhydryl group) ของโปรตีนในเซลล์ โครงสร้างชั้นนอกของกรดนิวคลีอิกและไขมันที่เชื่อมเซลล์ ในบางปฏิกิริยาจะมีการจับออกซิเจนไว้ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ในสภาวะไร้อากาศจึงไม่สามารถเจริญได้ (Salminen และ Wright, 1993)

2.3.3 เอทานอล (Ethanol)

เอทานอลเกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติกแบบเฮเทอโรเฟอโรเมนเตทีฟ (heterofermentative) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดเอทานอล ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

2.3.4 อะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

อะซีทัลดีไฮด์เกิดจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติก ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) จึงผลิตอะซีทัลดีไฮด์ออกมา ซึ่งเป็นการหมักแบบเฮเทอโรเฟอโรเมนเตทีฟ (heterofermentative) และมีรายงานว่า อะซีทัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นเพียง 10-100 พีพีเอ็ม (ppm) สามารถยับยั้ง *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium* (พงศ์เทพ วิไลพันธ์, 2546)

2.3.5 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิล ได้มาจากการสลายซิวเตรทในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งจับออกมาโดยจุลินทรีย์พวก *Lactococci*, *Pediococci* และ *Leuconostoc* (พงศ์เทพ วิไลพันธ์, 2546) และ สุกานดา วณิชวัฒน์ (2538) รายงานว่า หากมีการใช้ไดอะซีทิลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้

2.3.6 รูทีริน (Ruterin)

เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น β -hydroxypropionaldehyde ที่มีโมเลกุลต่ำ ละลาย ใด้ดี ที่ความเป็นกรดต่างปานกลาง สร้างมาจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ซึ่งรูทีรินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา โปรโตซัว และยีสต์ และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* และ *Clostridium* (อรวิรินทร์ เลหาวิชรัตน์, 2532)

2.3.7 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

เป็นสารที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก ซึ่งแบคเทอริโอซินจะทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดขึ้นอยู่กับชนิด ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของ

แบคทีเรียโอซิน รวมทั้งสภาพแวดล้อม ชนิด จำนวนเซลล์เป้าหมาย และการรวมตัวกับสารอาหาร ซึ่งจะทำลายเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินแต่ละ โมเลกุลจะร่วมกันทำให้เกิดช่องว่างที่เชื่อมหุ้ม เซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงาน (Ennahar และคณะ, 2000)

แบคทีเรียโอซินที่ยอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ มีเพียงในจีน (nisin) ซึ่งในประเทศอังกฤษและบางประเทศที่ได้ใช้ในจีนเป็นวัตถุกันเสียในอาหารมาตั้งแต่ต้น ทศวรรษที่ 1950 และเมื่อปี ค.ศ. 1988 US.FDA ได้ยอมรับในจีนเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) การคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ในจีนมาใช้เป็นตัวการหมักกรดแลคติก จะช่วยส่งเสริมผลในแง่ของการควบคุมแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะพวกที่สร้างสปอร์ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ต้องระวังไม่ให้ในจีนกลายเป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักอาหารนั้นๆเอง (สุเมธชา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.4 โยเกิร์ต

โยเกิร์ต (Yoghurt) มีแถบกำเนิดในทวีปเอเชีย โยเกิร์ตแบบดั้งเดิมมีวิธีการผลิตคล้ายกับนมหมักบัลแกเรีย โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม (whole milk) นมพร่องมันเนย นมคืนรูปพร่องไขมัน หรือผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ โดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* และ *Streptococcus thermophilus* ใส่ลงไปหมักในผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเหล่านี้จะช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส ในนมให้เป็นกรดแลคติก ทำให้นมมีภาวะเป็นกรดและมีรสเปรี้ยว โดยมีความเป็นกรดค้างอยู่ระหว่าง 3.8-4.6 (วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภา พงสวัสดิ์มานิต, 2532)

นักประวัติศาสตร์มีความเห็นว่า โยเกิร์ตเป็นอาหารที่รวมอยู่ในโภชนาการของชนเผ่าทราเซียน อันเป็นบรรพบุรุษเก่าแก่ที่สุดของชาวบัลแกเรีย ซึ่งชาวทราเซียนเก่งในเรื่องเลี้ยงแกะ โดยคำว่า yog ในภาษาทราเซียน แปลว่า นานหรือขึ้น ส่วน urt แปลว่า นำนม คำว่า yoghurt น่าจะได้อาจจากการสมาสของคำทั้งสอง ซึ่งหมายถึง ผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการนำนมไปหมักกับเชื้อจุลินทรีย์ (ศิริบุญ พูลสวัสดิ์, 2549)

2.4.1 คุณค่าทางโภชนาการอาหาร

องค์ประกอบของโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักด้วย *Lactobacillus* spp. และ *S. thermophilus* ดังตารางที่ 2.2 ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการของโยเกิร์ตในแต่ละประเทศแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณภาพและชนิดของนมที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของนม โคนและโยเกิร์ตนมโค (100 กรัม)

ส่วนประกอบ	นมโค		โยเกิร์ตนมโค		
	ไขมันเต็ม	ขาดมันเนย	ไขมันเต็ม	ไขมันต่ำ	ผลไม้
แคลอรี (กิโลแคลอรี)	67.5	36.0	72.0	64.0	98.0
โปรตีน (กรัม)	3.5	3.3	3.9	4.5	5.0
ไขมัน (กรัม)	4.25	0.13	3.40	1.60	1.25
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	4.75	5.1	4.9	6.5	18.6
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	119	121	145	150	176
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	94	95	114	118	153
โซเดียม (มิลลิกรัม)	50	52	47	51	-
โปรแตสเซียม (มิลลิกรัม)	152	145	186	192	254

ที่มา : Deeth และ Tamime (1981)

2.4.2 ชนิดของโยเกิร์ต (Type of yoghurt)

การแบ่งชนิดของโยเกิร์ต สามารถแบ่งได้โดยอาศัยหลักการต่อไปนี้

2.4.2.1 มาตรฐานกฎหมาย (Legal standard) ตามมาตรฐานขององค์การอาหารและเกษตร (Food and Agriculture Organization, FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ปี ค.ศ. 1973 ได้กำหนดให้แบ่งชนิดโยเกิร์ตตามปริมาณไขมัน ซึ่งแบ่งได้ 3 ระดับ ดังนี้

- โยเกิร์ตไขมันเต็ม (Full fat yoghurt) มีปริมาณไขมันมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์
- โยเกิร์ตไขมันปานกลาง (Medium fat yoghurt) มีปริมาณไขมันระหว่าง 0.5 – 3 เปอร์เซ็นต์
- โยเกิร์ตไขมันต่ำ (Low fat yoghurt) มีปริมาณไขมันต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์

2.4.2.2 กรรมวิธีการผลิต (Method of yoghurt processing) ซึ่งอาจสังเกตจากเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตและระบบการผลิตแบ่งได้ 2 ประเภท (วราวุฒิ ครุสงฆ์ และรุ่งนภา พงสวัสดิ์มานิต, 2532)

- โยเกิร์ตชนิดเซตตัว (Set yoghurt) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่การหมักเกิดขึ้นในบรรจุภัณฑ์ที่พร้อมบริโภค ดังนั้นเนื้อ โยเกิร์ตที่ได้จะมีลักษณะเป็นมวลของแข็งกึ่งเหลวตลอดทั้งภาชนะ
- โยเกิร์ตชนิดกวน (Stirred yoghurt) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในถังหมัก และภายหลังถูกแบ่งออกมาบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่พร้อมบริโภค ดังนั้นเนื้อ โยเกิร์ตที่ได้จึงมีลักษณะแตก หรือแยกจากกัน

2.4.3 กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ต

วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต (2532) กล่าวถึงกรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ต โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การเตรียมส่วนผสม การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน การให้ความร้อน กระบวนการหมัก การทำความเย็น การเติมองค์ประกอบสีและกลิ่น รวมถึงการเก็บรักษา ดังภาพที่ 2.1

2.4.3.1 การเตรียมส่วนผสมเบื้องต้น

เนื่องจากองค์ประกอบของนมที่ได้จากสัตว์ชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เมื่อผ่านกระบวนการหมักจะทำให้คุณภาพของโยเกิร์ตต่างกัน เช่น ถ้าไขมันในนมมีปริมาณสูง จะทำให้โยเกิร์ตที่ได้เป็นครีมสูงตามไปด้วย และน้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในนมจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของหัวเชื้อโยเกิร์ต ส่วนโปรตีนจะทำให้เกิดการตกตะกอน ซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับความหนืด (consistency/viscosity) ของผลิตภัณฑ์ ดังตารางที่ 2.3 ดังนั้นการปรับคุณภาพนมก่อนการหมักจะทำให้โยเกิร์ตที่ได้มีคุณภาพ ดังนี้

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบสำคัญที่มีในโยเกิร์ต

องค์ประกอบ (component)	โยเกิร์ตธรรมชาติ (nature yoghurt) (กรัม/100 กรัม)	
	ไขมันเต็ม (full fat)	ไขมันต่ำ (low fat)
โปรตีน (protein)	3.9	5.0
ไขมัน (fat)	3.4	0.5
คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)	4.9	6.5

ที่มา : Deeth และ Tammine (1981)

- การปรับปริมาณของแข็งที่ไม่ใช่ไขมัน (Solids-not-fat ; SNF)

ปริมาณของแข็งที่ไม่ใช่ไขมัน ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส โปรตีนและเกลือแร่ ในนมที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติทางกายภาพและกลิ่นรส โยเกิร์ตที่มีคุณภาพดีจะได้จากนมที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid ; TS) เท่ากับ 15-16 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โยเกิร์ตมี TS 14-15 เปอร์เซ็นต์ ถ้าในโยเกิร์ตมี TS สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ความชื้นลดลง และมีผลต่อกิจกรรมของเชื้อลดลง ซึ่งการเพิ่มปริมาณของแข็ง สามารถทำได้หลายวิธีเช่น การให้ความร้อน การเติมนมผง เคซีอี และ whey powder เป็นต้น

นำนมไขมัน 1±0.05 เปอร์เซ็นต์



ให้ความร้อนอุณหภูมิ 60- 65 องศาเซลเซียส



เติมสเตบิลไลเซอร์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) และนมผงขาดมันเนย 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)



ผสมที่อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที



พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 43 - 45 องศาเซลเซียส



เติมจุลินทรีย์โพรไบโอติก 0.02 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)



บรรจุใส่ถ้วยพลาสติก ขนาดบรรจุ 120 กรัม



ปิดฝาฟอยล์



บ่มที่อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

(ความเป็นกรดต่าง ประมาณ 4.5±0.2)



ทำให้เย็นแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 2.1 กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตธรรมชาติ

ที่มา: โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา (2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การเติมสารคงตัว

การเติมสารคงตัวในโยเกิร์ต จะมีส่วนช่วยของลักษณะเนื้อสัมผัส (body and texture) ความหนืด (consistency/viscosity) ลักษณะปรากฏด้าน โครงสร้างของเจล และช่วยลดปัญหาการแยกชั้นของหางนม (whey) หรือเรียกว่า syneresis

- การเติมสารให้ความหวาน

สารให้ความหวานหรือที่เรียกว่า sweetener มักนำมาเติมในโยเกิร์ตรสผลไม้ (fruit yoghurt) สารให้ความหวานที่นำมาใช้มีหลายชนิด เช่น ซอร์บิทอล และแอสพาแทม เป็นต้น ซึ่งจะมีส่วนในการปรับความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์ให้ลดลง ซึ่งปริมาณที่ใช้สารให้ความหวานขึ้นอยู่กับ ชนิดของสารให้ความหวาน ความต้องการของผู้บริโภค ชนิดของผลไม้ที่ใช้ ผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น (starter) และข้อกำหนดของกฎหมาย เป็นต้น

2.4.3.2 การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization)

หลังจากที่นมได้ผ่านกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยการให้นมผ่านเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ส่งผลให้เนื้อสัมผัสที่ได้เนียน มีกลิ่นรสที่เป็นครีม และช่วยลดการเกิดคริมที่ผิวหน้า หรือการแยกชั้นของหางนม (wheying-off) ซึ่งควรใช้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และความดัน 100-200 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (Tamime และ Deeth, 1980)

2.4.3.3 การให้ความร้อน (Heat treatment)

การให้ความร้อนจะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพของนมทำให้โปรตีนที่มีอยู่ในนม ซึ่งได้แก่พวกอัลบูมินและโกลบูลินที่เสียสภาพ (denature) ตกตะกอนเกิดการรวมตัวของโมเลกุลเคซีน ทำให้เกิดเป็นร่างแหในลักษณะ 3 มิติ โดยร่างแหนี้จะจับกับโปรตีนของหางนม ทำให้โยเกิร์ตที่ได้มีความหนืด (consistency) กำจัดอากาศที่มีอยู่ในนม เพื่อให้สภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแลคติกมากยิ่งขึ้น และช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยระดับความร้อนที่ให้นมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต คือ 85-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ แต่สปอร์หรือเอนไซม์ที่ทนต่อความร้อนยังคงอยู่ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนแก่นมที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต

เวลา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กระบวนการ	ผลที่ได้
30 นาที	65	Low temperature long time (Holder method)	ทำลายจุลินทรีย์ได้ 99 เปอร์เซ็นต์
15 นาที	72	High temperature short time (HTST)	
30 นาที	85	High temperature short time (HTST)	ทำลายเซลล์ทั้งหมด และสปอร์บางส่วน
5 นาที	90-95	Vary high temperature short time (VHTST)	
20 นาที	110-115	Conventional sterilization (in bottle)	ทำลายเซลล์ทั้งหมด และสปอร์เกือบทั้งหมด
3 วินาที	115	Low temperature UHT	ทำลายจุลินทรีย์และ สปอร์ได้ทั้งหมด ยกเว้น กระบวนการฆ่าเชื้อแบบ ยูเอชทีที่อุณหภูมิต่ำ
16 วินาที	135	Long time UHT	
1-2 วินาที	140	UHT	
0.8 วินาที	150	UHT French process	

ที่มา : Tamime และ Robinson (1985)

2.4.3.4 กระบวนการหมัก (Fermentation process)

นมที่ผ่านการให้ความร้อน จะต้องถูกทำให้เย็น เพื่อทำการเติมหัวเชื้อ โดยจะต้องทำด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) หัวเชื้อที่ใช้ประกอบด้วยเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักหรือการบ่มโยเกิร์ต คือ 40-45 องศาเซลเซียส ซึ่งขั้นตอนการหมักจะเกิดได้ 2 ลักษณะคือ ถ้าเป็นโยเกิร์ตชนิดคงตัว (set yoghurt) จะเกิดการหมักในภาชนะบรรจุที่จะจำหน่าย (retail container) และโยเกิร์ตชนิดกวน (stirred yoghurt) จะเกิดการหมักขึ้นในถังหมัก จนกระบวนการหมักสมบูรณ์ จึงจะนำไปบรรจุเพื่อส่งจำหน่ายต่อไป

2.4.3.5 การทำความเย็น (Cooling)

การผลิตโยเกิร์ตเป็นกระบวนการทางชีวภาพ การทำให้เย็นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการควบคุมกิจกรรมของหัวเชื้อและเอนไซม์ จนมีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส การให้ความเย็นแก่ coagulum จะเริ่มตั้งแต่ผลิตภัณฑ์มีระดับความเป็นกรดต่าง ได้ตามที่ต้องการประมาณที่ 4.6 หรือความเข้มข้นกรดแลคติกประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแล้วแต่ปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของโยเกิร์ตที่ผลิต วิธีให้ความเย็น และประสิทธิภาพของการถ่ายเทความร้อน เป็นต้น

2.4.3.6 การเติมองค์ประกอบที่ให้กลิ่นรสและสี (Addition of flavoring/colouring ingredients)

การเติมองค์ประกอบที่ให้กลิ่นรสและสี เพื่อเพิ่มความนิยมให้แก่ผู้บริโภคขึ้นกับชนิดของโยเกิร์ตที่ต้องการ เช่น ผลไม้ สารให้กลิ่นสี และสารประกอบอื่นๆ เช่น น้ำผึ้ง ถั่วต่างๆ มะเขือเทศ และกาแฟ เป็นต้น

2.4.1.7 การเก็บรักษาโยเกิร์ต

ควรเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1-2 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะในการผลิต เทคนิคในการผลิต ชนิดของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ และการใช้สารกันเสีย ปกติโยเกิร์ตจะมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปริมาณกรดที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้กลิ่นรสของโยเกิร์ตเปลี่ยนแปลงไปไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.4.4 จุลินทรีย์โยเกิร์ต

2.4.4.1 *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus เป็นแบคทีเรียแลคติก รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 2 ไมครอน มักเรียงตัวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย ดิคลิแกรมบวก ทนความร้อนที่อุณหภูมิสูง *S. thermophilus* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *S. thermophilus* และไม่สามารถเจริญเติบโตที่ 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ *S. thermophilus* ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเป็นกรดค่า 6.5 และจะหยุดการเจริญเติบโตที่ 4.2-4.4 *S. thermophilus* เมื่ออยู่เป็นเซลล์เดี่ยวจะสร้างกรดทำให้โปรตีนในน้ำนมตกตะกอนได้ดี ในระหว่างการหมักน้ำนม *S. thermophilus* จะผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) และเอนไซม์ β -galactosidase มาย่อยแลคโตสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสกับกาแลคโตส และผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (urease) มาย่อยสลายยูเรียในน้ำนมทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย นอกจากนี้ *S. thermophilus* ยังผลิตแคปซูลและผลิตเมือกภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ ช่วยให้โยเกิร์ตที่ผลิตได้มีลักษณะเนื้อที่เนียนข้นและทำให้ผลไม้กระจายตัวได้ดีในโยเกิร์ต (Vedamuthu, 1991)

