ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อการเหลือรอดของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

Effects of Probiotic Microorganisms on Survivability of *Listeria monocytogenes* in Kefir Product

จินตพร ชนม์นิภา ดิเรกโภค (Chintaporn Chonnipa Direkpok)* ดร.บวรศักดิ์ ลีนานนท์ (Dr.Borwonsak Leenanon)**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอร์ และผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกการเหลือรอดของ *Listeria monocytogenes* ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เริ่มจากการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้น (*Lactobacillus casei* : *Saccharomyces cerevisiae* = 1:1) โดยแปรที่ระดับ 2%, 3% และ 4% (v/v) ในการหมักผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2% (v/v) มีความเหมาะสม เพราะใช้เวลาในการหมัก 16 ชั่วโมง จนค่าพีเอชลดลงถึง 4.6-4.8 ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าพีเอชที่ใช้ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3% และ 4% (v/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และลักษณะเคิร์ดที่ได้เป็นที่ยอมรับ จากนั้นศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อการเหลือรอดของ *L. monocytogenes* ที่ได้จำลองปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อที่ระดับ 2, 3 และ 4 log CFU/mL ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ พบว่าเชื้อโปรไบโอติกมีผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ABSTRACT

This research was aimed to determine the suitable amount of initial starter for kefir production and the effects of probiotic microorganisms on survival of *Listeria monocytogenes* during product storage. First, the amounts of initial starter (*Lactobacillus casei* : *Saccharomyces cerevisiae* = 1:1) were varied at 2%, 3% and 4% (v/v) for kefir fermentation. It was found that 2% initial starter was appropriate because it took 16 hours of fermentation with a decrease of pH to 4.6-4.8 which was not significantly different from the ones using 3% and 4% levels and the curd was also acceptable. Then, the effects of probiotic microorganisms on the survival of *L. monocytogenes* with the artificial contamination at 2, 3 and 4 log CFU/ mL during storage of products at 4 °C were investigated and it was revealed that probiotic microorganisms significantly had the effect on a decrease in *Listeria monocytogenes* numbers ($p\leq0.05$).

คำสำคัญ: โปรไบโอติก ลิสทีเรียโมโนไซโตจีเนส คีเฟอร์

Keywords: Probiotics, *Listeria monocytogenes*, Kefir

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

เชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน น้ำ อาหาร และสิ่งปฏิกูล รวมไปถึงระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นในกระบวนการผลิตอาหารจึงอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้หากไม่มีการควบคุมการผลิตที่ดี โดยมักพบการปนเปื้อนและการระบาดของ *L. monocytogenes* ในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่างๆ (Center for disease control [CDC], 2017) ด้วยเหตุนี้ จึงมีโอกาสสูงที่จะพบการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น คีเฟอร์ (Kefir) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักแบบดั้งเดิมชนิดหนึ่ง ที่มีการบริโภคมานานแล้วและยังคงได้รับความนิยม เพราะมีประโยชน์ต่อสุขภาพเนื่องจากเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิต โดยคีเฟอร์เกิดจากการหมักน้ำนมด้วยเม็ดคีเฟอร์ (Kefir grains) ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่มีประโยชน์ เช่น *Lactobacillus casei* และ *Saccharomyces cerevisiae* (The Food and Drug Administration [FDA], 2013) แบคทีเรียแลคติกถูกจัดเป็นโปรไบโอติก ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ทนต่อกรดและด่าง สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแล็กโทส (lactose) ให้เกิดกรดแลคติก (lactic acid) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สำหรับยีสต์จะทำหน้าที่หมักน้ำตาลแลคโตสได้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ ทำให้ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีส่วนประกอบของแอลกอฮอล์อยู่ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการมีจุลินทรีย์โปรไบโอติก 2 ชนิด ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่ผลิตได้ น่าจะมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ และศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อการเหลือรอดของแบคทีเรียก่อโรคในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

วิธีการวิจัย

ขั้นตอนการผลิตคีเฟอร์ (พิชัย, 2557)

