การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

THE SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA IN CHOCOLATE TABLET INCORPORATED INTO KAFFIR LIME FLAVOURED ICE CREAM

ธีรภัทร งามฉวี
ปรียานุช ยกมา
พฤกษา อังศรีสุรพร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

THE SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA IN CHOCOLATE TABLET INCORPORATED INTO KAFFIR LIME FLAVOURED ICE CREAM

ธีรภัทร งามฉวี

ปรียานุช ยกมา

พฤกษา อังศรีสุรพร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

THE SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA IN CHOCOLATE TABLET INCORPORATED INTO KAFFIR LIME FLAVOURED ICE CREAM

THIRAPHAT NGAMCHAWEE

PRIYANUT YOKMA

PRUEKSA ANGSRISURAPORN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN MICROBIOLOGY PROGRAM

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด The survival of probiotic bacteria in chocolate tablet incorporated into kaffir lime flavoured ice cream		
ชื่อนักศึกษา	นายธีรภัทร	งามฉวี	รหัสนักศึกษา 55051298
	นางสาวปรียานุช	ยกมา	รหัสนักศึกษา 55051331
	นางสาวพฤกษา	อังศรีสุรพร	รหัสนักศึกษา 55051344
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีวิทยาอุตสาหกรรม		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ลินจง สุขลำภู		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
ผศ. ลินจง สุขลำภู กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

ชื่อนักศึกษา นายธีรภัทร งามฉวี รหัสนักศึกษา 55051298
นางสาวปรียานุช ยกมา รหัสนักศึกษา 55051331
นางสาวพฤกษา อังศรีสุรพร รหัสนักศึกษา 55051344

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีวิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ลินจง สุขลำภู

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด โดยทดลองผสมเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 390 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 ในเม็ดช็อกโกแลตเพื่อปรับปรุงการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ซึ่งผลการทดลองพบว่าปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* และเชื้อ *L. plantarum* ในเม็ดช็อกโกแลตเท่ากับ 7.46 log และ 7.43 log CFU/ml ตามลำดับ จากนั้นนำเม็ดช็อกโกแลตที่เติมเชื้อ *L.casei* มาผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด โดยศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีมและหลังกระบวนการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตมีปริมาณลดลง โดยมีปริมาณรอดชีวิตระหว่างกระบวนการปั่นเท่ากับ 7.5 log CFU/ml และหลังกระบวนการแช่แข็งเท่ากับ 6.66 log CFU/ml และเมื่อนำไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตไปศึกษาคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าพีเอชของไอศกรีมมีค่าลดลงเล็กน้อยและขนาดของเม็ดช็อกโกแลตไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าไอศกรีมโพรไบโอติกมีความแตกต่างทุกคุณลักษณะที่ทดสอบกับตัวอย่างควบคุม (0 สัปดาห์)

คำสำคัญ : การรอดชีวิต เม็ดช็อกโกแลต โพรไบโอติกแบคทีเรีย ไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

Title	The survival of probiotic bacteria in chocolate tablet incorporated into kaffir lime flavoured ice cream
Students	Mr. Thiraphat Ngamchawee Student ID 55051298
	Miss Priyanut Yokma Student ID 55051331
	Miss Prueksa Angsrisuraporn Student ID 55051344
Degree	Bachelor of Science in Microbiology Program
Department	Biology
Academic Year	2015
Advisor	Assist. Prof. Linchong Suklampoo

Abstract

The aim of this study was to investigate the survival of probiotic bacteria in kaffir lime flavoured ice cream. *Lactobacillus casei* TISTR 390 and *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 were mixed into chocolate tablet to improve the bacterial survival. The results showed that the viable cell of *L. casei* and *L. plantarum* in chocolate tablet were 7.46 and 7.43 Log CFU/ml, respectively. Then chocolate tablet with *L. casei* was incorporated into kaffir lime flavoured ice cream. The survival of *L.casei* during freezing process of ice cream and after hardening process ice cream for 24 hours was studied. It was found that the cell numbers of *L.casei* in chocolate tablet were decreased. The counts of *L.casei* during freezing process were 7.5 log CFU/ml and after hardening process were 6.66 log CFU/ml. The qualities of ice cream incorporated with chocolate tablet were investigated during storage for 4 weeks. The result showed that the viable cell numbers of *L.casei* in chocolate tablet decreased when the storage times increased. While, the pH of ice cream decreased slightly and the size of chocolate tablet did not change during storage. Results from sensory testing of probiotic ice cream found that the qualities attribute showed different during storage as compared to the control sample (at 0 week).

Keyword : Survival, chocolate tablet, probiotic bacteria, kaffir lime flavoured ice cream

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของ ท่านอาจารย์ ผศ.ลินจง สุขลำภู ที่ปรึกษาโครงงานเล่มนี้ที่ได้ให้ความรู้และช่วยแนะนำช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆด้วยความเอาใจใส่อย่างดีสม่ำเสมอตลอดมา นอกจากนี้ผู้จัดทำโครงงานยังได้รับความกรุณาจากท่านอาจารย์ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล และท่านอาจารย์ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาแนะนำข้อบกพร่องแก้ไขปรับปรุงโครงการเล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณพี่นักวิทย์ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้คำแนะนำผู้จัดทำโครงงานจึงกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ตลอดระยะเวลาในการจัดทำโครงการเล่มนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาผู้ซึ่งให้ความรักความเมตตาความห่วงใยและเป็นกำลังใจให้กับผู้จัดทำโครงการจนสำเร็จและขอขอบพระคุณพี่ๆน้องๆ รวมทั้งเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจขอมอบเป็นเครื่องบูชาบิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ผู้จัดทำโครงการจนสามารถทำโครงการเล่มนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นายธีรภัทร งานฉวี
นางสาวปรียานุช ยกมา
นางสาวพฤกษา อังศรีสุรพร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไอศกรีม	3
2.1.1 ความหมายของไอศกรีม	3
2.1.2 ประเภทของไอศกรีม	3
2.1.3 การผลิตไอศกรีม	6
2.2 สมุนไพร	7
2.2.1 ความหมายของคำว่า “สมุนไพร”	7
2.2.2 ลักษณะของสมุนไพร	7
2.2.3 ประโยชน์ของสมุนไพร	8
2.3 มะกรูด	9
2.3.1 สรรพคุณของมะกรูด	9
2.4 จุลินทรีย์โพรไบโอติก	10
2.4.1 โทษของโพรไบโอติก	12
2.4.2 ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus*	12
2.4.3 *Lactobacillus plantarum*	13
2.4.4 *Lactobacillus casei*	14
2.5 ความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติก	15
2.5.1 ค่าพีเอช (pH)	15
2.5.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในผลิตภัณฑ์	15

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.5.3 อุณหภูมิ	15
2.5.4 จำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์	16
2.6 การปรับปรุงการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	16
2.6.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน	17
2.6.2 เทคนิคอีมัลชัน	17
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.1 วัตถุดิบ	23
3.2 เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก	23
3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	23
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	23
3.5 วิธีการ	24
3.5.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* ในเม็ดช็อกโกแลต	24
3.6 วิธีการผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูด	26
3.7 การศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม และหลังการแช่แข็งไอศกรีมกลิ่นมะกรูด	27
3.7.1 การเตรียมเม็ดช็อกโกแลตที่ผสม *Lactobacillus casei*	27
3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการปั่นไอศกรีม	27
3.8 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรีย	28
3.8.1 ศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลต	28
3.8.2 ศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีม	29
3.8.3 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในเนื้อไอศกรีม	29
3.8.4 วัดขนาดของเม็ดช็อกโกแลต	29
3.8.5 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส	29
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	30
4.1 ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผสมในช็อกโกแลต	30

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2 ปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นและหลังการแช่แข็งไอศกรีม	31
4.3 ปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นและหลังการแช่แข็งไอศกรีม	32
4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตในระหว่างการเก็บรักษา	32
4.4.1 ปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในระหว่างการเก็บรักษา	32
4.4.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด –ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา	33
4.4.3 การเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดช็อกโกแลตในไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา	34
4.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	41
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	42
ภาคผนวก ค แบบสอบถามทางประสามสัมผัส	43
ภาคผนวก ง ตารางผลการทดลอง	47
ภาคผนวก จ อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยและการทดสอบทางประสาทสัมผัส	51
ภาคผนวก ฉ ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงส่วนผสมของไอศกรีมกลิ่นมะกรูด	26
4.1 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์	33
4.2 แสดงค่าเฉลี่ยของการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสไอศกรีมโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษา	36
ง1 แสดงข้อมูลจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นก่อนและหลังกระบวนการผสมลงในเม็ดช็อกโกแลต	47
ง2 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตก่อนผสมลงในไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม และหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	47
ง3 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ	48
ง4 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมกลิ่นมะกรูดลงระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	48
ง5 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ	49
ง6 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์	49
ง7 แสดงขนาดของเม็ดช็อกโกแลต วัดทันทีก่อนการผสมในไอศกรีมและระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมตลอด 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	50

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของไอศกรีม Standard ice cream	3
2.2 แสดงลักษณะของไอศกรีม Soft-serveice cream	4
2.3 แสดงลักษณะของไอศกรีม French custard ice cream	4
2.4 แสดงลักษณะของไอศกรีมกรานิต้า	5
2.5 แสดงลักษณะของไอศกรีมเชอร์เบท	5
2.6 แสดงภาพสมุนไพรชนิดต่างๆ	8
2.7 แสดงลักษณะของผลและใบของมะกรูด	10
2.8 แสดงลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*	13
2.9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus casei*	14
2.10 แสดงขั้นตอนการเอ็นแคปซูเลทด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน	18
3.1 แสดงการเตรียมเม็ดช็อกโกแลตโดยใช้หัวกดขนาด 0.82 มิลลิเมตร	25
3.2 แสดงการนำเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ผสมกับไอศกรีมระหว่างการปั่น	27
4.1 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantalum* และ เชื้อ *Lactobacillus casei* ในเม็ดช็อกโกแลต	30
4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตก่อนผสมลงในไอศกรีมระหว่าง กระบวนการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	31
4.3 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีม ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์	33
4.4 แสดงลักษณะของเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีม ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์	34
4.5 แสดงตัวอย่างไอศกรีมที่เปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุมกับไอศกรีมที่เก็บรักษาเป็น เวลา 4 สัปดาห์	35
จ1 ถังปั่นไอศกรีมขณะกำลังปั่นส่วนผสมของไอศกรีมกลิ่นมะกรูด	51
จ2 แสดงการทดสอบทางประสาทสัมผัส	52
จ3 แสดงการทดสอบทางประสาทสัมผัส	52

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้คนส่วนใหญ่หันมาใส่ใจสุขภาพมากขึ้นโดยเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ส่งผลดีต่อระบบต่างๆในร่างกาย อาทิเช่น ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบการย่อยอาหาร รวมถึงระบบการขับถ่าย จึงมีการคิดค้นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์ลงไปช่วยส่งเสริมสุขภาพ เช่น โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์นมหมัก เนยแข็ง น้ำผลไม้ เป็นต้น นอกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว ไอศกรีมเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจที่จะนำมาผสมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกลงไป เพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพ ซึ่งไอศกรีมสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ซอฟท์ไอศกรีมกับ ฮาร์ดไอศกรีม ส่วนผสมหลักๆของไอศกรีมคือ นม น้ำตาล วิปครีม เป็นต้นจุลินทรีย์โพรไบติกโดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) พบมากในลำไส้ใหญ่ การมีสุขภาพที่ดีขึ้นอยู่กับสมดุลของแบคทีเรียเหล่านี้กับเซลล์เยื่อบุลำไส้และระบบภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของร่างกาย ซึ่งประโยชน์ของมันคือช่วยลดการดูดซึมคลอเรสเตอรอลในลำไส้ได้ ลดสารพิษในตับ ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ช่วยดูดซับวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ เช่น วิตามินเค ซึ่งช่วยในเรื่องการแข็งตัวของเลือด อีกทั้งยังทำให้ระบบขับถ่ายในร่างกายเป็นปกติ โพรไบโอติกที่นิยมผสมลงไปในอาหารส่วนใหญ่จะใช้เชื้อในกลุ่ม Lactic acid bacteria เช่น *Lactobacillus casei* *Lactobacillus plantarum* เป็นแลคติกแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี ไม่มีการสร้างสปอร์ เจริญได้ดีในสภาวะทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Homayouni และคณะ, 2008)

ปัญหาของการผสมโพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์ คือ จุลินทรีย์จะมีจำนวนลดลง อันเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตและกระบวนการเก็บรักษา ดังนั้นจึงจะต้องมีเทคนิคต่างๆเพื่อเพิ่มอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ เช่น การแช่แข็ง หรือการเอนแคปซูเลท ซึ่งการเอนแคปซูเลท มีหลายวิธี เช่น spray drying, coacervation, fluid bed drying spray cooling,extrusion, และ molecular inclusion เป็นต้น (Sathyabama และคณะ, 2014)

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดโดยมีการผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยช็อกโกแลต เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในไอศกรีม นอกจากนี้มีการเติมผิวมะกรูดและใบของมะกรูดลงไปเพื่อเพิ่มกลิ่นหอมของมะกรูด และยังมีสรรพคุณทางยาช่วยลดการวิงเวียนศีรษะ แก้ไอ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลต

2.ศึกษาการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมระหว่างการปั่นและหลังการแช่แข็ง

3.ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการเก็บรักษา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อของโพรไบโอติกแบคทีเรียที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลต ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมมาผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูด โดยศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็ง รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการเก็บรักษา เป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทราบถึงสายพันธุ์โพรไบโอติกแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติแบคทีเรีย

2.ทราบถึงเทคนิคที่ใช้เพิ่มอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกแบคทีเรีย

3.ได้ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

4.ช็อกโกแลตที่ห่อหุ้มเซลล์สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไอศกรีม

2.1.1 ความหมายของไอศกรีม

ไอศกรีม เป็นของหวานแช่แข็งชนิดหนึ่ง ได้จากการผสมส่วนผสมต่างๆจากนั้นนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนั้นนำไปปั่นในที่เย็นจัด เพื่อเติมอากาศเข้าไปพร้อมๆ กับการลดอุณหภูมิ โดยอาศัยเครื่องปั่นไอศกรีม ไอศกรีมตักโดยทั่วไปจะต้องผ่านขั้นตอนการแช่เยือกแข็งอีกครั้งก่อนนำมาขายหรือรับประทานไอศกรีมเป็นของหวานที่ทุกเพศทุกวัยชื่นชอบโดยเฉพาะเด็กและวัยรุ่นจะชอบไอศกรีมเป็นพิเศษ รสหวานมันบวกกับเนื้อเนียนนุ่มของไอศกรีมทำให้รู้สึกสดชื่น ไม่เพียงแต่ในฤดูร้อนหรือในประเทศเขตร้อนเท่านั้นที่ไอศกรีมเป็นที่ชื้นชอบในหน้าหนาวและประเทศที่หนาวจัดก็มีความนิยมการกินไอศกรีมจึงได้มีการคิดวิธีเก็บรักษาโดยการเอาไปฝังในหิมะจึงเกิดเป็นไอศกรีมขึ้น แม้จะไม่ได้มีลักษณะเหมือนกับไอศกรีมอย่างทุกวันนี้

2.1.2 ประเภทของไอศกรีม (Arbuckle, 1977)

ประเภทของไอศกรีมจะแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆตามส่วนผสม และวิธีการผลิต โดยแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด ดังนี้

1. Standard ice cream คือ ไอศกรีมที่มีส่วนผสมของนมหรือผลิตภัณฑ์จากนม น้ำตาลและวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงแต่งกลิ่น รส โดยไม่เติมสารอื่นๆนอกเหนือจากส่วนผสมหลักเลยเนื้อไอศกรีมจะเหนียว เนียน นุ่มลิ้น โดยต้องผ่านขั้นตอนการตีปั่นให้ความเย็นจนเหนียวหนืด แล้วแช่แข็งอีกครั้งจึงจะรับประทานได้

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของไอศกรีม Standard ice cream
ที่มา : http://www.hdwallpaperup.com/2015/01/chocolate-ice-cream/
(สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

