

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไบโอโยเกิร์ตผสมเนื้อผลไม้

ด้วยเชื้อ *Bifidobacterium*

(Bio-yoghurt mix fruit development from *Bifidobacterium*)

ผศ.ดร. ดวงฤทัย ธำรงโชติ

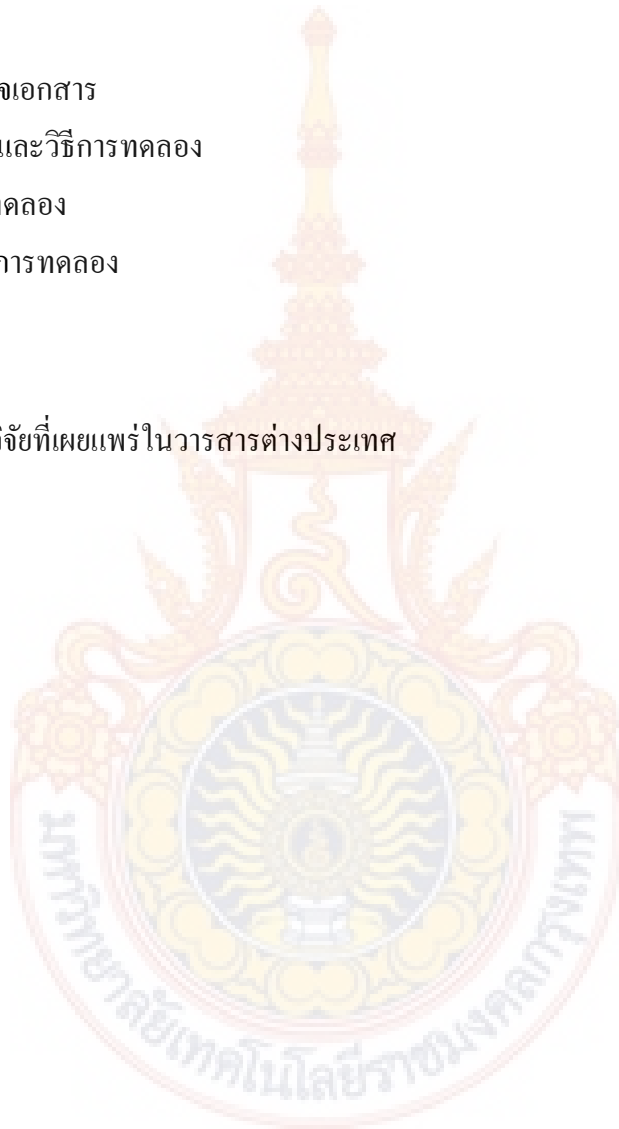
รายงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากงบรายได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

ปี 2555

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อไทย	2
<i>Abstract</i>	3
บทที่	
1 บทนำ	4
2 การตรวจเอกสาร	6
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
4 ผลการทดลอง	12
5 สรุปผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	17
ภาคผนวก	20
ร่างบทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ	



บทคัดย่อ

การวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไบโอโยเกิร์ตผสมเนื้อผลไม้ ด้วยเชื้อ

Bifidobacterium พบว่าชนิดของผลไม้ไทย มีผลต่อสมบัติทางประสาทสัมผัส และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกในโยเกิร์ตผลไม้ ในการทดลองนี้ ได้ใช้ผลไม้ไทย 3 ชนิด คือ สับปะรด (*Ananas comosus* (L) Merr.) มะละกอ (*Carica papaya* L.) และมะม่วง (*Manihot indica* Linn.) มาทำเป็นโยเกิร์ตผลไม้ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าชนิดของผลไม้ ไม่มีผลต่อคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัส ด้านลักษณะปรากฏ สี และเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตผลไม้ ($p > 0.05$) แต่ชนิดของผลไม้ไทยมีผลต่อคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น กลิ่นรส และความชอบรวมของโยเกิร์ตผลไม้ โดยโยเกิร์ตมะละกามีค่าระดับคะแนนต่ำที่สุด ส่วนอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในโยเกิร์ตผลไม้ พบว่า โยเกิร์ตสับปะรด และโยเกิร์ตมะม่วงมีอัตราการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ ต่ำกว่าในโยเกิร์ตมะละกอ และเมื่อทำการศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อผลไม้ในโยเกิร์ตพบว่า โครงสร้างของเนื้อเยื่อมะละกอ มีรูพรุนมากกว่าเนื้อเยื่อของสับปะรด และมะม่วง จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถแทรกเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อผลไม้ได้ดีกว่า