น้ำนมโคดิบ + น้ำตาลซูโครส 0.45%
↓
พาสเจอร์ไรซ์ 92±1 °ซ เป็นเวลา 15 นาที
↓
ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 22±1 °ซ
↓
เติม Starter culture
Lactobacillus casei : *Saccharomyces cerevisiae* อัตราส่วน 1:1
↓
หมักที่อุณหภูมิ 22±1 °ซ นาน 16 ชั่วโมง จนมีค่า pH 4.6-4.8
↓
ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 9±1 °ซ จนมีค่า pH 4.5
↓
เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 21 วัน

รูปที่ 1 ขั้นตอนการผลิตคีเฟอร์

1. ศึกษาระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

1.1 นำน้ำนมโคดิบมาเติมน้ำตาลซูโครส 0.45% โดยน้ำหนัก พาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 92±1 °ซ ด้วยหม้อไฟฟ้านาน 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วบนถังน้ำแข็งจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 22±1 °ซ

1.2 นำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก (*L. casei* TISTR 453) และเชื้อยีสต์โปรไบโอติก (*S. cerevisiae* Hansen TISTR 5011) เติมลงในน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอไรส์แล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นซึ่งเป็นเชื้อผสมระหว่าง เชื้อ *L. casei* และ *S. cerevisiae* ในอัตราส่วน 1:1 ที่ระดับ 2% 3% และ 4% โดยปริมาตร

1.3 นำไปหมักที่อุณหภูมิ 22±1 °ซ ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ (Incubator) แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จนกระทั่งได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงอยู่ในช่วง 4.6-4.8 พร้อมทั้งสังเกตการเกิดเคิร์ดของคีเฟอร์ ที่มีลักษณะอ่อนเหลวไม่มีการแยกชั้นของเวย์ (Syneresis) เพื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอร์

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทรีตเมนต์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2. ศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

2.1 นำน้ำนมโคดิบมาเติมน้ำตาลซูโครส 0.45% โดยน้ำหนัก พาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 92±1 °ซ ด้วยหม้อไฟฟ้านาน 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วบนถังน้ำแข็งจนมีอุณหภูมิเท่ากับ 22±1 °ซ

2.2 นำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *L. casei* และเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มาเติมลงในน้ำนมที่ผ่านการพาสเจอไรส์แล้วปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยเลือกใช้เปอร์เซ็นต์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 1.3 มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

2.3 นำไปหมักที่อุณหภูมิ 22±1 °ซ ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ (Incubator) นาน 16 ชั่วโมง จนกระทั่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงอยู่ในช่วง 4.6-4.8 จากนั้นลดอุณหภูมิลงมาที่ 9±1 °ซ ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ (Incubator) จนกระทั่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.5

2.4 จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (*L. monocytogenes* DMST 17303) ที่ระดับปริมาณเชื้อ 2, 3 และ 4 log CFU/mL เพื่อจำลองการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

2.5 เก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4±1 °ซ เป็นเวลา 21 วัน โดยในระหว่างการเก็บรักษาจะสุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 7, 14 และ 21 วัน เพื่อตรวจนับจำนวน *L. casei*, *S. cerevisiae* และ *L. monocytogenes* โดยใช้เทคนิคการ Pour plate บนอาหาร MRS agar, PDA agar และ PALCAM agar ตามลำดับ จากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37, 30 และ 37 °ซ ตามลำดับ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x2 Factorial Experimental in Completely Randomized Design ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา คือ ปริมาณเชื้อก่อโรค *L. monocytogenes* เริ่มต้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับและสภาวะที่มีและไม่มีเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์คอมบิเนชั่นโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test และทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. ระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

1.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคีเฟอร์ที่เวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22 °ซ ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) แตกต่างกัน