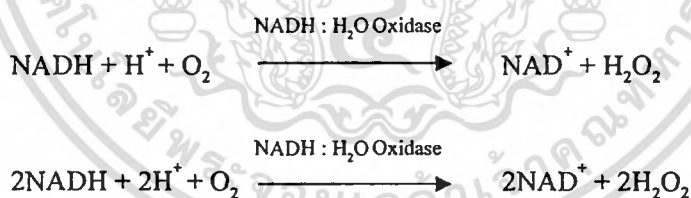
2.4.4.2 *Lactobacillus bulgaricus*

L. bulgaricus เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ดิคลิแกรมบวก อาจเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและมีกรดมากขึ้น *L. bulgaricus* พบอยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย สามารถทนความร้อนได้ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *L. bulgaricus* ประมาณ 45 องศาเซลเซียส และมีความสามารถอยู่รอดหลังผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ *L. bulgaricus* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดแลคติก และมีความทนกรด *L. bulgaricus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความ

เป็นกรดค่า 5.5 และหยุดการเจริญเติบโตที่ 3.5-3.8 การเจริญเติบโตของ *L. bulgaricus* เกิดได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย หรือในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นในช่วงแรกของการหมัก *L. bulgaricus* จะเจริญเมื่ออกนอกเซลล์ ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์เช่นเดียวกับ *S. thermophilus* ช่วยให้โยเกิร์ตมีเนื้อเนียนและข้นอย่างช้าๆ จนกว่าออกซิเจนจะถูกใช้ไปจนหมดโดยแบคทีเรียชนิดอื่น (Vedamuthu, 1991)

2.4.5 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ต

ในปัจจุบันการผลิตโยเกิร์ตนิยมใช้เชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* โดยทำการบ่มโยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) เมื่อการหมักดำเนินต่อไปจำนวนแบคทีเรียให้กรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีผลให้มีการเจริญเติบโตและกรดสูง เมื่อมีการนำมาใช้ร่วมกัน เช่น *S. thermophilus* ที่เจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ทำให้เกิดการสะสมของกรดแลคติกและกรดอะซิติก อะเซทอัลดีไฮด์ โคอะซิติกและกรดฟอรั่มิก การมีเกลือฟอรั่มและการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ในการให้และการรับอิเล็กตรอนในอาหารกระตุ้นให้ *L. bulgaricus* เจริญได้ดี ซึ่งบอกได้จากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ย่อยโปรตีน *L. bulgaricus* นี้ทำให้กรดอะมิโนถูกปล่อยออกจากโปรตีนในนมมากกว่า *S. thermophilus* จะใช้หมด จึงมีกรดอะมิโนอิสระเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต กรดอะมิโนที่มีมากได้แก่ กรดกลูตามิก และ โฟลีน ด้วยเหตุนี้โยเกิร์ตจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกรดอะมิโนสูง กระบวนการหมักต้องอาศัย NADH ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ (oxidize) ต่อไปเป็น NAD⁺ ดังนี้



จุลินทรีย์โยเกิร์ตโดยเฉพาะ *S. thermophilus* ไวต่อยาปฏิชีวนะและสารยับยั้งที่มีอยู่ในนม โดยระดับของเพนิซิลลินที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติกได้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย บางครั้งพบว่าเพนิซิลลินต่ำเพียง 0.004-0.01 IU (International unit) ก็เพียงพอในการยับยั้งแบคทีเรีย (Tamime และ Robinson, 1985)

2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมลบ รูปแท่ง อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แยกได้ ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วงในปี ค.ศ.1885 โดยนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันชื่อ ทีโอดอร์ เอสเชอริช (Theodor Escherich) ต่อมาได้ตั้งชื่อเป็น *Escherichia coli* (*E. coli*) ก่อนปี ค.ศ. 1982 ไม่ถือว่า *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียที่มีอันตราย ถึงแม้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้มักทำให้เด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาเกิดอาการท้องเดิน เนื่องจากเป็นแบคทีเรียในลำไส้จึงพบได้บ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of faecal contamination) โดยการระบาดครั้งสำคัญเกิดขึ้นในสหรัฐอเมริกา ปี ค.ศ. 1982 และปี ค.ศ. 1983 ได้ระบุว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.5.1 การจำแนกชนิดของ *E. coli* (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.5.1.1 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

ทำให้เกิดโรคโดยกลไกการเกาะติดกับเซลล์เนื้อเยื่อในลำไส้ เกิดการรวมตัวกับเยื่อเมือกและแบคทีเรียจะเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในเยื่อเมือกของลำไส้ แล้วขับโปรตีนออกมายับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ซึ่งมักจะเกิดกับเด็กทารกที่มีอายุต่ำกว่า 1 ขวบ

2.5.1.2 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซิน แต่ทำให้เกิดโรคโดยการเจาะเข้าไปในเซลล์ชั้นนอกของโฮสต์ (epithelial cells) แล้วกระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงคล้ายกับพฤติกรรมของเชื้อบิด มักอยู่ในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงทั้งชนิดที่มีเลือดและไม่มีเลือดปน เกิดกับเด็กอ่อนและคนชรา EIEC เป็น *E. coli* สายพันธุ์แรกที่พบว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยเกิดโรคระบาดขึ้นในประเทศอังกฤษปี ค.ศ. 1947 ซึ่งการระบาดนี้เกิดจากการบริโภคปลาซัลมอนของนักเรียนในโรงเรียนแห่งหนึ่ง

2.5.1.3 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน 2 แบบ คือ แบบที่ทนความร้อน (heat-stable toxin; ST) จำแนกออกเป็น 2 ชนิด เรียกว่า ST_A หรือ ST-I และ ST_B หรือ ST-II มีคุณสมบัติคล้ายสารพิษของซิจิเลลา และแบบไม่ทนความร้อน (heat-labile toxin; LT) จำแนกออกเป็น 2 ชนิด เรียกว่า LT_A และ LT_B มีคุณสมบัติคล้ายสารพิษของซิจิเลลาทำให้เกิดโรคจากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน โดยแบคทีเรียจะเจริญในลำไส้เล็กพร้อมกับการขับสารพิษออกมา ทำให้เกิดอาการท้องร่วง อุจจาระไม่มีเลือดปน ถ่ายเหลวคล้ายอหิวาต์แต่รุนแรงน้อยกว่า มักเกิดกับนักเดินทางจึงได้ชื่อว่า เป็นโรคท้องร่วงนักเดินทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.4 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่มีสมบัติคล้ายกับสารพิษของซีเจลลา (Shiga-like toxins) ทำให้เกิดโรคเนื่องจากสารพิษที่ชื่อชนิดนี้ผลิตขึ้น ซึ่งเป็นสารพิษประเภทเวโรทอกซิน (verotoxin) ทำให้เกิดอาการ hemolytic uremic syndrome (HUS) ซึ่งเป็นอาการปัสสาวะเป็นเลือด ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางเฉียบพลัน กล้ามเนื้อไม่แข็งแรง และอาจเกิดไตวายเฉียบพลันได้ ตัวอย่างของ *E. coli* ในกลุ่มนี้ได้แก่ *E. coli* O157:H7

2.5.2 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 เป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค ซึ่งจัดเป็น Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) มีขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมครอน ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ มีแคปซูลบางๆ หุ้ม ส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่โดยการใส่แฟลกเจลลา (flagella) ที่มีอยู่รอบตัว เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จัดเป็นพวกที่สามารถเจริญได้ในทั้งในที่สภาวะมีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534; อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

2.5.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7

1) อุณหภูมิ

E. coli O157:H7 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส (อัจฉรา เพิ่ม, 2550) และ Raghubeer และ Matches (1990) รายงานว่า *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญและผลิตแก๊สใน *Escherichia coli* (EC) medium ภายใน 48 ชั่วโมง ที่ช่วงอุณหภูมิ 19.3-41 องศาเซลเซียส และ Glass และคณะ (1992) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) พบว่า *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-42 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมिन้อยกว่า 42 องศาเซลเซียส และสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สิริพร สรณเสาวภาคย์ และคณะ, 2543)

2) ความเป็นกรดต่าง

E. coli O157:H7 สามารถเจริญได้ในค่าความเป็นกรดต่าง 5.5-7.5 และมีปริมาณลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างลดลง (Buchanan และ Klawitter, 1992) และไม่สามารถอยู่รอดได้ เมื่อค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4 (Glass และคณะ, 1992) นอกจากนี้สิริพร สรณเสาวภาคย์ และคณะ (2543) ศึกษาผลของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml ใน Tryptic soy broth (TSB) ที่ปรับความเป็นกรดต่าง เป็น 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 พบว่า *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญเติบโตได้ในความเป็นกรดต่างช่วง 4.5-9.5

3) ปัจจัยอื่นๆ

สิริพร สรณเสาวภาคย์และคณะ (2543) รายงาน *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือไม่น้อยกว่า 5.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีที่โซเดียมเบนโซเอต และโพแทสเซียมไนเตรทความเข้มข้น 1,000 ppm นอกจากนี้พบว่าไกลซีน (glycine) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลาย *E. coli* O157:H7 ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

2.5.2.2 แหล่งที่พบ

E. coli O157:H7 พบได้ในเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อไก่ เนื้อหมู รวมถึงมนุษย์ นอกจากนี้พบว่ามีการปนเปื้อนในทางน้ำและอาหาร ได้แก่ นม น้ำดื่มที่ใช้ในครัวเรือน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ดังภาพที่ 2.2 *E. coli* O157:H7 ไม่ทนทานต่อความร้อน แต่สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิแช่แข็ง และยังพบว่า *E. coli* O157:H7 สามารถเจริญได้ในลำไส้ของไก่ สำหรับการปนเปื้อนในอาหารส่วนมากเกิดจากอาหารที่มีเนื้อวัว จึงเชื่อว่าจะน่าจะเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยปฐมภูมิของแบคทีเรีย โดยทั่วไปมักพบ *E. coli* O157:H7 ในอุจจาระของลูกวัวในระยะยังไม่หย่านมสูงกว่าวัวในระยะอื่นๆ จากการตรวจวิเคราะห์อุจจาระของลูกวัวหลังหย่านม และวัวในระยะเจริญวัยเต็มที่แล้วซึ่งมีสุขภาพดีในสหรัฐอเมริกา แคนาดา อังกฤษ และสเปน พบว่ามีการปนเปื้อนจาก *E. coli* O157:H7 0.3-2.2 เปอร์เซ็นต์ (Nystrom และคณะ, 1997)

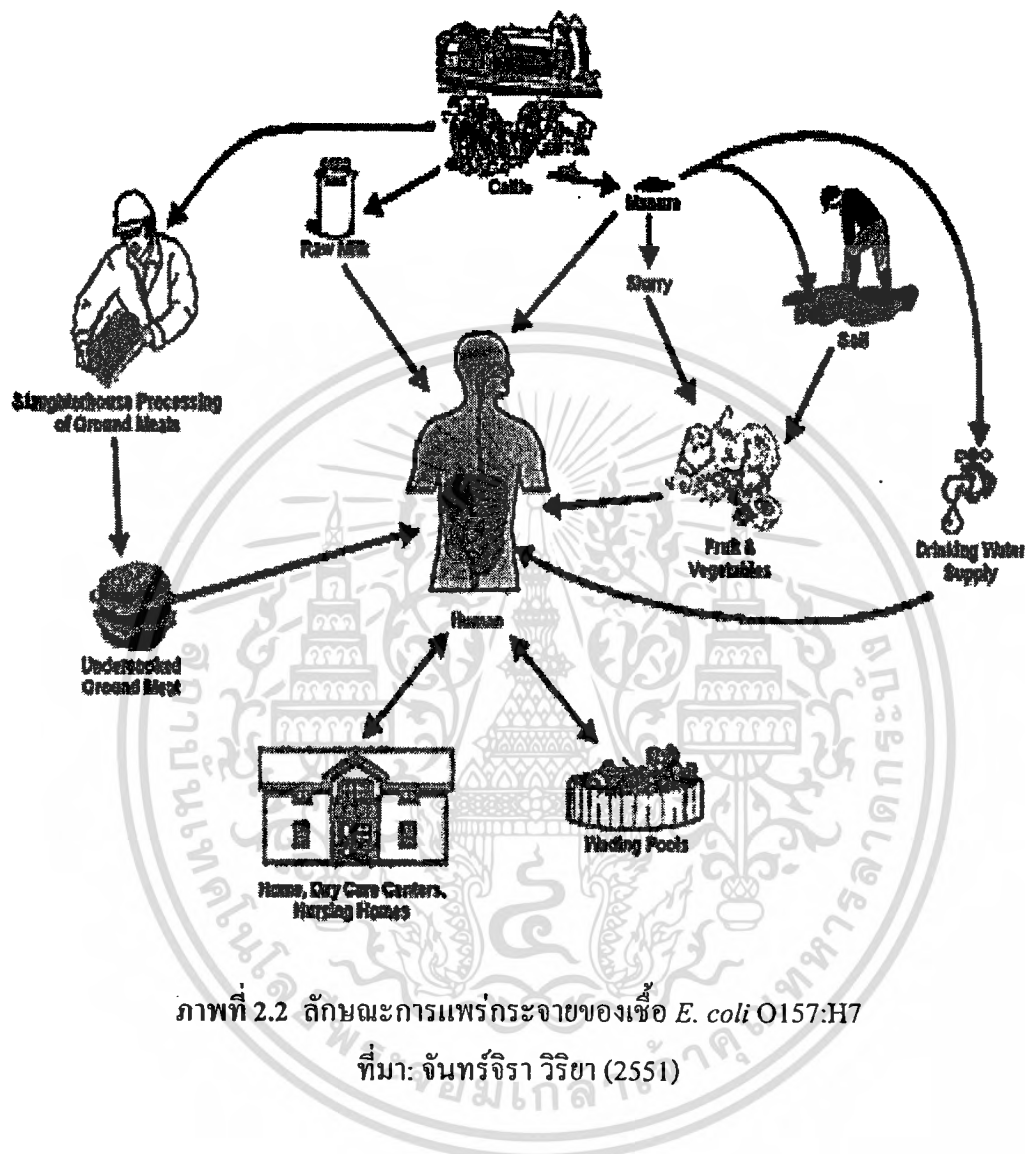
2.5.2.3 อาการของโรคที่เกิดจาก *E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 มักก่อให้เกิดโรคได้ทุกช่วงอายุ แต่ในเด็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงก่อให้เกิดโรคและอาการรุนแรงมากกว่า เชื้อปริมาณน้อยกว่า 10 เซลล์ สามารถทำให้เกิดโรคได้ ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 1-3 วันของการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน จากนั้นอาการของโรคจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการได้รับเชื้อ *E. coli* O157:H7 ดังภาพที่ 2.3 ผู้ที่ติดเชื้ออาจมีอาการหรือไม่มีอาการ และมีอาการตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงความรุนแรง และทำให้เสียชีวิตได้ อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* O157:H7 มีดังนี้ (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

1) Hemorrhagic colitis ลักษณะอาการ คือ ปวดท้องรุนแรง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำในระยะแรก 2-3 วัน ต่อมาถ่ายอุจจาระมีเลือดปนหรือถ่ายเป็นสีเลือดสด อาจมีอาการอาเจียน ไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย

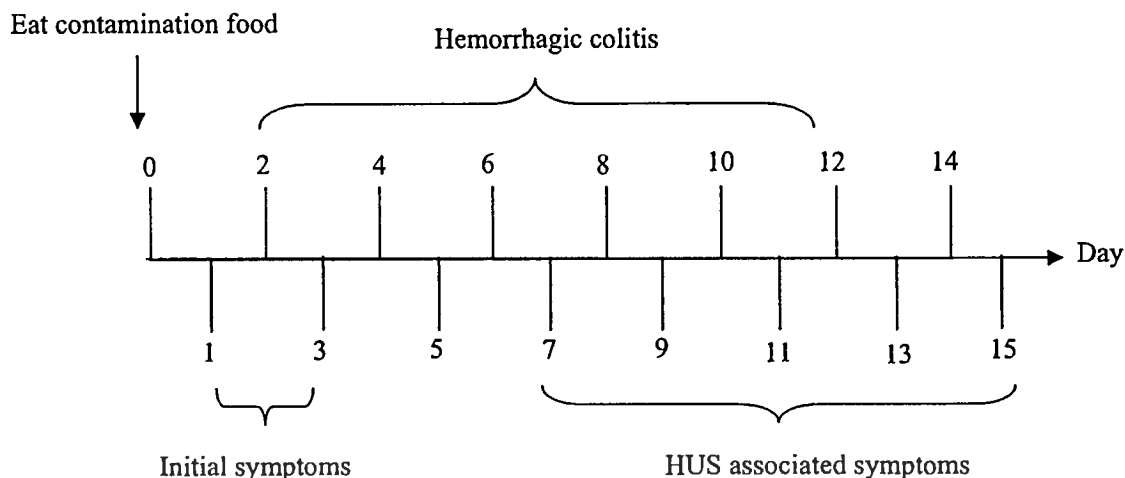
2) Hemolytic uremic syndrome (HUS) ผู้ป่วยมีอาการ 3 แบบ คือ microangiopathic hemolytic anemia ซึ่งมีการจับตัวของเม็ดเลือดแดง ทำให้ถูกทำลายได้ thrombocytopenia มีจำนวน platelet น้อยและ acute nephropathy ซึ่งจะทำให้การทำงานของไตผิดปกติ การรักษาทำได้โดยการล้างไต และการถ่ายเลือด บางรายผู้ป่วยอาจมีอาการโคม่า และเสียชีวิตในที่สุด

3) Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) ลักษณะอาการคล้ายกับ HUS แต่ที่แตกต่างกันออกไป คือมีอาการทางประสาทเข้ามาเกี่ยวข้องและมีไข้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการเลือดคั่งในสมองและเสียชีวิตในที่สุด (อรอนงค์ รัชตราชนชัย, 2542)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* O157:H7
ที่มา: จันทร์จิรา วิริยา (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 อาการและระยะเวลาของการได้รับเชื้อ *E. coli* O157:H7

ที่มา : Khishigjargal (2007)

2.5.2.4 การป้องกันโรค

ในด้านการป้องกันนั้น ในปัจจุบันทำได้ค่อนข้างยาก เพราะการคมนาคมเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว การแพร่ระบาดของโรคจากประเทศหนึ่งไปสู่อีกประเทศหนึ่ง จึงรวดเร็วตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการที่จะช่วยป้องกัน มิให้ติดเชื้อที่ดีที่สุดก็คือ การสร้างสุขนิสัยในการรับประทานอาหารให้ถูกต้อง เช่น รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ๆ ดื่มน้ำที่สะอาด หรือดื่มน้ำที่ผ่านการต้มแล้ว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้ง ก่อนรับประทานอาหาร เป็นต้น ส่วนผู้ที่ชอบดื่มนมนั้น ควรดื่มนมที่ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อแล้ว เช่น นมพาสเจอร์ไรส์ นมสเตอริไรซ์หรือนมยูเอชที เป็นต้น ซึ่งมีความปลอดภัยต่อการบริโภค สำหรับในผู้ป่วยที่ปรากฏอาการอุจจาระร่วงนั้น หากอาการไม่รุนแรงนักก็ให้รับประทานน้ำดื่มเกลือแร่ (electrolytes) เพื่อทดแทนการสูญเสียน้ำ แต่ถ้าหากอาการยังไม่ทุเลา ต้องรีบมาพบแพทย์เพื่อให้การรักษาพยาบาลต่อไป (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2542)

2.5.3 การปนเปื้อนและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร

E. coli O157:H7 พบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นม มีการศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ดังนี้

สิริพร สธนเสาวภาคย์ และคณะ (2543) ศึกษาผลของการเติม *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 Log CFU/ml ในนมพาสเจอร์ไรส์ (ความเป็นกรดต่าง 6.5) น้ำสลัด (ความเป็นกรดต่าง 3.8) และแฮม (ความเป็นกรดต่าง 5.4) พบว่าในน้ำสลัด *E. coli* O157:H7 ลดลง จนไม่สามารถตรวจพบได้ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแต่นมพาสเจอร์ไรส์และแฮม สามารถตรวจพบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 14 วัน

Ramsaran และคณะ (1998) ได้ทำศึกษาการปนเปื้อนของ *E.coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^4 CFU/ml ในนมดิบที่ใช้สำหรับผลิตเนยแข็ง Camembert cheese พบว่า *E. coli* O157:H7 มีจำนวนเพิ่มขึ้น 2 Log cycle ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการผลิต และมีจำนวนลดลงในระหว่างการเก็บรักษานเนยแข็งที่อุณหภูมิ 2 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 65 วัน

Chang และคณะ (2000) ศึกษาผลของการเติม *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^7 Log CFU/ml ที่ได้จากการหมัก *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *L. casei* ssp. *casei* นมเปรี้ยวชนิดไม่มีการเติมน้ำตาลที่ได้จาก *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* จำนวนของ *E. coli* O157:H7 ลดลง จนไม่สามารถตรวจพบได้ในระหว่างการเก็บรักษานมเปรี้ยวที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 3.5 ขณะที่นมเปรี้ยวชนิดไม่มีการเติมน้ำตาลที่ได้จาก *L. casei* ssp. *casei* ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 เป็นเวลา 1-4 วัน นอกจากนั้นพบว่า การเติมน้ำตาลลงในนมเปรี้ยวทำให้การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น

Yi และ Chou (2001) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) ที่ปรับปริมาณกรดด้วยไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล ทำให้ *E. coli* O157:H7 สามารถรอดชีวิตเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ชาคูลท์และโยเกิร์ตไขมันต่ำ ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

Ogwaro และคณะ (2002) ศึกษากระบวนการหมักโยเกิร์ตแบบแอฟริกัน (African yoghurt) ที่มีการเติม *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 10^7 CFU/ml และบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และ 43 องศาเซลเซียส พบว่าโยเกิร์ตที่ผ่านการหมักที่อุณหภูมิต่ำ สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนไม่สามารถตรวจพบได้ ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สำหรับโยเกิร์ตที่ผ่านการหมักที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ไม่พบ *E. coli* O157:H7 เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน และการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิด เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

Simsek และคณะ (2005) ศึกษาผลของ *L. actobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* และ *S. thermophilus* ต่อการเจริญและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์นมหมัก Ayrhan พบว่า *E. coli* O157:H7 มีจำนวนลดลงจาก 6.4 Log CFU/g เป็น 3.10 Log CFU/g ที่ความเป็นกรดต่าง 4.4 และ จาก 6.30 Log CFU/g เป็น 3.10 Log CFU/g ที่ความเป็นกรดต่าง 4.6 และผลิตภัณฑ์นมหมักทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

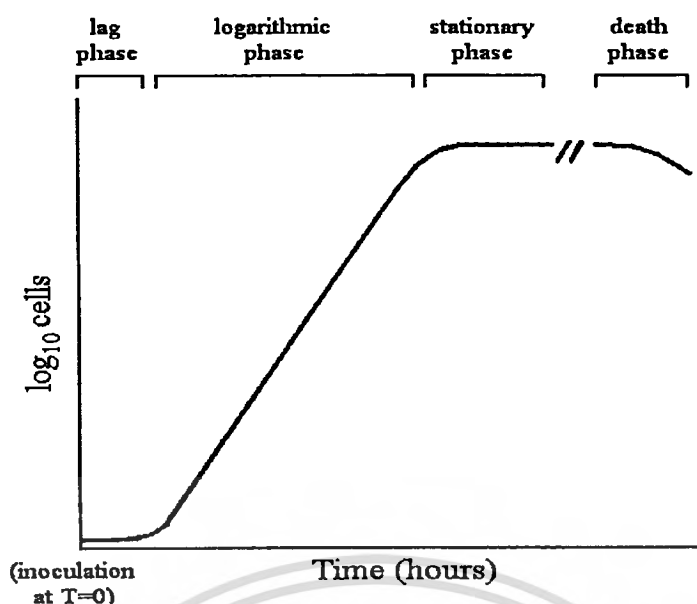
Bachrouri และคณะ (2002) ศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า การเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส ปริมาณ *E. coli* O157:H7 ลดลงน้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 และ 22 องศาเซลเซียส และตรวจไม่พบ

E. coli O157:H7 ในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 312 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 8, 17 และ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168, 28 และ 16 ชั่วโมง ตามลำดับ

Bachroui และคณะ (2006) ศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างกระบวนการหมักและการเก็บรักษาโยเกิร์ต พบว่าเมื่อมีการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *E. coli* O157:H7 มีการเพิ่มจำนวนเล็กน้อย จาก 5.1 เป็น 5.4 Log CFU/g และตรวจไม่พบเชื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน และที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ส่วนการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส *E. coli* O157:H7 มีการเพิ่มขึ้นจาก 4.8 เป็น 5.4 Log CFU/g และตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 เมื่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

2.6 จลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แบ่งออกได้เป็น 6 ระยะ (ดังภาพที่ 2.4) หลังจากมีการถ่ายเชื้อ (inocubation) แล้ว จุลินทรีย์จะยังคงไม่มีการเจริญเติบโต เป็นระยะที่จุลินทรีย์ปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะปรับตัว (lag phase) จากนั้นจึงจะมีการเติบโตเริ่มเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะต้นที่เรียกว่า ระยะเร่งตัว (acceleration phase) อัตราการเจริญเติบโต (growth rate) จะเพิ่มขึ้นสูงสุดและคงที่เข้าระยะที่เรียกว่า ระยะเติบโตทวีคูณ (log หรือ exponential phase) จากการที่จุลินทรีย์เติบโตอย่างรวดเร็วนี้เองทำให้สารอาหารเริ่มไม่เพียงพอและเกิดสภาวะการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสร้างและสลายเซลล์ เช่น เอทานอล กรดอะซิติก เป็นต้น ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงลดลง เรียกระยะนี้ว่า ระยะถดถอย (deceleration phase) จนกระทั่งอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย (death rate) ทำให้ปริมาณเซลล์อยู่ในสภาพคงที่ ระยะนี้จึงถูกเรียกว่า ระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมนี้ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้จุลินทรีย์สลายเซลล์ตัวเอง ปริมาณเซลล์ลดลงเรื่อยๆ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะตาย (death หรือ declining phase) (สาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ, 2538)



ภาพที่ 2.4 การแบ่งระยะการเติบโตของจุลินทรีย์

ที่มา : Michael (1998)

เมื่อมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาศึกษาถึงการเพิ่มประชากร โดยเพิ่มจำนวนด้วยการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 เซลล์ และเซลล์ลูกแต่ละเซลล์จะมีลักษณะเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ เมื่อการแบ่งเซลล์สิ้นสุด จำนวนเซลล์หรือชีวมวล (biomass) เป็น 2 เท่าของจำนวนหรือชีวมวลก่อนการแบ่งเซลล์ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มจำนวนเซลล์เช่นนี้เป็น exponential กับเวลา หรือเป็น logarithmic กับเวลา กล่าวคือ ถ้าสร้างเส้นกราฟระหว่าง logarithm ของจำนวนเซลล์กับเวลาที่ใช้ในการเจริญจะได้รับความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง หรือกล่าวได้ว่าการเจริญของเชื้อเป็น exponential growth หรือ logarithmic growth เมื่อใช้คณิตศาสตร์ในการพิจารณาการเพิ่มจำนวน คำนวณได้จากสมการ (คณะอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2538; Bachrouri และคณะ, 2002) ดังนี้

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ N คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เวลา t

N_0 คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

ใช้ logarithm ให้สมการเกิดความสมดุล

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu t \quad \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ μ คือ ค่าความชันของ $\ln(N)$ เปรียบเทียบกับเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าต้องการคำนวณค่าเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, t_g)

เมื่อ $N = 2 N_0$ คือ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็น 2 เท่า

$$t_g = \frac{\ln 2}{\text{slope}} = \frac{0.693}{\mu} \quad \text{.....(3)}$$

จากข้อมูลของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่แสดงเป็น Log CFU/ml แต่แสดงเป็นเลขฐาน 10 Log CFU/ml ซึ่งการกำหนดเป็น Log_{10} ของ CFU/ml กับเวลา สามารถนำมาใช้เป็นสูตรคำนวณได้

$$t_g = \frac{\text{Log}(2)}{\text{slope}} = \frac{0.301}{\mu} \quad \text{.....(4)}$$

ค่าคงที่อัตราการเจริญ (growth rate, k) จะมีค่าผกผันกับ generation time (t_g)

$$k = \frac{1}{t_g} \quad \text{.....(5)}$$

จากสมการ 4 และ 5 มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, t_g) และค่าคงที่อัตราการเจริญ (growth rate, k) คือ

$$\mu = \frac{\text{Log}(2)}{t_g} = k \cdot \text{Log}(2) \quad \text{.....(6)}$$

Bachrouri และคณะ (2002) กล่าวถึง การเจริญและการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถใช้สมการคณิตศาสตร์ในการคาดเดาได้ ดังนั้นจากสมการการเจริญของเชื้อเป็น exponential growth ดังสมการ 1 สามารถนำมาคำนวณหาสมการการตายของเชื้อได้ โดย

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad \text{.....(7)}$$

เมื่อ N คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดที่เวลา t

N_0 คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

μ' คือ อัตราการตายจำเพาะ (specific death rate)

จากสมการ 7 สามารถคำนวณค่าเวลาสำหรับการลดลงของเซลล์เป็น 2 เท่าหรือเวลาการตาย (death time, t_d) ได้จากค่าอัตราการตายจำเพาะ (μ') และอัตราการตาย (death rate, k') ซึ่งแปรผกผันกับ t_d

$$t_d = \frac{0.301}{\mu'} \quad \text{.....(8)}$$

$$k' = \frac{1}{t_d} \quad \text{.....(9)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษา จากสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลา จะได้ค่าความชันของกราฟหรือค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราการตายจำเพาะ (μ') จากนั้นนำมาหาคำนวณหาค่าเวลาสำหรับการลดลงของเซลล์เป็น 2 เท่า (t_d) และ เวลาการตาย (t_d') รวมถึงค่าคงที่อัตราการเจริญ (k) และอัตราการตาย (k')



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

- | | |
|------------------------------------|--|
| 3.1.1 นมโคพร่องไขมัน | โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา,
กรุงเทพฯ |
| 3.1.2 สเตบิลไลเซอร์ Palsgaard 5842 | Palsgaard, Denmark |
| 3.1.1.1. หางนมผง | Bonlac, Australia |

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

- | | |
|--|----------------------------------|
| 3.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7 | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กรุงเทพฯ |
| 3.2.2 เชื้อโยเกิร์ต | Chr. Hansen, Denmark |
| - เชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ ได้แก่ YC-380 ประกอบด้วย <i>Streptococcus thermophilus</i> ,
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> | |
| - เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ได้แก่ ABY-3 ประกอบด้วย <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> ,
<i>L. acidophilus</i> และ <i>Bifidobacterium lactis</i> และ ABT-5 ประกอบด้วย <i>S. thermophilus</i> ,
<i>L. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. | |

3.3 สารเคมี

- | | |
|--|----------------------------|
| 3.3.1 Cysteine hydrochloride | Merck, Germany |
| 3.3.2 di-Ammonium hydrogen citrate | Merck, Germany |
| 3.3.3 Dichloxallin | Sigma, U.S.A |
| 3.3.4 di-Potassium hydrogen phosphate | Carlo Erba Reagents, Italy |
| 3.3.5 Glucose | Merck, Germany |
| 3.3.6 Lithium chloride | Merck, Germany |
| 3.3.7 Magnesium sulphate. 7H ₂ O | Carlo Erba Reagents, Italy |
| 3.3.8 Maltose | Merck, Germany |
| 3.3.9 Manganese(II)- sulphate. 7H ₂ O | Carlo Erba Reagents, Italy |
| 3.3.10 Peptone | Merck, Germany |
| 3.3.11 Sodium acetate. 3H ₂ O | Carlo Erba Reagents, Italy |
| 3.3.12 Sodium hydroxide | Merck, Germany |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.13 Tryptone	Oxoid, England
3.3.14 Tween 80	Merck, Germany
3.3.15 Yeast extract	Oxoid, England

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 Agar	Merck, Germany
3.4.2 De Man, Rogosa and sharp (MRS) Broth	Merck, Germany
3.4.3 Sorbitol MacConkey agar	Merck, Germany
3.4.4 Tryptic soy broth	Merck, Germany
3.4.5 Tryptic soy agar	Merck, Germany

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.5.1 กล้องจุลทรรศน์	Olympus, Japan
3.5.2 Anarobic system	Forma Scientific Inc., U.S.A
3.5.3 Autoclave	Tomy SS-245, Japan
3.5.4 Balance spring	Dragon 3002, China
3.5.5 Centrifuge	Hettich, Germany
3.5.6 Incubator	Memmert, Germany
3.5.7 pH Meter	Inolab, Germany

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อโยเกิร์ตทางการค้า

ทำการเลี้ยงเชื้อโยเกิร์ตทางการค้าทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ YC-380, ABT-5 และ ABY-3 ในนมพาสเจอร์ไรส์และบ่มที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ คือ เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ใช้อาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Robert, 1992) *L. acidophilus* ใช้อาหาร MRS-IM agar ที่เติมมอลโตส 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bifidobacterium* ssp. ใช้อาหาร MRS-IM agar ที่เติมกลูโคส, dichloxallin, lithium chloride และ cysteine hydrochloride 20, 0.05, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Chr. Hansen, 2005) ทำการส่องดูตัวอย่างเชื้อโคโลนี โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เย็บเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งให้ติดขวดเย็บเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วละเลงเชื้อบนหยดน้ำกลั่นที่หยดเตรียมไว้ โดยใช้ลวดเย็บเชื้อให้กระจายบนแผ่นสไลด์ให้เป็นวงเล็กๆ ทิ้งไว้ให้เสมียร์เชื้อแห้ง (ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2538) นำไปย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) ตามวิธีในภาคผนวก ข และนำมาส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

3.6.2 การเตรียมเชื้อ *E. coli* O157:H7

ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* O157:H7 (Lot. 12743) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากหลอด deep tube stock agar โดยการเติม tryptic soy broth (TSB) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้มาใส่ใน TSB ปริมาณ 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บไว้ใน glycerol ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (อัตราส่วน 0.5 : 0.5 มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็น stock culture นำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนทำการศึกษานำ *E. coli* O157:H7 ที่เก็บรักษาไว้ลงในอาหารเหลว TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเชื้อแล้วนำตะกอนเชื้อที่ได้มาทำการศึกษาในการทดลองต่อไป

3.6.3 การผลิตโยเกิร์ต

ผสมหางนมสดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ จำนวน 1 ลิตร กับหางนมผง 3 เปอร์เซ็นต์ และสเตบิลไลเซอร์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ทำการเติมเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตทางการค้า ได้แก่ YC-380, ABT-5 หรือ ABY-3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากข้อ 3.6.2 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ก่อนกระบวนการหมักโยเกิร์ต บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างโยเกิร์ตในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และในระหว่างเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ศึกษาการรอดชีวิตของ *E. coli* O157:H7 การเจริญของแบคทีเรียแลคติก, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp. วัดค่าความเป็นกรดค่า และเปอร์เซ็นต์กรด

3.6.4 ศึกษาการรอดชีวิตของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตโพรไบโอติกชนิดต่างๆ

ทำการเจือจางตัวอย่างโยเกิร์ตในระหว่างการบ่มและการเก็บรักษา จากข้อ 3.6.3 ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ติดตามการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต โดยการ pour plate บนอาหารบนอาหาร Sorbitol MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mekonnen และ Mogessie, 2005)

3.6.5 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp.