2. Soft-serve ice cream คือ ไอศกรีมที่มีลักษณะกึ่งแข็ง สามารถบริโภคหรือจำหน่ายได้ทันทีหลังจากออกจากเครื่องปั่นไอศกรีมโดยไม่ต้องแช่แข็ง

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของไอศกรีม Soft-serveice cream
ที่มา : http://www.scottbrothers.com/img/soft-serve.jpg
(สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

3. Frozen custard, French ice cream หรือ French custard ice cream คือไอศกรีมที่มีการเพิ่มส่วนผสมของไข่แดงลงไปทำให้เนื้อไอศกรีมมีปริมาณไขมันสูง ขณะรับประทานจะได้กลิ่นไข่

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของไอศกรีม French custard ice cream
ที่มา : http://www.decodingdelicious.com/strawberry-basil-ice cream/com (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

4. กรานิต้า (Granita)คือ ไอศกรีมที่มีส่วนผสมของน้ำผลไม้ น้ำตาล อาจมีส่วนผสมของเหล้าหรือกาแฟด้วย นิยมเสิร์ฟระหว่างมื้ออาหารเพื่อล้างปาก Granita และ Sorbet มีความแตกต่างกันที่ Sorbetจะมีเนื้อละเอียด และนุ่มนวลกว่า Granita

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของไอศกรีมกรานิต้า
ที่มา : http://th.openrice.com/UserPhoto/Article/0/A/00024N3981E0A278CE3724j.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

5.เชอร์เบท (Sherbet) คือ ไอศกรีมผลไม้ที่มีส่วนผสมของน้ำผลไม้ น้ำตาล ไข่ขาว และไม่ใส่นมหรือครีมสามารถเลือกใช้ผลไม้ได้หลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นผลไม้รสเปรี้ยวหรือผลไม้รสหวาน

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของไอศกรีมเชอร์เบท
ที่มา : http://ed.filesmedia.com/ud/attachment/forum/201302/03/155656pyggspz6pkm65d35.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

2.1.3 การผลิตไอศกรีม (กมลพิพัฒน์ และคณะ,2557)

1.ส่วนผสมในการทำไอศกรีม

1.) วิปปิ้งครีม

1.1 วิปปิ้งครีมแบบครีมสด โดยอัตราการผสมใช้วิปปิ้งครีมสดหนัก 125 กรัม

1.2 วิปปิ้งครีมแบบผง สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าแบบครีมสด โดยผสมในอัตราส่วน น้ำเย็น:วิปปิ้ง 175:125 กรัม หรือตามสูตรหลังซอง

จากนั้นตีให้ตั้งยอดซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที วิธีการดูลักษณะตั้งยอดของครีมคือ เวลายกพายหรือที่กวนขึ้นจะมียอดแหลมตั้งขึ้นมา

2.) เจลลาติน

ใช้อัตราส่วนผสมเป็น ผงเจลลาติน 1 ช้อนครึ่ง ขนาดช้อนเบอร์ 4 ผสมกับน้ำเย็นประมาณ 1 ช้อนครึ่ง ขนาดช้อนโต๊ะ คนจนเป็นวุ้นและผงวุ้นละลายหมด

3.) นมสด

4.) สารให้รสหวาน เช่น น้ำตาลทราย กลูโคสไซรับ

2.ขั้นตอนการทำไอศกรีม

ไอศกรีมนม ไอศกรีมดัดแปลง ไอศกรีมผสม ผ่านกรรมวิธีตามลำดับดังต่อไปนี้

1.) การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบ

2.) การผ่านความร้อน ระดับ การพาสเจอรไรซ์ (pasteurization) เพื่อการทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) อาจทำได้โดยวิธี

1.) พาสเจอไรซ์แบบกะ (batch pasteurization) โดยการต้มในหม้อต้ม ทำให้ร้อนขึ้นถึงอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 68.5 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที

2.) พาสเจอไรซ์แบบ in-line pasteurizationซึ่งเป็นการใช้ความร้อนสูงเวลาสั้น (High Temperature Short Time, HTST) โดยทำให้ร้อนขึ้นถึงอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 25 วินาที

3.) ทำให้ร้อนโดยกรรมวิธีอื่นตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเห็นชอบ

4.) การให้ความร้อนต้องมีเครื่องวัดอุณหภูมิพร้อมด้วยเครื่องบันทึกอัตโนมัติ แสดงอุณหภูมิเวลาที่ใช้จริง

5.) ทำให้เย็น (cooling) ลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินี้

6.) การโฮโมจิไนซ์ (homogenization)

7.) การแช่แข็ง (freezing) โดย การปั่น กวน หรือผสม เพื่อทำให้ถึงจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -2.2 องศาเซลเซียสโดยใช้เครื่องปั่นไอศกรีม

8.) การบ่มส่วนผสม (aging the mix) ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า -2.2 องศาเซลเซียส

9.) การบรรจุ (packaging)

10.) การทำให้แข็งตัว (hardening) ส่วนผสมที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว ใส่ในบรรจุภัณฑ์ แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ -40 องศาเซลเซียส เพื่อให้คงรูปร่างอยู่ได้ ถ้าไม่ผ่านการทำให้แข็งตัวจะเรียกว่าไอศกรีมซอฟต์เสิรฟ (soft serve ice cream)

2.2 สมุนไพร (www.student.nu.ac.th ,สืบค้นเมื่อ 13 ธันวาคม 2558)

สมุนไพร หมายถึง "ผลิตผลธรรมชาติ ได้จาก พืช สัตว์ และ แร่ธาตุ ที่ใช้เป็นยา หรือผสมกับสารอื่นตามตำรับยา เพื่อบำบัดโรค บำรุงร่างกาย หรือใช้เป็นยาพิษหากนำเอาสมุนไพรตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมาผสมรวมกันซึ่งจะเรียกว่า ยา ในตำรับยา นอกจากพืชสมุนไพรแล้วยังอาจประกอบด้วยสัตว์และแร่ธาตุอีกด้วย เราเรียกพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของยานี้ว่า เภสัชวัตถุ พืชสมุนไพรบางชนิด เช่น เร่ว กระวาน กานพลู และจันทน์เทศ เป็นต้นปัจจุบันมีผู้พยายามศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนายาสมุนไพรให้สามารถนำมาใช้ในรูปแบบที่สะดวกยิ่งขึ้น เช่น นำมาบดเป็นผงบรรจุแคปซูล ตอกเป็นยาเม็ด เตรียมเป็นครีมหรือยาขี้ผึ้งเพื่อใช้ทาภายนอก เป็นต้น ในการศึกษาวิจัยเพื่อนำสมุนไพรมาใช้เป็นยาแผนปัจจุบันนั้น ได้มีการวิจัยอย่างกว้างขวาง โดยพยายามสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมี ฟิสิกส์ของสารเพื่อให้ทราบว่าเป็นสารชนิดใด ตรวจสอบฤทธิ์ด้านเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อดูให้ได้ผลดีในการรักษาโรคหรือไม่เพียงใด ศึกษาความเป็นพิษและผลข้างเคียง เมื่อพบว่าสารชนิดใดให้ผลในการรักษาที่ดี โดยไม่มีพิษหรือมีพิษข้างเคียงน้อยจึงนำสารนั้นมาเตรียมเป็นยารูปแบบที่เหมาะสมเพื่อทดลองใช้ต่อไป

2.2.1 ความหมายของคำว่า “สมุนไพร”

คำว่า สมุนไพร ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพรกำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์โดยเฉพาะ ในทางสุขภาพ อันหมายถึงทั้งการส่งเสริมสุขภาพและการรักษาโรค ความหมายของยาสมุนไพรในพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2510 ได้ระบุว่า ยาสมุนไพร หมายความว่า ยาที่ได้จากพฤกษาชาติสัตว์หรือแร่ธาตุ ซึ่งมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังเป็นส่วนของราก ลำต้น ใบ ดอก ผลฯลฯ ซึ่งมิได้ผ่านขั้นตอนการแปรรูปใดๆ แต่ในทางการค้า สมุนไพรมักจะถูกดัดแปลงในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ถูกหั่นให้เป็นชิ้นเล็กลง บดเป็นผงละเอียด หรืออัดเป็นแท่งแต่ในความรู้สึกของคนทั่วไปเมื่อกล่าวถึงสมุนไพรมักนึกถึงเฉพาะต้นไม้ที่นำมาใช้เป็นยาเท่านั้น

2.2.2 ลักษณะของสมุนไพร

ลักษณะของสมุนไพรแบ่งออกเป็น5 ลักษณะ ดังนี้

1.) รูป ได้แก่ ใบไม้ ดอกไม้ เปลือกไม้ แก่นไม้ กระพี้ไม้ รากไม้ เมล็ด

2.) สี มองแล้วเห็นว่าเป็นสีเขียวใบไม้ สีเหลือง สีแดง สีส้ม สีม่วง สีน้ำตาล สีดำ

3.) กลิ่น ให้รู้ว่ามรกลิ่น หอม เหม็น หรือกลิ่นอย่างไร

4.) รส ให้รู้ว่ามีรสอย่างไร รสจืด รสฝาด รสขม รสเค็ม รสหวาน รสเปรี้ยว รสเย็น

5.) ชื่อ ต้องรู้ว่ามีชื่ออะไรในพืชสมุนไพรนั้น ๆ ให้รู้ว่า ขิงเป็นอย่างไร ข่า เป็นอย่างไร

2.2.3 ประโยชน์ของสมุนไพร

1.) สามารถรักษาโรคบางชนิดได้ โดยไม่ต้องใช้ยาแผนปัจจุบัน ซึ่งบางชนิดอาจมีราคาแพงและต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก อีกทั้งอาจหาซื้อได้ยากในท้องถิ่นนั้น

2.) ให้ผลการรักษาได้ดีใกล้เคียงกับยาแผนปัจจุบัน และให้ความปลอดภัยแก่ผู้ใช้มากกว่าแผนปัจจุบัน

3.) สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นเพราะส่วนใหญ่ได้จากพืชซึ่งมีอยู่ทั่วไปทั้งในเมืองและ ชนบท

4.) มีราคาถูก สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้อยาแผนปัจจุบัน ที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศเป็นการลดการขาดดุลทางการค้า

5.) ใช้เป็นยาบำรุงรักษาให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรง

6.) ใช้เป็นอาหารและปลูกเป็นพืชผักสวนครัวได้ เช่น กะเพรา โหระพา ขิง ข่า ตำลึง

7.) ใช้ในการถนอมอาหารเช่น ลูกจันทร์ ดอกจันทร์และกานพลู

8.) ใช้ปรุงแต่ง กลิ่น สี รส ของอาหาร เช่น ลูกจันทร์ ใช้ปรุงแต่งกลิ่นอาหารพวกขนมปัง เนย ไส้กรอก แฮม เบคอน

9.) สามารถปลูกเป็นไม้ประดับอาคารสถานที่ต่างๆ ให้สวยงาม เช่น คูน ชุมเห็ดเทศ

10.) ใช้ปรุงเป็นเครื่องสำอางเพื่อเสริมความงาม เช่นว่านหางจระเข้ ปรนะคำดีควาย

11.) ใช้เป็นยาฆ่าแมลงในสวนผัก, ผลไม้ เช่น สะเดา ตะไคร้ หอม ยาสูบ

12.) เป็นพืชที่สามารถส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศ เช่น กระวาน ขมิ้นชัน เร่ว

รูปที่ 2.6 แสดงภาพสมุนไพรชนิดต่างๆ
ที่มา: http://www.saisawankhayanying.com/wp-content/uploads/2014/06/DSCN0577.jpg , http://www.bloggang.com/data/vinitsiri/picture/1331476722.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม2558)

สมุนไพรไทยที่มีประโยชน์ต่อร่างกายนั้นมีมากมายหลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็น เตยหอม ที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงหัวใจ รางจืด ที่มีสรรพคุณช่วยในการถอนพิษได้ เป็นต้น นอกจากที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วพืชผักสวนครัวบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นสมุนไพรอีกด้วยตัวอย่างเช่น มะกรูด

2.3 มะกรูด (ณัฏฐา, 2555)

ชื่อสามัญ คือ Kaffir lime, Leech lime, Mauritius papeda
ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ Citrus hystrix DC.
ชื่อวงศ์ คือ Rutaceae
ชื่ออื่นๆ คือ มะขู (แม่ฮ่องสอน), มะขุน มะขูด (ภาคเหนือ), ส้มกรูด ส้มมั่วผี (ภาคใต้)

มะกรูดเป็นสมุนไพรคู่ครัวไทยมาอย่างยาวนาน เพราะนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องแกงที่จำเป็นอย่างขาดไม่ได้เลย ซึ่งโดยปกติมักจะนิยมใช้ใบมะกรูดและผิวมะกรูดมาเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องปรุงอาหารหลายชนิด นอกจากมะกรูด จะใช้เป็นเครื่องประกอบในอาหารต่างๆแล้วก็ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆอีกมากมายไม่ว่าจะเป็นในด้านของความงามและในด้านของยาสมุนไพร นอกจากนี้ยังถือว่าเป็นไม้มงคลที่นิยมปลูกไว้บริเวณบ้านอีกด้วย เพราะเชื่อว่าจะทำให้ผู้อยู่อาศัยมีความสุข โดยจะปลูกไว้ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือสารเคมีที่สำคัญที่พบได้ในผลมะกรูดก็คือน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีทั้งในส่วนของเปลือกผลหรือผิวมะกรูด และในส่วนของใบ โดยเปลือกผลจะมีน้ำมันหอมระเหยประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์และในส่วนของใบนั้นจะมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณ 0.08 เปอร์เซ็นต์และยังสกัดยากกว่าน้ำมันในเปลือกผลอีกด้วย แต่ก็ยังมีจุดเด่นตรงที่น้ำมันจากใบจะมีกลิ่นมากกว่านั่นเอง จึงนิยมใช้ทั้งน้ำมันมะกรูดทั้งจากใบและเปลือกผล ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้ก็สามารถนำใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างและยังมีสรรพคุณเป็นยาอีกด้วย การใช้น้ำมันหอมระเหยมะกรูด มาใช้ทาภายนอกหลังจากทาแล้วภายใน 4 ชั่วโมงไม่ควรให้ผิวหนังบริเวณที่ทานั้นสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง เพราะอาจจะทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นไหม้ได้

ลักษณะ: เป็นต้นไม้ขนาดเล็ก สูง 2-8 เมตร เปลือกต้นเรียบ สีน้ำตาล มีหนามแหลมตามกิ่งก้าน ใบเป็นใบประกอบที่มีใบยอดใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบเป็นมันสีเขียวเข้ม มีต่อมน้ำมันอยู่ตามผิวใบ มีกลิ่นหอมเฉพาะ ก้านใบมีปีกดูคล้ายใบ ผลเป็นรูปทรงกลมหรือรูปไข่ โคนผลเรียวเป็นจุก ผิวขรุขระ มีต่อมน้ำมัน ผลอ่อนสีเขียวแก่ สุกเป็นสีเหลือง มีรสเปรี้ยว เมล็ดกลมรี สีขาว มีหลายเมล็ด

ส่วนที่ใช้ : ราก ใบ ผล ผิวจากผล

2.3.1 สรรพคุณของมะกรูด (ดวงตะวัน, 2553)

ราก ได้แก่ถอนพิษ แก้ปวดท้อง แก้ฝีภายในและแก้เสมหะเป็นพิษ

ใบ ได้แก่มีน้ำมันหอมระเหย มีสารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ผล ได้แก่ใช้แต่งกลิ่น รักษารังแค นำมาประกอบอาหารหรือนำมาดอง ใช้เป็นยาฟอกเลือดในสตรี ขับลมในลำไส้ ขับระดู แก้ลมจุกเสียด แก้โรคลักปิดลักเปิด และใช้บำรุงประจำเดือน

ผิว ได้แก่ ใช้ปรุงยาขับลมในลำไส้ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ และเป็นยาบำรุงหัวใจ

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะของผลและใบของมะกรูด
ที่มา:http://static.naewna.com/uploads/userfiles/images/COE@Sep15_Coe2.jpg?t=1467331200055 (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

2.4 จุลินทรีย์โพรไบโอติก (พวงทอง, 2554)