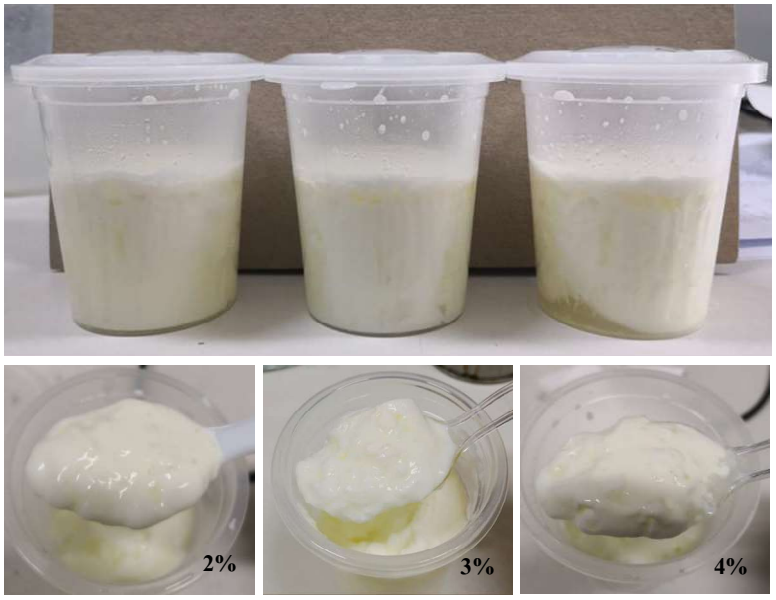
ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคีเฟอร์ที่เวลา 16 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 22 °ซ

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (v/v)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
2%	$4.88^{a}\pm0.01$
3%	$4.84^{a}\pm0.01$
4%	$4.79^{b}\pm0.01$

a, b.. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความหมายแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 1 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคีเฟอร์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ร้อยละ 2 และ 3 โดยปริมาตร เมื่อใช้เวลา 16 ชั่วโมงเท่ากัน จะลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไปที่ 4.88 และ 4.84 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 4.6- 4.8 ขณะที่ตัวอย่างคีเฟอร์ที่มีเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 4.79 ที่เวลา 16 ชั่วโมง ของการหมักที่อุณหภูมิ 22 °ซ

1.2 ลักษณะเคิร์ดของคีเฟอร์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 22 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ลักษณะเคิร์ดของคีเฟอร์ เมื่อหมักโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 22 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

รูปที่ 2 แสดงลักษณะเคิร์ดของคีเฟอร์ที่หมักด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้น (starter culture) ร้อยละ 2, 3 และ 4 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 22 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างคีเฟอร์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร มีการแยกชั้นของเวย์ (syneresis) อย่างชัดเจน แต่ตัวอย่างคีเฟอร์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร มี