นำตัวอย่างโยเกิร์ตที่เจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water จากข้อ 3.6.4 ทำการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในโยเกิร์ต ด้วยวิธี pour plate บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Robert, 1992) *L. acidophilus* ทำการ pour plate บนอาหาร MRS-IM agar ที่เติมมอลโตส 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bifidobacterium* sp. ทำการ pour plate บนอาหาร MRS-IM agar ที่เติมกลูโคส, dichloxallin, lithium chloride และ cysteine hydrochloride 20, 0.05, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Chr. Hansen, 2005)

3.6.6 การวิเคราะห์ความเป็นกรดต่างและเปอร์เซ็นต์กรด

นำตัวอย่างโยเกิร์ตจากข้อ 3.6.4 มาวิเคราะห์ความเป็นกรดต่างด้วยเครื่องวัดพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรด โดยการไทเทรตด้วย 0.1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (AOAC, 1995) ตามวิธีการในภาคผนวก ข

3.6.7 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแฟกทอเรียล (factorial experiment design) และวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1. สันฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB) จัดอยู่ในกลุ่มของ family Lactobacillaceae จากการศึกษาลักษณะสันฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่พบในก๊าล้าเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 (ประกอบด้วย *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*) และเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ได้แก่ ABT-5 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp.) และ ABY-3 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*) ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* บนอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar, MRS-IM agar ที่เติมมอลโตส 20 เปอร์เซ็นต์, MRS-IM agar ที่เติมกลูโคส, dichloxallin, lithium chloride และ cysteine hydrochloride 20, 0.05, 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาทำการช้อมแกรมและส่องดูลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000X พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์ที่พบในก๊าล้าเชื้อโยเกิร์ตทั้ง 3 ชนิด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะของเชื้อ *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ขณะที่ *S. thermophilus* เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ มีการเรียงตัวเป็นสายยาว ดังตารางที่ 4.1

4.2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตที่ใช้ก๊าล้าเชื้อโยเกิร์ตชนิดต่างๆทางการค้า

ผลของการใช้ก๊าล้าเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 และเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรดและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

การเจริญของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ในโยเกิร์ตที่มีการใช้ก๊าล้าเชื้อโยเกิร์ตทุกชนิด มีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการบ่มโยเกิร์ต (ภาพที่ 4.1) โดยเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 7.08 ± 0.04 เป็น 7.52 ± 0.31 Log CFU/g โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 ปริมาณของ *L. acidophilus* เพิ่มขึ้นจาก 5.69 ± 0.10 เป็น 6.30 ± 0.00 Log CFU/g และ *Bifidobacterium* spp. เพิ่มขึ้นจาก 5.70 ± 0.04

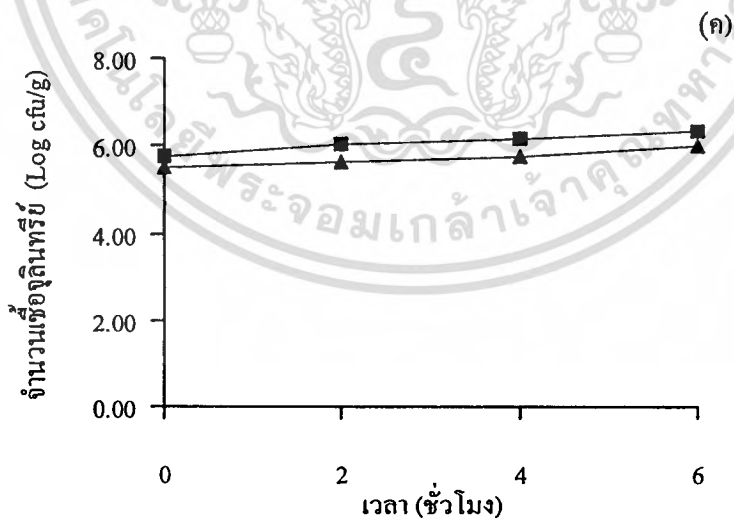
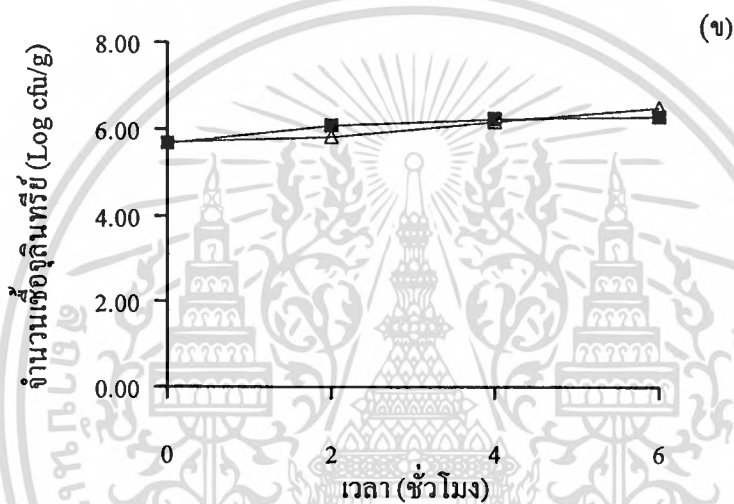
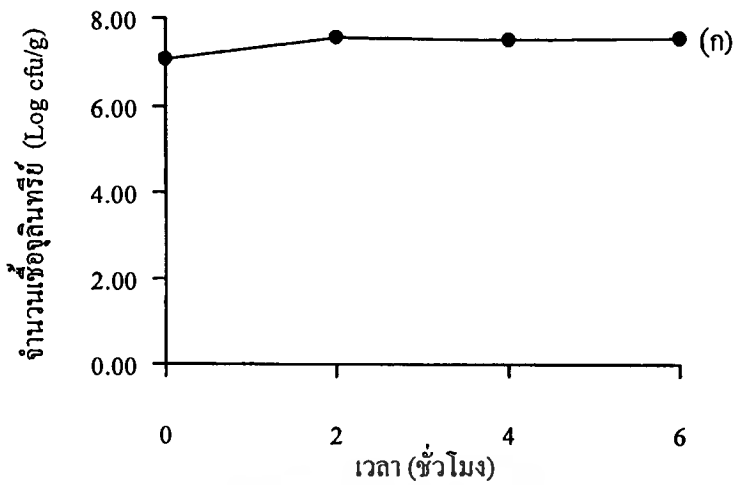
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อโยเกิร์ต

เชื้อจุลินทรีย์	ลักษณะ
<i>L. bulgaricus</i>	- แกรมบวก - เซลล์เป็นรูปแท่ง - มีการเรียงตัว 3-4 แท่ง - ไม่เคลื่อนที่
<i>S. thermophilus</i>	- แกรมบวก - เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ - มีการเรียงตัวเป็นสายขาว - ไม่เคลื่อนที่
<i>L. acidophilus</i>	- แกรมบวก - เซลล์เป็นรูปท่อน - มีการเรียงตัวเป็นสายหรือเซลล์เดี่ยว - ไม่เคลื่อนที่
<i>Bifidobacterium</i> spp.	- แกรมบวก - เซลล์เป็นรูปท่อนสั้น - ไม่เคลื่อนที่
<i>Bifidobacterium lactis</i>	- แกรมบวก - เซลล์เป็นรูปท่อนสั้น - ไม่เคลื่อนที่

เป็น 6.50 ± 0.04 Log CFU/g ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABY-3 ปริมาณของ *L. acidophilus* เพิ่มจาก 5.75 ± 0.09 เป็น 6.36 ± 0.01 Log CFU/g และปริมาณของ *Bf. lactis* เพิ่มขึ้นจาก 5.53 ± 0.04 เป็น 6.01 ± 0.09 Log CFU/g จากผลการทดลอง พบว่าการใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตต่างชนิดกัน ทำให้การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในโยเกิร์ตแตกต่างกัน โดยเชื้อธรรมชาติ YC-380 มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสูงกว่าเชื้อ *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3 ประมาณ 1 Log cycle และเมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่า ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดใน YC-380 มากกว่า *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (●), *L. acidophilus* (■), *Bifidobacterium* spp. (Δ) และ *Bf. lactis* (▲) ในโยเกิร์ตที่ใช้ก๊อแล็กต์ YC-380 (ก), ABT-5 (ข), ABY-3 (ค) ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับ Dave และ Shah (1997) รายงานว่าชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่พบในกล้าเชื้อ โยเกิร์ตทางการค้า มีผลต่อการเพิ่มหรือลดจำนวนของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในโยเกิร์ต พบว่าการใช้ กล้าเชื้อโยเกิร์ต C1 และ C2 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp.) และกล้าเชื้อโยเกิร์ต C3 และ C4 (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp.) มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในโยเกิร์ตแตกต่างกัน โยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อ C3 และ C4 มีปริมาณของ *L. acidophilus* มากกว่าโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อ C1 และ C2 เนื่องจากการเจริญ ของ *L. bulgaricus* ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ *L. acidophilus* ได้

ความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ตที่มีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการบ่ม โยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 6.54 ± 0.04 เป็น 4.09 ± 0.16 ขณะที่ ABT-5 ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 6.50 ± 0.07 เป็น 4.50 ± 0.04 และ ABY-3 ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 6.53 ± 0.10 เป็น 4.55 ± 0.02 ตามลำดับ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์กรดในโยเกิร์ต YC-380, ABT-5 และ ABY-3 เพิ่มขึ้นเป็น 1.46 ± 0.13 , 1.16 ± 0.08 และ 1.16 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดต่างในโยเกิร์ตทั้ง 3 ชนิด พบว่าความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ต YC-380 มีค่าลดลงมากที่สุด รองลงมา คือ ABY-3 และ ABT-5 ตามลำดับ เนื่องจากโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 ประกอบด้วย *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* มีการเพิ่มปริมาณสูงกว่าเชื้อ *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3 จึงเกิดการสร้างกรดได้สูง ทำให้ความเป็นกรดต่างลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ พบว่าการลดลงของความเป็นกรดต่างใน ABT-5 และ ABY-3 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปริมาณของแบคทีเรียแลคติกใน โยเกิร์ตความแตกต่าง ทำให้ความเป็นกรดต่างลดลงแตกต่างกัน สอดคล้องกับ Sodini และคณะ (2002) พบว่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นในนมหมัก มีความสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณแบคทีเรียแลคติกในกล้า เชื้อ พบว่าการใช้เชื้อผสมที่ประกอบด้วย *S. thermophilus* ร่วมกับ *L. bulgaricus* ส่งผลให้เกิดการผลิต กรดได้เร็ว และลดระยะเวลาในการหมักนมได้

เมื่อทำการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการ บ่มโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 จำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลงอย่างรวดเร็ว จน ตรวจไม่พบภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 จำนวน *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 5.77 ± 0.02 เป็น 6.00 ± 0.10 Log CFU/g ในชั่วโมงแรกของการบ่ม จากนั้นลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงเล็กน้อยจนถึง 5.70 ± 0.02 Log CFU/g ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ โพรไบโอติก ABY-3 ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงเล็กน้อยจาก 5.61 ± 0.13 เป็น 5.53 ± 0.06 Log CFU/g ตามลำดับ การลดลงของ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต เป็นผลมาจากการเจริญของ แบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น เกิดการผลิตกรดแลคติก ทำให้ความเป็นกรดต่างลดลง จนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ ในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด และการอยู่รอดของจำนวน *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อชนิดต่างๆ ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 43 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เชื้อ โยเกิร์ต	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ความเป็นกรดต่าง	ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)	<i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g)
YC-380	0	6.54 ± 0.04^d	0.24 ± 0.04^a	5.38 ± 0.16^c
	2	5.00 ± 0.30^c	1.00 ± 0.30^b	5.61 ± 0.28^d
	4	4.35 ± 0.05^b	1.24 ± 0.05^c	4.35 ± 0.31^b
	6	4.09 ± 0.16^a	1.46 ± 0.16^d	$< 1.00^a$
ABT-5	0	6.50 ± 0.07^d	0.37 ± 0.01^a	5.77 ± 0.02^c
	2	5.12 ± 0.03^c	0.72 ± 0.01^b	6.00 ± 0.10^d
	4	4.70 ± 0.01^b	1.00 ± 0.03^c	6.15 ± 0.05^b
	6	4.50 ± 0.04^a	1.16 ± 0.03^d	5.70 ± 0.02^a
ABY-3	0	6.53 ± 0.10^d	0.38 ± 0.01^a	5.61 ± 0.13^c
	2	5.23 ± 0.03^c	0.61 ± 0.06^b	5.62 ± 0.04^d
	4	4.66 ± 0.05^b	1.16 ± 0.01^c	5.64 ± 0.11^b
	6	4.55 ± 0.02^a	1.16 ± 0.04^d	5.53 ± 0.06^a

a, b, c,.....ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

< 1.00 คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนอาหาร ที่ระดับความเจือจาง 100 เท่า

YC-380 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสูงกว่า ทำให้ความเป็นกรดต่างลดลงเร็วกว่า โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABT-3 ส่งผลให้ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ต เนื่องจากความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ตที่ 4.50 ± 0.04 และ 4.55 ± 0.02 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการบ่ม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ สอดคล้องกับรายงานของ สิริพร ธรนเสาวภาคย์ และคณะ (2543) พบว่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 เจริญเติบโตได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 4.5 - 9.5 เช่นเดียวกับรายงานของ Karagozlu และคณะ (2007) พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.6 และ Connor และ Kotrola (1995) รายงานว่า *E. coli* O157:H7 สามารถอยู่รอดในอาหาร tryptic soy broth ที่มีการปรับความเป็นกรดต่าง 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

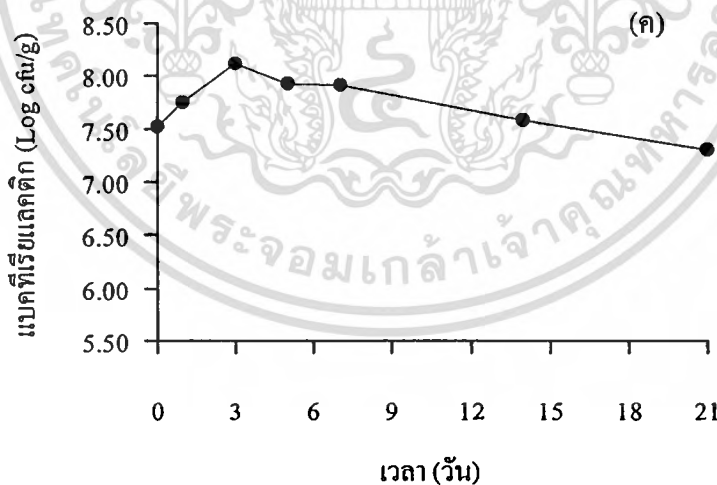
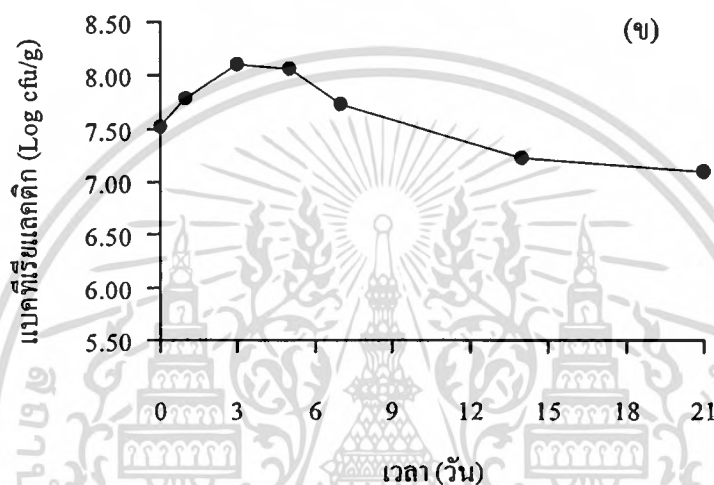
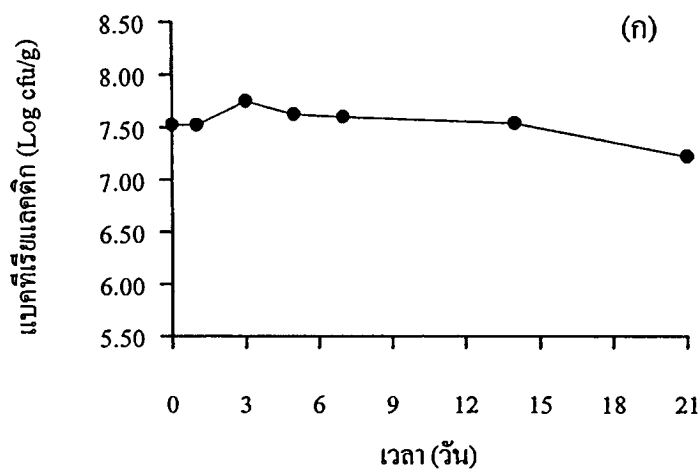
จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตต่างชนิดกัน เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ ลดจำนวนของ *E. coli* O157:H7 ลง จนไม่สามารถตรวจพบ *E. coli* O157:H7 ภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 และโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABT-3 พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ต