Abstract

The research in topic of Bio-yoghurt mix fruit development from *Bifidobacterium* found that Thai fruits affect on sensory properties of fruit yogurt and survival of yogurt starter culture added with probiotic strains in fruit yogurt were studied at refrigerated temperature ($5 \pm 2^{\circ}\text{C}$) during 3 weeks of storage. This research was to study the influence of Thai fruit, which was pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.), papaya (*Carica papyra* L.), and mango (*Manifera Indica* Linn.), on the sensory properties and survival of fruit yogurt. The result showed that the addition of Thai fruit purée was not significantly different ($p > 0.05$) on the accepted mean score of fruit yogurt. The highest average mean score was fruit yogurt with pineapple (7.14), while the fruit yogurt with mango and papaya obtained the average mean score 6.98 and 6.93. The decline of probiotic bacteria cell in pineapple fruit yogurt and mango fruit yogurt were significantly greater than papaya fruit yogurt. The morphology of fruit in yogurt after keep for 3weeks at $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ by using Electron microscope showed that papaya has a porous structure more than the structure of mango and pineapple. Therefore, the probiotic bacteria can be embedded and survival in papaya more than the other fruit purée.

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบัน สหกรณ์โคนมหนองโพราชบุรี จำกัด (ในพระบรมราชูปถัมภ์) เป็นสหกรณ์ประเภทการเกษตร มีการดำเนินกิจการเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากนมโค เพื่อช่วยเหลือเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในประเทศไทย โดยรับซื้อน้ำนมดิบมาเข้าสู่กระบวนการผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีคุณภาพและสามารถตอบสนองความต้องการแก่ผู้บริโภค ภายใต้เครื่องหมายการค้า “ หนองโพ ” นมโคแท้ๆ ที่มีเคลือบผิวจากธรรมชาติสูง เช่น นมพาสเจอร์ไรส์ นมยูเอชที นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม โยเกิร์ต และไอศกรีม การดำเนินงานเป็นไปตาม Good Manufacturing Practice (GMP) จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา Codex(มาตรฐานสากลของโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO) และมาตรฐานระบบบริหารคุณภาพ ISO 9000 : 2008 ก่อนจำหน่ายผลิตภัณฑ์ให้แก่ผู้บริโภค จะต้องผ่านการตรวจสอบคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ก่อน จึงนำออกจำหน่ายทุกครั้ง

จากผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ผลิตขึ้นเกิดจากการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพียง 2 ชนิด คือเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโยเกิร์ต จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีปฏิสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันในลักษณะร่วมมือกันคือ *Lactobacillus bulgaricus* เป็นตัวช่วยย่อยโปรตีนในน้ำนมทำให้เชื้อ *Streptococcus thermophilus* ถูกกระตุ้นให้เจริญซึ่งในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจนจะใช้น้ำตาลแลคโตสหรือกลูโคสในน้ำนมเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ที่จะไปกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ส่งผลให้เชื้อตัวนี้สร้างกรดและสารให้กลิ่นรสที่ระเหยได้ขึ้นมาด้วยและเป็นกลิ่นเฉพาะของตัวโยเกิร์ต

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตของสหกรณ์ที่จำหน่ายจะบรรจุในถ้วยขนาด 150 กรัมมีเพียง 4 รสชาติ คือ โยเกิร์ตผสมวุ้นมะพร้าว โยเกิร์ตผสมสับปะรด โยเกิร์ตผสมสตอเบอรี่ และโยเกิร์ตธรรมชาติ เท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อสุขภาพ โดยการทดลองผลิตโยเกิร์ตโปรไบโอติกส์ โดยให้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ เกาะติดอยู่กับผลไม้ที่ใช้ผสมในโยเกิร์ต โดยจะใช้จุลินทรีย์เชื้อ *Bifidobacterium bifidum* ร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Streptococcus thermophilus* เนื่องจากการใช้เชื้อ *Bifidobacterium bifidum* เป็นโปรไบโอติกส์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ช่วยป้องกันเชื้อโรคเข้ามาทำร้ายร่างกาย ช่วยขจัดสารพิษออกไปเพื่อให้การทำงานของปกติ แบคทีเรีย *bifidobacteria* สามารถสร้างสารประกอบแอนติเจนที่มีผลกระตุ้น

ให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันขึ้น (Ventura และคณะ, 2001) นอกจากนั้นยังพบว่า แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงได้ (Lee และคณะ, 2003) นอกจากนั้น bifidobacteria สามารถทนกรดในกระเพาะอาหาร และทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นด่างของน้ำดีจากตับ (Gilliland, 1996).