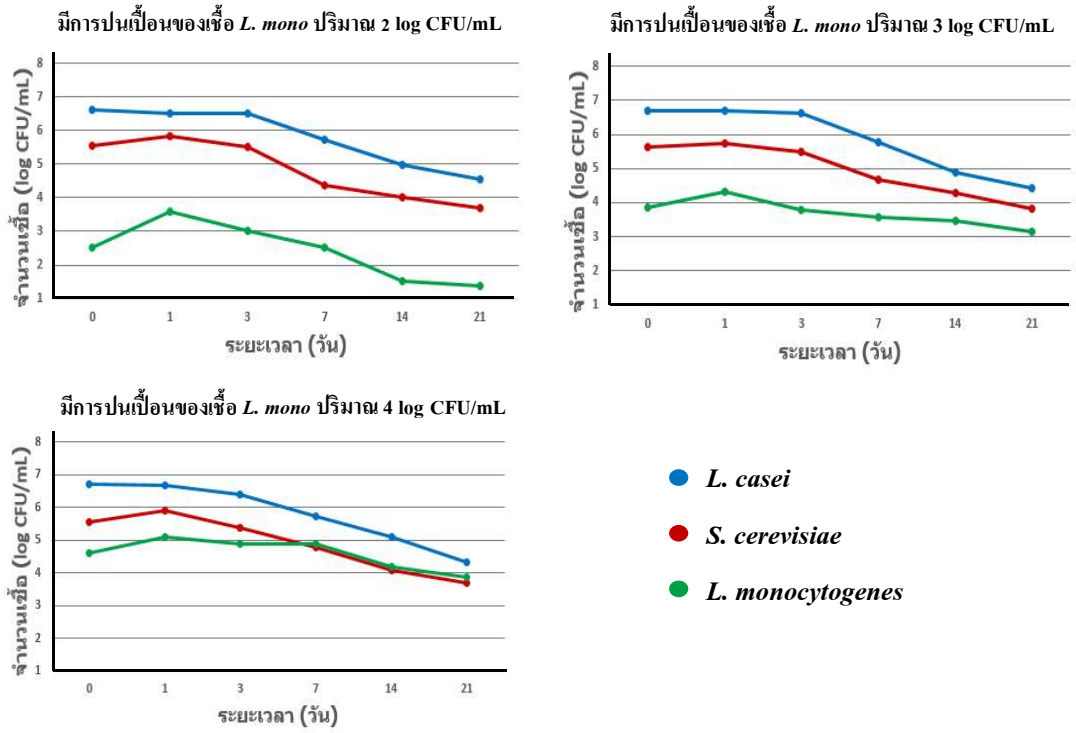
การแยกชั้นของเวย์ (syneresis) น้อยกว่า และเคิร์ดมีลักษณะอ่อนเหลวกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร

จากผลการวิจัย การผลิตคีเฟอร์ที่มีการแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับร้อยละ 2, 3 และ 4 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 22 °ซ พบว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลง โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคีเฟอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาการหมัก 16 ชั่วโมง แต่ทั้งนี้พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2, 3 และ 4 โดยปริมาตร ใช้เวลา 16 ชั่วโมงเท่ากัน ในการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้อยู่ในช่วง 4.6 -4.8 เมื่อพิจารณาลักษณะเคิร์ดของคีเฟอร์ควบคู่กับการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่า ตัวอย่างคีเฟอร์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เคิร์ดที่ได้มีลักษณะอ่อนเหลวกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มากกว่า และลักษณะเคิร์ดที่ได้เป็นที่ยอมรับโดยมีการแยกชั้นของเวย์ (syneresis) น้อยกว่าเคิร์ดที่ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร ดังนั้นการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

2. ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน

จากรูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติก 2 ชนิด ได้แก่ *L. casei* และ *S. cerevisiae* และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน โดยมีการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 7, 14 และ 21 วัน แล้วนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ (selective media) โดยเทคนิค spread plate



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* ปริมาณแตกต่างกัน ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน

จากรูปที่ 3 พบว่าที่เวลา 0 วัน เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด คือ *L. casei* และ *S. cerevisiae* มีปริมาณเชื้อ 6.7 และ 5.6 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ตามลำดับ และเชื้อ *L. monocytogenes* มีปริมาณเชื้อ 2.5, 3.9 และ 4.6 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ในระหว่างการเก็บรักษา 1 วัน เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย แต่พบว่าเชื้อ *L. monocytogenes* มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 0.5-1.0 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) หลังจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ 1 วัน เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด จะมีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่อง และพบว่าในวันที่ 21 เชื้อโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณเชื้อ 4.2-4.4 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) และ 3.6-3.8 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ตามลำดับ ซึ่งเชื้อจะลดลง 1-2 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) จากวันแรกของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ เช่นเดียวกับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องและลดลงไป 0.9 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) จากวันแรกของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน จากงานวิจัยของ Gahan et al. (1996) ที่ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ปริมาณ 5 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ลงไปในผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.17 พบว่าเชื้อ *L. monocytogenes* จะมีปริมาณลดลงและ ลดลงมากกว่า 3 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL)

2.2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน

ศึกษาปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* กลุ่มควบคุม และ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่มีเชื้อเริ่มต้น (starter culture) หรือจุลินทรีย์โปรไบโอติกร่วมอยู่ด้วย ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่มีการแปรปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* เริ่มต้นเป็น 3 ระดับ หลังสิ้นสุดเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 21 วัน

