บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide ; NaOH) AR Grade ของบริษัท BDH ปกระเทศอังกฤษ

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟธาเลต (Potassium hydrogen phthalate ; $C_6H_4(COOH)COOK$)

ฟีนอฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (Phenolpthalene indicator)

แอลกอฮอล์ 95 % (95% alcohol) ของบริษัท เอส ซี ซายน์ จำกัด ประเทศไทย

ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท KMC จำกัด ประเทศไทย

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS broth ยี่ห้อ Pronadisa ของบริษัท Laboratories Conda ประเทศสเปน

Sorbitol McConkey agar ยี่ห้อ Himedia ของบริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

Tryptic soya broth ยี่ห้อ Himedia ของบริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

Plate count agar ยี่ห้อ Himedia ของบริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

Peptone water ยี่ห้อ Himedia ของบริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

Agar ของบริษัท KMC จำกัด ประเทศไทย

1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F21 ของบริษัท Horiba ประเทศญี่ปุ่น

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

ตู้ถ่ายเชื้อ (Lamina flow) รุ่น Biolgical safety cabinets class II ของบริษัท Gibthai ประเทศออสเตรเลีย

เครื่องผสม (Vortex mixture) รุ่น G-560E ของบริษัท Metler Tolido ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องนับจำนวนจุลินทรีย์ (Colony counter) ของบริษัท Stuart Science ประเทศอังกฤษ

เครื่องชั่งละเอียด (Balance) รุ่น AB104 ของบริษัท Metler Tolido ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ตู้แช่เย็น ของบริษัท Ice land ประเทศไทย

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

Lactobacillus acidophilus TISTR No. 450, *Lactobacillus casei* TISTR No. 390, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* TISTR No. 785, *Lactobacillus plantarum* TISTR No. 050, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR No. 58 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Lactococcus lactis IO-1 จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Escherichia coli O157:H7 strain PN 41 จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เชื้อเริ่มต้นทางการค้าสำหรับผลิตโยเกิร์ต (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus*) CH-1 – Yo-Flex ® ของ Chr.Hunsen, Australia

2.1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ดัดแปลงจากวิธีของ Kasimoglu, Akgün (2004)

2.1.1.1 นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ที่อยู่ในลักษณะผงแห้งจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ *Lactococcus lactis* IO-1 ที่อยู่ในกลีเซอรีนแช่แข็งมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth โดยสภาวะปลอดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น (aseptic technique) นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้เชื้อเจริญและมีความแข็งแรง

2.1.1.2 *Escherichia coli* O157:H7 เตรียมโดยนำเชื้อมาถ่ายลงใน Tryptic Soya Broth (TSB) โดยวิธีการปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.1.3 เมื่อแบคทีเรียเจริญและเพิ่มจำนวน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะใสจะเปลี่ยนเป็นขุ่น นำไปนับจำนวนเชื้อโดยใช้วิธีการ Dilution plate count (Food and drug administration : Bacteriological Analytical Manual [FDA-BAM], 1998)

2.1.1.4 นำโปรไบโอติกมาถ่ายลงบน MRS agar ส่วน *Escherichia coli* O157:H7 ถ่ายลงบน TSB agar นำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดที่บ่มเสร็จแล้วไปใช้ในการถ่ายเชื้อเพื่อศึกษาและเก็บไว้ใช้งานได้อีกที่อุณหภูมิต่ำ

2.1.1.5 โปรไบโอติกแต่ละชนิดนำมาหา maximum activity โดยใช้ Litmus milk เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

2.1.1.6 เชื้อเริ่มต้นที่ใช้ผลิตโยเกิร์ตอยู่ในลักษณะผงแห้งปลอดเชื้อ เตรียมใส่ Erlenmeyer flask ปลอดเชื้อ ผสมนมปลอดเชื้อ ปิดจุกให้แน่น ผสมให้ผงละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับนม นำไปบ่มที่ 43 °ซ ประมาณ 5-6 ชั่วโมง (pH 4.2-4.3)

2.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7

ขั้นตอนในการทดลอง ดัดแปลงจาก Gagnon et al. (2004)

2.2.1 นำโปรไบโอติกแต่ละชนิดมาถ่ายลงใน MRS broth บ่มที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop แตะเชื้อใน MRS broth ให้เต็ม 1 loop แล้วหยดลงบน MRS agar plate ทิ้งให้แห้ง ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาบ่มที่ 37 °ซ 18 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2.2.2 นำ *E. coli* O157:H7 มาถ่ายลงใน TSB บ่มที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง เจือจางใน TSA จนได้จำนวนประมาณ 6 log cfu/mL