ปัจจุบันผู้คนหันมาสนใจในเรื่องของอาหารเพื่อสุขภาพเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื่อจะช่วยให้สุขภาพแข็งแรง ป้องกันโรคต่างๆรวมทั้งโรคมะเร็งได้ จุลินทรีย์โพรไบโอติก ช่วยปรับสมดุลสภาพแวดล้อมในลำไส้ โดยทำให้จุลินทรีย์ชนิดดีหรือจุลินทรีย์สุขภาพเกาะติดผนังลำไส้และเจริญเติบโตดีขึ้น ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ไม่ดีหรือจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มจำนวนแต่ร่างกายของเราสร้างโพรไบโอติกเองไม่ได้ จึงต้องอาศัยการกินอาหารที่มีโพรไบโอติกเข้ามาช่วย โพรไบโอติกโดยทั่วไปเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ใหญ่ของทุกคน ซึ่งในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ของทุกคน มีแบคทีเรียประจำถิ่นหลากหลายชนิดรวมกันอยู่เป็นหลายๆล้านตัว โดยมีอยู่น้อยกว่ามากในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่มีอยู่มากมายในลำไส้ใหญ่ซึ่งการจะมีสุขภาพที่ดีนั้นขึ้นกับสมดุลของแบคทีเรียเหล่านี้กับเซลล์เยื่อบุลำไส้และระบบภูมิคุ้มกันต้านทานโรคของร่างกาย (ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการสร้างในบริเวณลำไส้ต่างๆโดยเฉพาะลำไส้ใหญ่) ประโยชน์ของโพรไบโอติก โพรไบโอติกในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อโรค ช่วยกำจัดสารพิษต่างๆ รวมทั้งสารก่อมะเร็ง ช่วยสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรคโดยเฉพาะโรคติดเชื้อระบบทางเดินอาหาร โรคท้องเสียในเด็กอ่อน โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ช่วยลดการอักเสบในลำไส้ ช่วยสร้างและช่วยการดูดซึมวิตามิน เกลือแร่หลายชนิดเช่น วิตามินเค (ช่วยการแข็งตัวของเลือด) และวิตามินบี ช่วยลดโอกาสเกิดโรคภูมิแพ้และอาจช่วยลดการดูดซึมไขมันโคเลสเตรอล ส่วนโทษของมันก็มีเช่นเดียวกัน โทษของโพรไบโอติก คือ มักเกิดจากการได้รับโพรไบโอติกจำนวนมากเกินไปหรือได้รับโพรไบโอติกในขณะมีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคต่ำ เช่น ในขณะได้ยาเคมีบำบัดหรือขณะมีเม็ดเลือดขาวต่ำ โพรไบโอติกเหล่านี้จึงอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ อาจติดเชื้อถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นผู้ป่วยทุกโรค รวมทั้งโรคมะเร็ง เมื่อจะบริโภคอาหารที่มีโพรไบโอติก ควรปรึกษาแพทย์ก่อน ซึ่งในผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดหรือมีเม็ดเลือดขาวต่ำ นอกจากนั้นเมื่อบริโภคในปริมาณสูง ยังอาจเกิดโรคอ้วนจากการบริโภคอาหารไขมันปริมาณสูงส่วนเชื้อที่เป็นโพรไบโอติกก็มีหลายชนิดแต่ละชนิดก็มีประสิทธิภาพต่างกันโพรไบโอติกที่มีชื่อคุ้นหูกันดีคือ *Lactobacillus* ช่วยในเรื่องของระบบย่อยอาหาร และเสริมภูมิคุ้มกัน แลกโทบาซิลลัส มาจากชื่อของน้ำตาลแลกโทส

ซึ่งเป็นน้ำตาลในน้ำนม และบาซิลลัสคือ รูปร่างของแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง โดยพบว่าแบคทีเรียแลกโทบาซิลลัสจะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและมี *Bifidobacteria* ซึ่งมีประสิทธิภาพลดอาการแพ้ บรรเทาอาการท้องร่วง ช่วยระบบย่อยอาหาร และเสริมภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าจะอาศัยในส่วนลำไส้ใหญ่ (พิมพ์เพ็ญและนิธิยา, 2555)

โพรไบโอติกมีส่วนช่วยในการลดอาหารลำไส้แปรปรวน ช่วยระบบย่อยอาหาร ลดคอเลสเตอรอลโดยการนำไปสร้างน้ำดี ช่วยละลายเกลือน้ำดี ลดท้องผูก ท้องเสีย กระดูกผุ โรคหัวใจ โรคอ้วน การดื้อของ อินซูลิน การสร้างไขมัน การเปลี่ยนแปลงเซลล์ไขมัน ลดการติดเชื้อ ทางเดินปัสสาวะ สร้างสารแบคทีริโอซิน และเพอรอกไซด์ ซึ่งฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค สร้างกรดแลกติก และกรดอะซิติก ทำให้เกิดความเป็นกรดเชื้อโรคเติบโตช้า โดยเฉพาะเชื้อแกรมลบ(Gram negative bacteria) เสริมภูมิคุ้มกัน แอนติบอดี IgA และเม็ดเลือดขาวชนิด Macrophage รักษาสมดุลในช่องปาก ป้องกันและบรรเทาอาการท้องร่วง ยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ป้องกันการเกิดมะเร็งเพราะอาหารที่มีไขมันมากเพิ่มน้ำดีในลำไส้ก่อให้เกิดโรคไส้เน่า ซึ่งเพิ่มสารพิษและเพิ่มโอกาสเป็นมะเร็ง ส่วนเชื้อที่เป็นโพรไบโอติกก็มีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดก็มีประสิทธิภาพต่างกัน โพรไบโอติกที่มีชื่อคุ้นหูกันดีมีชื่อว่า แลกโทบาซิลลัส หรือชื่อเต็มคือ *Lactobacillus casei* ชิโรต้าของบริษัท ยาคูลท์ ที่มีประสิทธิภาพป้องกันการเกิดมะเร็ง ช่วยระบบย่อยอาหารและเสริมภูมิคุ้มกันแลกโทบาซิลลัส มาจากชื่อของน้ำตาลแลกโทสซึ่งเป็นน้ำตาลในน้ำนม ส่วนบาซิลลัส คือ รูปร่างของแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง เคซิไอ เป็นชื่อของโปรตีนเคซีนในน้ำนมชิโรต้ามาจากชิโรตะซึ่งเป็นชื่อของผู้ค้นพบเชื้อนี้ โดยพบว่าแบคทีเรียแลกโทบาซิลลัสจะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและยังมี *Bifidobacteria* ซึ่งมีประสิทธิภาพลดอาการแพ้ บรรเทาอาการท้องร่วง ช่วยระบบย่อยอาหารและเสริมภูมิคุ้มกัน โดยพบว่า *Bifidobacteria* จะอาศัยในส่วนลำไส้ใหญ่ ปัจจุบันนมผงสำหรับเด็กจะมีการเติมโอลิโกแซคคาไรด์ลงไป เช่น หากรับประทานฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ 15 กรัมต่อวัน ช่วยให้อุจจาระนิ่ม ขับถ่ายดี เพิ่มมวลอุจจาระ ลดการเกิดไข้และโรคทางเดินอาหาร หากรับประทานโอลิโกแซคคาไรด์ ร่วมกับการฉีดวัคซีนหัด จะช่วยเสริมภูมิคุ้มกันให้ดียิ่งขึ้นและพบว่าหากรับประทานโอลิโกแซคคาไรด์ ร่วมกับอินนูลิน 8 กรัมต่อวัน จะช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในผู้ใหญ่ คนปกติรับประทานอินนูลิน 8-10 กรัมต่อวัน จะช่วยในการดูดซึมแคลเซียม ลดไตรกลีเซอไรด์ ลดคอเลสเตอรอลและเพิ่มน้ำในทางเดินอาหารทำให้อุจจาระนิ่ม ขับถ่ายดี คนชรารับประทาน 20-40 กรัมต่อวัน ช่วยให้ขับถ่ายดี เพิ่มการขับไขมันออกมากับอุจจาระ ปัจจุบันมีโพรไบโอติกที่มีหน้าที่เฉพาะจำหน่ายในรูปแบบแคปซูลและซองเล็กๆ รับประทานง่ายเพียงฉีกซองแล้วละลายน้ำโดยภายในซองจะมีแบคทีเรียที่แห้งแต่ยังมีชีวิตอยู่เมื่อเข้าสู่ลำไส้แล้วก็จะเจริญเติบโตตัวอย่างเช่น

1.) โพรไบโอติกป้องกันโรคท้องเสีย จากการรับประทานอาหารสกปรกปนเปื้อนเชื้อโรค โดยโพรไบโอติก ชนิดนี้ จะเข้าไปสู้กับเชื้อโรคทำให้เชื้อโรคตายไป โพรไบโอติกชนิดนี้ไม่ต้องรับประทานทุกวัน โดยรับรับประทานทันทีที่เกิดอาหารท้องร่วง

2.) โพรไบโอติกป้องกันฟันผุ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกโทบาซิลลัส พาราเคไซ (*Lactobacillus paracasei* SD1) ค้นพบโดยคณาจารย์คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยอยู่ในรูปนมผงชนิดเม็ด โยเกิร์ต และยาอม รับประทานเพียงครั้งเดียวเชื้อก็จะเจริญเติบโตในช่องปากและยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดฟันผุ คือ สเตรปโทคอกคัส มิวแทนต์(*Streptococcus mutans*) ได้นานถึง 1-2 สัปดาห์ (www.greenclinic.in.th, สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

2.4.1 โทษของโพรไบโอติก

มักเกิดจากการได้รับโพรไบโอติกจำนวนมากเกินไปหรือได้รับโพรไบโอติกในขณะมีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ เช่น ในขณะที่ได้ยาเคมีบำบัด หรือขณะมีเม็ดเลือดขาวต่ำ โพรไบโอติกเหล่านี้อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อได้มีรายงานว่าอาจมีการติดเชื้อถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นผู้ป่วยทุกโรครวมถึงผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเมื่อจะบริโภคอาหารที่มีโพรไบโอติกควรปรึกษาแพทย์ก่อน ซึ่งในผู้ป่วยโรคมะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดหรือมีเม็ดเลือดขาวต่ำ แพทย์มักแนะนำงดการบริโภคโยเกิร์ตและนมเปรี้ยวเสมอ นอกจากนั้นเมื่อบริโภคในปริมาณสูง ยังอาจเกิดโรคอ้วนจากการบริโภคอาหารไขมันปริมาณสูง

2.4.2 ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus*

Lactobacillus รูปร่างเป็น ท่อนเดี่ยว หรือ ต่อกันเป็นสายสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ และจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก *Lactobacillus* ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่บางชนิดชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ จัดอยู่ในกลุ่ม lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแลคโตส (lactose) ให้เกิดกรดแลกติก (lactic acid fermentation)กรดแลกติกได้จากการที่แบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) ย่อยสลายสารอาหารโดยไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน จึงมีการนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการหมักหรือผลิตอาหารบางชนิด เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เต้าหู้ยี้ การดองผักและผลไม้ต่างๆ แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสามารถในการทนกรดที่ตัวมันผลิตขึ้นมาในปริมาณสูงๆได้ ปกติเจริญในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้างคือตั้งแต่ 5-45 องศา การที่เป็นแบคทีเรียที่ไม่ชอบใช้ออกซิเจนหรือชอบในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย จึงทำให้เกิดการสลายน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย

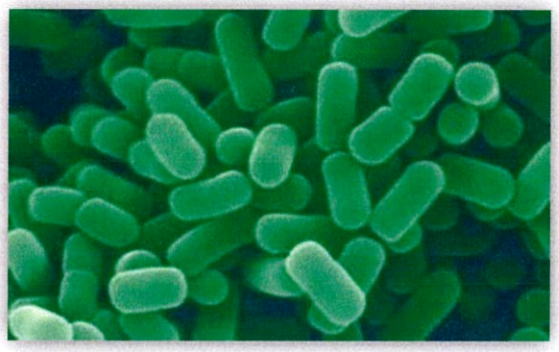
แลคโตบาซิลัส (*Lactobacillus*) สามารถช่วยรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะลำไส้ของเรา ช่วยเพิ่มภูมิต้านทาน ช่วยให้สุขภาพเราดีขึ้นและช่วยลดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหารอีกด้วยซึ่งเราถือว่า *Lactobacillus* เป็นโพรไบโอติกชนิดหนึ่ง ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ในรูปที่เป็นอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เมื่อรับประทานด้วยปริมาณที่พอเหมาะจะส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* เป็นเชื้อที่ดีที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดภายในลำไส้มนุษย์ได้ เนื่องจากมี ความสามารถทนต่อกรดและน้ำดีที่มีอยู่ภายในลำไส้ได้ ซึ่งเชื้อทั้งดีและไม่ดีส่วนใหญ่จะถูกทำลายเพราะทนกรดในกระเพาะอาหารไม่ได้ และ *Lactobacillus* ยังสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus* สามารถช่วยกระตุ้นภูมิต้านทานของ

ร่างกายได้ จากการศึกษาวิจัยพบว่าถ้าหากจุลินทรีย์สามารถเกาะติดกับเยื่อบุผนังลำไส้และแบ่งตัวเพิ่มขึ้นก็จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดที่ก่อโรคเกาะติดลำไส้ หลั่งสารพิษออกมาซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดเยื่อบุลำไส้อักเสบจนเกิดท้องร่วง

2.4.3 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง เจริญโดยใช้อากาศน้อยหรือไม่ใช้อากาศ เจริญที่อุณหภูมิประมาณ 15 – 45 องศาเซลเซียส ไม่มีการสร้างสปอร์ เป็นแลกติกแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยงคือ de Man Rogosa and Shrape (MRS) *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในอุตสาหกรรมการหมักในสภาวะที่ไร้อากาศ มีการเจริญที่รวดเร็วใช้ระยะเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จะผลิตกรดแลกติกและอะซิติกผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof Pathway (EMP) หรือไกลโคไลซิส นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหารที่พบการใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* เช่น การหมักกะหล่ำปลีดอง ผักกาดดอง กิมจิ บางชนิดสามารถทำชีสได้ ในปี2008 มีการศึกษาเชื้อชนิดนี้เพื่อลดการเกิดภูมิแพ้จากแป้งถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังนิยมใช้เชื้อนี้มากในแถบประเทศอินโดนีเซีย



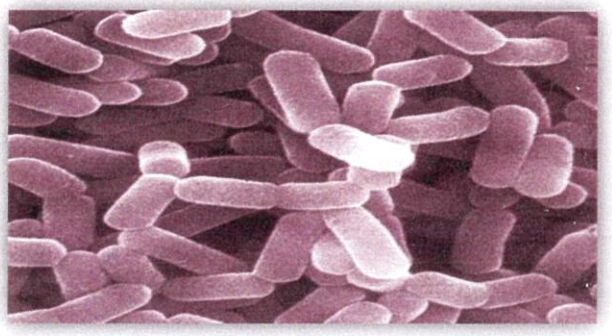
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*
ที่มา : https://microbewiki.kenyon.edu/images/0/00/LP.jpg
(สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

สามารถจัดหมวดหมู่ของ *Lactobacillus plantarum* ได้ดังนี้

Scientific		**Classification**
Kingdom	:	Bacteria
Division	:	Firmicutes
Class	:	Bacilli
Order	:	Lactobacillales
Family	:	Lactobacillaceae
Genus	:	*Lactobacillus*
Species	:	*L.plantarum*

2.4.4 *Lactobacillus casei*

แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศในการเจริญ เคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ สร้างกรดแลคติก สำคัญและใช้มากในระดับอุตสาหกรรม ทนต่อสภาวะการสร้างกรดได้ดี เจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้จากน้ำตาลเฮกโซส ผ่านวิถีEmbden-Meyerhof Pathway (EMP) หรือไกลโคไลซิส สารที่จำเป็นที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้แก่พวกวิตามินบีต่างๆ แคลเซียม ไนอะซิน นอกจากนี้ *Lactobacillus casei* ยังสามารถปรับสภาพให้ตัวเองสามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี และถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเสริมคุณค่าหรือเพิ่มประโยชน์ให้กับอาหาร ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารสมดุล ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พบการใช้ *Lactobacillus casei* เช่น ยาคูลท์ (Yacult) โดยจะใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ชิโรต้า เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกรดนมที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งมีอยู่แล้วตามธรรมชาติในลำไส้เล็ก เป็นสายพันธุ์ที่มีความพิเศษเฉพาะของยาคูลท์ เพื่อช่วยให้ระบบย่อยอาหารทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus casei*
ที่มา : https://c1.staticflickr.com/9/8084/8344600413_0dd3a38dba.jpg (สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

