

การเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกในเนยแข็งคอตเทจในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ Survivability of Probiotic Bacteria in Cottage Cheese During Storage at Low Temperature

สุกฤษ กำเนิดพันธุ์ (Sukrit Kamnerdphan)* ดร.บวรศักดิ์ ลีนานนท์ (Dr.Borwonsak Leenanon) **

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกซึ่งเจริญอยู่ในระยะคงที่จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจบรรจุถ้วย โดยปรับให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^9 cfu/g แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 15 วัน โดยในระหว่างการเก็บจะสุ่มตัวอย่างเนยแข็งทุกๆ 3 วัน เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อ โดยใช้ MRS Agar ร่วมกับ Bromocresol purple 0.04% หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อเก็บไว้ครบ 15 วัน นำจำนวนเชื้อที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเหลือรอด ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยแบ่งกลุ่มทดลองของผลิตภัณฑ์เนยแข็งออกเป็น 2 กลุ่มตามสายพันธุ์ของเชื้อที่ต่างกัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการเก็บ และเมื่อเก็บไว้ครบ 15 วัน *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 จะมีเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดเท่ากับ 92.56% และ 93.54% ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ABSTRACT

This research was aimed to determine the survivability of two strains of probiotic bacteria growing in the stationary phase including *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 and *Lactobacillus casei* TISTR 39 in cups of cottage cheese with their initial numbers adjusted to 10^9 cfu/g. Then, they were kept at 5°C in the refrigerator for 15 days. Meanwhile, cups of cottage cheese were sampled every three days for probiotic enumeration using MRS Agar with bromocresol purple 0.04% after incubated at 37 °C for 24-48 hours. Their survivabilities were subsequently calculated after 15 days storage. Completely randomized design was assigned for two groups of cottage cheese treatments with different strains. It was found that both strains tended to decrease in numbers during storage. On day 15, the survivabilities of *L. acidophilus* TISTR 1338 and *L. casei* TISTR 39 were 92.56% and 93.54% respectively ($P>0.05$).

คำสำคัญ: เนยแข็งคอตเทจ จุลินทรีย์โปรไบโอติก

Keywords: Cottage cheese, Probiotic microorganisms

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เนยแข็งคือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนม ครีม บัตเตอร์มิลค์ (butter milk) หรือ เวย์ (whey) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่าง มาผสมกับเอนไซม์หรือกรดหรือจุลินทรีย์จนเกิดเป็นลิ่มนม (curd) จากนั้นจะแยกส่วนที่เป็นเวย์ออกไป โดยจะนำมาบริโภคในลักษณะสดหรือนำมาผ่านการบ่ม (ripening) ให้ได้ที่ก่อนก็ได้ ส่วนประกอบที่สำคัญของเนยแข็งได้แก่ โปรตีน (เคซีน) ไขมัน น้ำและเกลือ ซึ่งส่วนประกอบเหล่านี้จะมีปริมาณแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเนยแข็ง สำหรับคุณภาพของเนยแข็งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแลคโตส ออกซิเจน เกลือ ตลอดจนอุณหภูมิในการเก็บรักษา

เนยแข็งคอตเทจ (cottage cheese) เป็นเนยแข็งชนิดอ่อน (soft cheese) ที่ไม่ต้องผ่านการบ่ม มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆของลิ่มนม (curd) ที่นุ่มและอ่อนนุ่มไม่เหนียวเหมือนเนยแข็งชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่จะใช้หางนม (skimmed milk) เป็นวัตถุดิบ แต่บางครั้งอาจมีการเติมครีมลงไปด้วย เรียกว่า creamed cottage cheese เนยแข็งชนิดนี้จะมีปริมาณน้ำค่อนข้างสูงโดยอยู่ในช่วง 70-80%

ในปัจจุบันมนุษย์มีแนวโน้มของสุขภาพที่อ่อนแอลงเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น พฤติกรรมการบริโภคอาหารหรือสิ่งแวดล้อมต่างๆ ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ตามมา ส่งผลให้ผู้บริโภคให้ความสำคัญในด้านสุขภาพมากขึ้น ทำให้มีความนิยมสำหรับการเลือกบริโภคอาหารที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย แนวคิดอย่างหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบันนี้ คือ การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหาร โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะหมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตในกลุ่มของแบคทีเรียโดยเฉพาอย่างยิ่งแบคทีเรียแลคติก รวมถึงยีสต์และราบางประเภท ซึ่งเมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพที่ดีขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้จะไปช่วยรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ รวมทั้งยังช่วยให้เกิดประโยชน์อย่างอื่นอีกหลายประการ เช่น ช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันและป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นต้น

ผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมนำมาเติมจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีหลากหลายชนิด เช่น ไอศกรีม โยเกิร์ต น้ำผลไม้ น้ำสลัด และเนยแข็ง เป็นต้น โดยอาหารที่จัดเป็นอาหารโปรไบโอติกจะต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และมีชีวิตในปริมาณอย่างน้อย 10^5 โคโลนีต่อมิลลิกรัมหรือกรัม ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เติมนลงในเนยแข็งคอตเทจ เพื่อผลิตเป็นเนยแข็งคอตเทจเสริมโปรไบโอติก (probiotic cottage cheese) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มตัวเลือกของอาหารเพื่อสุขภาพสำหรับมนุษย์ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาการเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

วิธีการวิจัย

แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยแบ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ซ้ำ ดังนี้

EX 1 = ผลิตภัณฑ์เนยแข็งคอตเทจเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338

EX 2 = ผลิตภัณฑ์เนยแข็งคอตเทจเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* TISTR 39

การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลโดยในระหว่างการเก็บรักษา จะสุ่มตัวอย่างเนยแข็งคอตเทจมาตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 ทุก ๆ 3 วัน โดยใช้ MRS Agar + Bromocresol purple 0.04% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก (cfu/g) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนยแข็งคอตเทจ แล้ว นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเหลือรอด (% survivability)

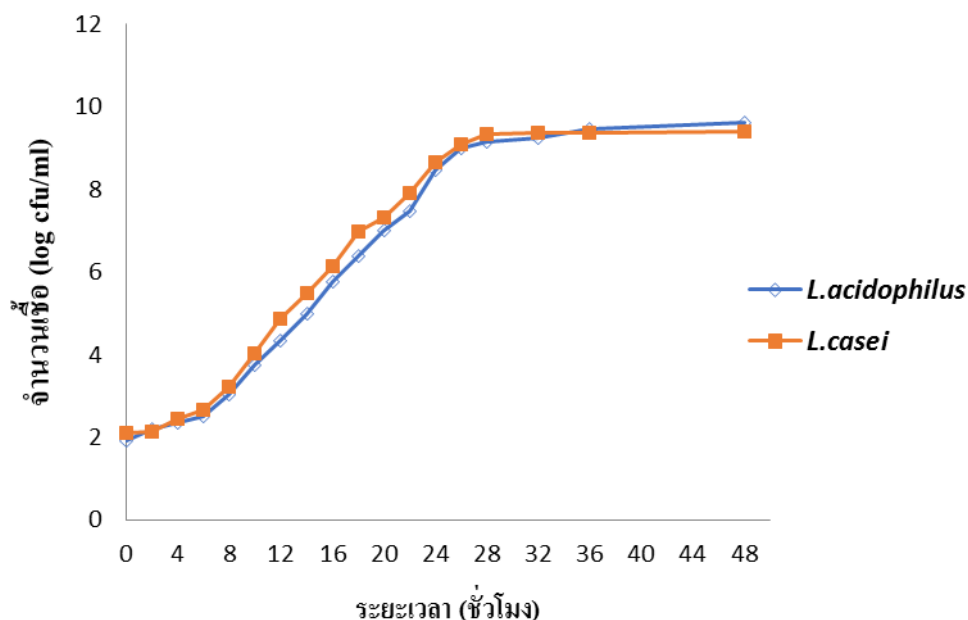
สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระยะเวลาในการทดลอง (12 สัปดาห์) ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม 2562 ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการวิจัย

กราฟการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39

จากการศึกษากราฟการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นสุ่มตัวอย่างเชื้อในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ มา นับจำนวนเชื้อโดยวิธีการ pour plate ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 1