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่มีเชื้อจุลินทรีย์ Probiotic Bifidobacteria รวมอยู่ด้วย
2. เพื่อศึกษาการเกาะติดของเชื้อจุลินทรีย์ Probiotic Bifidobacteria ในเนื้อผลไม้ที่ผสมอยู่ในโยเกิร์ต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มของผลผลิตทางการเกษตร
2. ทราบถึงลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย bifidobacteria ในผลไม้ไทย
3. สร้างเสริมสุขภาพให้คนไทยที่นิยมบริโภคโยเกิร์ต

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเติมโพรไบโอติก โดยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Bafidobaterium พบว่าการเติมเชื้อ Bafidobaterium ลงไปพร้อมกับกระบวนการผลิตโยเกิร์ต จะทำให้อัตราการอยู่รอดของ Bafidobaterium ลดลง ดังนั้นการเติม Bafidobaterium ลงไปในโยเกิร์ตควรเติมหลังจากการหมักโยเกิร์ตจนมี ph ประมาณ 4.5 และการเติม Bafidobaterium ลงไปในโยเกิร์ตโดยตรงจะทำให้การรอดของเชื้อลดลง โดยทั่วไปจะใช้วิธีการตรึง Bafidobaterium ลงในเม็ดปิดของ sodium alginate เพื่อให้เชื้อ Bafidobaterium อยู่ได้ในสถานะที่เป็นกรดสูง แต่จากการศึกษาเรื่องการผลิตไวน์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไวน์ สามารถใช้เปลือก หรือเนื้อองุ่น เป็นสารเกาะพุงใช้เชื้อเจริญเติบโตได้ ดังนั้นกรอบแนวคิดในการวิจัย จึงต้องการศึกษาชนิดของผลไม้ไทย ที่จำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความเป็นกรด กลุ่มที่มีความเป็นกรดอ่อน และกลุ่มที่มีความเป็นกลาง แต่มีใยอาหารสูง เป็นสารยึดเกาะของแบคทีเรีย Bafidobaterium และตามคุณลักษณะการเจริญเติบโต และการอยู่รอดของ Bafidobaterium ในผลไม้ทั้ง 3 กลุ่ม และศึกษาผลของการเติมผลไม้ที่มีเชื้อ Bafidobaterium เกาะอยู่ลงในโยเกิร์ต และติดตามดูการเจริญเติบโต และการอยู่รอดของ Bafidobaterium ที่อยู่ในโยเกิร์ตผลไม้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 โยเกิร์ต

โยเกิร์ต (Yogurt) เป็น ผลิตภัณฑ์นม ที่จัดอยู่ในกลุ่มนมเปรี้ยว ที่ได้จากการหมัก นม ด้วยหัวเชื้อ (Starter) ที่ประกอบด้วย แบคทีเรียในกลุ่มของ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* (Shah, 2003) วัตถุดิบหลักที่ใช้ทำโยเกิร์ต คือนม ในส่วนของ Skim milk โยเกิร์ตที่ผลิตได้ มีหลายชนิด ขึ้นกับ องค์ประกอบทางเคมี วิธีการผลิต สารปรุงแต่ง กลิ่นรสที่ใช้ และกรรมวิธีการบ่ม เช่น โยเกิร์ตผลไม้ (Fruit yogurt) โยเกิร์ตแช่แข็ง (frozen yogurt) โยเกิร์ตแล็กโตสต่ำ (low-lactose yogurt)

ในระหว่างการหมักนม เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* ทั้งสองชนิดนี้จะใช้น้ำตาลแลคโทส (lactose) ในนม เป็นแหล่ง พลังงาน และสร้างกรดแลคติก (lactic acid) และสารที่ทำให้กลิ่นรสของโยเกิร์ต กรดแลคติกที่ เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก จะทำให้เคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในนม สูญเสียสภาพ ธรรมชาติ (protein denaturation) เกิดการรวมตัวกัน เป็นก้อน นอกจากนี้เอนไซม์เคซีนบางส่วน ไปเกิดปฏิกิริยากับแอลฟา-แลคตาบูมิน (alpha -lactalbumin) และ บีตา-แลคโตโกลบูลิน (beta-lactoglobulin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในหางนม ทำให้เกิดเจล (gel) การหมักนม โดยใช้เชื้อสอง ชนิดนี้ร่วมกัน จะทำเกิดลักษณะของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตได้เร็ว มีกลิ่น และรสชาติดีกว่าใช้เชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีขั้นตอนการเจริญเติบโตดังนี้