2.2.3 นำ *E. coli* O157:H7 จากข้อ 2.2.2 มาเททับลงบน plate ที่มีโปรไบโอติกที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 นำมาบ่มที่ 37 °ซ 18 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหยดโปรไบโอติกและโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบหยดโปรไบโอติกแล้วคำนวณหาพื้นที่

2.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง โดยติดตามค่าสังเกตได้แก่เปอร์เซ็นต์โซนยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ซึ่งหาได้จาก

เปอร์เซ็นต์โซนยับยั้ง *E. coli* O157:H7 = (พื้นที่โซนยับยั้งทั้งหมด – พื้นที่หยดโปรไบโอติก) x 100
พื้นที่โซนยับยั้งทั้งหมด

2.2.4.1 แผนการทดลอง

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) จากการศึกษาโปรไบโอติก 6 ชนิดและ 1 ตัวอย่างควบคุม ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 7x2 คือ 14 หน่วยการทดลอง

2.2.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 11.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของค่าสังเกตต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยวิธีดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

2.3 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของโปรไบโอติกแต่ละชนิดในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและเก็บรักษาเมื่อจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้นต่างกัน

นำโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้จากข้อ 2.2 มาศึกษาต่อในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต ปัจจัยที่จะศึกษาคือชนิดของโปรไบโอติกและจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น

ขั้นตอนในการทดลอง

2.3.1 การเตรียมน้ำนมพาสเจอไรซ์

นำนมดิบมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 85 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันทีแล้วบรรจุลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 5 °ซ

2.3.2 การผลิตโยเกิร์ต

นำน้ำนมพาสเจอไรซ์มาอุ่น แล้วทิ้งให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30 °ซ เติมเชื้อโยเกิร์ตที่เตรียมไว้ลงไปในน้ำนมพาสเจอไรซ์ 4% (v/v) ตัวอย่างที่ใช้โปรไบโอติกจะเติมโปรไบโอติกและเชื้อเริ่มต้นโยเกิร์ตในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 ลงไปรวม 4% (v/v) เช่นกัน ผสมให้เข้ากันโดยให้ตัวอย่างที่ไม่มีโปรไบโอติกเป็นตัวอย่างควบคุม เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่มีโปรไบโอติกแต่ละชนิด

2.3.3 เติม *E. coli* O157:H7 ลงในส่วนผสมของโยเกิร์ตจำนวน 2, 4 และ 6 log cfu/mL บ่มที่อุณหภูมิ 43 °ซ 6 ชั่วโมง นำมาทำให้เย็นและเก็บรักษาที่ 4 °ซ

2.3.4 ศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและการเก็บรักษา ทำการศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตคือ โยเกิร์ตธรรมดา โยเกิร์ตที่มี *Lb. acidophilus* และโยเกิร์ตที่มี *Lb. plantarum* เก็บตัวอย่างระหว่างการบ่มที่ 43 °ซ และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ติดตามผลโดยสุ่มตัวอย่างในชั่วโมงการหมักที่ 0 2 4 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0 24 48 72 และติดตามค่าสังเกต ดังนี้

1. จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่เหลือรอดในโยเกิร์ต นับจำนวน *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol McConkey Agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24 ชั่วโมง

2. จำนวนโปรไบโอติกในโยเกิร์ต นับจำนวนโปรไบโอติกโดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MRS Agar บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ 72 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ (ดัดแปลงจาก Shah, 2000; Tharmaraj, Shah, 2003)

3. จำนวนเชื้อโยเกิร์ตคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* นับจำนวน *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* โดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ใน MRS agar บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแล้วลบด้วยจำนวนโปรไบโอติกที่หาได้จากข้อ 2 จะได้จำนวนเชื้อโยเกิร์ต

4. ความเป็นกรด-ด่าง สุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตและไบโอเกิร์ต นำมาวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

5. เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 1999) โดยการสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ 3-5 หยด ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (N) จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) คำนวณเปอร์เซ็นความเป็นกรดจาก

$$\text{เปอร์เซ็นความเป็นกรด (กรดแลกติก)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาตรของ NaOH} \times \text{MW} \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง} \times 1000}$$

หมายเหตุ MW คือมวลโมเลกุลของกรดแลกติกเท่ากับ 90.05 g/mol

2.3.4.1 แผนการทดลอง

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) 2 ปัจจัยคือชนิดโปรไบโอติกมี 3 ระดับคือ ไม่ใช้โปรไบโอติก ใช้ *Lb. acidophilus* และใช้ *Lb. plantarum* และจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 3x3x2 คือ 18 หน่วยการทดลอง