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7

4.3.1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

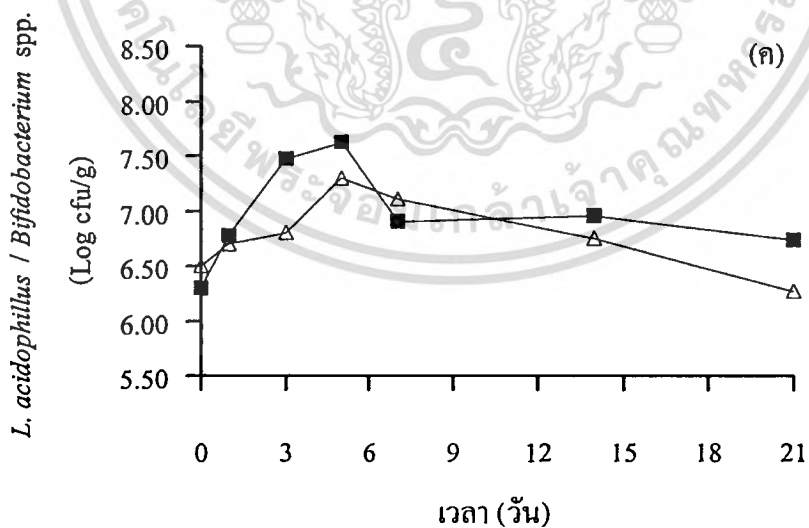
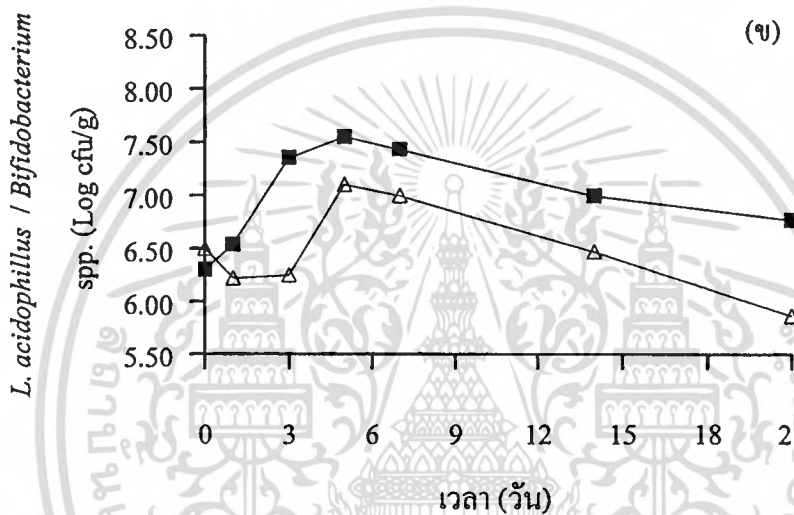
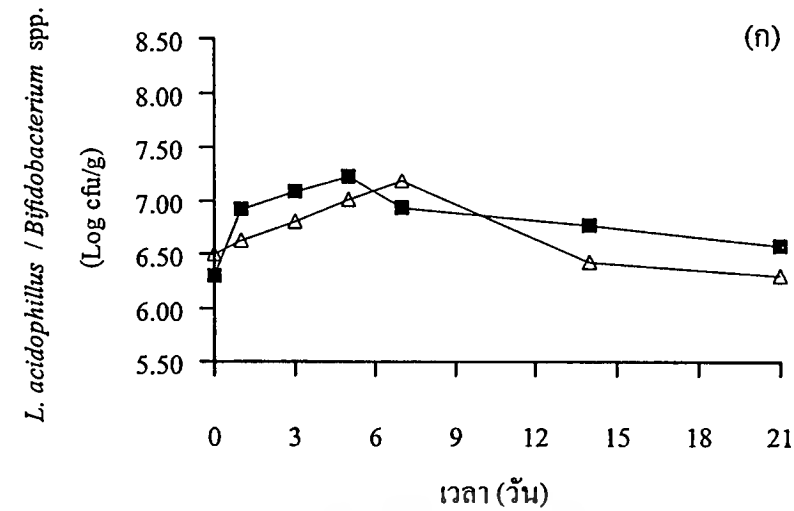
การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 ดังภาพที่ 4.2 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดเริ่มต้นที่ 7.52 ± 0.31 Log CFU/g และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าแบคทีเรียแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 7.63 ± 0.04 , 8.07 ± 0.08 และ 7.93 ± 0.13 Log CFU/g จากนั้นมีการลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน และการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 15 และ 8 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกมากกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ดังภาพที่ 4.4 และ 4.5 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *L. acidophilus*, *Bf. lactis* ใน ABY-3 มีปริมาณเพิ่มขึ้น จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน และเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา พบว่า *L. acidophilus* มีปริมาณมากกว่า *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *Bf. lactis* ใน ABY-3 การเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส พบมีปริมาณ *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



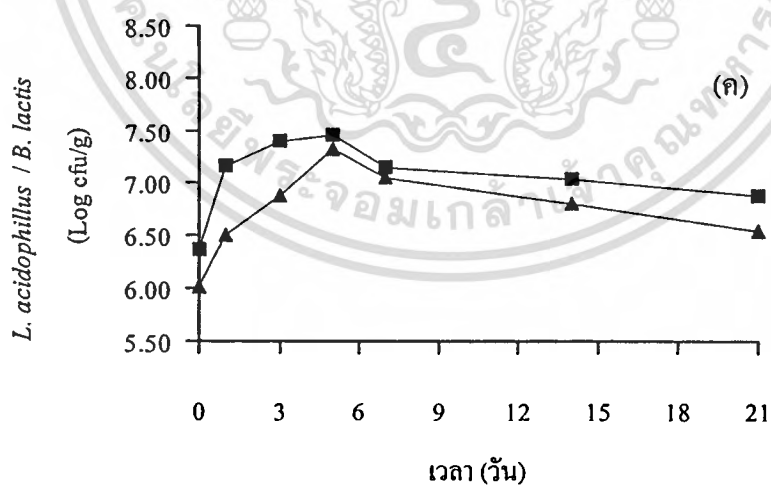
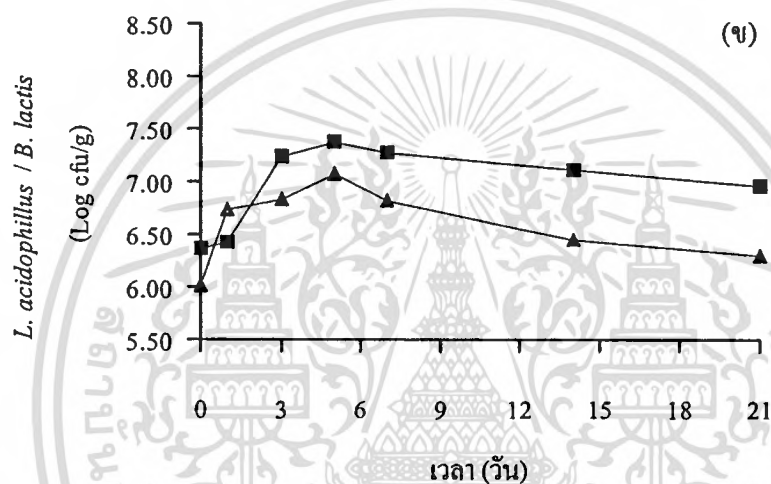
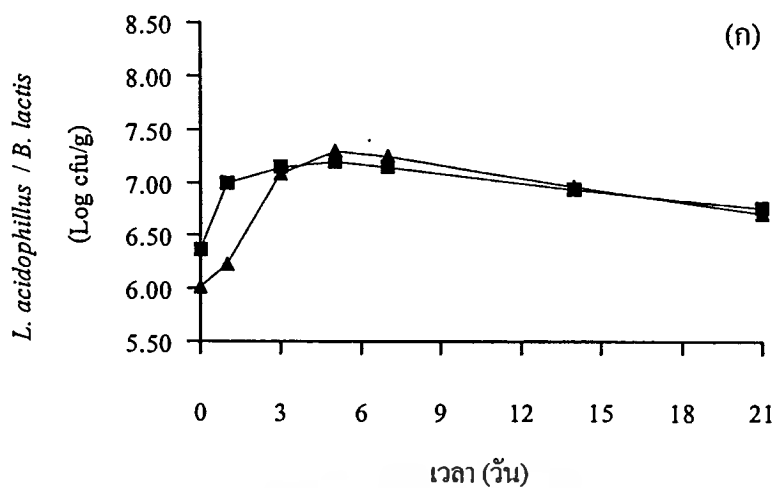
ภาพที่ 4.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแอโรบิก (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข) และ 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ปริมาณเชื้อ *L. acidophilus* (■), *Bifidobacterium* spp. (△) (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข) และ 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ *L. acidophilus* (■), *B. lactis* (▲) (Log CFU/g) ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข) และ 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต พบว่า โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกมากกว่า *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ในโยเกิร์ตที่ใช้โพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ประมาณ 0.5 - 1 Log cycle ที่อุณหภูมิเดียวกัน เนื่องจากปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในระหว่างการเก็บรักษาแตกต่างกัน YC-380 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น 7.52 ± 0.31 Log CFU/g มากกว่า ABT-5 ที่มีปริมาณ *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. เริ่มต้น 6.30 ± 0.00 Log CFU/g และ 6.50 ± 0.04 Log CFU/g และ ABY-3 มีปริมาณ *L. acidophilus* เริ่มต้น 6.36 ± 0.01 Log CFU/g และ *Bf. lactis* เริ่มต้น 6.01 ± 0.09 Log CFU/g นอกจากนี้พบว่า ABT-5 มีปริมาณ *L. acidophilus* มากกว่า ABY-3 ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาโยเกิร์ต เนื่องจากใน ABT-5 ไม่มีส่วนผสมของเชื้อ *L. bulgaricus* ที่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *L. acidophilus* (Analie, 2001) สอดคล้องกับ Dave และ Shah (1997) รายงานว่าโยเกิร์ตที่ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. acidophilus* มีปริมาณ *L. acidophilus* น้อยกว่าโยเกิร์ตที่ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ในโยเกิร์ต ABT-5 และ ABY-3 ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า *L. acidophilus* มีปริมาณมากกว่า *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 และ *Bf. lactis* ใน ABY-3 เนื่องจาก *L. acidophilus* เจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.00 (Hood และ Zottola, 1988) ส่วน *Bifidobacterium* spp. เจริญได้ช้า ในสถานะความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.60 (Tamime และ Robinson, 1985) สอดคล้องกับ Lankaputhra และ Shah (1995) พบว่า *L. acidophilus* มีความทนทานต่อความเป็นกรดได้มากกว่า *Bf. bifidum* แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถเจริญได้เมื่อค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.00 (Playne, 1994)

จากผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* มากกว่าอุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงทำให้แบคทีเรียแลคติกมีการเจริญสูงกว่าที่อุณหภูมิต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ จารุวรรณ มณีศรี (2550) รายงานว่า *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* เป็นแบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ในกลุ่มเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) การเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นสถานะใกล้เคียงกับช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จึงทำให้การเจริญของแบคทีเรียแลคติกมากกว่าที่ 8 และ 4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการทดลองของ Dave และ Shah (1997) พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 10 องศาเซลเซียส มีปริมาณ *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. มากกว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาณแบคทีเรียแลคติก *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ลดลงอย่างต่อเนื่องภายหลังการเก็บรักษาโยเกิร์ตมากกว่า 5 วัน เป็นผลมาจากจุลินทรีย์ใช้น้ำตาลแลคโตสและออกซิเจนในนม เพื่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติก ทำให้เกิดการขาดแคลนสารอาหาร รวมถึงสถานะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตสารในกระบวนการเมตาบอลิซึม สอดคล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับ Lankaputhra และ Shah (1994) อธิบายว่าการลดลงของเชื้อโพรไบโอติก มีผลมาจากค่าความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่คงเหลืออยู่ในโยเกิร์ตธรรมชาติ และโยเกิร์ตโพรไบโอติก ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน มีจำนวนมากเพียงพอ (6-7 Log CFU/g) ที่จะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 289 พ.ศ. 2548 เรื่อง นมเปรี้ยว กำหนดให้มีจุลินทรีย์ที่ใช้ในกรรมวิธีการหมักคงเหลือในนมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมักไม่น้อยกว่า 7 Log CFU/1 กรัม พบโคลิฟอร์มน้อยกว่า 3 ต่อนมเปรี้ยว 1 กรัม โดยวิธี เอ็ม พี เอ็น (Most Probable Number) ยีสต์และราไม่เกิน 2 Log CFU/1 กรัม และไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค

4.3.2 ความเป็นกรดต่างและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

โยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 (ภาพที่ 4.5) ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 4.09 ± 0.16 เป็น 3.61 ± 0.26 , 3.51 ± 0.17 และ 3.64 ± 0.16 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นจาก 1.46 ± 0.13 เป็น 1.89 ± 0.18 , 1.90 ± 0.20 และ 1.96 ± 0.02 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 (ภาพที่ 4.6) ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 4.50 ± 0.04 เป็น 4.25 ± 0.01 , 4.24 ± 0.01 และ 4.20 ± 0.02 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นจาก 1.16 ± 0.03 เป็น 1.45 ± 0.03 , 1.45 ± 0.05 และ 1.46 ± 0.12 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ส่วนโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 (ภาพที่ 4.7) ความเป็นกรดต่างลดลงจาก 4.55 ± 0.02 เป็น 4.30 ± 0.06 , 4.25 ± 0.05 และ 4.24 ± 0.02 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นจาก 1.16 ± 0.04 เป็น 1.42 ± 0.02 , 1.39 ± 0.04 และ 1.34 ± 0.03 ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

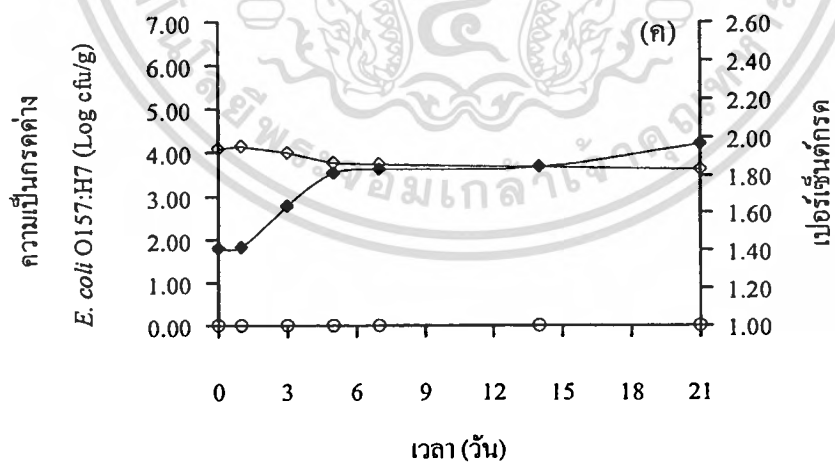
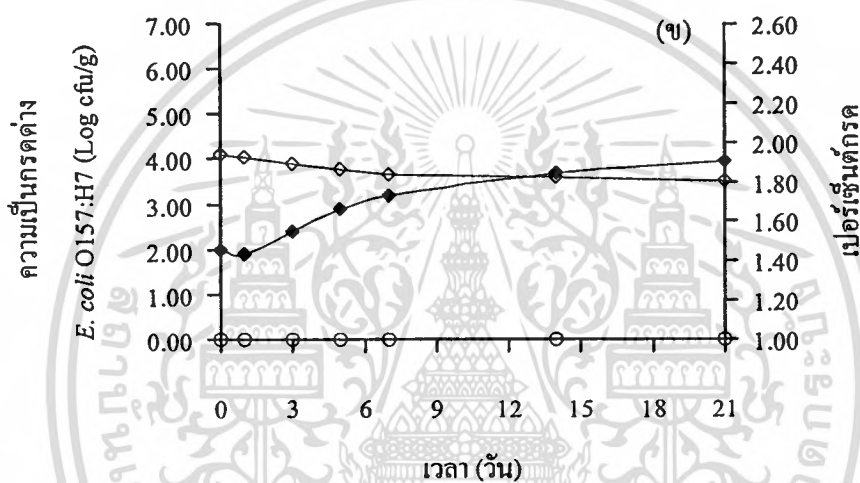
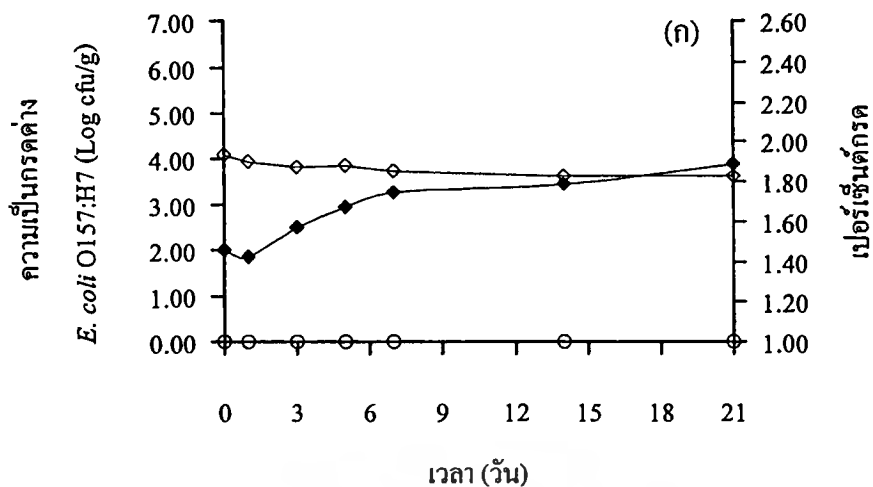
จากผลการทดลองพบว่า ความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ตที่ ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้น ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างและเปอร์เซ็นต์กรด มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงชนิด และปริมาณของแบคทีเรียแลคติก พบว่า โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 ความเป็นกรดต่างลดลงมากกว่าในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 เนื่องจาก YC-380 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงกว่า *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3 0.5-1 Log cycle (ภาพที่ 4.2-4.4) ทำให้ความเป็นกรดลดลงมากกว่า สอดคล้องกับ Sodini และคณะ (2002) รายงานว่าชนิดและสายพันธุ์ของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ทางการค้า มีผลต่อสภาพกรด ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษานมหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างใน โยเกิร์ต พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างลดลง มากกว่า 8 และ 4 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างลดลงไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก ที่อุณหภูมิสูงมีผลทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ มนัสชนก สากิยะ (2548) พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ปริมาณของ *L. acidophilus* และ *B. lactis* สูงกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรดต่างในโยเกิร์ตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ลดลงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