สามารถจัดหมวดหมู่ของ *Lactobacillus casei* ได้ดังนี้

Scientific		**Classification**
Kingdom	:	Bacteria
Division	:	Firmicutes
Class	:	Bacilli
Order	:	Lactobacillales
Family	:	Lactobacillaceae
Genus	:	*Lactobacillus*
Species	:	*L.casei*

2.5 ความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติก (Nualkaekul, 2013)

ปัจจุบันโพรไบโอติกเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางในบทบาทของสารเสริมสุขภาพ (Functional Ingredient) ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพในหลายประเทศ ผลิตภัณฑ์นมหมักเนยแข็ง ผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกในกลุ่มอาหารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นม (non-dairy foods) และกลุ่มที่ไม่ใช่อาหารหมัก (non-fermented foods) เช่น น้ำผลไม้ ช็อกโกแลต ซีเรียล ไอศกรีม มายองเนสเป็นต้น

อย่างไรก็ตามเสถียรภาพ (stability) ในแง่ของอัตราการรอดชีวิตและคุณสมบัติทางหน้าที่ (Functionality) ของโพรไบโอติกสู่เป้าหมายหลักคือลำไส้ใหญ่นั้นยังอุปสรรคสำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคไม่ได้รับประโยชน์จากการบริโภคอาหารโพรไบโอติกอย่างแท้จริง ไม่สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ของโพรไบโอติกเพื่อการบำบัดรักษาและส่งเสริมสุขภาพตามที่ได้อ้างอิง (Fulfilling health health claims)ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกในท้องตลาดส่วนใหญ่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตต่ำกว่ามาตรฐาน ขณะที่มาตรฐานสากลได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกต้องมีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 10^7 เซลล์ต่อกรัม ณ จุดขาย การลดลงของโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื่องจากอิทธิพลของปัจจัยต่างๆเหล่านี้ (กรแก้วและพรรณพิชา, 2541)

2.5.1 ค่าพีเอช (pH)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญที่สุดแตกต่างกัน โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญนี้มักมีค่าเป็นกลางหรือใกล้เคียง (พีเอช 7.0) ส่วนใหญ่จะสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชสูงและต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมไม่เกิน 1 หน่วย *Lactobacillus* sp. จัดเป็นแบคทีเรียชนิดที่ชอบกรด (Acidophiles) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ แต่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดไม่มากนัก (mild acidity) เท่านั้น

ผลกระทบของพีเอชที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการป้องกันของผนังเซลล์ พบว่าใน *Lactobacillus* sp. และจุลินทรีย์อื่นๆที่ผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างการหมักจะทำให้เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ขึ้นในอาหารซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเองด้วย

2.5.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในผลิตภัณฑ์

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียพวก aerotolerant anaerobe ซึ่งหมายถึงแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้รับพลังงานจากการหมัก แต่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเมทาบอริซึม แม้ว่าจะมีออกซิเจนอยู่ในสภาพแวดล้อมรอบๆเซลล์ก็ตาม

2.5.3 อุณหภูมิ (Temperature)

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียพวก mesophile แต่ในบางครั้งก็จัดอยู่ในพวก thermophile ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้คือ 2 ถึง 53 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียสซึ่งหากอุณหภูมิในกระบวนการผลิตมีอุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินไปก็จะส่งผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์

2.5.4 จำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์

ในผลิตภัณฑ์นมหมักควรมีจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตอย่างน้อย 10^5-10^6 เซลล์ต่อกรัมซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปแล้วจะมีจุลินทรีย์เหลืออยู่รอดในระบบทางเดินอาหารลดลง

จากปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการที่จะทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารมีอัตราการอยู่รอดมากขึ้น โดยหนึ่งในวิธีที่จะช่วยให้จุลินทรีย์มีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นนั้นคือวิธีการเอ็นแคปซูเลชชั่น (Encapsulation)

2.6 การปรับปรุงการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Nualkaekul, 2013)

การอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารได้รับความสนใจเนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีจำนวนลดลงในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา ในการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีผลต่อสุขภาพ สหพันธ์นานาชาติด้านผลิตภัณฑ์นม (International Dairy Federation) ให้คำแนะนำว่าปริมาณของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ต่ำที่สุดที่ควรบริโภคเท่ากับ 10^5-10^7 CFU/ml จากอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ จากงานวิจัยหลายฉบับพบว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้าต่างๆรวมถึง นมหมัก โยเกิร์ต นมผงและนมอัดเม็ด มีปริมาณของเซลล์ต่ำกว่าที่ระบุไว้บนฉลาก อันเนื่องจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความไวต่อกระบวนการแปรรูปและกระบวนการเก็บรักษา

เทคนิคการเอ็นแคปซูเลท สามารถนำมาใช้ในการป้องกันจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด เช่น ในผลิตภัณฑ์นมหมักและน้ำผลไม้ สารที่ใช้ในการทำเอ็นแคปซูเลทมีหลากหลาย เช่น แอลจิเนต (Alginate) เป็นโพลิเมอร์ร่วม (Co-polymer) ประจุลบ ของพันธะ1,4-ลิงค์-เบต้า-ดี-แมนนูโรนิก และ แอลฟา-แอล-กลูลูโรนิก แอซิด เป็นกรดที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ได้รับความสนใจมากเนื่องจากพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ไม่ก่อสารพิษ เข้ากับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ดี และต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดบางอย่างก่อให้เกิดปัญหา เนื่องจากความคงตัวในสภาวะปานกลางจะพบสารคีเลต (Chelating agents) ภายใต้สภาวะกรดเพกทิน (Pectin) เป็นสารเชิงซ้อนพอลิแซ็กคาไรด์ประจุลบสกัดจากผลส้ม ประกอบด้วยโซ่เชิงซ้อนของพันธะแอลฟา-(1,4)-ลิงค์ดี-กาแลคทูโร-นิก แอซิด เช่นเดียวกับโซเดียมแอลจิเนตและการฟอร์มเจลของเพกทินด้วยพันธะไอออนิกเมื่อสัมผัสกับแคลเซียมไอออน

กระบวนการที่เซลล์ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเยื่อหุ้มเพื่อลดการบาดเจ็บของเซลล์หรือสูญเสียของเซลล์จากสภาวะแวดล้อม วิธีการเอ็นแคปซูเลทเซลล์ได้ถูกประยุกต์ใช้ในการเอ็นแคปซูเลทเซลล์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมักหรือผลิตมวลเซลล์สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ การเอ็นแคปซูเลทจัดเป็นเทคโนโลยีในการปกป้องกันเซลล์ไว้ภายในเม็ดบีทช่วยรักษาความคงตัวและรักษาระดับจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกภายในผลิตภัณฑ์และระบบทางเดินอาหาร เทคนิคเอ็นแคปซูเลทที่นำไปประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์นมหมักหรือการผลิตชีวมวลสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion) และ

เทคนิคอิมัลชัน (Emulsion) ทั้งเทคนิคเอ็กทรูชันและเทคนิคอิมัลชันสามารถเพิ่มการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ถึง 80-90เปอร์เซ็นต์

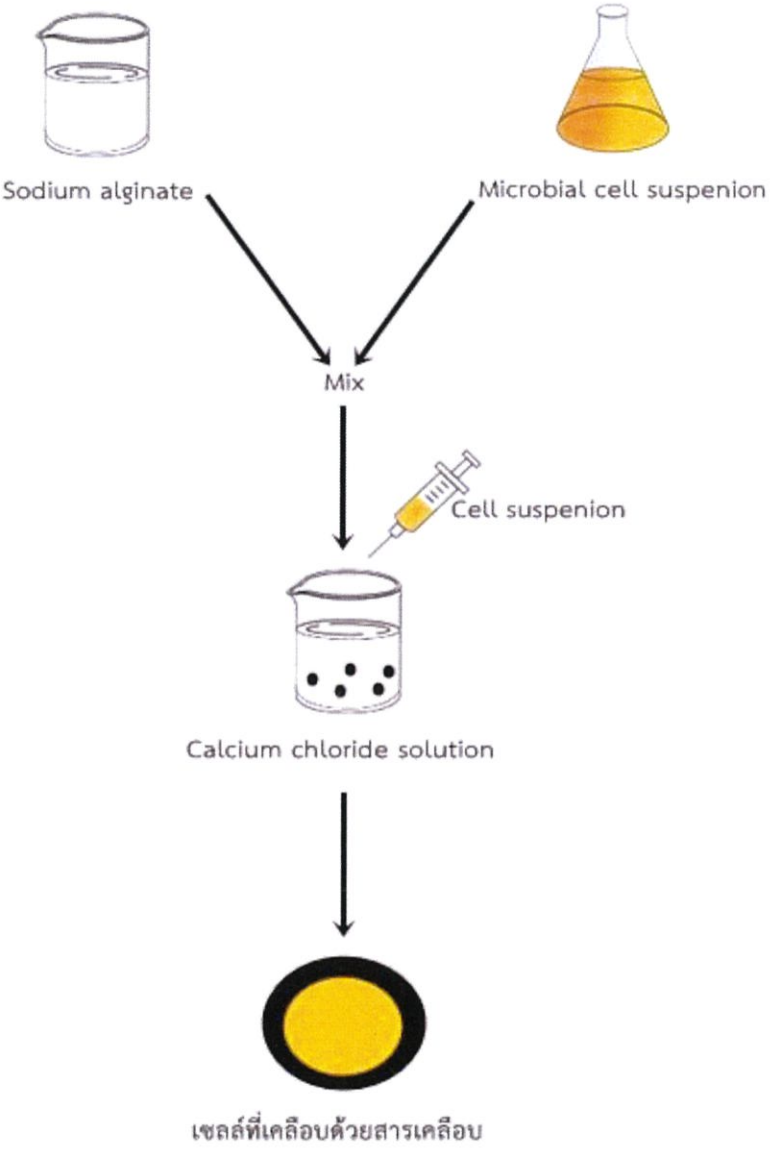
2.6.1 เทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion) (Krasaekoopt และคณะ, 2003)

เทคนิคเอ็กซ์ทรูชันเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดและเป็นที่นิยม วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งอาศัยการฟอร์มเจลในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)เริ่มจากมีการเตรียมสารละลายโพลิเมอร์และเติมจุลินทรีย์ลงไปดังแสดงในรูป 2.10 จากนั้นขับเซลล์ให้ไหลออกจากรูของเข็มฉีดยาในรูปของหยดสารละลาย ทำให้แข็งตัวหรือขึ้นรูปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขนาดและรูปร่างของเม็ดบีทจะขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม ระยะห่างของหยดแต่ละหยด วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสะดวก ราคาถูกและไม่มีสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เช่น ความร้อนหรือแรงเฉือน วัตถุดิบที่นิยมใช้เคลือบเซลล์โพรไบโอติก ได้แก่ แอลจิเนต การฟอร์มเจลทำได้โดยเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมแอลจิเนตจะถูกหยดลงในสารละลายที่มีประจุบวกมาก (multication) โดยทั่วไปใช้แคลเซียมไอออนในรูปของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ หยดของสารผสมจะฟอร์มเป็นเม็ดบีทในทันที การดักจับเซลล์ของแอลจิเนตจะอยู่ในรูป โครงสร้างที่สานกันเป็นร่างแหสามมิติที่มีการเชื่อมของพันธะไอออนิกระหว่างแคลเซียมไอออนกับโพลิเมอร์ การเคลือบเซลล์จะให้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับตัวที่ใช้ในการดักจับโดยมีราคาถูก ใช้งานง่าย และเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต(Biocompatibility) อย่างไรก็ตามขั้นตอนการฟอร์มตัวเป็นเจลโดยวิธีเอ็กซ์ทรูชันค่อนข้างใช้เวลานาน ทำให้การขยายขนาดการผลิตทำได้ค่อนข้างยาก

2.6.2 เทคนิคอีมัลชัน (Emulsion) (Krasaekoopt และคณะ, 2003)

เทคนิคนี้ใช้การเติม suspension ของแบคทีเรียที่ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85เปอร์เซ็นต์ปริมาตรเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่า และน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น จากนั้นจะโฮโมจีไนส์ส่วนผสมนี้เพื่อที่จะทำให้เกิดอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัวลงไป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ขนาดของเม็ดเจลขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่นโดยเม็ดเจลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร เทคนิคนี้ได้ใช้อย่างประสบผลสำเร็จเพื่อห่อหุ้มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (lactic acid bacteria)

เทคนิคนี้ใช้น้ำมันพืชเป็นเฟสต่อเนื่องสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร บางรายงานใช้น้ำมันพาราฟิน (white light paraffin oil) และน้ำมันแร่ (mineral oil) ในบางกรณีมีการเติมอิมัลซิไฟเออร์ลงไปเพื่อทำให้เกิดอิมัลชันที่ดีขึ้น เพราะว่าอิมัลซิไฟเออร์จะไปลดแรงตึงผิวเป็นผลให้เม็ดอัลจิเนตมีขนาดเล็กลง อิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้บ่อยที่สุด คือ ทวีน 80 (tween 80) ที่มีความเข้มข้น 0.2เปอร์เซ็นต์ใช้ทวีน 80 กับโซเดียมลอริลซัลเฟตในการผลิตเม็ดอัลจิเนตขนาด 25-35 ไมครอน



รูปที่ 2.10 แสดงขั้นตอนการเอ็นแคปซูเลทด้วยเทคนิคเอ็กซ์ทรูชัน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Krasaekoopt และคณะ (2003)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทิพรักษ์ และคณะ (2555)ได้ศึกษาผลของการเติมแป้งกล้วยน้ำว้าดัดแปรในโยเกิร์ตเสริมจุลินทรีย์ *Lactobacillus acidophilus*ต่อการรอดชีวิตของ *L.acidophilus*ในระหว่างการเก็บรักษาและสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร จากผลการวิจัยพบว่าโยเกิร์ตที่เติมแป้งกล้วยดัดแปรมีการเหลือรอดของ *L.acidophilus* ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษามากกว่าโยเกิร์ตที่ไม่เติมแป้งกล้วยดัดแปร ($P<0.05$)และมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงที่สุดหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน (9.3log CFUต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อเริ่มต้นหลังการผลิต 8.8 log CFU/ml มีแนวโน้มลดลงหลังจากการเก็บรักษา 14 และ 28 วัน ผลการเติมแป้งกล้วยดัดแปรต่อการเหลือรอดของ *L.acidophilus*ในสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร พบว่าการเติมแป้งกล้วยดัดแปรเพิ่มมากขึ้นการเหลือรอดของเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเติมแป้งกล้วยดัดแปร 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเหลือรอดของเชื้อสูงที่สุดมีจำนวนเชื้อเหลือรอดในช่วง 6.8-8.4 log CFU/ml

ปาลิดา (2556) ได้ศึกษาผลของการเสริมกากใยส้มในปริมาณที่แตกต่างกัน 0 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่มี *Lactobacillus plantarum* C7 เป็นกล้าเชื้อ โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่เสริมกากใยส้ม 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด และใช้เวลาในการบ่มน้อยที่สุด คุณภาพทางจุลินทรีย์สำหรับการรอดชีวิตของ *L plantarum* C7 พบว่ามีจำนวนมากกว่าโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่ไม่เติมกากใยส้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยจุลินทรีย์แบคทีเรียแลกติกมีชีวิตอยู่ในช่วง 7.70-8.66 log CFU/ml และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองเสริมกากใยส้มเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่าโยเกิร์ตมีการแยกตัวของหางนมเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น เห็นได้ชัดว่าแบคทีเรียกรดแลตติกสามารถรอดชีวิตได้อยู่ระหว่าง 8.03-8.59 log CFU/ml