2.3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 11.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองตามแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยวิธีดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

2.4 การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและเก็บรักษาเมื่ออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตต่างกัน

นำโปรไบโอติกที่สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีที่สุดจากข้อ 2.3 มาศึกษาต่อในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต ปัจจัยที่ใช้ศึกษาคืออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ต และจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น

2.4.1 เติม *E. coli* O157:H7 ลงในนมพาสเจอไรซ์ที่จะใช้ผลิตโยเกิร์ตจำนวน 2, 4 และ 6 log cfu/mL เติมเชื้อโยเกิร์ตและโปรไบโอติกลงในน้ำนมพาสเจอไรซ์ที่มีเชื้อ *E. coli* O157:H7 แต่ละระดับโดยใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อเริ่มต้นโยเกิร์ต 3 ระดับคือ 2:1, 1:1 และ 1:2

2.4.2 บ่มที่อุณหภูมิ 43 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.4.3 ศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและการเก็บรักษา

ทำการศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในตัวอย่างโยเกิร์ตที่ใช้อัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อเริ่มต้นโยเกิร์ตระดับต่างกัน เก็บตัวอย่างระหว่างการบ่มที่ 43 °ซ และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ติดตามผลโดยสุ่มตัวอย่างในชั่วโมงการหมักที่ 0 2 4 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0 24 48 72 และติดตามค่าสังเกต ดังนี้

1. จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่เหลือรอดในโยเกิร์ต นับจำนวน *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol McConkey Agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. จำนวนโปรไบโอติกในโยเกิร์ต นับจำนวนโปรไบโอติกโดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MRS Agar นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ (ดัดแปลงจาก Shah, 2000; Tharmaraj, Shah, 2003)

3. จำนวนเชื้อโยเกิร์ตคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* นับจำนวน *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* โดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ใน MRS agar บ่มที่ 37 °ซ 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแล้วลบด้วยจำนวนโปรไบโอติกที่หาได้จากข้อ 2 จะได้จำนวนเชื้อโยเกิร์ต

4. ความเป็นกรด-ด่าง สุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตและไบโอเกิร์ต นำมาวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

5. เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 1999) โดยการสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ 3-5 หยด ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (N) จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) คำนวณเปอร์เซ็นความเป็นกรดจาก

$$\text{เปอร์เซ็นความเป็นกรด (กรดแลกติก)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาตรของ NaOH} \times \text{MW} \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง} \times 1000}$$

หมายเหตุ MW คือมวลโมเลกุลของกรดแลกติกเท่ากับ 90.05 g/mol

2.3.4.1 แผนการทดลอง

ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) 2 ปัจจัยคืออัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตเริ่มต้นมี 3 ระดับคือ 2:1, 1:1 และ 1:2 และจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 3x3x2 คือ 18 หน่วยการทดลอง

2.3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 11.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของค่าสังเกตต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองตามแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยวิธีดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

2.5 การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของโปรไบโอติกในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ปนเปื้อนก่อนและหลังการหมัก

นำอัตราส่วนระหว่างโปรไบโอติกและเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 มาศึกษาต่อในการผลิตโยเกิร์ต ปัจจัยที่ใช้ศึกษาคือช่วงที่โยเกิร์ตมีการปนเปื้อน *E.coli* O157:H7 และจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น

2.5.1 เติม *E. coli* O157:H7 จำนวน 2, 4 และ 6 log cfu/mL ลงในนมพาสเจอไรซ์ก่อนการหมักโยเกิร์ต ทำการผลิตโยเกิร์ตโดยเติมโปรไบโอติกที่เลือกได้จากการทดลองที่ 2 และเชื้อโยเกิร์ตในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 ลงในนมพาสเจอไรซ์ที่มี *E. coli* O157:H7

2.5.2 ผลิตโยเกิร์ตโดยเติมโปรไบโอติกและเชื้อโยเกิร์ตในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 ลงในนมพาสเจอไรซ์ที่ปราศจาก *E. coli* O157:H7

2.5.3 นำโยเกิร์ตจากข้อ 2.5.1 และ 2.5.2 หมักที่อุณหภูมิ 43 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โยเกิร์ตที่เติม *E. coli* O157:H7 ก่อนการหมักนำมาทำให้เย็นแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ โยเกิร์ตที่ไม่มี *E. coli* O157:H7 นำมาทำให้เย็นแล้วเติมเชื้อ *E. coli* O157:H7 ลงในตัวอย่าง 3 ระดับเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.5.4 ศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตระหว่างการหมักและการเก็บรักษา