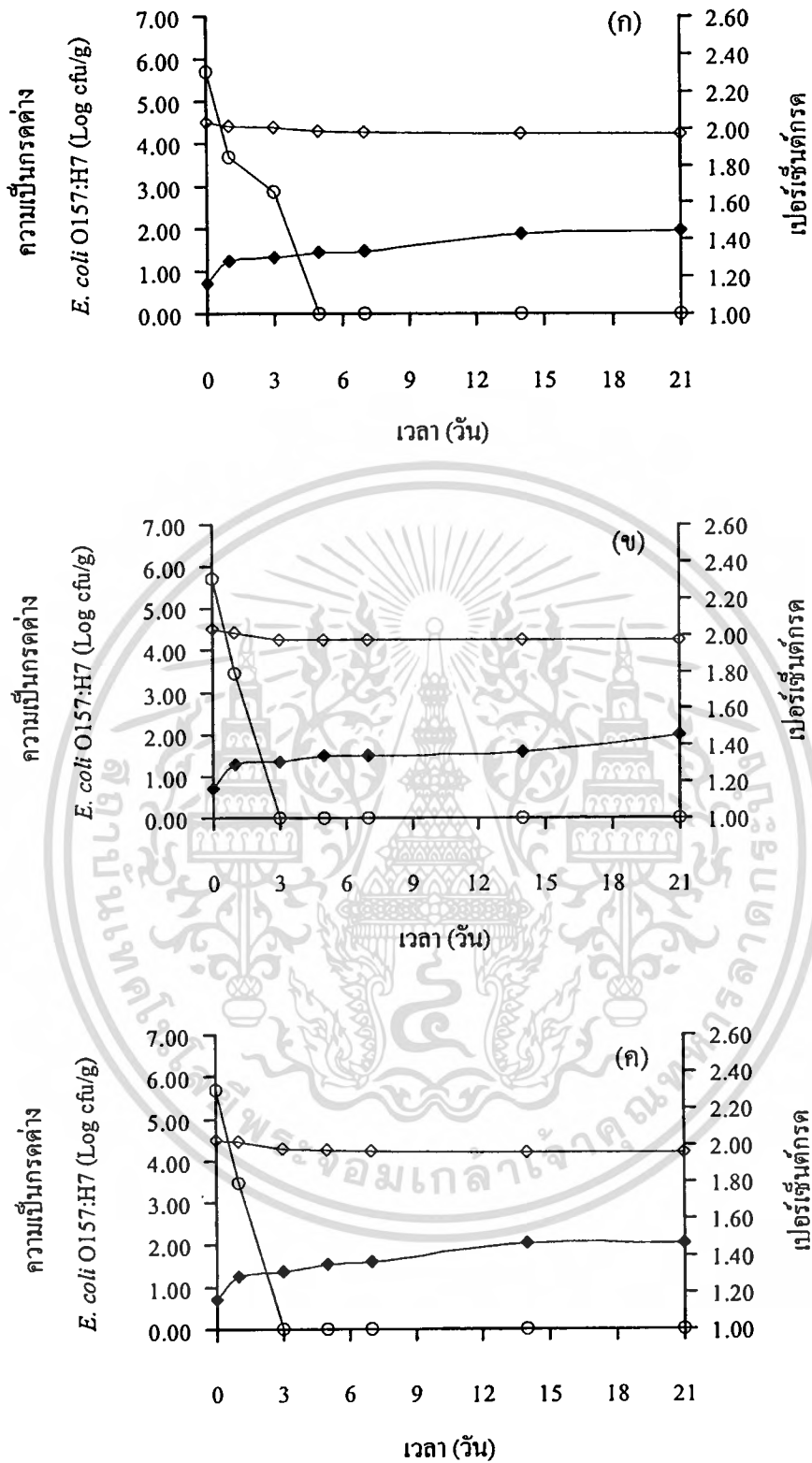


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



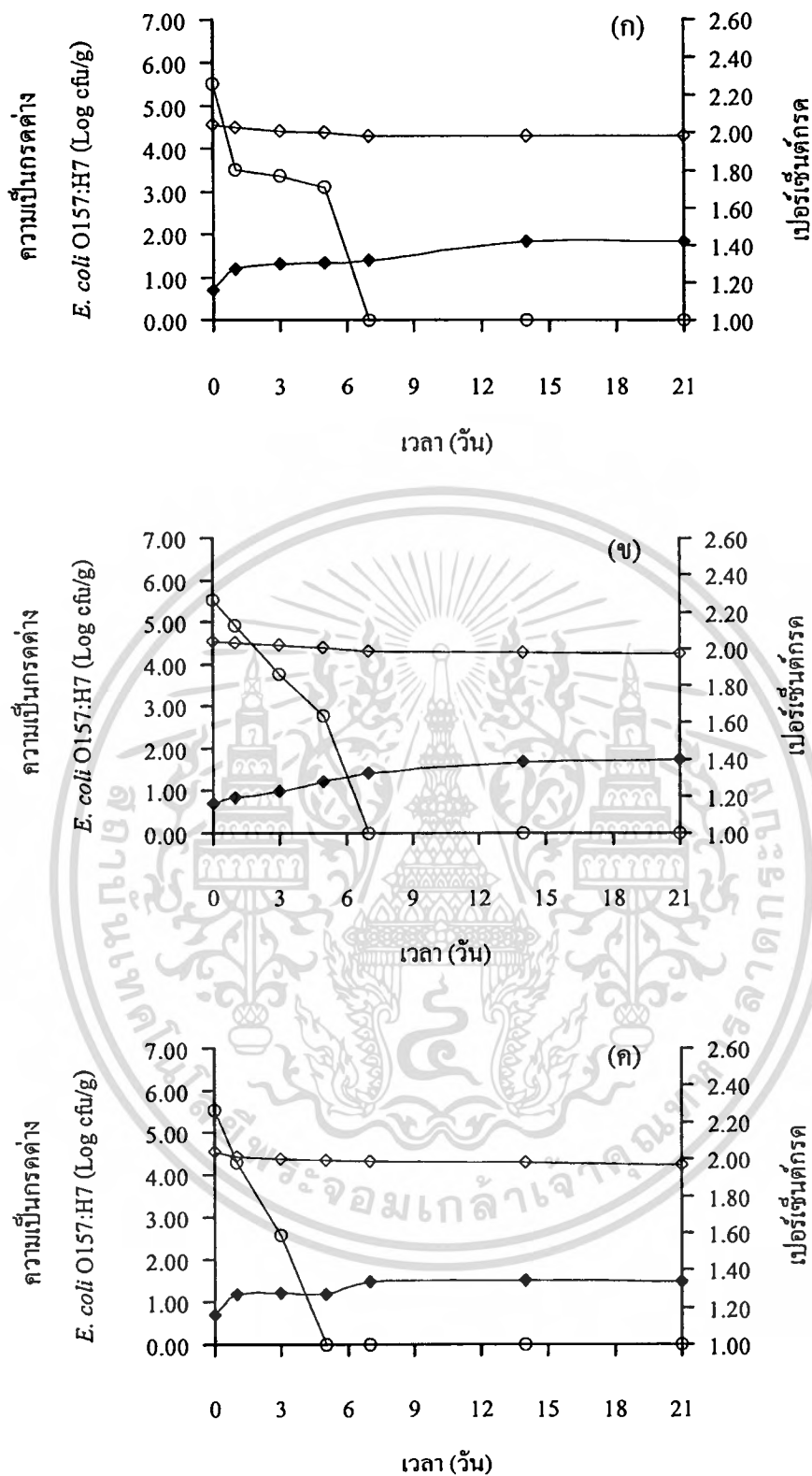
ภาพที่ 4.5 ปริมาณ *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) (○) ความเป็นกรดต่าง (◇) เปอร์เซ็นต์กรด (◆) โยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข) และ 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ปริมาณ *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) (○) ความเป็นกรดต่าง (◇) เปอร์เซ็นต์กรด (◆) โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข), 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ปริมาณ *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) (○) ความเป็นกรดต่าง (◇) เปอร์เซ็นต์กรด (◆)

ในโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 (ก), 8 (ข)

และ 15 องศาเซลเซียส (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาโยเกิร์ต

เมื่อทำการศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 เป็นเวลา 21 วัน (ภาพที่ 4.5) เนื่องจากตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ที่ 6 ชั่วโมงในช่วงการบ่ม จึงทำให้ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส

โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 (ภาพที่ 4.6) จำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลง 3 Log cycle ในช่วง 3 วันแรกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และลดลง 2 Log cycle หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตามลำดับ และตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.30 ± 0.03 และที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.25 ± 0.02 และ 4.29 ± 0.01

โยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 (ภาพที่ 4.7) พบว่าจำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลง 3 Log cycle ในช่วง 5 วันแรกที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส และลดลง 3 Log cycle หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.31 ± 0.06 และ 4.31 ± 0.04 และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.34 ± 0.03

ผลการศึกษาพบว่า การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 มีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ ชนิดและอัตราส่วนของจุลินทรีย์โยเกิร์ตทางการค้า รวมทั้งความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ต โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกมากกว่า *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3 ส่งผลให้ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.09 ± 0.16 (ภาพที่ 4.5) สำหรับโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 สามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบในระหว่างการเก็บรักษา ที่ความเป็นกรดต่างช่วง 4.25 ± 0.02 - 4.34 ± 0.03 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างมากกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 แสดงให้เห็นว่าการลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต โพรไบโอติกอาจเป็นผลมาจากเชื้อโพรไบโอติก สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไคอะเซทิล และแบคเทอริโอซินส์ เป็นต้น (วชิราภรณ์ ทิพย์ศร, 2549) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dave และ Shah (1997b) พบว่า *L. acidophilus* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินส์ และอะซิโดฟิลิซิน LA-1 (acidophilicin LA-1)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษา พบว่าในโยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 จะมีปริมาณ *L. acidophilus* มากกว่าในโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 จึงอาจกล่าวได้ว่านอกจากค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกันแล้ว ยังมาจากปริมาณของ *L. acidophilus* ที่ทำให้โยเกิร์ตที่ใช้ ABT-5 มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 มากกว่าโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3

ผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบว่าโยเกิร์ต ABT-5 ในการเก็บรักษาที่ 15 และ 8 องศาเซลเซียส พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ไม่แตกต่างกัน แต่พบว่ามียาจำนวนน้อยกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABY-3 ในการเก็บรักษาที่ 15 องศาเซลเซียส พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 น้อยกว่าที่ 8 และ 4 องศาเซลเซียส แต่พบว่าการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน

จากการเปรียบเทียบระยะเวลาในการลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABT-5 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 และ 8 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนของ *E. coli* O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ภายใน 3 วัน และที่ 4 องศาเซลเซียส ลดจำนวนของ *E. coli* O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ภายใน 5 วัน สำหรับโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ ABY-3 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ภายใน 5 วัน และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนของ *E. coli* O157:H7 ลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ภายใน 7 วัน จากผลการทดลองพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง มีผลทำให้ลดระยะเวลาการลดจำนวนของ *E. coli* O157:H7 เร็วกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำ จึงกล่าวได้ว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำเอื้ออำนวยต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.3.2 พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างลดลงน้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 และ 8 องศาเซลเซียส จึงทำให้การอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณมากกว่าที่อุณหภูมิ 15 และ 8 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับ Batjantsan (2007) รายงานว่า เมื่อมีการเก็บรักษาโยเกิร์ตแบบพื้นบ้าน และ acidophilus โยเกิร์ต (ประกอบด้วย *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. acidophilus*) ที่มีการเติม *E. coli* O157:H7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^7 Log CFU/ml ที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ปริมาณ *E. coli* O157:H7 ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จนตรวจไม่พบ ภายในเวลา 13 วัน เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบ ภายในเวลา 22 วัน ความเป็นกรดต่างของโยเกิร์ตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดต่าง 3.7 และโยเกิร์ตที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.3 สอดคล้องกับ Bachouri และคณะ (2006) รายงานว่า ตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 หลังจากเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 2 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-21 วัน และการเก็บรักษาที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-8 วัน ดังนั้นการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียแลคติกที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม thermophile สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตกรดแลคติก ทำให้ความเป็นกรดต่างลดลง ทำให้เซลล์ของ *E. coli* O157:H7 เกิดการบาดเจ็บ มีผลในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ จึงพบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 น้อยกว่าการเก็บรักษาที่ 8 และ 4 องศาเซลเซียส

การเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบว่าในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีกว่า ABY-3 เนื่องจากปริมาณของ *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. ใน ABT-5 มีปริมาณมากกว่าปริมาณ *L. acidophilus* และ *Bf. lactis* ABY-3 จึงทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง และเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ สมณชา วัฒนสินธุ์ (2545) กล่าวว่าแบคทีเรียสกุล *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* จะผลิตกรดแลคติก 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตได้มากกว่า *Bifidobacterium* spp.

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า อุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ยับยั้งการเจริญและลดระยะเวลาในการตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาจากค่าความเป็นกรดต่างในโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ ที่ความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 และโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ที่ความเป็นกรดต่างช่วง $4.25 \pm 0.02 - 4.34 \pm 0.03$ ไม่พบการอยู่รอด *E. coli* O157:H7 นอกจากนี้ชนิดและอัตราส่วนของเชื้อโยเกิร์ตทางการค้า เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ดีกว่า ABY-3 ในช่วงการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโยเกิร์ตพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นสถานะที่เหมาะสมที่สุด เป็นไปตามมาตรฐานของประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 289 พ.ศ. 2548 เรื่องนมเปรี้ยว ระบุว่านมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก จะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส เนื่องจากการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แม้ว่า การเก็บรักษาที่ 15 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ดีดื่อกว่าก็ตาม แต่ที่ 15 องศาเซลเซียส อาจส่งผลถึงคุณภาพด้านประสาทสัมผัส กลิ่นรสที่มีการเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากกิจกรรมของเชื้อโยเกิร์ตที่มีอยู่ในโยเกิร์ต ทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

4.4 จลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อ *E. coli* O157:H7

ในการศึกษาการเจริญและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่มีการใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตชนิดต่างๆ สามารถศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มและการเก็บรักษาโยเกิร์ต ได้จากสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ($\log \text{CFU/g}$) (x) และเวลา (y) ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งจากสมการดังกล่าวสามารถหาความชันของกราฟจากสมการเส้นตรง แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ) และอัตราการตายจำเพาะ (specific death rate, μ') ได้

ในช่วงของการบ่มโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 จำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลงอย่างต่อเนื่อง ที่อัตราการตายจำเพาะ (μ') มีค่าเท่ากับ -1.4025 ต่อชั่วโมง ต่างจากโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะดื่มใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ที่ปริมาณ *E. coli* O157:H7 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.0980 และ 0.0750 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำมาหาเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน *E. coli* O157:H7 เป็น 2 เท่า (generation time, t_g) ในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 มีค่า t_g เท่ากับ 3.07 และ 4.01 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงว่ามีการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* O157:H7 ใน ABT-5 น้อยกว่า ABY-3 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.2 และ 4.3 พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบ ในช่วงของการบ่ม ขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ต

ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส พบการลดจำนวนลงของ *E. coli* O157:H7 ในเชื้อโพรไบโอติก ABT-5 ที่ค่า μ' เท่ากับ 1.0371, -1.8764 และ -1.8771 ต่อชั่วโมง และโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABY-3 ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลง ที่ค่า μ' เท่ากับ -0.6376, -0.7398 และ -1.0075 ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาทำให้ ค่า μ' เพิ่มมากขึ้น แสดงว่าที่การเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิสูงยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นนำมาหาเวลาการตาย (t_d) และอัตราการตาย (k') ของ *E. coli* O157:H7 ได้จาก $t_d = 0.301/\mu$ และ $k' = \mu/0.301$ พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 มีค่า t_d เท่ากับ -0.29, -0.16 และ -0.16 วัน ซึ่ง t_d มีค่าน้อยกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABY-3 ที่ค่า t_d เท่ากับ -0.47, -0.41 และ -0.28 วัน ในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 สำหรับค่า k' พบมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับค่า μ' และค่า t_d คือ พบว่าการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 มีจำนวนน้อยกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABY-3 ดังตารางที่ 4.5 สอดคล้องกับผลการทดลอง ข้อ 4.3.3 พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง 15 และ 8 องศาเซลเซียส โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 มีผลต่อการอยู่รอด *E. coli* O157:H7 ไม่แตกต่างกัน แต่ยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABY-3 พบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15 องศาเซลเซียส ยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้มากกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 8 และ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 สมการเส้นตรงแสดงการเจริญและการลดลงของ *E. coli* O157:H7 กับเวลา และสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ในระหว่างการบ่มและการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ YC-380, ABT-5 และ ABY-3

เชื้อโยเกิร์ต	ระหว่างการบ่มโยเกิร์ต			ระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต		
	อุณหภูมิ*	สมการเชิงเส้น**	R^2	อุณหภูมิ*	สมการเชิงเส้น**	R^2
YC-380	43	$y = -1.4025x + 8.9300$	0.9082	***		
ABY-3	43	$y = 0.0750x + 5.6083$	0.9643	4	$y = -0.6376x + 5.1022$	0.8438
				8	$y = -0.7398x + 5.7612$	0.9495
				15	$y = -1.0775x + 5.5168$	0.9936
ABT-5	43	$y = 0.0980x + 5.7840$	0.9854	4	$y = -1.0371x + 5.4010$	0.9456
				8	$y = -1.8764x + 5.5860$	0.9958
				15	$y = -1.8771x + 5.5629$	0.9960