พิลาวัลย์และบวรศักดิ์ (2558) ได้การศึกษากราฟการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 390 ใน MRS broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพบว่าเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงเฟสคงที่ในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่ม ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณของแบคทีเรียสูงถึง 8 – 9log CFU/ml พร้อมทั้งศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *L.acidophilus* TISTR 1338 และ *L.casei* TISTR 390 ในระหว่างกระบวนการผลิตไอศกรีมขาวกล้องมันปูพบว่าเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียต่างชนิดกันและขั้นตอนการผลิตไอศกรีมไม่มีผลร่วมต่อค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดโดยสายพันธุ์ของเชื้อทั้งสองชนิดมีการเหลือรอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P> 0.05$) โดยที่เชื้อ *L.acidophilus* TISTR 1338 และ *L.casei* TISTR 390 มีค่าการเหลือรอดคิดเป็น 96.23± 1.98 และ 97.01 ± 2.48เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในส่วนของขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างกันคือขั้นตอนการปั่นไอศกรีม (freezing) ขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง (hardening) พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของโพรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง2 ชนิดไม่แตกต่างนัก ($P> 0.05$) โดยมีค่าการเหลือรอดคิดเป็น 97.75 ± 1.74 เปอร์เซ็นต์และ 95.49 ± 2.01 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

รัฐสรณ์และบวรศักดิ์ (2555) ได้ศึกษาการผลิตไอศกรีมเผือกหอมโดยใช้ปริมาณเผือกหอมที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์และปริมาณสารช่วยให้คงตัวคือแซนแทนกัม ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์จากการประเมินความชอบของผู้ทดสอบชิม

ต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าการเติมเผือกหอมที่ระดับปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์นั้นให้ค่าคะแนนความชอบโดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 7.33 ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างไอศกรีมเผือกหอมที่เติมเผือกหอมที่ระดับปริมาณ 10 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) ส่วนการเติมสารช่วยให้คงตัวที่ระดับปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่าให้ค่าคะแนนความชอบโดยรวมเฉลี่ยคือ 7.07 ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างไอศกรีมที่เติมสารช่วยให้คงตัวที่ระดับปริมาณ 0.1 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ได้ศึกษากราฟการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกแบคทีเรียได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ใน MRS broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงเฟสคงที่ ในชั่วโมงที่19 ของการบ่มโดยมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 9log CFU/ml

สิรสา (2555) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1034 ที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมัก ตามลำดับ จากการนำไปทดสอบการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด พีเอช 2.0 นาน 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้ม *Lactobacillus plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1034 ซึ่งแยกจากหนูและกะหล่ำปลีดองให้การรอดชีวิต 74.79 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกจากสภาวะที่มีกรดสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ

Champagne และคณะ (2015) ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์ของโพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีชีวิตในไอศกรีมกระบวนการทำไอศกรีม ได้แก่ การเติมเชื้อหลังกระบวนการแช่แข็ง การใช้เชื้อแบบไมโครเอนแคปซูลเลต (ใช้วิธีการเคลือบด้วยการสเปรย์) และการผสมเชื้อโพรไบโอติกรวมในช็อกโกแลตหรือในเม็ดแท็บเล็ตซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อนำเซลล์ชนิดผง (Free cell powder (FCP)) ของเชื้อ *Bifidobacterium longum* R0175 ผสมเข้าไปในไอศกรีมก่อนที่จะทำให้ไอศกรีมแข็งตัวนั้น ในระหว่างกระบวนการผลิตและในระหว่างการเก็บรักษาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงเกือบ 3 log CFU/g ในขณะที่เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* R0011 มีปริมาณลดลงเพียง 0.43logCFU/g อย่างไรก็ตามการเติมเชื้อชนิดผงในรูปของไมโครเอนแคปซูเลต (microencapsulatedcell (MEP)) ช่วยเพิ่มความคงตัวของเชื้อ *B.longum* ความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อโพรไบโอติกจะเพิ่มขึ้นไปอีกเมื่อผสม MEP ลงในช็อกโกแลต หลังจากนั้นจึงนำผสมช็อกโกแลตลงในไอศกรีมนอกจากนี้ยังพบว่ามีการสูญเสียการรอดชีวิตของเชื้อชนิดผงแบบ FCP ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -16 องศาเซลเซียสในช่องแช่แข็งที่มีระบบการละลายน้ำแข็งสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิคงที่ -20 องศาเซลเซียส ถึง 10 เท่า

Nualkaekul และคณะ (2013) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเม็ดบีทแอลจิเนตและเม็ดบีทเพกทินที่ช่วยปรับปรุงการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ*Bifidobacterium longum* ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำทับทิมและน้ำแครนเบอร์รี่ รวมทั้งศึกษาผลของสารที่นำมาใช้ในการเคลือบชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคโตซาน เจลาติน กลูโคแมนแนน ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ ขนาดและความแข็งของเม็ดบีท ผลการทดลองพบว่าในน้ำทับทิม เซลล์อิสระของเชื้อ *L.plantarum* ตาย

ภายใน 4 สัปดาห์ของการเก็บรักษา ในขณะที่เซลล์อิสระของเชื้อ *B.longum* ตายภายใน 1 สัปดาห์ ส่วนในน้ำแครนเบอร์รี่แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะตายภายใน 1 สัปดาห์ การทำเอ็นแคปซูเลทเม็ดบีทเจลาตินและเม็ดบีทเพกทินจะช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์มีการอยู่รอดมาก แต่เมื่อนำมาเคลือบเม็ดบีทด้วยไคโตซานหรือเจลาตินอีกชั้นจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดมากยิ่งขึ้น ส่วนการเคลือบด้วยกลูโคแมนแนนไม่มีผลในเชิงบวก ในขณะที่การเคลือบด้วยเจลาตินสองชั้นบนเม็ดบีทเพกทินจะป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ได้สูงสุด ซึ่งมีปริมาณเซลล์สุดท้ายของเชื้อ *L.plantarum* และ *B.longum* เท่ากับ 10^8 CFU/mlและ 10^6 CFU/ml หลังจาก 6 สัปดาห์ของการเก็บรักษาในน้ำทับทิมและน้ำแครนเบอร์รี่ ตามลำดับ

Priscilla และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ คุณสมบัติการละลาย และคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสของไอศกรีมนมแพะที่ผลิตโดยที่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* สายพันธุ์ lactis BLC1 จากการนำไอศกรีมที่มีการเติม *Bifidobacterium animalis* มาวิเคราะห์เพื่อหาอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต ระหว่างการเก็บรักษา และในสภาวะการย่อยในน้ำย่อยจำลอง ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเติม *Bifidobacterium animalis* ในไอศกรีมมีผลต่อการลดลงของค่าพีเอชที่ระดับนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เป็นค่าโอเวอร์รันและการละลายของไอศกรีม หลังจากเก็บรักษาไอศกรีมในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 120 วัน พบว่ามีอัตราการรอดของเชื้อ 84.7 เปอร์เซ็นต์และมีการตรวจนับเซลล์ระหว่างการย่อยในระบบย่อยจำลอง ในน้ำดีและน้ำย่อยเพนครีเอติน พบว่ามีการลดลงของเชื้อเหลือเพียง 3.82 log cfu/g สำหรับคะแนนทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมโพรไบโอติกนมแพะอยู่ในเกณฑ์ที่ดีและเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิแช่แข็งเป็นเวลา 120 วัน พบว่ายังมีจำนวนโพรไบโอติกอยู่ระหว่าง6-7 log CFU/g ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* มีความเหมาะสมเพียงพอที่จะนำมาใช้ในไอศกรีมนมแพะ

Ranadheera และคณะ(2013) ได้ศึกษาการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติกจากนมแพะและผลของวัสดุที่ใช้บรรจุต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยทำการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติกรสช็อกโกแลตผลิตจากนมแพะโดยใส่แบคทีเรียโพรไบโอติกลงไปซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis BB-12 และ *Propionibacterium jensenii* 702 และทำการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกันได้แก่ โพรพิลีน พลาสติก แก้ว และทำการประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยตรวจหาจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิต คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่เก็บในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่ากระบวนการแช่แข็งในระหว่างการผลิตไอศกรีมส่งผลต่อการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต อย่างไรก็ตามจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีชีวิตทั้งหมด จะมีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ที่ 10^7ถึง 10^8 CFU/ml จนถึงสัปดาห์ที่ 52 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุจะส่งผลต่อระยะเวลาของการละลายของไอศกรีม และคุณสมบัติในด้านการละลายของผลิตภัณฑ์โดยทำการตรวจวัดหลังจากการผลิตหนึ่งสัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าขั้นตอน

การบรรจุไม่มีผลกับคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส แต่หลังผ่านไป 12 สัปดาห์ของการเก็บรักษาพบการเปลี่ยนแปลงด้านประสาทสัมผัสบางอย่าง เช่น รูปร่าง เนื้อสัมผัส และรสชาติของไอศกรีม

Sathyabama และคณะ (2014) ได้ศึกษาจุลินทรีย์โพรไบโอติกจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus succinus* (MAbB4) และ *Enterococcus fecium* (FidM3)มาเอนแคปซูเลทร่วมกันกับพรีไบโอติก โดยใช้พรีไบโอติกแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ ชูกาบีทและชิโครี โดยนำชูกาบีทและชิโครีมาเอนแคปซูเลทกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอัลจิเนต 2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบเปรียบเทียบเซลล์อิสระกับเซลล์ที่เอนแคปซูเลท โดยดูอัตราการสร้างกรดจากการหมักในหลอดทดลอง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ถูกเอนแคปซูเลทมีอัตราการอยู่รอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่ออยู่ในสภาวะกรด (pH 2-3) และน้ำดี (ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และa 0.8 กรัม/100 มิลลิลิตร) นอกจากนี้การอยู่รอดของเซลล์ที่เอนแคปซูเลทสามารถเหลือรอดในสภาพแวดล้อมที่คล้ายคลึงกับกระเพาะอาหารได้ถึง 88.75 – 98.75 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการเจริญอยู่ที่ 8.1 log CFU/mlถึง 7.9 log CFU/ml โดยที่เซลล์ที่มีชีวิตดังกล่าวยังคงมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลา 30 วัน เมื่อรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างไรก็ตามสิ่งที่น่าสนใจก็คือการใช้โอลิโกแซ็คคาไรด์ซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารอาหารคาร์โบไฮเดรตในการเอนแคปซูเลชัน และพบว่าการเอนแคปซูเลชันด้วยอัลจิเนตสามารถปรับปรุงการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

1. นมพาสเจอไรส์ชนิดจืด ยี่ห้อดัชมิลล์ซีเล็คชัน
2. น้ำตาลทราย ยี่ห้อลิน
3. วิปปิ้งครีมชนิดจืด ยี่ห้ออังเคอร์
4. ไข่ไก่เบอร์ 2
5. ผลมะกรูด
6. ใบมะกรูด
7. เกลือ ยี่ห้อปรุงทิพย์
8. สีผสมอาหารสีเขียวแก่ ยี่ห้อวินเนอร์
9. ช็อกโกแลตก้อน ยี่ห้อทิวลิป

3.2 เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก

1. *Lactobacillus casei* TISTR 390 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2. *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 โซเซียมคลอไรด์ ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd.

3.3.2 de Man Rogosa and Sharpe (MRS) ยี่ห้อ Himedia

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั่นไอศกรีม ยี่ห้อ Fortunate
2. เครื่องชั่ง ยี่ห้อ AND GF-800
3. ชุดเครื่องครัว
4. ตู้แช่แข็ง ยี่ห้อ Panasonic
5. ภาชนะบรรจุอาหารแบบมีฝาปิด
6. หัวบีบครีม ยี่ห้อ Atary เบอร์ 12
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ HERMLE รุ่น Z384K

8. หม้อนึ่งอัดไอ ยี่ห้อ TOMY
9. ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ MEMMERT
10. ตู้เขี่ยเชื้อ ยี่ห้อ MICROTECH
11. เครื่อง shaker ยี่ห้อ GALLENKAMP
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ GENESYS 10S UV-VIS
13. ชุดเครื่องแก้ว

3.5 วิธีการ

3.5.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* ในเม็ดช็อกโกแลต

3.5.1.1 การเตรียมสารละลายของเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum*TISTR 2075 หรือ *Lactobacillus casei* TISTR 390 มาลากบนอาหารแข็ง MRS จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารผิวเอียง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำให้เป็นสารละลายแขวนลอยของเซลล์โดยใช้สารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาณเซลล์สุดท้ายให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10^9 CFU/ml ทั้งสองสายพันธุ์

3.5.1.2 การเตรียมเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย

หลอมช็อกโกแลตให้ละลาย จากนั้นลดอุณหภูมิลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมสารละลายเชื้อ *Lactobacillus plantarum* หรือ *Lactobacillus casei* ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.1.1 ลงในช็อกโกแลตเหลวปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ผสมเชื้อให้เข้ากันกับช็อกโกแลต จากนั้นเทช็อกโกแลตลงในถาดสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยให้ช็อกโกแลตมีความสูงเท่ากันประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ทั้งถาดและนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อมานำช็อกโกแลตที่ได้มากดให้เป็นเม็ดโดยใช้หัวกดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.82 มิลลิเมตร ดังที่แสดงในรูปที่ 3.1 นำเม็ดช็อกโกแลตที่ได้ใส่ในภาชนะที่สะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

รูปที่ 3.1 แสดงการเตรียมเม็ดช็อกโกแลตโดยใช้หัวกดขนาด 0.82 มิลลิเมตร

3.5.1.3 การตรวจหาปริมาณเซลล์โพรไบโอติกแบคทีเรียที่รอดชีวิตในเม็ดช็อกโกแลต (Homayouni และคณะ, 2008)

นำตัวอย่างเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* หรือ *Lactobacillus casei* 10 กรัม มาละลายในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เพื่อละลายเม็ดช็อกโกแลต จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม นำระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาทำการ pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีรายงานผลเป็น log CFU/g

3.6 การผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

ทำการทดลองผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดโดยดัดแปลงสูตรจากในเว็บไซต์ www.everything-ain.blogspot.com(สืบค้นวันที่ 24 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558) ซึ่งมีส่วนผสมและวิธีทำ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมของไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

ส่วนผสม	ปริมาณ
ใบมะกรูดหั่นฝอย	0.3 กรัม
ผิวมะกรูดขูดฝอย	0.6 กรัม
น้ำตาลทราย	100 กรัม
นมสดพาสเจอร์ไรส์ชนิดจืด	500 กรัม
วิปครีมสด	200 กรัม
ไข่แดง เบอร์ 2	4 ฟอง
เกลือ	¼ ช้อนชา
สีผสมอาหารสีเขียว	3 หยด

วิธีทำ

1. ใส่ใบมะกรูดและผิวมะกรูดลงไปในหม้อที่มีครีมและนม นำไปตั้งไฟอ่อนๆเป็นเวลา 7 นาที
2. ตีไข่แดงกับน้ำตาลให้สีอ่อนลง
3. เทส่วนผสมของนมกับครีมที่ต้มไว้ลงไปในส่วนผสมของไข่แดง จากนั้นกรองเอาใบมะกรูดและผิวของมะกรูดออกใช้ตะกร้อมือคนตลอดเวลา ส่วนผสมนี้มีลักษณะคล้ายคัสตาร์ด
4. เทส่วนที่เป็นคัสตาร์ดกลับลงไปในหม้อ ใส่เกลือและสีผสมอาหาร
5. นำขึ้นตั้งไฟอ่อนอีกครั้ง โดยใช้ไม้พายคนตลอดเวลาเพื่อให้ส่วนผสมข้นขึ้น ใช้เวลาประมาณ 3 นาที
6. ยกลงจากเตาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทใส่โถปั่นไอศกรีม
7. นำเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง จากนั้นปั่นในเครื่องทำไอศกรีมใช้เวลาในการปั่น 40 นาที จะได้ ซอฟต์ไอศกรีม
8. เทส่วนผสมของไอศกรีมลงในภาชนะบรรจุ แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ส่วนผสมแข็งตัว

3.7 การศึกษาการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม และหลังการแช่แข็งไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