ทำการศึกษาการเหลือรอดของ *E. coli* O157:H7 ในโยเกิร์ตที่ปนเปื้อน *E. coli* O157:H7 ก่อนและหลังการหมัก เก็บตัวอย่างระหว่างการบ่มที่ 43 °ซ และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ติดตามผลโดยสุ่มตัวอย่างในชั่วโมงการหมักที่ 0 2 4 6 และชั่วโมงการเก็บรักษาที่ 0 24 48 72 ติดตามค่าสังเกต ดังนี้

1. จำนวน *E. coli* O157:H7 ที่เหลือรอดในโยเกิร์ต นับจำนวน *E. coli* O157:H7 โดยใช้วิธีการ Dilution plate count ทำการ pour plate (FDA-BAM, 1998) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol McConkey Agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24 ชั่วโมง นำจำนวน *E. coli* O157:H7 ที่นับได้ตั้งแต่การเก็บรักษาชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ตรวจไม่พบมาสร้างกราฟเส้นตรงเฉลี่ยและคำนวณหาค่า D-value จาก

$$\text{D-value} = (t/\ \log No - \log N)$$

เมื่อ D-value = เวลาในการลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ลง 90% หรือ 1 log cycle

t = เวลาที่ใช้โปรไบโอติกแล้วทำให้ *E. coli* O157:H7 ลดลง 1 log cycle

log No = ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

log N = ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือเมื่อเวลาผ่านไป t

2. จำนวนโปรไบโอติกในโยเกิร์ต นับจำนวนโปรไบโอติกโดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Sorbitol MRS Agar บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีอากาศ (ดัดแปลงจาก Shah, 2000; Tharmaraj, Shah, 2003) นำจำนวนที่ได้ตั้งแต่การเก็บรักษาชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72 มาหา % log reduction ดังนี้

$$\%\ \log\ \text{reduction} = \frac{(\log \text{จำนวนโปรไบโอติกชั่วโมงที่ 0} - \log \text{จำนวนโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 72}) \times 100}{\log \text{จำนวนโปรไบโอติกชั่วโมงที่ 0}}$$

3. จำนวนเชื้อโยเกิร์ตคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* นับจำนวน *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* โดยใช้วิธีการ Dilution plate count (FDA-BAM, 1998) ทำ

การ pour plate ใน MRS agar บ่มที่ 37 °ซ 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแล้วลบด้วยจำนวนโปรไบโอติกที่หาได้จากข้อ 2 จะได้จำนวนเชื้อโยเกิร์ต นำจำนวนที่ได้ตั้งแต่การเก็บรักษาชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72 มาหา % log reduction จาก

$$\% \text{ log reduction} = \frac{(\log \text{จำนวนโปรไบโอติกชั่วโมงที่ 0} - \log \text{จำนวนโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 72}) \times 100}{\log \text{จำนวนโปรไบโอติกชั่วโมงที่ 0}}$$

4. ความเป็นกรดด่าง สุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตและไบโอเกิร์ต นำมาวัดความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

5. เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 1999) โดยการสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตมา 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร หยดฟินอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ 3-5 หยด ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (N) จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) คำนวณเปอร์เซ็นความเป็นกรดจาก

$$\text{เปอร์เซ็นความเป็นกรด (กรดแลกติก)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาตรของ NaOH} \times \text{MW} \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง} \times 1000}$$

หมายเหตุ MW คือมวลโมเลกุลของกรดแลกติกเท่ากับ 90.05 g/mol

2.3.4.1 แผนการทดลอง

ค่า D-value และค่า % log reduction ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) ปัจจัยคือช่วงเวลาที่โยเกิร์ตปนเปื้อน *E.coli* O157:H7 มี 2 ระดับคือก่อนและหลังการหมัก และจำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 2x3x2 คือ 12 หน่วยการทดลอง

ความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นความเป็นกรด ศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) ปัจจัยคือเวลาที่โยเกิร์ตมีการปนเปื้อนของ *E.coli* O157:H7 มี 2 ระดับคือก่อนและหลังการหมัก จำนวน *E. coli* O157:H7 เริ่มต้น 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 log cfu/mL และเวลาในการเก็บรักษามี 4 ระดับคือ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 2x3x4x2 คือ 48 หน่วยการทดลอง

2.3.4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window version 11.0 วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ของค่าสังเกตต่างๆ ที่ได้จากการทดลองตามแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Completely Randomized Design) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวอย่างโดยวิธีดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

3. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น