หมายเหตุ * หน่วย องศาเซลเซียส

** ปริมาณของ *E. coli* O157:H7 (Log CFU/g) (x) และเวลา (วัน) (y)

***ตรวจไม่พบ *E. coli* O157: H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

ตารางที่ 4.4 เวลาสำหรับการเพิ่มจำนวน *E. coli* O157:H7 เป็น 2 เท่า (t_d) เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในระหว่างการบ่ม และเวลาการตาย (t_d) ของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส

เชื้อโยเกิร์ต	ระหว่างการบ่มโยเกิร์ต		ระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	t_d (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	t_d (วัน)
YC-380	43	-0.21	***	
ABY-3	43	4.01	4	-0.47
			8	-0.41
			15	-0.28
ABT-5	43	3.07	4	-0.29
			8	-0.16
			15	-0.16

หมายเหตุ ***ตรวจไม่พบ *E. coli* O157: H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญ (k) ของ *E. coli* O157:H7 เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 Log CFU/ml ในระหว่างการบ่ม และอัตราการตายของเชื้อ *E. coli* O157:H7 (k') ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต ที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส

เชื้อโยเกิร์ต	ระหว่างการบ่มโยเกิร์ต		ระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	K	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	k'
YC-380	43	-4.65	***	
ABY-3	43	0.24	4	-2.12
			8	-2.46
			15	-3.35
ABT-5	43	0.33	4	-3.45
			8	-6.23
			15	-6.24

หมายเหตุ ***ตรวจไม่พบ *E. coli* O157: H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต

จากผลการศึกษา สรุปได้ว่าการใช้เชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 ในระหว่างการเก็บรักษาพบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ดีกว่าโยเกิร์ตที่ใช้ ABY-3 และการเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 15 องศาเซลเซียส พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 น้อยกว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ 8 และ 4 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การอยู่รอดของ *Escherichia coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติกแบบแช่แข็ง โดยใช้เชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติกทางการค้า สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตที่ใช้กึ่งสำเร็จโยเกิร์ตชนิดต่างๆทางการค้า ในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 มีปริมาณสูงกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ซึ่งส่งผลให้โยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 มีค่าความเป็นกรดต่ำลงและเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นมากกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 ปริมาณของ *E. coli* O157:H7 ลดลงจนตรวจไม่พบภายใน 6 ชั่วโมงของการบ่ม ที่ความเป็นกรดต่าง 4.09 ± 0.16 เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น เกิดการผลิตกรดแลคติก ทำให้ความเป็นกรดต่ำลง จนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ ขณะที่โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 เมื่อสิ้นสุดการบ่ม โยเกิร์ตที่ความเป็นกรดต่างช่วง $4.50 \pm 0.04 - 4.55 \pm 0.02$

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโพรไบโอติกต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด และการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิที่ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ปริมาณของแบคทีเรียแลคติกสูงสุดใน YC-380 *L. acidophilus* และ *Bifidobacterium* spp. และ *Bf. lactis* ใน ABT-5 และ ABY-3 มีปริมาณสูงสุดในช่วงวันที่ 5 ของการเก็บรักษา การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในโยเกิร์ตที่ใช้ YC-380 ทำให้ความเป็นกรดต่ำลงและเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 เมื่อศึกษาการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ต พบว่าเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABT-5 ลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.30 ± 0.03 ที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.25 ± 0.02 และ 4.29 ± 0.01 และเชื้อโยเกิร์ตโพรไบโอติก ABY-3 ลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 จนตรวจไม่พบในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.31 ± 0.06 และ 4.31 ± 0.04 และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ที่ความเป็นกรดต่าง 4.34 ± 0.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาจนพบผลศาสตร์การเจริญและการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในช่วงการบ่มโยเกิร์ต พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ YC-380 จำนวน *E. coli* O157:H7 ลดลงอย่างต่อเนื่อง จนตรวจไม่พบ *E. coli* O157:H7 มีอัตราการตายจำเพาะ (μ') เท่ากับ -1.4025 โยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 พบมีการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในระหว่างการบ่มโยเกิร์ต (อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.0980 และ 0.0750 ต่อชั่วโมง) ในระหว่างการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 และ ABY-3 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ปริมาณของ *E. coli* O157:H7 จะลดลงมากกว่าที่ อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส สำหรับค่า r_0 และค่า k' พบมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับค่า μ' คือ พบว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อโพรไบโอติก ABT-5 สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ดีกว่าโยเกิร์ตที่ใช้เชื้อ โพรไบโอติก ABY-3

การใช้เชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ดีกว่าการใช้ เชื้อโพรไบโอติก และพบว่าการเก็บรักษาโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณของ *E. coli* O157:H7 ลง ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 8 และ 4 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาในครั้งนี้มีการใช้เชื้อโยเกิร์ตทางการค้า ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแลคติกหลาย สายพันธุ์ ดังนั้นการหาปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ไม่สามารถเป็นตัวแทนของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ได้ จึงควรมีการหาปริมาณ *S. thermophilus* และ *L. acidophilus* ในโยเกิร์ต เพื่อสามารถอธิบายผลของ แบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7

5.2.2 เนื่องจากการปนเปื้อนของ *E. coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีปริมาณเชื้อแตกต่างกัน จึง ควรมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน เพื่อดูประสิทธิภาพของเชื้อโยเกิร์ตชนิดต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7

บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. 2548. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 289 (พ.ศ. 2548) เรื่อง นมเปรี้ยว. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.
- กิจการ สุภมาตย์. 2544. “การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกึ่งอุตสาหกรรม.” สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จารุวรรณ มณีศรี. 2550. เทคโนโลยีอาหารหมัก. กรุงเทพฯ : โฟร์เพช.
- จันทร์จิรา วิริยา. 2551. *Escherichia coli*. [Online]. Available: <http://www.technoinhome.com>
- นภา โล่ทอง ชงชัย คัมภีร์ ชัยวัฒน์ ศีตะจิตต์ วิเชียร ยามาฉิตชัย และพัชรี สุนทรนันท์. 2538. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นวลจันทร์ พาร์กษา. 2533. “สารละลายเกี่ยวกับโปรไบโอติก.” วารสารสุรสาสน์. 16(53) : 6-13.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2542. “อี.โคไลกับการเกิดโรคอุจจาระร่วง.” ใกล้เคียง. 23 (5) : 14-14.
- ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2548. “ฟังก์ชันนัลฟู้ดส์ : อาหารเพื่อสุขภาพ (Functional Foods : Foods for Health).” วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม. 4(2) : 43-50.
- พงศ์เทพ วิลพานิช. 2546. “แบคทีเรียโอซินจากกรดแลคติกในโรงงานอุตสาหกรรม.” อาหาร. 33(3) : 173-180.
- มนัสชนก สากิยะ. 2548. “การรอดชีวิตของแบคทีเรียโยเกิร์ตและแบคทีเรียโปรไบโอติกในโยเกิร์ต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขภาพอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- มลิวรรณ ส่งเสริม. 2542. “การยับยั้ง *E. coli* O157:H7 และ *Listeria monocytogenes* ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นม.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วชิราภรณ์ ทิพย์ศรี. 2549. “ผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ในโยเกิร์ต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2542. “โปรไบโอติก : อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ตอนจบ.” วารสารจารย์. 6(49) : 31-35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ศิริบุญ พูลสวัสดิ์. 2548. โยเกิร์ต อาหารดีมีคุณค่า. [Online]. Available: <http://www.stkc.go.th>.
- สุมนทนา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุภาพ อังฉริยศรีพงศ์. 2552. วว.โซ่วผงเชื้อโพรไบโอติกบำรุงลำไส้ฝีมือนคนไทย. [Online]. Available : <http://www.vcharkarn.com>.
- สุญาณี พงษ์ชนานิก. 2549. โพรไบโอติกและโพรไบโอติก : อาหารสุขภาพ. [Online]. Available : http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/All.html.
- สารโรจน์ สิริศันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพ พื้นฐาน1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สารโรจน์ สิริศันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพ การหมัก และสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สรีพร สธนเสาวภาคย์. 2536. “ระวัง..อันตรายจาก *E.coli* O157:H7.” วารสารอาหาร. 23(4) : 239-241.
- อรวิรินทร์ เลาหรัชนันท์. 2532. “สารกันเสียจากอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก.” วารสารอาหาร. 19(3) : 16-16.
- อรอนงค์ รัชตราเซนชัย. 2542. เชื้อ *Escherichia coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- อังฉรา เพิ่ม. 2550. แบคทีเรียแลคติก. สงขลา : มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.
- โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา. 2548. กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตธรรมชาติ. มาตรฐานกระบวนการผลิต. กรุงเทพฯ.
- Analie, L.H. and Bennie, C.V. 2001. “Yoghurt as Probiotic Carrier Food.” *International Dairy Journal*. 11 : 1-17.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official method of analysis of association of official analytical chemists*. 15th ed. Gaithersburg Maryland : Association of Analytical Communities.
- Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D. Rupnow, J.H., and Ballerman, L. 1992. “Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 During the Manufacture of Cottage Cheese.” *Journal Food Protection*. 55 : 379-381.
- Axelsson, L.T. 1993. *Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology*. in Salminen, S. and Wright, A.V. *Lactic Acid Bacteria*. New york : Marcel Dekker.

- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology. in Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. **Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects**. New York : Marcel Dekker.
- Bachrouri, M., Quinto, E.J. and Mora, M.T. 2002. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 During Storage of Yoghurt at Different Temperatures." **Journal of Food Science**. 65 : 1899-1903.
- Bachrouri, M., Quinto, E.J. and Mora, M.T. 2006. "Kinetic Parameters of *Escherichia coli* O157:H7 Survival During Fermentation of Milk and Refrigeration of Home-Made Yoghurt." **International Dairy Journal**. 16 : 474-481.
- Buchanan, R.L., and Klawitter, L.A. 1992. "The Effect of Incubation Temperature, Initial pH, and Sodium chloride on the Growth Kinetics of *Escherichia coli* O157:H7." **Food Microbiology**. 9(3) : 185-196.
- Carey, C.M., Kostrzynska, M., Ojha, S.O., and Thompson, S. 2008. "The Effect of Probiotics and Organic Acid on Shiga-toxin 2 Gene Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." **Journal of Microbiological Method**. 73 : 125-132.
- Charidimos, L., Athanasia, K. Evaggelos, P. Leandros, P. Michael. G. and John, S. 2006. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri Cheese Stored at 4 °C and 12 °C." **Journal Food Microbiology**. 23 : 268-276.
- Chang, J.H., Chou, C.C, and Li, C.F. 2000. "Growth and Survival of During the Fermentation and Storage of Diluted Cultured Milk Drink." **Food microbiology**. 17 : 579-578.
- Chr. Hansen. 2005. "*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in Fermented Milk Products." **Guidelines technical bullentin F-6 method for counting probiotic bacteria**. Denmark : Chr. Hansen.
- Christiansen, P.S. Edelsten, D. Kristiansen, J.R. and Nielsen E.W. 1996. "Some Properties of Ice Cream containing *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*." **Milchwissenschaft**. 51 : 502-504.
- Coeuret, V., Gueguen, M. and Vernoux, J.P. 2004. "Numbers and Strains of Lactobacilli in some Probiotic Products." **Internation Journal of Food Microbiology**. 97 : 147-156.
- Conner, D.E. and Kotrola, J.S. 1995. "Growth and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Acidic Conditions." **Applied Environment Microbiology**. 61: 382-385.

- Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997. "Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurt Made from Commercial Starter Cultures." **Internation Dairy Journal**. 31-41.
- Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997b. "Characteristics of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1." **International Dairy Journal**. 7: 707-715.
- Dean-Nystrom, E.A., Bosworth, B.T. and Cray, W.C. 1997. "Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the Intestines of Neonatal Calves." **Infection and Immunity**. 65 : 1842-1848.
- Deeth, H.C. and Tamime, A.Y. 1981. "Yoghurt : Nutritive and Therapeutic Aspects". **Journal Food Protection**. 44 :78-86.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2006. "Survival and Activity of Selected Probiotic or Ganism in Set-Type Yoghuret During Clod Storing." **Internation Dairy Journal**. 1-9.
- Edward, G.F. 1980. **Acetic acid. In antimicrobial food additive**. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. 2000. "Class Iia Bacteriocin : Biosynthesis, Structure and activity." **FEMS Microbiological Reviews**. 24 : 85-106.
- Food and drug 1988 Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. **Official method of analysis of association of official analytical chemists**. 15th ed. Gaithersburg Maryland : Association of Analytical Communities.
- Fooks, L.J., Filler, R., and Gibson, G. R. 1999. "Prebiotic, Probiotic and Human Gut Microbiology." **Internation Dairy Journal**. 9: 53-61.
- Fuller, R. 1989. "Probiotic in Man and Animals." **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 365-378.
- Fuller, R. 1992. **Probiotic : The Science Basic**. London : Chapman & Hall.
- Gerald, W. 2005. **Probiotics & prebiotic: Scientific Aspects**. U.K. : Cairter Academic Press.
- Gilliland, S.E. 1990. "Health and Nutritional Benefic from Lactic Acid Bacteria". **FEMS Microbiology Reviews**. 87: 175-188.
- Glass, K.A., Loefflehosz., Ford. J.P.Ford and Doyle, M.P. 1992. "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and fermented, dry sausage." **Applied Environment Microbiology**. 58 : 2513-2513.
- Govaris, A., Koidis, P., and Papatheodorou, K. 2002. "Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in Sour Milk, Cow's Milk Yoghurt and Ewe's Milk Yoghurt." **Journal of Dairy Research**. 69 : 655-660.

- Halil, T. 2007. "Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermentation milk product." **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. 31(1) : 61-66.
- Hood, S.K. and Zottola, M.L. 1998. "Effect of Low pH on the Ability of *Lactobacillus acidophilus* to Survive and Adhere to Human Intestinal Cell." **Journal of Food Science**. 53 : 1514-1516.
- Hoover, D.G. 2000. "Microorganism and Their Products in Preservation of Food." 251-276. in Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. **The microbiological Safety and Quality of Food Vol.1**. Washington D.C. : ASM Press.
- Jay, J.M. 1996. Intrinsic and extrinsic parameter of foods that effect microbial growth. In **Modern food microbiology**. USA : Chapman & Hall.
- Kailasapathy, K. and Harmstorf, M.P. 2007. "Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts." **LWT-Food science and Technology**. 41 : 1317-1322.
- Karagozlu, N., Cem, K. and Bulent, E. 2007. "Survival Characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* During Kefir Fermentation." **Czech Journal Food Science**. 25 : 202-207.
- Kalanzopoulos, G. 1997. "Fermented Products with Probiotic Qualities." **Anaerobe**. 3 : 185-190.
- Khishigjargal, B. 2007. "The Effect of Probiotic on Food Pathogen *E. coli* O157:H7 During Fermentation and Storage of Home-Made Yoghurt." Master of Science in Food Processing, Asian Institute of Technology.
- Lankaputhra, W.E.V., and Shah, N.P. 1994. "Investigation of Factors Affecting Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in Yoghurt." **International Dairy Congress**. 30 : 18-22.
- Lankaputhra, W.E.V., and Shah, N.P. 1995. "Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in the Presence of Aid and Bile Salts." **Cultured Dairy Products Journal**. 30(3) : 113-118.
- Lilly, D.M and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics : Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**. 147 : 747-748.
- Machino, H., Araki, K. and Minami, S. 1998. "Recent outbreaks of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Japan." 73-81. In Kaper, J.B. and O'Brien, A.D. **Escherichia coli O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strain**. Washington : ASM Press. 73-81.

- Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V., and De Pace, R, Z. 1997. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Yoghurt During Preparation and Storage at 4 °C." **Leeter In Applied Microbiology**. 24 : 347-350.
- Mekonnen, T. and Mogessie, A. 2005. "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 During the Processing and Storage of Ergo and Ayib, Traditional Ethiopian Dairy Products." **International Journal of Food Microbiology**. 103 : 11-21.
- Michael, B. 1998. **Growth in bacterial populations**. [Online]. Available : <http://www.mikeblaber.org>.
- Ogwaro, B.A., Gibson, H., Whitehead, M. and Hill, D.J. 2002. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation." **International Journal of Food Microbiology**. 79 : 105-112.
- Ouwehand, A., Kurvinen, T. and Rissanen, P. 2004. "Use of a Probiotic *Bifidobacterium* in a Dry Food Matrix, an in Vivo Study." **International Journal of Food Microbiology** 95 : 103-106.
- Parker, R.B. 1974. "Probiotics, the other half of the antibiotic story." **Animal Nutrition and Health**. 29 : 4-8.
- Playne, M. 1994. Probiotic Foods. **Food Australia**. 46(8) : 43-64.
- Pulusani, S.R., Rao, D.R. and Sunki, G.R. 1979. "Antimicrobial Activity of Lactic Cultures: Partial Purification and Characterization of Antimicrobial Compound(s) Produced by *Streptococcus thermophilus*." **Journal of Food Science**. 44 : 575-578.
- Raghubeer, E.V. and Matches J.R. 1990. "Temperature range for growth of *Escherichia coli* O157:H7 and selected coliform in *E. coli* medium." **Clin. Microbiol**. 28 : 803-805.
- Ramasaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., and Griffiths, M.W. 1998. "Survival of Bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Soft Cheeses." **Journal Dairy Science**. 81: 1810-1817.
- Reddy, G.V. and Shahani, K.M. 1974. "Isolation of an Antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*." **Journal of Dairy Science**. 54 : 740-748.
- Robert, T.M. 1992. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16th ed. Washington DC : American public health association.
- Rusoff, L.L. 1987. "Calcium-Osteoporosis and Blood Pressure." **Journal of Dairy Science**. 70 : 407-413.