1. *Streptococcus thermophilus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจน จะเปลี่ยนน้ำตาลแลคโทส(lactose) ที่มีอยู่ใน นม เป็นกรดแลคติก (lactic acid) ทำให้ค่าความเป็นกรด่างในนมลดลง เหลือ pH ประมาณ 5.5 ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด่างระดับนี้ จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในกลุ่ม *Lactobacillus*
2. *Lactobacillus delbrueckii* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส สามารถเปลี่ยน กรด แลคติก เป็นสารอะเซตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสเฉพาะของ โยเกิร์ต

2.2 โพรไบโอติก

โพรไบโอติกมาจากภาษากรีก มีความหมายว่า เพื่อชีวิต (For life) ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี 1965 โดย Lilly และ Stillwell โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในรูปแบบของอาหาร หรืออาหารเสริม หากมีในปริมาณที่เพียงพอจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยช่วยให้จุลินทรีย์ในลำไส้เกิดความสมดุลและก่อให้เกิดประโยชน์ต่างๆอีกมากมาย ชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus โพรไบโอติกที่นิยมนำมาใช้กันมาก ได้แก่ Lactobacillus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็ก และ Bifidobacterium ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่

ประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ

โพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น ช่วยให้อุณหภูมิในลำไส้เกิดความสมดุล ช่วยป้องกันหรือทำให้อวัยวะภายในร่างกายที่สัมผัสกับทางเดินอาหารทำงานอย่างถูกต้อง ซึ่งประโยชน์ของโพรไบโอติก ต่อสุขภาพ (พนารัตน์, 2555) สามารถจำแนกได้ดังนี้

- เพิ่มคุณค่าทางอาหาร (ช่วยให้การย่อยดีขึ้น, เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุและวิตามิน)
- ป้องกันการติดเชื้อในลำไส้
- ลดการตอบสนองต่อการอักเสบ
- ป้องกันมะเร็ง
- ลดคอเรสเตอรอลในซีรัม
- ป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน
- ช่วยให้อุณหภูมิดีขึ้น
- กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะโพรไบโอติกสายพันธุ์ Lactic Acid Bacteria (Lab) ให้ผลดีในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ

- ป้องกันโรคท้องร่วง พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถป้องกันหรือบรรเทาอาการท้องท้องร่วงในเด็ก ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสโรตาได้
- บรรเทาอาการโรคลำไส้อักเสบ พบว่าโปรไบโอติกสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบหลังการผ่าตัด ช่วยรักษาอาการเปื่อยของแผลในลำไส้ และรักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง
- ป้องกันฟันผุ โดยพบว่าเด็กเล็ก ที่ดื่มน้ำที่มีส่วนผสมของ *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) มีปัญหาฟันผุน้อยลง

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จักรกฤษณ์ วังราษฎร์ (2552) ได้ทำการวิจัยผลิตโยเกิร์ตน้ำนมแพะผสมน้ำนมวัวที่มีการเติมแบคทีเรีย โปรไบโอติก จากเชื้อโปรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum*) โดยการตรึงเซลล์เชื้อโปรไบโอติกใน sodium alginate-hi-maize starch ผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของ maize starch ที่ 2%(w/v) สามารถกักเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด ให้อยู่ในเม็ดปิดของ sodium alginate ได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของ maize starch 0.5 %(w/v) และการเติมเม็ดปิดที่ผ่านการตรึงเชื้อโปรไบโอติกลงในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต ควรเติมหลังจากการหมักโยเกิร์ตจนมี pH 4.5 จะมีอัตราการอยู่รอดของโปรไบโอติกมากกว่าการเติมเม็ดปิดที่ตรึงเชื้อโปรไบโอติกลงไปพร้อมกันกับเชื้อโยเกิร์ตตั้งต้นตั้งแต่เริ่มกระบวนการ