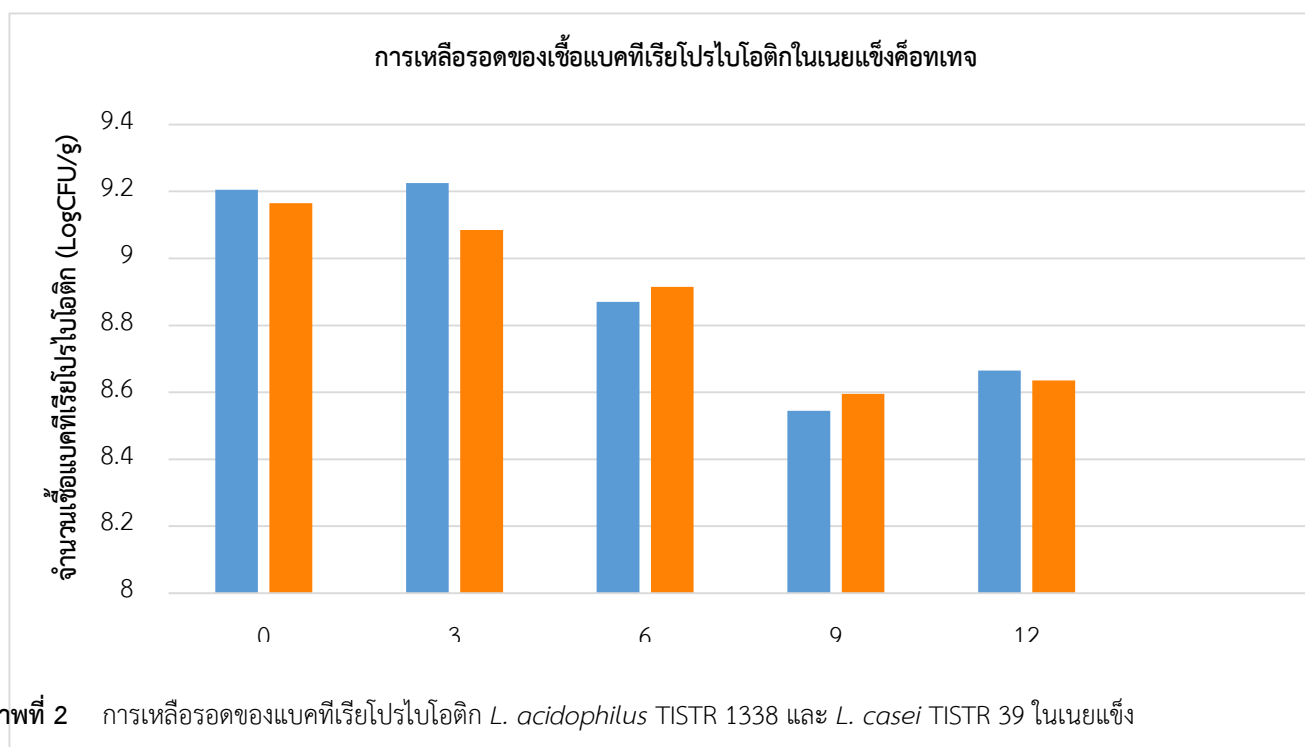


ภาพที่ 1 กราฟการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

จากภาพที่ 1 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ในช่วงแรกของการสุม เชื้อทั้ง 2 ชนิดอยู่ในช่วง lag phase ในช่วงชั่วโมงที่ 0-2 โดยมีจำนวนเชื้ออยู่ที่ประมาณ 2 log cfu/ml ต่อมาในชั่วโมงที่ 3-24 เชื้อเข้าสู่ช่วง log phase โดยเชื้อจะค่อยๆเพิ่มจำนวนขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น และเชื้อจะเข้าสู่ช่วง stationary phase ในชั่วโมงที่ 26 โดยมีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 9 log cfu/ml ส่วนในช่วง death phase นั้นจะเริ่มหลังจากชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป โดยในการศึกษานี้จะใช้เชื้อโปรไบโอติกทั้งสองชนิดที่เจริญอยู่ในช่วง stationary phase ในชั่วโมงที่ 26 มาใช้ในการทดลอง เพราะเชื้อในช่วงนี้จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุดและคงที่ และมีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

การเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในเนยแข็งคอตเทจ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกในเนยแข็งคอตเทจ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 ซึ่งมีระยะการเจริญอยู่ในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) โดยปรับให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นในเคิร์ดประมาณ 10^9 cfu/g จากนั้นนำมาบรรจุใส่ถ้วย แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C เป็นระยะเวลา 15 วัน โดยในระหว่างการเก็บรักษาจะสุมตัวอย่างเนยแข็งคอตเทจมาทุกๆ 3 วัน เพื่อตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 โดยใช้ MRS Agar ร่วมกับ Bromocresol purple 0.04% แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลอง ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน

จากภาพที่ 2 พบว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการเก็บรักษาและเมื่อเก็บรักษาไว้ครบ 15 วัน จะมีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกเหลือรอดอยู่ในช่วง 8.4-8.6 LogCFU/g

Garcia et al. (2012) ได้ศึกษาการเติมแบคทีเรียโปรไบโอติกลงในเนยแข็งโคลโฮล (Coalho cheese) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 21 วัน พบว่า *L. acidophilus* (LA-5) *Lactobacillus casei* subsp. *paracasei* (*L. casei*-01) และ *Bifidobacterium lactis* (BB-12) ยังคงเหลือรอดในเนยแข็ง ตลอดระยะเวลาการเก็บ โดยมีจำนวนเชื้อสูงกว่าระดับจำนวนเชื้อที่กำหนด คือ 6-7 Log CFU/g สำหรับอาหารโปรไบโอติก

เมื่อนำจำนวนเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดในเนยแข็งคอตเทจ เมื่อครบระยะเวลาการเก็บเป็นเวลา 15 วัน พบว่าให้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในเนยแข็งคอตเทจ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นระยะเวลา 15 วัน

เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก	เปอร์เซ็นต์การเหลือรอด
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TISTR 1338	92.56 ^a
<i>Lactobacillus casei</i> TISTR 39	93.54 ^a

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอด ของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจมีค่าเท่ากับ 92.56% และ 93.54% ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

Oliveira et al.(2014) ได้ศึกษาการเติมแบคทีเรียโปรไบโอติก ได้แก่ *L. acidophilus* *Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium lactis* ลงในเนยแข็งโคลโฮล ที่ผลิตจากน้ำนมแพะ (Goat Coalho cheese) เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคคือ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* พบว่า *Lactobacillus casei* มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดได้สูงที่สุด ($P\leq 0.05$) โดยมีผลยับยั้ง *Staphylococcus aureus* 7.87% และ 23.63% ในวันที่ 14 และ 21 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ และมีผลยับยั้ง *Listeria monocytogenes* 12.96% และ 32.99% ในวันที่ 14 และ 21 ของการเก็บรักษา ตามลำดับ

ดังนั้น จากผลการทดลองที่ได้ จึงเลือกใช้ *L. casei* TISTR 39 ในการผลิตเนยแข็งคอตเทจเนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจไม่แตกต่างกัน แต่ *Lactobacillus casei* มีแนวโน้มของศักยภาพสูงกว่าในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในเนยแข็ง

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* TISTR 39 ซึ่งมีระยะการเจริญอยู่ในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เมื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกในเนยแข็งคอตเทจ พบว่าจำนวนเชื้อมีแนวโน้มลดลงในระหว่างการเก็บรักษาและเมื่อเก็บรักษาไว้ครบ 15 วัน จะมีจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกเหลือรอดอยู่ในช่วง 8.4-8.6 LogCFU/g ซึ่งยังคงมีจำนวนการเหลือรอดสูงกว่าระดับจำนวนเชื้อต่ำสุดที่ยังคงมีประโยชน์ต่อร่างกาย (Minimum Therapeutic dose) คือ 5Log CFU/g และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเหลือรอดของแบคทีเรียโปรไบโอติก *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. casei* TISTR 39 ในเนยแข็งคอตเทจมีค่าเท่ากับ 92.56% และ 93.54% ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ *Lactobacillus casei* TISTR 39 มีแนวโน้มของศักยภาพสูงกว่าในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในเนยแข็ง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ อาคารปฏิบัติการแปรรูป ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Garcia EF, Oliveira CEV, Queiroga CRDE, Machado TAD. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. Journal of food 2012; 63: 8.
- Oliveira MEG, Garcia EF, Oliveira CEV, Gomes AMP, Pintado MME, Madureira ARMF, et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. Food Research International 2014; 64: 241-247.