- Salminen, S and Wright, A.V. 1993. **Lactic Acid Bacteria**. New York : Marcel Dekker Inc.
- Shah, N.P., and Jelen, P. 1990. "Survival of Lactic Acid Bacteria and their Lactases under Acidic condition." **Journal of Food Science**. 55 : 506-509.
- Simsek, B., Sagdic, O. and Ozcelik. S. 2005. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 During the Storage of Ayran Produced with Different Spices." **Journal of Food Engineering** 78 : 676-680.
- Sodini, I, Lucas, A., Oliveira, M.N., Remeuf, F. and Corrieu, G. 2002. "Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing." **Journal of Dairy Science**. 85: 2479-2488.
- Stantan, C., Lynch, P.B., Collin, J.K., Fitzgerald, G. and Ross, R.P. 1998. "Probiotic Cheese." **International Dairy Journal**. 8 : 491-496.
- Tamine, A Y. and Deeth, H.C. 1980. "Yoghurt Technology and Biochemistry." **Journal of Food Protection**. 43 : 939-977.
- Tamime, A. Y. and Robinson. 1985. **Yoghurt : Science and Technology**. Oxford : Pergamon Press.
- Tamime, A Y. 1990. Microbiology of Starter Culture. pp. 131-201 In R.K. Robinson . **Diary Microbiology: The Microbiology of Milk Products**. Vol. 2. London : Elsevier Science Publisher.
- Tamime. A.Y. and Robinson, R.K. 1999. **Yoghurt Science and Technology**. 2nd ed. Woodhead : publishing Cambridge.
- Torriani, S., Oris, C. and Vescovo, M. 1997. "Potential of *Lactobacillus casei* culture Permeate and Lactic Acid to Control Microorganisms in Ready-to-use Vegetables." **Journal Food protection**. 60 : 1564-1566.
- Tozzi, A.A. 1997. **Survival of *E. coli* in yoghurt**. [Online]. Availabie : <http://www.iss.it>.
- Vedamuthu, E.R. 1991. "The Yoghurt Story-Past, Present and Future part3." **Dairy Food and Environment Sanitation**. 11(6) : 310-311.
- Vinderola, C.G., Bailo, N. And Reinheimer, J.A. 2000. "Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage." **Food Research International** 33: 97-102.
- Wood, B.J. 1992. **Probiotic: A General View. The Lactic acid Bacteria in Health & Disease**. Glasgow UK.

Yi, C.Y and Chou, C.C. 2001. "Acid Adaptation and Temperature Effect on the Survival of *E. coli* O157:H7 in Acidic Fruit Juice and Lactic Fermented Milk Product." **International Journal of Food Microbiology**. 70 : 189-195.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	52	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งสารอาหารตามสูตร ลงในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MacConkey Agar

Sorbitol Macconkey Agar (SMAC)	51.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่งสารอาหารตามสูตร ลงในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-IM Agar ที่เติมมอลโตส สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	3.407	กรัม
Sodium acetate. 3H ₂ O	3.015	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Magnesium sulphate. 7H ₂ O	0.2	กรัม
Manganese(II)- sulphate. 7H ₂ O	0.05	กรัม
Agar	13	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซั่งสารอาหารตามสูตร ลงในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้เติมสารละลาย Maltose 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-IM Agar ที่เติมกลูโคส, Dichloxallin, Lithium chloride และ Cysteine hydrochloride สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bifidobacterium lactis*

ซั่งสารอาหารตามสูตรในข้อ 3 ลงในบีกเกอร์ 2000 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้เติมสารละลายกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย dichloxallin (สารละลาย A) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย lithium chloride (สารละลาย B) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย cysteine hydrochloride (สารละลาย C) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5. มอลโตส 20 เปอร์เซ็นต์

ซั่งมอลโตส (maltose) 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร แล้วเก็บรักษาโดยการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. กลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์

ซั่งกลูโคส (glucose) 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร แล้วเก็บรักษาโดยการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Dichloxallin 10 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย A)

ซั่ง dichloxallin (Sigma D-9016) 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร สารละลายนี้เก็บรักษาได้นาน 2 สัปดาห์ โดยการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Lithium chloride 0.09 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย B)

ซั่ง lithium chloride (LiCl) (Merck No. 5679) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 18 กรัม คนให้เข้ากันจนเป็นสารละลาย แล้วฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 มิลลิเมตร สารละลายนี้เก็บรักษาได้นาน 2 สัปดาห์ โดยการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. Cysteine hydrochloride 10 เปอร์เซนต์ (สารละลาย C)

ชั่ง cysteine hydrochloride (Merck No 2839) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สารละลายนี้เก็บรักษาได้ 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง

10. สารละลายเปป्टอน 0.1 เปอร์เซนต์

Peptone water	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง peptone 0.1 กรัมลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำมาแบ่งใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 เซนติเมตร ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การย้อมสีแกรม (นภา โล่ทอง และคณะ, 2538) การย้อมแกรมเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

- 1.1 ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง
- 1.2 เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
- 1.3 หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
- 1.4 เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะล้างด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีน ให้ทั่วรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
- 1.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์อะซิโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ
- 1.6 ชับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safrinO ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
- 1.7 เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง
- 1.8 นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรด (Titratable acidity) (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่างโยเกิร์ต 10 ± 0.2 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาไลน์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอินดิเคเตอร์ไตเตรทกับสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N จนถึงจุดยุติ (เปลี่ยนเป็นสีชมพู) ปริมาณกรดคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \frac{N \times V \times 90.08 \times 100}{1000 \times 10}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

ภาคผนวก ค

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ตารางที่ ค1 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานความเป็นกรดต่าง เพอร์เซ็นต์กรด ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย แลคติก และการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้ก๊าล่าเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ YC-380 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	วัน	ค่าความเป็น กรดต่าง	ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)	แบคทีเรีย แลคติก (Log CFU/g)	<i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g)
4	0	4.09±0.16 ^d	1.46±0.13 ^a	7.52±0.31 ^{ab}	< 1.00
	1	3.95±0.20 ^d	1.43±0.12 ^a	7.53±0.08 ^{bc}	< 1.00
	3	3.83±0.23 ^{cd}	1.57±0.11 ^{ab}	7.75±0.01 ^d	< 1.00
	5	3.84±0.16 ^{bc}	1.67±0.15 ^{bc}	7.63±0.04 ^d	< 1.00
	7	3.74±0.22 ^{ab}	1.75±0.13 ^{cd}	7.60±0.07 ^{bc}	< 1.00
	14	3.63±0.29 ^{ab}	1.79±0.27 ^{cd}	7.54±0.64 ^{ab}	< 1.00
	21	3.61±0.26 ^a	1.89±0.18 ^d	7.23±0.02 ^a	< 1.00
8	0	4.09±0.16 ^d	1.46±0.13 ^a	7.52±0.31 ^{ab}	< 1.00
	1	4.03±0.11 ^d	1.43±0.12 ^a	7.79±0.12 ^{bc}	< 1.00
	3	3.91±0.14 ^{cd}	1.55±0.11 ^{ab}	8.10±0.62 ^d	< 1.00
	5	3.77±0.20 ^{bc}	1.66±0.15 ^{bc}	8.07±0.08 ^d	< 1.00
	7	3.66±0.26 ^{ab}	1.73±0.13 ^{cd}	7.74±0.68 ^{bc}	< 1.00
	14	3.59±0.28 ^{ab}	1.85±0.27 ^{cd}	7.23±0.35 ^{ab}	< 1.00
	21	3.51±0.17 ^a	1.90±0.18 ^d	7.10±0.32 ^a	< 1.00
15	0	4.09±0.16 ^d	1.41±0.13 ^a	7.52±0.31 ^{ab}	< 1.00
	1	4.15±0.22 ^d	1.42±0.26 ^a	7.75±0.19 ^{bc}	< 1.00
	3	4.01±0.09 ^{cd}	1.64±0.11 ^{ab}	8.12±0.21 ^d	< 1.00
	5	3.78±0.12 ^{bc}	1.81±0.31 ^{bc}	7.93±0.13 ^d	< 1.00
	7	3.76±0.13 ^{ab}	1.83±0.03 ^{cd}	7.91±0.48 ^{bc}	< 1.00
	14	3.70±0.15 ^{ab}	1.84±0.03 ^{cd}	7.58±0.28 ^{ab}	< 1.00
	21	3.64±0.16 ^a	1.96±0.02 ^d	7.31±0.15 ^a	< 1.00

a, b, c,...ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ
เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

< 1.00 คือ ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ ที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค2 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานความเป็นกรดต่าง เพอร์เซ็นต์กรด *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. และการยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ ABT-5 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	วัน	ค่าความเป็น กรดต่าง	ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)	<i>L.</i> <i>acidophilus</i> (Log CFU/g)	<i>Bifidobacterium</i> spp. (Log CFU/g)	<i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g)
4	0	4.50±0.04 ^d	1.16±0.03 ^a	6.30±0.00 ^a	6.50±0.04 ^{ab}	5.70±0.02 ^d
	1	4.43±0.03 ^c	1.28±0.01 ^b	6.92±1.24 ^b	6.63±0.07 ^{cd}	3.70±0.01 ^c
	3	4.40±0.05 ^c	1.30±0.02 ^{bc}	7.08±0.21 ^{ab}	6.80±0.07 ^d	2.87±0.09 ^b
	5	4.30±0.03 ^b	1.33±0.03 ^{bc}	7.22±0.12 ^{ab}	7.01±0.08 ^c	<1.00 ^a
	7	4.28±0.02 ^{ab}	1.34±0.01 ^c	6.93±0.02 ^{ab}	7.18±0.05 ^c	<1.00 ^a
	14	4.26±0.00 ^{ab}	1.43±0.04 ^c	6.77±0.11 ^{ab}	6.43±0.09 ^{bc}	<1.00 ^a
	21	4.25±0.01 ^a	1.45±0.03 ^d	6.58±0.13 ^a	6.30±0.01 ^a	<1.00 ^a
8	0	4.50±0.04 ^b	1.16±0.03 ^a	6.30±0.00 ^a	6.50±0.04 ^{ab}	5.70±0.02 ^c
	1	4.43±0.03 ^c	1.29±0.01 ^b	6.54±0.05 ^b	6.22±0.01 ^{ab}	3.47±0.02 ^b
	3	4.25±0.02 ^a	1.31±0.08 ^b	7.36±0.11 ^c	6.25±0.05 ^a	<1.00 ^a
	5	4.24±0.01 ^a	1.34±0.03 ^b	7.55±0.09 ^d	7.10±0.24 ^c	<1.00 ^a
	7	4.24±0.01 ^a	1.34±0.02 ^b	7.43±0.03 ^{cd}	7.00±0.21 ^{bc}	<1.00 ^a
	14	4.25±0.01 ^a	1.36±0.01 ^b	7.00±0.09 ^d	6.48±0.35 ^{abc}	<1.00 ^a
	21	4.24±0.01 ^a	1.45±0.05 ^d	6.77±0.17 ^c	5.87±0.03 ^a	<1.00 ^a
15	0	4.50±0.04 ^f	1.16±0.03 ^a	6.30±0.00 ^a	6.50±0.04 ^a	5.70±0.02 ^c
	1	4.46±0.02 ^e	1.29±0.03 ^b	6.78±0.04 ^b	6.70±0.06 ^b	3.48±0.03 ^b
	3	4.29±0.01 ^d	1.31±0.03 ^{bc}	7.47±0.07 ^d	6.81±0.04 ^b	<1.00 ^a
	5	4.26±0.01 ^e	1.36±0.02 ^{bc}	7.63±0.08 ^e	7.30±0.03 ^d	<1.00 ^a
	7	4.24±0.01 ^c	1.37±0.03 ^{cd}	6.90±0.04 ^{bc}	7.11±0.14 ^c	<1.00 ^a
	14	4.20±0.02 ^b	1.46±0.10 ^d	6.95±0.20 ^c	6.75±0.15 ^b	<1.00 ^a
	21	4.20±0.02 ^a	1.46±0.12 ^d	6.74±0.06 ^b	6.27±0.06 ^a	<1.00 ^a

a, b, c,...ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

< 1.00 คือ ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ ที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค3 ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานความเป็นกรดต่าง เปอร์เซ็นต์กรด *L. acidophilus*, *Bf. lactis* และการอยู่รอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ใช้กล้าเชื้อโยเกิร์ตธรรมชาติ ABY-3 ในระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4, 8 และ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	วัน	ค่าความเป็น กรดต่าง	ปริมาณกรด (เปอร์เซ็นต์)	<i>L.</i> <i>acidophilus</i> (Log CFU/g)	<i>Bf. lactis</i> (Log CFU/g)	<i>E. coli</i> O157:H7 (Log CFU/g)
4	0	4.55±0.02 ^d	1.16±0.04 ^a	6.36±0.01 ^a	6.01±0.09 ^a	5.53±0.06 ^d
	1	4.49±0.03 ^{cd}	1.27±0.09 ^b	7.00±0.15 ^{cd}	6.23±0.10 ^b	3.52±0.23 ^c
	3	4.41±0.04 ^{bc}	1.30±0.02 ^b	7.14±0.09 ^{de}	7.08±0.05 ^{de}	3.37±0.12 ^c
	5	4.38±0.05 ^{ab}	1.31±0.03 ^b	7.20±0.05 ^a	7.30±0.06 ^f	3.12±0.03 ^b
	7	4.31±0.06 ^a	1.32±0.03 ^b	7.15±0.06 ^{de}	7.24±0.20 ^{ef}	< 1.00 ^a
	14	4.30±0.07 ^a	1.42±0.01 ^c	6.93±0.12 ^c	6.96±0.17 ^d	< 1.00 ^a
	21	4.30±0.06 ^a	1.42±0.02 ^c	6.76±0.15 ^b	6.71±0.02 ^c	< 1.00 ^a
8	0	4.55±0.02 ^d	1.16±0.04 ^a	6.36±0.01 ^a	6.01±0.09 ^a	5.53±0.06 ^e
	1	4.50±0.06 ^{cd}	1.19±0.09 ^{ab}	6.43±0.04 ^a	6.74±0.47 ^b	4.91±0.40 ^d
	3	4.46±0.04 ^{bc}	1.22±0.04 ^{abc}	7.24±0.11 ^c	6.84±0.58 ^{ab}	3.76±0.69 ^c
	5	4.40±0.04 ^b	1.28±0.08 ^{bcd}	7.37±0.06 ^d	7.07±0.63 ^b	2.77±0.12 ^b
	7	4.31±0.04 ^a	1.32±0.0 ^{cde}	7.27±0.05 ^{cd}	6.82±0.49 ^{ab}	< 1.00 ^a
	14	4.28±0.04 ^a	1.38±0.04 ^{de}	7.11±0.05 ^c	6.45±0.57 ^{ab}	< 1.00 ^a
	21	4.25±0.05 ^a	1.39±0.04 ^c	6.96±0.06 ^b	6.30±0.70 ^{ab}	< 1.00 ^a
15	0	4.55±0.02 ^e	1.16±0.04 ^a	6.36±0.01 ^a	6.01±0.09 ^a	5.53±0.06 ^c
	1	4.45±0.02 ^d	1.27±0.07 ^b	7.16±0.08 ^d	6.50±0.28 ^b	4.29±0.78 ^c
	3	4.38±0.03 ^c	1.28±0.03 ^b	7.40±0.02 ^e	6.88±0.11 ^c	2.55±2.21 ^b
	5	4.34±0.03 ^{bc}	1.27±0.01 ^{bc}	7.46±0.03 ^e	7.33±0.06 ^d	< 1.00 ^a
	7	4.32±0.02 ^b	1.34±0.03 ^{bc}	7.15±0.10 ^{cd}	7.05±0.07 ^{cd}	< 1.00 ^a
	14	4.30±0.01 ^b	1.34±0.01 ^{bc}	7.04±0.07 ^c	6.80±0.24 ^{bc}	< 1.00 ^a
	21	4.24±0.02 ^a	1.34±0.03 ^c	6.87±0.10 ^b	6.54±0.16 ^b	< 1.00 ^a

a, b, c,...ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

< 1.00 คือ ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ ที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุกัญญา โคมะนิตย์
วัน เดือน ปีเกิด	25 กุมภาพันธ์ 2526 ที่จังหวัดเพชรบูรณ์
ที่อยู่	200 ม.11 ต.หนองย่างทอย อ.ศรีเทพ จ.เพชรบูรณ์ 67170
ประวัติการศึกษา	2548 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร) มหาวิทยาลัยรังสิต
ประสบการณ์การทำงาน	
พ.ศ. 2548-2551	ตำแหน่งเจ้าหน้าที่งานควบคุมผลิตภัณฑ์ โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา รับผิดชอบในการจัดทำระบบ GMP โรงงานศูนย์รวมนม น้ำดื่ม และน้ำผึ้ง
พ.ศ. 2551-2552	ตำแหน่งหัวหน้างานเนยแข็ง โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา รับผิดชอบในการควบคุมกระบวนการผลิต และ คุณภาพของผลิตภัณฑ์
พ.ศ. 2552 - ปัจจุบัน	ตำแหน่งหัวหน้างานผลิตภัณฑ์น้ำผึ้ง โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา รับผิดชอบในการควบคุมกระบวนการผลิต และ คุณภาพของผลิตภัณฑ์
ผลงานวิจัย	สุกัญญา โคมะนิตย์ อพัชชา จินดาประเสริฐ อติสร เสวตวิวัฒน์ ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด. 2553. “การอยู่รอดของ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ในกระบวนการผลิตและเก็บรักษาโยเกิร์ตโพรไบโอติก แบบแช่แข็ง.” หน้า 99. ใน งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้