ภวดี สังข์วัฒนะ (2544) ทำการวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งในการทดลองได้ใช้นมผง หมักด้วยเชื้อโปรไบโอติก 3 ชนิด คือ *L. acidophilus* La-5 *L. casei* Lc-01 และ *B. bifidum* Bb-12 พบการวิจัยพบว่า สูตรที่เหมาะสมคือนมผงชนิดธรรมดาละลายทันทีร้อยละ 15.5 นมผงขาดมันเนยร้อยละ 10 การจีเนนร้อยละ 0.075 เชื้อจุลินทรีย์ *L. acidophilus* La-5 ร้อยละ 0.33 *L. casei* Lc-01 ร้อยละ 0.33 และ *B. bifidum* Bb-12 ร้อยละ 0.33 สภาพที่เหมาะสมในการหมักคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 14 ชั่วโมง

ศิรินทิพย์ พงษ์สว่าง (2550) ทำการวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตผลไม้รวม โดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลอง ผลการทดลองพบว่าผลไม้รวมมีผลต่อคะแนนการยอมรับของผู้บริโภค โดยสูตรผลไม้ที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยสับปะรดเชื่อมร้อยละ 56 สตอเบอร์รี่เชื่อม ร้อยละ 39 และมะละกอเชื่อมร้อยละ 5

ปิ่นนรี ชินวรรณวงศ์ (2551) ทำการวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีมโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นทางการค้า (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 และ *Bifidobacterium bifidum* BB-12; ABT 5) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6

ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาไอศกรีมโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของปริมาณเชื้อ *S. thermophilus* ในระหว่างการเก็บรักษาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่ปริมาณเชื้อเหลือรอดของเชื้อ *L. acidophilus* และเชื้อ *B. bifidum* มีค่าลดลงจาก 7.51 log cfu/g (3.3×10^7 cfu/g) เหลือ 6.96 log cfu/g (9.1×10^6 cfu/g) และ 6.96 log cfu/g (9.2×10^6 cfu/g) เหลือ 6.46 log cfu/g (3.1×10^6 cfu/g) ตามลำดับ



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบและเชื้อจุลินทรีย์

1.1 วัตถุดิบ

หางนมผง

สับปะรดพันธุ์ศรีราชา (Ananas comosus (L.)

มะละกอพันธุ์ปักษ์ใต้ (Carica papaya L.),

มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (Mangifera Indica Linn.)

น้ำตาลทราย

1.2 เชื้อจุลินทรีย์

หัวเชื้อโยเกิร์ตผง Lyofast SAB442B) ที่ประกอบด้วย จุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium animalis*

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Starter culture)

การเตรียมหัวเชื้อ ทำโดยการนำหัวเชื้อโยเกิร์ต yogurt starter culture มาปั่นผสมกับน้ำนมฆ่าเชื้อ (sterilized milk) ในอัตราส่วน 0.5:100 (w/w) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมผลไม้

นำผลไม้ มาปอกเปลือก และหั่นเป็นรูปลูกเต๋า ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$ หลังจากนั้นนำไปต้มในสารละลายน้ำเชื่อมเข้มข้น 20% นาน 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$

2.3 การเตรียมโยเกิร์ต

นำน้ำนมปลอดเชื้อ มาให้ความร้อนจะมีอุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ แล้วปรับปริมาณของแข็งในน้ำ ให้ได้ 180 กรัม/ลิตร ด้วยหางนมผง หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนจนน้ำนมมีอุณหภูมิ $85 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำให้น้ำนมเย็นลงทันทีจนมีอุณหภูมิ ให้ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$

แล้วจึงเติมหัวเชื้อโยเกิร์ต ในข้อ 2.1 ในอัตราส่วน นํ้านม 2 ลิตร ต่อหัวเชื้อ 0.5 ลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในถ้วยพลาสติกฆ่าเชื้อขนาด 4 oz ที่ภายในมีผลไม้บรรจุอยู่ 10 กรัม ในปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 3 อาทิตย์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง การยอมรับทางประสาทสัมผัส และการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์

2.4 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การหาค่าความเป็นกรด-ด่างทำโดยใช้เครื่อง pH meter (Eutech, Cyberscan 1000, Singapore) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของโยเกิร์ตผลไม้ที่เก็บ ที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลาการเก็บ 0, 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ทุกๆตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