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* หลังสิ้นสุดเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน

ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ปนเปื้อนเริ่มต้น (log CFU/mL)	**ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เวลา 21 วัน (log CFU/mL)**	
	***L. monocytogenes* (Control)**	***L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์**
2.64	$4.37^{c}\pm0.02$	$1.32^{f}\pm0.20$
3.82	$5.33^{b}\pm0.01$	$3.14^{e}\pm0.10$
4.71	$6.06^{a}\pm0.03$	$3.87^{d}\pm0.06$

a-d ในคอลัมน์และแถว..ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 2 ศึกษาปริมาณของเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ในกลุ่มควบคุม ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ที่ระดับการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* เริ่มต้นเท่ากัน ปริมาณ *L. monocytogenes* ในคีเฟอร์กับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และพบว่าปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* กลุ่มควบคุม มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากระดับการปนเปื้อนเริ่มต้นประมาณ 1.5 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ซึ่งปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ มีปริมาณเชื้อลดลงจากระดับการปนเปื้อนเริ่มต้นประมาณ 0.9 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ซึ่งปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และงานวิจัยของ Ryser, Marth (2007) ได้ศึกษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* หลังกระบวนการหมักโยเกิร์ต ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* จะเจอกับสภาวะกรดอย่างเฉียบพลัน (Acid shock) โดยพบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 วัน ส่งผลให้เชื้อ *L. monocytogenes* มีปริมาณลดลง 3 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL)

จากผลการวิจัยในช่วงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ ซึ่งผลิตภัณฑ์เกิดการหมักจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 4.6 -4.8 จากนั้นจึงจำลองการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือ *L. monocytogenes* ในระดับปริมาณแตกต่างกันลงสู่ผลิตภัณฑ์ในช่วงการบรรจุคีเฟอร์ลงในบรรจุภัณฑ์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 21 วัน พบว่าในช่วง 1 วันของการเก็บรักษา เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น แต่หลังจากวันที่ 1 ของการเก็บรักษาพบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณเชื้อค่อยๆลดลง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด ที่นำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นมีการสร้างกรด แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และแอลกอฮอล์ ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และกรดที่สร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นก็จะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อโปรไบโอติกด้วย ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคีเฟอร์จะลดลงไปที่ 4.53-4.47 ใน 1 วัน และจะลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมหมักที่อุณหภูมิ 4 °ซ (Katsiari et al., 2002; Koktas et al., 2013) และพบว่าการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกนั้นจะเกิดขึ้นได้ช้าลงในกรณีที่มีเชื้อยีสต์ร่วมอยู่ด้วย (Collar, 1996) จึงทำให้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อเวลาการเก็บเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าเชื้อก่อโรค *L. monocytogenes* มีจำนวนเชื้อลดลง 0.9 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) ที่เวลาการเก็บ 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อปนเปื้อนเริ่มต้นและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* กลุ่มควบคุมกับ *L. monocytogenes* กลุ่มที่มีเชื้อโปรไบโอติกร่วมอยู่ด้วย พบว่าเชื้อโปรไบโอติกมีผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ทั้งนี้การเพิ่มจำนวนของ *L. monocytogenes* ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (psychrotrophic pathogen) ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถดำรงชีพและเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0-45 °ซ แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 °ซ (Leimeister-Wächter et al., 1992) และแม้ว่า *L. monocytogenes* จะสามารถทนกรดได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 4.5-4.6 (Koutsoumanis et al., 2003) ซึ่งการปนเปื้อนลงในคีเฟอร์ยังอยู่ในช่วงที่คีเฟอร์ยังมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ที่ 4.6 -4.8 ทำให้ *L. monocytogenes* ยังสามารถเจริญได้ในช่วงแรกของการปนเปื้อน

โปรไบโอติกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. และอื่นๆ (Haris et al., 1989; Chateau et al., 1993) การยับยั้งนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก เช่น *L. casei* ปริมาณกรดที่เพิ่มมากขึ้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* เนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตสารยับยั้ง เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) หรือกรดอินทรีย์ (Zubillaga et al., 2001) สำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) จะทำให้เกิดรูรั่วที่ผนังเซลล์ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย มีผลต่อสมดุลการเข้าออกของสารภายในเซลล์ (Delesa, 2017) การทำงานของแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ร่วมกับปัจจัยอื่นๆที่ก่อให้เกิดความเครียดจะเสริมประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารได้ดียิ่งขึ้น (Pal et al., 2015) โดยแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) จากแบคทีเรียแลคติก ส่วนผลของแอลกอฮอล์ต่อ *L. monocytogenes* ยังไม่ได้รับการยืนยันที่แน่ชัด แต่

แอลกอฮอล์มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ในส่วนที่เป็นลิปิด และการสูญเสียโครงสร้างของผนังเซลล์มีผลให้การซึมผ่านของโปรตอนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อกิจกรรมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Wan et al., 2002)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เหมาะสมต่อการหมักผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ เพราะใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นน้อยกว่า และใช้เวลาในการหมักผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ 16 ชั่วโมง จนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลงเป็น 4.6-4.8 เท่ากับการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร และลักษณะเคิร์ดของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่ผลิตจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นที่ยอมรับโดยมีการแยกชั้นของเวย์ (syneresis) น้อยกว่าเคิร์ดที่ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 3 และ 4 โดยปริมาตร นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 0.9 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) และในกลุ่มควบคุมมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 1.5 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร (log CFU/mL) โดยปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีผลต่อการลดลงของปริมาณเชื้อก่อโรค *L. monocytogenes*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. บวรศักดิ์ ลีนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัยด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาขั้นสูง ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

พิชัย สัมดี. การผลิตผลิตภัณฑ์คีเฟอร์เสริมโปรไบโอติก [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2557.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* (Listeriosis) [online] 2017 [cited 2018 Dec 21]. Available from: https://www.cdc.gov/listeria/index.html

Chateau N, Castellanos I, Deschamps AM. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. Journal of Applied Bacteriology 1993; 74: 36–40.

Collar C. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications. Food Science and Technology International 1996; 2: 349–367.

Delesa DA. Bacteriocin as an advanced technology in food industry. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 2017; 4(12): 178-190.

Gahan CGM, O'Driscoll B, Hill C. Acid Adaptation of *Listeria monocytogenes* Can Enhance Survival in Acidic Foods and during Milk Fermentation. Applied and Environmental Mcrobiology 1996; 62(9): 3128-3132.

Haris LJ, Daeschel M, Stiles ME, Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 1989; 52: 348–387.

Katsiari MC, Voutsinas LP, Kondyli E. Manufacture of yogurt from stored frozen sheep's milk. Food Chemistry 2002; 77: 413–420.

Koktas T, Seydim AC, Ozer B, Guzel-Saydim ZB. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. Dairy Science 2013; 96: 780-789.

Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN. Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 2003; 69(12): 7514-7516.

Leimeister-Wächter M, Domann E, Chakraborty T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. Journal of Bacteriol 1992; 174: 947–952.

Pal M, Gebretensay A, Shibeu T, Abdurahman M, Karanfil O. The Role of Bacteriosin as Food Preservative. Beverage & food world 2015; 42(1): 28-35.

Ryser ET, Marth EH. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Ohio: CRC Press; 2007.

Wan F, Wang Y, Zhang G. Influence of the physical states of membrane surface area and center area on lysosomal proton permeability. Archives of Biochemistry and Biophysics 2002; 404: 285-292.

The Food and Drug Administration (FDA). Fermented milk [online] 2013 [cited 2018 Dec 21]. Available from: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/V.English/P353_E.pdf

Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R, Boccio J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutrition Research 2001; 21: 569–579.