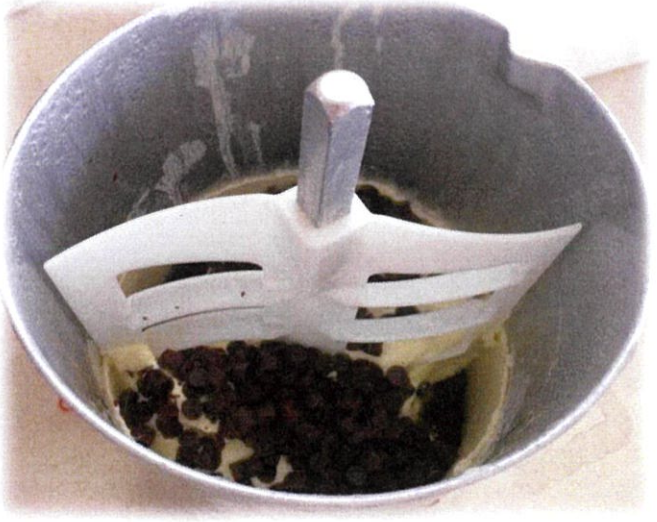
จากการคำนวณหาปริมาณเชื้อรอดชีวิตในเม็ดช็อกโกแลตทั้งสองสายพันธุ์ในข้อ 3.5 พบว่า *L.casei* มีจำนวนเชื้อรอดชีวิตในเม็ดช็อกโกแลตใกล้เคียงกับเชื้อ *L.plantarum* แต่เนื่องจากในงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใส่เชื้อ *L.casei* ผสมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทนมหมัก ผู้ศึกษาจึงเลือกเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* เพื่อทำการศึกษาต่อไป

3.7.1 การเตรียมเม็ดช็อกโกแลตที่ผสม *Lactobacillus casei*

ทำการเตรียมเม็ดช็อกโกแลตตามวิธีการดังข้อ 3.5.1.2 จากนั้นสุ่มตัวอย่างเม็ดช็อกโกแลตมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อ *L.casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างกระบวนการปั่น และกระบวนการแช่แข็งไอศกรีม

3.7.2 วิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ที่ผสมในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการปั่นไอศกรีม

โดยทำการผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดตามส่วนผสมและวิธีการในหัวข้อ 3.6 จากนั้นนำเอาเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 3.7.1 ปริมาณ 150 กรัม มาผสมกับไอศกรีมหลังขั้นตอนการปั่นส่วนผสมของไอศกรีม 20 นาที จากนั้นทำการปั่นไอศกรีมต่ออีกเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เม็ดช็อกโกแลตผสมเข้ากันกับเนื้อไอศกรีม ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงการนำเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ผสมกับไอศกรีมระหว่างการปั่น

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการปั่นไอศกรีมแล้วสุ่มตัวอย่างไอศกรีมไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตหลังกระบวนการปั่น ส่วนไอศกรีมที่เหลือจะบรรจุลงภาชนะบรรจุ ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* หลังกระบวนการแช่แข็งซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. นำเนื้อไอศกรีมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายประมาณ 10 นาที

2. แยกเอาเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ออกมา 10 กรัมใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3. ทำการเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม และนำระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางมาทำการ pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และรายงานผลเป็น log CFU/g

ส่วนเนื้อไอศกรีมนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *L.casei* ที่หลุดรอดจากเม็ดช็อกโกแลตในระหว่างการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็งโดยมีวิธีการดังนี้

1. ทำการปิเปตไอศกรีมที่ละลายแล้ว 10 มิลลิลิตร มาใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. ทำการเจือจางที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม หลังจากนั้นนำความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางมาทำการ pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และรายงานผลเป็น log CFU/ml

3.8 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรีย

ทำการผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลต จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ดังนี้

3.8.1 ศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลต

1. นำเนื้อไอศกรีมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายประมาณ 10 นาที

2. แยกเอาเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ออกมา 10 กรัมใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3. ทำการเจือจางให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม และนำระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางมาทำการ pour plate ด้วยอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และรายงานผลเป็น log CFU/g

3.8.2 ศึกษาปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีม

ทำการปิเปตไอศกรีมที่ละลายแล้ว 10 มิลลิลิตร มาใส่ในบีกเกอร์ที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.7

3.8.3 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในเนื้อไอศกรีม

นำเอาเนื้อไอศกรีมที่ทำให้ละลายแล้วปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

3.8.4 วัดขนาดของเม็ดช็อกโกแลต

เพื่อศึกษาผลของการเก็บรักษาไอศกรีมต่อขนาดเม็ดช็อกโกแลต โดยจะทำการวัดขนาดของเม็ดช็อกโกแลตก่อนการผสมในไอศกรีมหลังเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

3.8.5 การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

การทดสอบจะนำไอศกรีมที่เก็บรักษาทุก 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์มาทำการทดสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างไอศกรีมที่ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะใช้วิธีการทดสอบความแตกต่าง (Difference form control test) ให้คะแนนความแตกต่างในด้านกลิ่นรส เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และสี ซึ่งมีระดับคะแนน คือ 1 = ไม่แตกต่าง 2 = แตกต่างเล็กน้อย 3 = แตกต่างมาก โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 25 คน

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

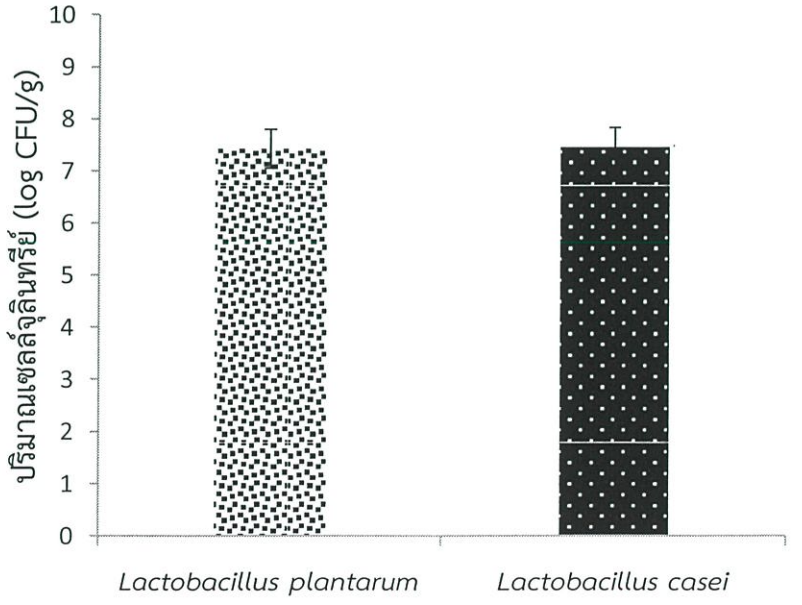
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาประเมินผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 23 ทำการหาค่าเฉลี่ย และความแปรปรวน

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ผสมในช็อกโกแลต

จากการตรวจนับจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 และ *Lactobacillus casei* TISTR 390 โดยมีปริมาณสารละลายหัวเชื้อของเชื้อ *L.casei* และ *L.plantarum* เท่ากับ 9 log CFU/ml และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์มาผสมในช็อกโกแลตเพื่อศึกษาปริมาณการรอดชีวิตพบว่า *L.plantarum* มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 7.43 log CFU/g ส่วน *L.casei* มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 7.46 log CFU/g (รูปที่ 4.1) ในการศึกษาของ สิรสา (2556) กล่าวว่า วัสดุพยุงที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียมีหลายชนิด ซึ่งวัสดุตัวพยุงที่แตกต่างกันก็จะมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ต่างกัน การใช้อัลจิเนตมีความเหมาะสมในการห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* ได้แก่ *L.acidophilus* ,*L.plantarum* เป็นต้น ส่วนแคปปา-คาราจีแนน เหมาะสมต่อการห่อหุ้มแบคทีเรียสายพันธุ์ *L.lactis* , *L.casei* เป็นต้น แต่การใช้แคปปา-คาราจีแนนเพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย ในการศึกษาโครงงานวิจัยครั้งนี้เราจึงเลือกใช้เชื้อ *L.casei* เนื่องจากเหมาะกับการตรึงเซลล์มากกว่าเชื้อชนิดอื่นจึงนำมาผสมในช็อกโกแลต ซึ่งงานวิจัยของ Champagne และคณะ (2015) กล่าวว่า การผสมเชื้อในเม็ดช็อกโกแลตมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อในทางบวก

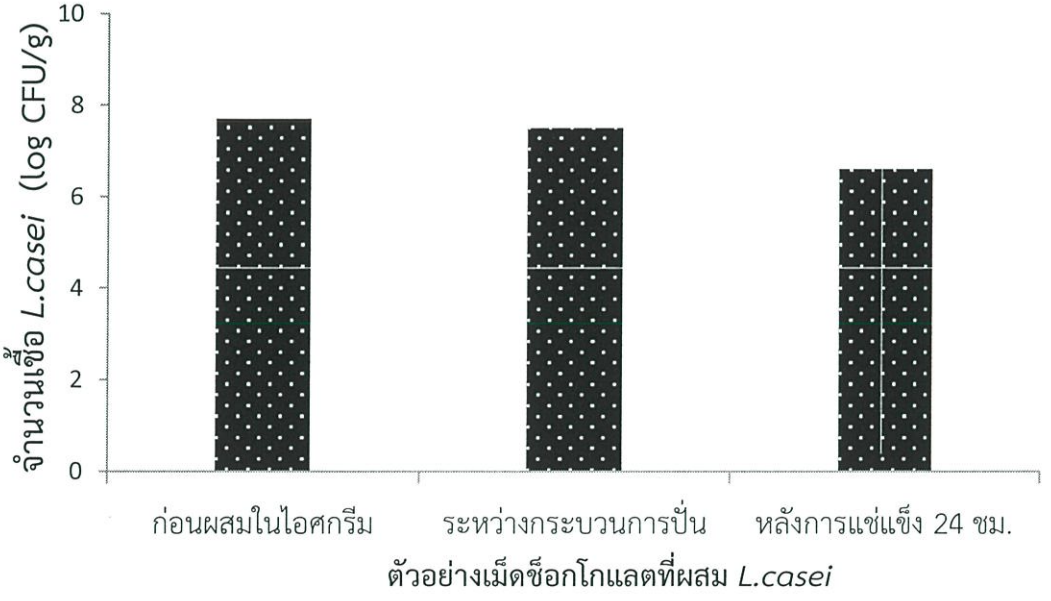


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และเชื้อ *Lactobacillus casei* ในเม็ดช็อกโกแลต

จากปริมาณของเชื้อดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการบริโภค โครงงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เชื้อ *L.casei* ในการศึกษา

4.2 ปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นและหลังการแช่แข็งไอศกรีม

จากการเตรียมเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* แล้วนำมาวิเคราะห์จำนวนการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลต พบว่า มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 7.7 log CFU/g และเมื่อนำเอาเม็ดช็อกโกแลตไปผสมในไอศกรีม เพื่อศึกษาปริมาณการรอดชีวิตระหว่างการปั่นไอศกรีม พบว่า ปริมาณเชื้อ *L.casei* มีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.5 log CFU/g ที่ปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลงเป็นผลมาจากผลึกน้ำแข็งที่อยู่ในเนื้อไอศกรีมส่งผลต่อการลดลงและการตายของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Champagne และคณะ (2015) ที่กล่าวถึงการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ามีการลดลงของเชื้อโพรไบโอติกตั้งแต่ 0.2 - 1 log CFU/ml ในระหว่างกระบวนการผลิตไอศกรีม ดังนั้นหลังจากนำเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจวิเคราะห์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 6.6 log CFU/ml (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงของเชื้อโพรไบโอติกในช่วงดังกล่าว ดังนั้นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์น่าจะเป็นกระบวนการแช่แข็ง (Haynes และ Playne, 2002) Abghari และคณะ (2011) และ Alamprese และคณะ (2005) รายงานถึงการศึกษาก่อนหน้านี้ว่ามีการลดลงของเชื้อโพรไบโอติกตั้งแต่ 0.2 - 1 log cfu/g ในระหว่างกระบวนการผลิตไอศกรีม



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตก่อนผสมลงในไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 ปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นและหลังการแช่แข็งไอศกรีม

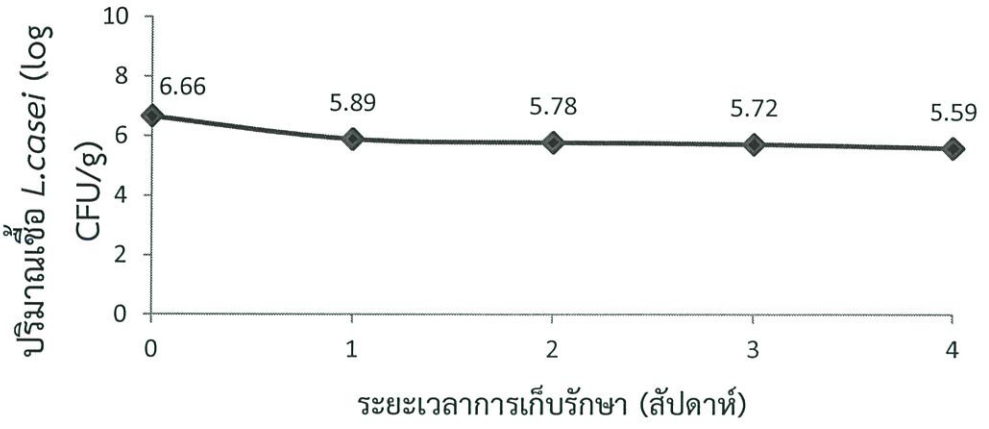
ทำการผลิตไอศกรีมกลิ่นมะกรูดโดยมีการเติมเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ลงไป จากนั้นนำเนื้อไอศกรีมจากขั้นตอนระหว่างกระบวนการปั่นและหลังการแช่แข็งมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่หลุดรอดจากเม็ดช็อกโกแลตมายังเนื้อไอศกรีม พบว่า มีจำนวนเชื้อที่หลุดรอดมาในเนื้อไอศกรีมระหว่างการปั่นไอศกรีม และ หลังการแช่แข็งไอศกรีม เท่ากับ 1.1 log CFU/ml และ 1 log CFU/ml ตามลำดับ อาจจะเป็นเพราะระยะเวลาในการปั่นไอศกรีมทำให้เชื้อ *L.casei* มีปริมาณลดลงเล็กน้อย เนื่องจากผลึกน้ำแข็งในเนื้อไอศกรีมที่สร้างขึ้นในระหว่างการปั่นไอศกรีมและหลังการแช่แข็งไอศกรีม

4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตในระหว่างการเก็บรักษา

จากการนำเอาไอศกรีมที่ผสมเม็ดช็อกโกแลตมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยนำตัวอย่างมาทำการตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทุกๆ 1 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.4.1 ปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในระหว่างการเก็บรักษา

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ (รูปที่ 4.3) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่า มีปริมาณของ *L.casei* ที่ผสมลงในเม็ดช็อกโกแลตโดยเก็บรักษาตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 ถึง สัปดาห์ที่ 4 มีค่าเท่ากับ 6.66 5.89 5.78 5.72 และ 5.59 log CFU/g ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Homayouni และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการเอ็นแคปซูเลทเชื้อ *Lactobacillus casei* (Lc-01) ใส่ลงในไอศกรีมซินไบโอติก ทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *L.casei* เท่ากับ 5.1×10^9 CFU/ml และเมื่อผ่านไป 180 วัน ปริมาณของเชื้อลดลงเหลือ 4.2×10^6 CFU/ml **และ**จากการศึกษาของ Champagne และคณะ (2015) กล่าวถึงเชื้อโพรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อถูกห่อหุ้มในเม็ดช็อกโกแลต และมีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าของเซลล์อิสระของโพรไบโอติกเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษา (-20 องศาเซลเซียส) เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกแม้จะอยู่ในช็อกโกแลต โดยการเก็บเชื้อโพรไบโอติกไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสพบว่ามีการลดลงของเชื้อน้อยที่สุดคือมีการลดลงต่ำกว่า 0.5 log



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมในไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ไม่พบเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด -ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา

จากการนำไอศกรีมที่ผสม *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตมาเก็บรักษาและทดลองสุ่มตัวอย่างเนื้อไอศกรีมมาวัดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 0 สัปดาห์ โดยมีค่าเท่ากับ 6.39 แต่ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 6.38 และ 6.37 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในเนื้อไอศกรีมนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อ *L.casei* สร้างกรดแลกติก ซึ่งผลของการทดลองสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่า เชื้อ *L.casei* มีความสามารถในการสร้างกรดแลกติดทำให้ค่ามีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น (Adams, 2014)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	6.39±0.01
1	6.39±0.01
2	6.39±0.01
3	6.38±0.01
4	6.37±0.01

หมายเหตุ* รายงานผลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.4.3 การเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดช็อกโกแลตในไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา

จากการทดลองผสม *L.casei* ลงในช็อกโกแลต จากนั้นนำมาผสมลงในไอศกรีม แล้วนำมาเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างเม็ดช็อกโกแลตมาวัดขนาดทุกๆ สัปดาห์เปรียบเทียบกับเม็ดช็อกโกแลตที่เก็บรักษา 0 สัปดาห์ พบว่าขนาดของเม็ดช็อกโกแลตที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยมีขนาดเท่ากับ 0.82 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่า การผสมเม็ดช็อกโกแลตในไอศกรีมและเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดช็อกโกแลต เนื่องมากจากช็อกโกแลตเป็นวัสดุพยุงที่มีความเสถียร จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เมื่อผสมในไอศกรีมระหว่างการแช่แข็ง

(A) (B) (C) (D) (E)

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* ระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(A) เม็ดช็อกโกแลตก่อนการผสมในไอศกรีม

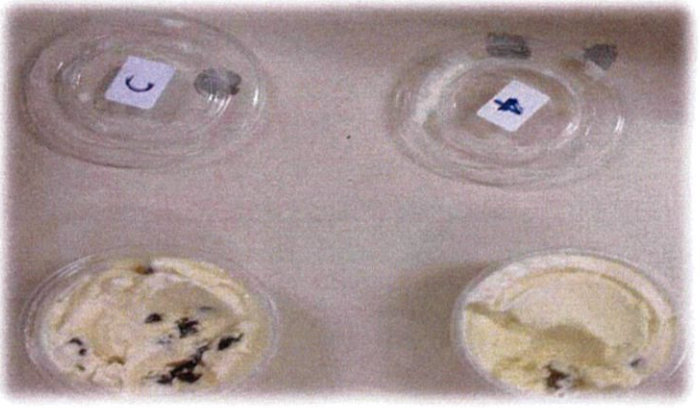
(B)-(E) เม็ดช็อกโกแลตที่การเก็บรักษา 1-4 สัปดาห์ ตามลำดับ

4.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษา

จากการนำผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดเสริมโพรไบโอติกแบคทีเรียที่เก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆไปทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีทดสอบความแตกต่าง (Difference form control test) ระหว่างตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เก็บรักษาแต่ละสัปดาห์ ทางด้านกลิ่นรส เนื้อสัมผัส ลักษณะที่ปรากฏ และสี โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้ 1 คือไม่มีความแตกต่างกัน 2 คือ แตกต่างกันเล็กน้อย และ 3 คือ แตกต่างกันมาก ซึ่งผลการทดลองพบว่า คุณลักษณะทางด้านกลิ่นรสในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 4 ค่าความแตกต่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น พบว่าในด้านกลิ่นรสเมื่อทำการเก็บรักษาที่เวลาต่างๆ มีค่าความต่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อกลิ่นรส ในด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้านเนื้อสัมผัส ในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2 มีค่าลดลงจาก 2.12 เป็น 1.92 ตามลำดับ ส่วนในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 4 ก็ยังคงมีค่าลดลงเรื่อยๆ แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส ส่วนในด้านของลักษณะที่ปรากฏ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 มีค่าลดลงเรื่อย จาก 1.52 เป็น 1.32 แต่เมื่อเก็บจนถึงสัปดาห์ที่ 4 มีค่าความแตกต่างสูงถึง 1.96 เช่นเดียวกับในด้านสีของผลิตภัณฑ์ ในสัปดาห์ที่

1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากค่าความต่างเท่ากับ 1.28 เพิ่มเป็น 2.20 แต่ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าความแตกต่างลดลงเป็น 1.44 (ตารางที่ 4.2)

จากการให้ผู้ชิมทำได้เขียนข้อเสนอแนะในแบบทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า ในด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัส ผู้ชิมได้เขียนข้อเสนอแนะว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้ว มีความแตกต่างกันในด้านกลิ่นรส อาจเนื่องมาจากบริเวณผิวและใบของมะกรูดที่ได้ผสมลงในไอศกรีมมีส่วนผสมเป็นน้ำมันหอมระเหย จึงทำให้กลิ่นนั้นจางลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ส่วนในด้านเนื้อสัมผัส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บในแต่ละสัปดาห์มีเนื้อสัมผัสที่ไม่เนียนละเอียดเหมือนชุดควบคุม ส่วนในด้านลักษณะปรากฏนั้น ผู้ชิมกล่าวว่าเมื่อเก็บไปจนถึงสัปดาห์ที่สีสามารถแยกออกอย่างชัดเจนว่า ถ้วยไหนเป็นผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษามาแล้ว 4 สัปดาห์โดยดูจากลักษณะโดยรวมของผลิตภัณฑ์ และในด้านสี ผู้ชิมให้ความเห็นว่า ระยะเวลาในการเก็บมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีเพียงเล็กน้อย ส่วนความเห็นจากผู้จัดทำโครงงาน มีความเห็นว่า เมื่อทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ตลอด 4 สัปดาห์ เนื้อไอศกรีมจะร่วนขึ้น กลิ่นรสจะจางลง ลักษณะปรากฏแตกต่างเล็กน้อยจากชุดควบคุม ส่วนสีในผลิตภัณฑ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก



รูปที่ 4.5 แสดงตัวอย่างไอศกรีมที่เปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุมกับไอศกรีมที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยของการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสไอศกรีมโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษา

สัปดาห์	คุณลักษณะคุณภาพ			
	กลิ่นรส	เนื้อสัมผัส	ลักษณะปรากฏ	สี
1	1.72±0.79	2.12±0.60	1.52±0.58	1.28±0.45
2	2.08±0.81	1.92±0.64	1.40±0.50	1.64±0.48
3	2.08±0.49	1.88±0.72	1.32±0.55	2.20±0.64
4	2.16±0.62	1.80±0.57	1.96±0.53	1.44±0.65

หมายเหตุ*** กำหนดให้ระดับคะแนนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ

1= ไม่มีความแตกต่างกัน

2 = มีความแตกต่างกันเล็กน้อย

3 = มีความแตกต่างกันมาก

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองผลิตเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 ชนิดได้แก่ *Lactobacillus casei* TISTR 390 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 พบว่า เชื้อ *L.casei* และ เชื้อ *L.plantarum* มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในเม็ดช็อกโกแลตเท่ากับ 7.46 และ7.43 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทดลองนำเอาเม็ดช็อกโกแลตที่ผสมเชื้อ *L.casei* มาผสมในไอศกรีมกลิ่นมะกรูดและศึกษาการรอดชีวิตในขั้นตอนการปั่นไอศกรีม และ หลังกระบวนการแช่แข็งไอศกรีม ผลการทดลองพบว่า การรอดชีวิตของเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตมีจำนวนลดลงทั้งในระหว่างขั้นตอนการปั่นไอศกรีม และ หลังกระบวนการแช่แข็งไอศกรีม จากการศึกษานำไอศกรีมที่ผสมโพรไบโอติกแบคทีเรียในเม็ดช็อกโกแลตไปเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า *L.casei* มีแนวโน้มลดลง โดยมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต เท่ากับ 5.59 log CFU/g ในสัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของไอศกรีมมีค่าลดลงเล็กน้อย และเม็ดช็อกโกแลตยังคงมีขนาดไม่แตกต่างจากก่อนการเก็บรักษา จากการนำไอศกรีมที่เก็บรักษาในแต่ละสัปดาห์ไปทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส พบว่าคุณลักษณะทางด้าน กลิ่นรส เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และสีของไอศกรีม มีความแตกต่างกันกับตัวอย่างควบคุม(0 สัปดาห์)

เอกสารอ้างอิง

กมลพิพัฒน์ ชนะสิทธิ์, ปรัชญา แพมงคล และณนนท์ แดงสังวาลย์. 2557. "**การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีมโยเกิร์ตเสริมว่านหางจระเข้.**" งานวิจัยได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัย. คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

กรแก้ว ตั้งศีลสุขชัย และพรรณพิชา วงศ์รัตนากรไกร. 2541. "**การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* ในอาหารเหลว.**" ปริญญานิพนธ์ วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์). กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กระทรวงสาธารณสุข. 2555. **การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร.**

ณรงค์ มูลคำ. 2553. **ปลูกผักพื้นบ้านอาหาร – ยาต้านโรค.** กรุงเทพมหานคร : Feelgood.

ณัฏฐา พรอำนาจ. 2555. **สมุนไพรใกล้ตัวสารพัดรักษาโรค.** กรุงเทพมหานคร : ยิปซีกรุ๊ป.

ดวงตะวัน ศุภาลัย. 2553. **กินสมุนไพรไกลโรค.** กรุงเทพมหานคร : อักษรเงินดี.

ทิพรักษ์ วงษาดี, อัสนี วงคาหาร และสุรีพร หงส์สีดา. 2555. "**การเหลือรอดของ *Lactobacillus acidophilus* ในโยเกิร์ตกล้วยน้ำว้าและสภาวะเลียนแบบระบบย่อยอาหาร.**" *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 43(2) : 261-264.

พวงทอง ไกรพิบูลย์. 2554. **อาหารโพรไบโอติกพรีไบโอติกและซินไบโอติก กับโรคมะเร็ง.** [Online]. Available : http://portal.in.th/thastro.org/pages/14223 (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

พิลาวัลย์ ไชยมีสุข และบวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2558. "**การเหลือรอดของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ในไอศกรีมข้าวกล้องมันปู.**" โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 34. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2555. **โพรไบโอติก.** [Online]. Available : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0780/probiotic (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

ปาลิดา ตั้งอนุรัตน์. 2556. "**รายงานวิจัยเรื่องผลของกากใยส้มต่อคุณภาพและการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง.**" โครงการวิจัยได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

รัฐสรณ์ ดุลยเภรี และบวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2555. "**การผลิตไอศกรีมเผือกหอมเสริมโปรไบโอติก.**" ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 13. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สิรสา สุมงคล. 2555. "**การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว.**" ปริญญานิพนธ์ วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. เอกสารอัดสำเนา

Abghari, A., Sheikh-Zeinoddin, M., and Soleimanian-Zad, S. (2011). "**Nonfermented ice cream as a carrier for Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus rhamnosus**". *International Journal of Food Science and Technology*. 46 : 84-92.

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., and Corti, S. (2005). "**Effects of Lactobacillus rhamnosus GG addition in ice cream.**" *International Journal of Dairy Technology*. 58 : 200-206.

Arbuckle, W. S. 1977. Ice cream third edition. Connecticut: AVI.

Bergey, D. H., F. C. Harrison, R. S. Breed, B. W. Hammer, and F. M. Huntoon (ed). 1923. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 1st ed. The Williams & Wilkins Co : Baltimore.

Adams, C. 2014. **Probiotics - Protection Against Infection**. [Online]. Available: http://www.probiotic.org.(สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

Champagne, C. P., Yves, R., Guertin, N,. and Belanger, G. 2015. "**Effects of Storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the Stability of probiotic bacteria in ice cream.**" *International Dairy Journal*. 47 : 109-117.

Hansen and Lessel.1971. ***Lactobacillus casei.*** [Online]. Available : https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacilluscasei. (สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

Haynes, I. N., and Playne, M. J. (2002). "**Survival of probiotic cultures in low-fat Ice cream**". *Australian Journal of Dairy Technology*. 57 : 10-14.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., and Razavi, S. H. (2008). "**Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream.**" *Food Chemistry*. 111 : 50-55.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003). "**Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt.**" *International Dairy Journal* . 13(1) : 3-13.

Nualkaekul, S., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V., Charalampopoulos, D. 2013.

"Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices." *Food Research International.* 53 : 304 – 311.

Priscilla Diniz Lima da Silva , Maria de Fátima Bezerra , Karina Maria Olbrich dos Santos and Roberta Targino Pinto Correia. 2014. "**Potentially probiotic ice cream from goat's milk:Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions.**" *LWT - Food Science and Technology*. 62 : 452-457.

Ranadheera, C.S., Evans, C.A., Adams, M.C. and Bainesc, S.K. 2012. "**Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality.**" *Small Ruminant Research*. 112 : 174-180.

Sathyabama, S., Ranjith kumar, M., Bruntha devi, P., Vijayabharathi, R. and Brindha priyadharisini, V. 2014. "**Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment.**" *LWT - Food Science and Technology*. 57 : 419-425.

http://www.bloggang.com/data/vinitsiri/picture/1331476722.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

https://c1.staticflickr.com/9/8084/8344600413_0dd3a38dba.jpg (สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

http://ed.filesmedia.com/ud/attachment/forum/201302/03/155656pyggspz6pkm65d35.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

www.everything-ain.blogspot.com (สืบค้นวันที่ 24 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558)

http://www.decodingdelicious.com/strawberry-basil-ice%20cream/%20com (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

http://www.hdwallpaperup.com/2015/01/chocolate-ice-cream/ (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

www.greenclinic.in.th (สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

https://microbewiki.kenyon.edu/images/0/00/LP.jpg (สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2558)

http://th.openrice.com/UserPhoto/Article/0/A/00024N3981E0A278CE3724j.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

http://www.saisawankhayanying.com/wp-content/uploads/2014/06/DSCN0577.jpg , (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม2558)

http://www.scottbrothers.com/img/soft-serve.jpg (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

http://static.naewna.com/uploads/userfiles/images/COE@Sep15_Coe2.jpg?t=1467331200055 (สืบค้นวันที่ 10 ธันวาคม 2558)

www.student.nu.ac.th (สืบค้นเมื่อ 13 ธันวาคม 2558)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man Rogosa and Sharpe (MRS)

วิธีการ

1.1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth แบบสำเร็จรูปซึ่งประกอบไปด้วย Proteose peptone ,Beef extract, Yeast extract, Dextrose, Polysorbate 80, Ammonium citrate, Sodium acetate, Magnesium sulphate, Manganese sulphatec และ Dipotassium phosphate ใส่ปริมาณ 55.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ละลายให้เข้ากันหลังจากนั้นนำ MRS broth ที่เตรียมเขากันแล้วไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

ทำการเตรียมเหมือนทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth แต่ก่อนที่จะละลายให้เข้ากัน ให้เติมวุ้นเข้าไป 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ลงไปก่อน แล้วจึงจะละลายให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

วิธีการ

สาระละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ : ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมจนโซเดียมคลอไรด์ละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต
ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆ

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ..... อายุ.....

ท่านชอบทานไอศกรีมหรือไม่.....ทานบ่อยแค่ไหน.....

ตัวอย่างที่ท่านได้รับนี้เป็นผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรุณาชิมตัวอย่างไอศกรีมดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วให้คะแนนตามความแตกต่างของไอศกรีมในด้านต่างๆ ตามที่กำหนดไว้ โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

1 = ไม่แตกต่างกัน

2 = แตกต่างกันเล็กน้อย

3 = แตกต่างกันมาก

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	เนื้อสัมผัส	กลิ่นรส	สี
01				

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆ

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ..... อายุ.....

ท่านชอบทานไอศกรีมหรือไม่.....ทานบ่อยแค่ไหน.....

ตัวอย่างที่ท่านได้รับนี้เป็นผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กรุณาชิมตัวอย่างไอศกรีมดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วให้คะแนนตามความแตกต่างของไอศกรีมในด้านต่างๆ ตามที่กำหนดไว้ โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

1 = ไม่แตกต่างกัน

2 = แตกต่างกันเล็กน้อย

3 = แตกต่างกันมาก

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	เนื้อสัมผัส	กลิ่นรส	สี
02				

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆ

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ..... อายุ.....

ท่านชอบทานไอศกรีมหรือไม่.....ทานบ่อยแค่ไหน.....