2.5 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตผลไม้ ทำโดยให้ รสชาติ โยเกิร์ตตัวอย่าง เป็นเลขสุ่ม 3 หลัก ต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วทำการเสิร์ฟตัวอย่างที่อุณหภูมิ $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้กับผู้ทดสอบชิม ที่เป็นนักศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ จำนวน 30 คน เพื่อประเมินผลความชอบทางประสาทสัมผัส ในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรส รสชาติ เนื้อ สัมผัส และความชอบรวม โดยวิธี 9-point hedonic scale test (1=ไม่ชอบมากที่สุด, 9= ชอบมากที่สุด) (Larmond, 1982) ทุกๆตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.6 การวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา (Microbiological analysis)

การหาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ในโยเกิร์ตผลไม้ ที่เก็บที่ อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 0, 1, 2, และ 3 สัปดาห์ โดยวิธี viable plate count ในสภาวะไร้อากาศ (IDF, 1997) ชั่งโยเกิร์ต 1 กรัม ใส่ลงใน 0.1% Peptone water 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำ ตัวอย่างไปเทลงใน จานเพาะเชื้อ เพื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS agar (Merck, Germany บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมงในภาวะไร้อากาศ ทุกๆตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.7 การวิเคราะห์ด้วย (Scanning Electron Microscope, SEM)

นำผลไม้ที่อยู่ในโยเกิร์ตผลไม้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 3 สัปดาห์ มาทำการวิเคราะห์ด้วย SEM microscope (JEOL model JSM-6510, Tokyo, Japan) ที่ accelerating voltage of 15kV และ magnification rate of 15000 X.

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของโยเกิร์ตผลไม้ในระหว่างการเก็บ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของโยเกิร์ตผลไม้ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลดังแสดงในภาพที่ 1 (in Fig. 1). จะเห็นว่าเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง โดย ค่าความเป็นกรด-ด่างในสัปดาห์ที่ 3 ของโยเกิร์ตปราศจากผลไม้ โยเกิร์ตสับปะรด โยเกิร์ตมะละกอ และ โยเกิร์ตมะม่วง มีค่าเท่ากับ 4.22, 4.14, 4.26 และ 4.20 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sadaghdar et al. (2012); Kailasapathy, K. (2006); Saxelin et al. (1999). การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของโยเกิร์ตผลไม้ แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ในระหว่างการเก็บ อาจขึ้นอยู่กับสารอาหารในโยเกิร์ต (Srisuvor et al., 2013). ในระยะแรกของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus thermophilus* ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และผลิตกรดฟอมิก (formic acid) ซึ่งเป็นกรดที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำนมลดลง อัตราการเจริญเติบโต ของเชื้อจุลินทรีย์ *Streptococcus thermophilus* จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำนมลดลงถึง 5.4 ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่กระตุ้นให้เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp.เติบโตได้อย่างรวดเร็ว เพราะเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ เป็นจุลินทรีย์ที่ทนกรด และสามารถผลิตกรดแลคติก เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำนมลดลงถึงระดับ 4.5 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp.ก็จะลดลง และในระหว่างการเก็บโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำ เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ เชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* ในผลไม้จะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างช้าๆ (Tamine, 2002).

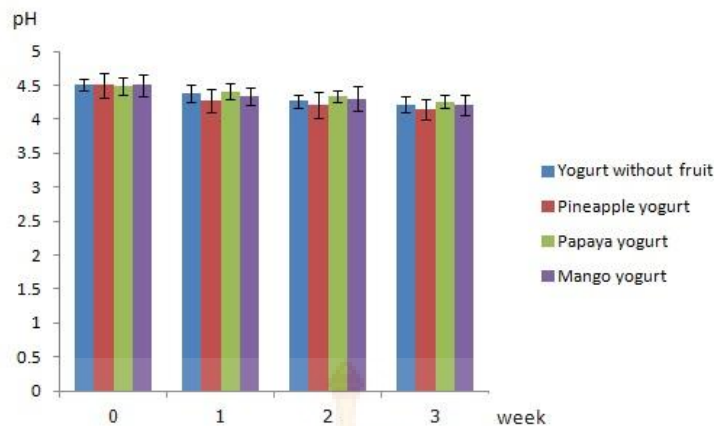


Fig. 1 Changes in pH throughout the shelf life of fruit yogurt samples.