ตัวอย่างที่ท่านได้รับนี้เป็นผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ กรุณาชิมตัวอย่างไอศกรีมดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วให้คะแนนตามความแตกต่างของไอศกรีมในด้านต่างๆ ตามที่กำหนดไว้ โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

1 = ไม่แตกต่างกัน

2 = แตกต่างกันเล็กน้อย

3 = แตกต่างกันมาก

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	เนื้อสัมผัส	กลิ่นรส	สี
03				

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆ

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ..... อายุ.....

ท่านชอบทานไอศกรีมหรือไม่.....ทานบ่อยแค่ไหน.....

ตัวอย่างที่ท่านได้รับนี้เป็นผลิตภัณฑ์ไอศกรีมกลิ่นมะกรูดที่ผสมจุลินทรีย์โพรไบโอติกในช็อกโกแลต ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กรุณาชิมตัวอย่างไอศกรีมดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แล้วให้คะแนนตามความแตกต่างของไอศกรีมในด้านต่างๆ ตามที่กำหนดไว้ โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

1 = ไม่แตกต่างกัน

2 = แตกต่างกันเล็กน้อย

3 = แตกต่างกันมาก

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	เนื้อสัมผัส	กลิ่นรส	สี
04				

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ภาคผนวก ง

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ ง1 แสดงข้อมูลจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นก่อนและหลังกระบวนการผสมลงในเม็ดช็อกโกแลต

	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต			
	ก่อนกระบวนการผสม (CFU/ml)	**ซ้ำที่**	หลังกระบวนการผสม (CFU/g)	**เฉลี่ย**
Lactobacillus plantarum	5.3×10^{8}	1 2 3	2.8×10^{7} 2.5×10^{7} 2.8×10^{7}	2.7×10^{7}
Lactobacillus casei	5.8×10^{8}	1 2 3	3.1×10^{7} 2.8×10^{7} 2.8×10^{7}	2.9×10^{7}

ตารางที่ ง2 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตก่อนผสมลงในไอศกรีมระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม และหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)			
	ซ้ำที่	ก่อนผสมในไอศกรีม	ระหว่างปั่นไอศกรีม	หลังการแช่แข็งไอศกรีม
Lactobacillus casei	1	5.1×10^{7}	2.9×10^{7}	4.6×10^{6}
	2	5.0×10^{7}	2.9×10^{7}	4.6×10^{6}
	3	4.9×10^{7}	3.1×10^{7}	4.4×10^{6}

ตารางที่ ง3 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเม็ดช็อกโกแลตระหว่างการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)	ซ้ำที่	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	เฉลี่ย
0	1 2 3	4.6×10^6 4.6×10^6 4.4×10^6	4.5×10^6
1	1 2 3	9.1×10^5 8.3×10^5 6.0×10^5	7.8×10^5
2	1 2 3	6.1×10^5 6.3×10^5 5.7×10^5	6.0×10^5
3	1 2 3	4.7×10^5 5.7×10^5 5.7×10^5	5.3×10^5
4	1 2 3	3.6×10^5 3.5×10^5 4.2×10^5	3.8×10^5

ตารางที่ ง4 แสดงปริมาณเชื้อ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมกลิ่นมะกรูดลงระหว่างกระบวนการปั่นไอศกรีม และหลังการแช่แข็งไอศกรีมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)		
	ซ้ำที่	ระหว่างปั่นไอศกรีม	หลังการแช่แข็งไอศกรีม
Lactobacillus casei	1	1.0×10^1	1.0×10^1
	2	2.0×10^1	0
	3	1.0×10^1	0

ตารางที่ ง5 แสดงปริมาณการรอดชีวิตของ *L.casei* ในเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0

ตารางที่ ง6 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อไอศกรีมระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

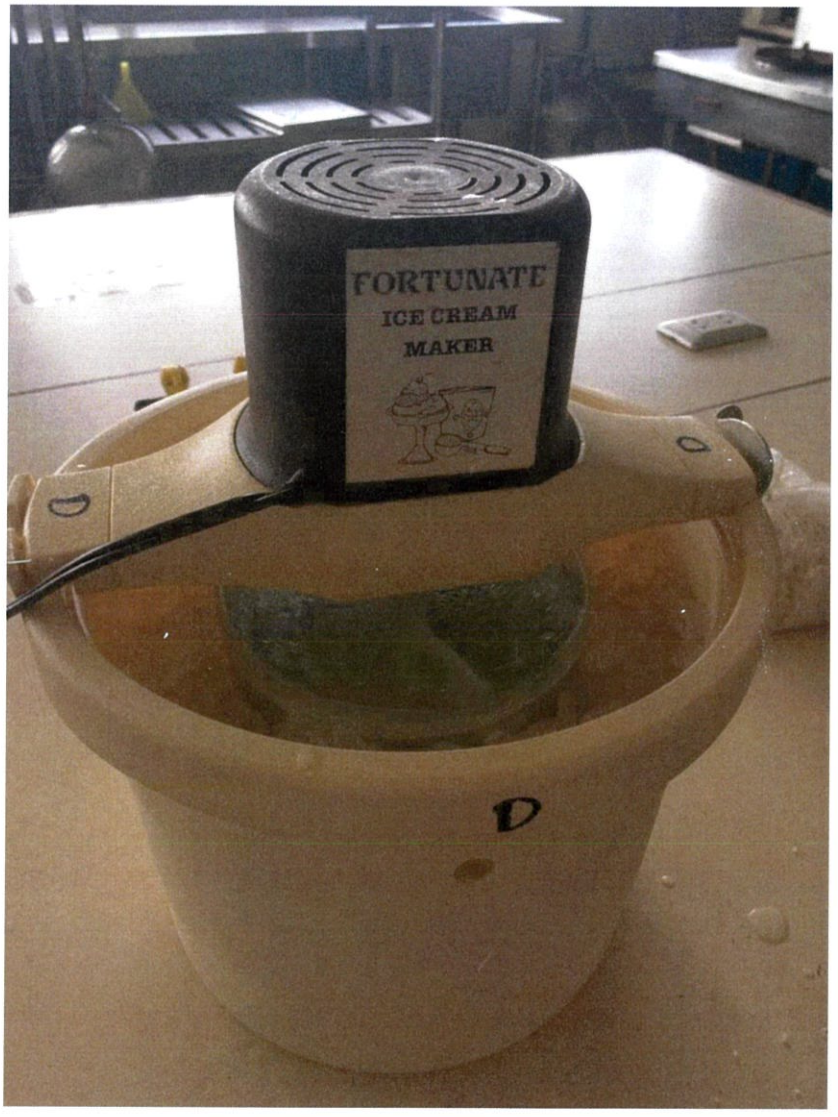
ระยะเวลาการเก็บรักษา(สัปดาห์)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	6.39±0.01
1	6.39±0.01
2	6.39±0.01
3	6.38±0.01
4	6.37±0.01

ตารางที่ ง7 แสดงขนาดของเม็ดช็อกโกแลต วัดทันทีก่อนการผสมในไอศกรีมและระหว่างการเก็บรักษาไอศกรีมตลอด 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สัปดาห์	ขนาดเม็ดช็อคโกแลต (มิลลิเมตร)
0	0.82
1	0.82
2	0.82
3	0.82
4	0.82

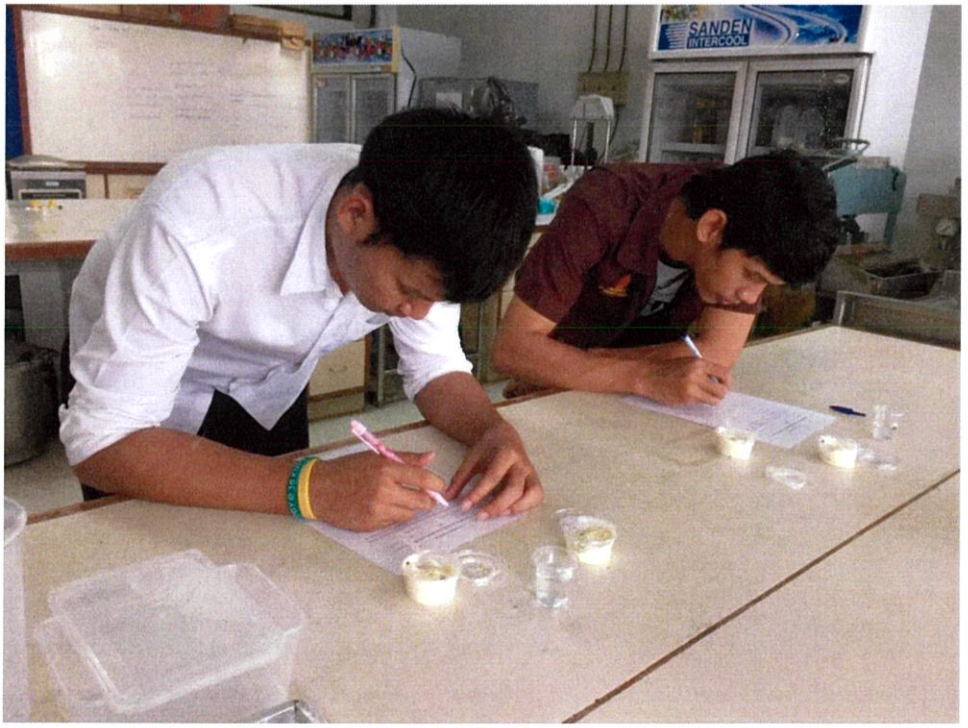
ภาคผนวก จ

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยและการทดสอบทางประสาทสัมผัส



รูปที่ จ1 ถังปั่นไอศกรีมขณะกำลังปั่นส่วนผสมของไอศกรีมกลิ่นมะกรูด

รูปที่ จ2 แสดงการทดสอบทางประสาทสัมผัส



รูปที่ จ3 แสดงการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ภาคผนวก ฉ

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๔๖) พ.ศ.๒๕๕๕ เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ ๒)

ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารอย่างแพร่หลาย ดังนั้นเพื่อให้การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารเป็นไปอย่างถูกต้องเหมาะสม และปลอดภัยต่อการบริโภค กระทรวงสาธารณสุข โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จึงได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๔๖) พ.ศ.๒๕๕๕ เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร (ฉบับที่ ๒) ซึ่งมีสาระสำคัญสรุปได้ดังนี้

๑. กำหนดความหมายของคำว่า *"จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic)"* ซึ่งสรุปได้ว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติก นั้นหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งใช้ในอาหาร และจะเกิดผลต่อสุขภาพก็ต่อเมื่อผู้บริโภคได้รับในปริมาณที่เพียงพอ

๒. กำหนดจุลินทรีย์ที่ไม่เข้าข่ายคำว่า *"จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic)"* ตามข้อ ๑ ไว้ เช่นจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารชีวบำบัด (biotherapeutic agents) จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ที่ไม่ใช้ในอาหาร จุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Microorganism, GMM) และจุลินทรีย์ตามที่กำหนดไว้ในบัญชีแนบท้ายประกาศฯ ที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นตามความจำเป็นในกระบวนการผลิตอาหารและได้ปฏิบัติตามประกาศว่าด้วยเรื่องนั้นๆ แล้ว

๓. กำหนดเงื่อนไขอาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องเป็นดังนี้

๓.๑ ได้รับอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาก่อน

๓.๒ มีปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิตอยู่ คงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 106 CFU ต่ออาหาร ๑ กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น กรณีที่มีการใช้จุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิด จุลินทรีย์โพรไบโอติกตามความหมายในประกาศนี้ ต้องมีปริมาณคงเหลืออยู่ไม่น้อยกว่า 106 CFU ต่ออาหาร ๑ กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้นด้วย

๓.๓ ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกตามรายชื่อในบัญชีแนบท้ายประกาศฯ กรณีที่ต้องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกชนิดอื่นนอกเหนือจากที่กำหนดไว้ในบัญชีแนบท้ายประกาศฯ ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องยื่นหลักฐานแสดงผลการประเมินความปลอดภัย และคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ตามหลักการใน Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for

the Evaluation of Probiotics in Food, ปี ค.ศ.๒๐๐๒ พร้อมรายละเอียดข้อมูลประกอบการยื่นขออนุญาต ดังนี้

(๑) การบ่งชี้เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

(๒) การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก

(๓) การประเมินความปลอดภัยของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัย และปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

๔. กำหนดความหมายของ *"การกล่าวอ้างทางสุขภาพ (Health Claim)"* ซึ่งตามประกาศนี้หมายความว่า การแสดงรูป รูปภาพ รอยประดิษฐ์ เครื่องหมาย เครื่องหมายการค้า หรือข้อความใดๆ บนฉลากที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ส่วนประกอบของอาหาร หรือสารอาหาร ซึ่งเกี่ยวข้องกับสุขภาพทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยแบ่งเป็น ๓ ลักษณะ ได้แก่ การกล่าวอ้างหน้าที่สารอาหาร การกล่าวอ้างหน้าที่อื่น และการกล่าวอ้างการลดความเสี่ยงของการเกิดโรค

๕. กำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไข ในการขออนุญาตแสดงการกล่าวอ้างทางสุขภาพ ดังนี้

๕.๑ ต้องแจ้งรายละเอียดของอาหารและส่วนประกอบของอาหารในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการกล่าวอ้างนั้นให้ครบถ้วนและเพียงพอ และต้องส่งมอบผลการศึกษาในมนุษย์ ที่มีการออกแบบการศึกษาอย่างดีมีจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสม และมีผลการศึกษาชัดเจนเพียงพอพอที่จะพิจารณาประสิทธิผลของสายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกหรืออาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก จำนวนอย่างน้อย ๒ ฉบับ ที่ทำการศึกษาจากต่างสถาบัน เพื่อประกอบการพิจารณาประสิทธิผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อสุขภาพ

๕.๒ การกล่าวอ้างทางสุขภาพนั้นต้องสามารถพิสูจน์ตามหลักการทางวิทยาศาสตร์

๕.๓ เงื่อนไขการแสดงการกล่าวอ้างทางสุขภาพบนฉลาก ซึ่งต้องแสดงข้อมูลต่างๆ เช่น สกุล (Genus) และชนิด (Species) ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เป็นส่วนผสม สำหรับสายพันธุ์ (Strain) ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เป็นส่วนผสม ถ้ามีก็ต้องแสดงด้วย และข้อความคำเตือนว่า "ผลิตภัณฑ์นี้ไม่ใช้สำหรับรักษาบำบัด บรรเทา หรือป้องกันโรค"

๖. การแสดงฉลากของอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกนอกเหนือจากประกาศฉบับนี้ต้องปฏิบัติให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่เกี่ยวข้อง เช่น ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลากประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลากโภชนาการ และประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องของอาหารนั้น

๗. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร มีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ ๔ สิงหาคม พ.ศ.๒๕๕๔ และประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ.๒๕๕๕

๘. ผู้ประกอบการที่ได้รับอนุญาตผลิตหรือนำเข้าอาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกไว้ก่อนวันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ.๒๕๕๕ ต้องปฏิบัติให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุขทั้ง ๒ ฉบับดังกล่าวข้างต้น ภายในวันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ.๒๕๕๖

๙. ผู้ประกอบการที่ไม่ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขทั้ง ๒ ฉบับดังกล่าวข้างต้น

เป็นการฝ่าฝืนประกาศฯ ซึ่งออกตามมาตรา ๖(๔)(๕) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.๒๕๒๒ มีโทษปรับไม่เกิน ๒๐,๐๐๐ บาท และตามมาตรา ๖(๑๐) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.๒๕๒๒ มีโทษปรับไม่เกิน ๓๐,๐๐๐ บาท

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจึงขอประกาศให้ทราบโดยทั่วกัน และขอให้ผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขดังกล่าวโดยเคร่งครัด และหากมีข้อสงสัยประการใด ติดต่อสอบถามได้ที่สำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โทรศัพท์ ๐๒-๕๙๐-๗๑๗๙ และ ๐๒-๕๙๐-๗๔๐๘ ในเวลาราชการ

ประกาศ ณ วันที่ ๕ เมษายน ๒๕๕๖

บุญชัย สมบูรณ์สุข
(นายบุญชัย สมบูรณ์สุข)
เลขาธิการคณะกรรมการอาหารและยา

รับรองสำเนาถูกต้อง
วารุณี เสนสุภา
(นางสาววารุณี เสนสุภา)
นักวิชาการอาหารและยาเชี่ยวชาญ ด้านมาตรฐานอาหาร