4.2 ผลของชนิดของผลไม้ต่อการอยู่รอดของเชื้อโปรไบโอติกในโยเกิร์ต

ผลของชนิดของผลไม้ต่ออัตราการอยู่รอดของเชื้อโปรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium animalis*) ในโยเกิร์ตผลไม้ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 2 (in Fig. 2) พบว่า ในวันที่ 0 (เริ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C) เชื้อโปรไบโอติกในโยเกิร์ตมีปริมาณ 3.37×10^9 cfu/g และลดลงจนเหลือ 8.17×10^7 cfu/g เมื่อเก็บไว้นาน 3 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างในโยเกิร์ตลดลงทำให้อัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตลดลง ในโยเกิร์ตมะละกามีปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติก มากที่สุด คือ 1.47×10^8 cfu/g ซึ่งจากรายงานของ CODEX (2003) ระบุว่า การบริโภคจุลินทรีย์โปรไบโอติก ที่มีชีวิตในโยเกิร์ตจำนวน 10^6 - 10^7 cfu/g จะมีประโยชน์ต่อร่างกาย

จากภาพที่ 3 (Fig. 3) แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในโยเกิร์ต พบว่า โยเกิร์ตผลไม้มีอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์มากกว่าโยเกิร์ตธรรมดา ซึ่งผลการทดลอง สอดคล้องกับผลการค้นพบของ Kailasapathy et al. (2008) ดังนั้นจึงทำการศึกษาโครงสร้างของผลไม้ในโยเกิร์ต ที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อของมะละกามีโครงสร้างที่พรุนกว่าของ สับปะรด และมะม่วง ดังแสดงในภาพที่ 4 (Fig. 4)

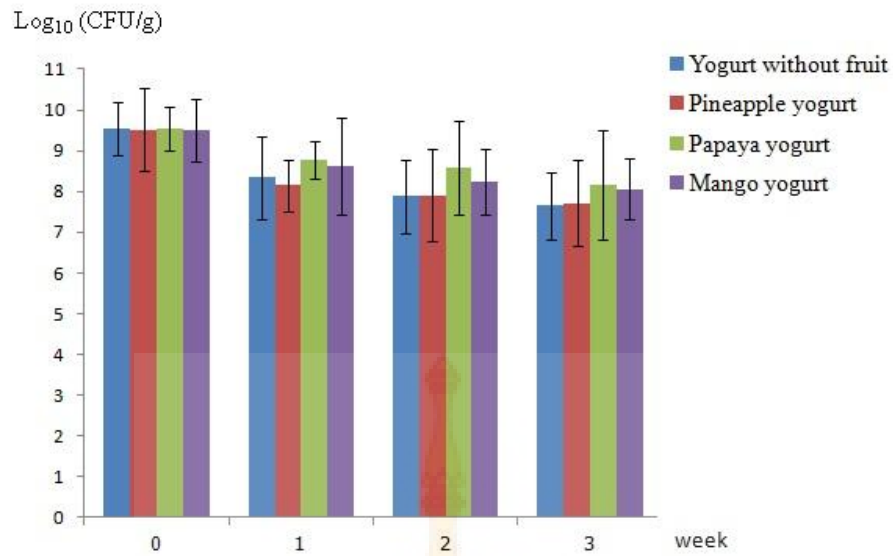


Fig. 2 Viability of probiotic bacteria in fruit yogurt during storage at $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$

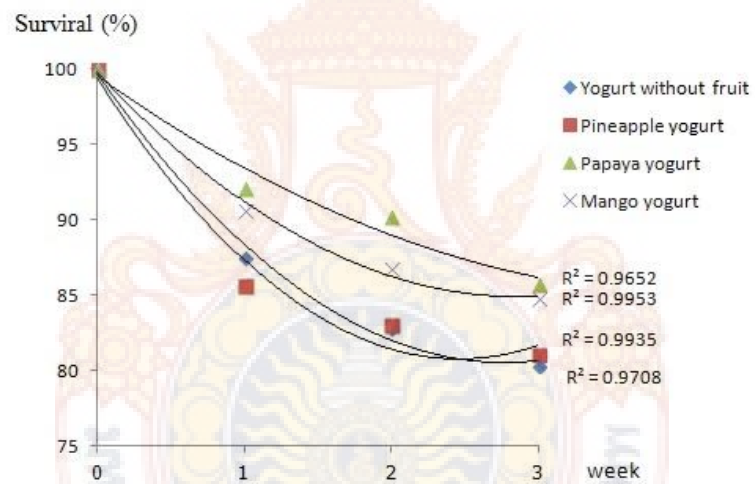


Fig. 3 Survival rate (percentage) of probiotic bacteria in fruit yogurts during storage at

$5 \pm 2^{\circ}\text{C}$

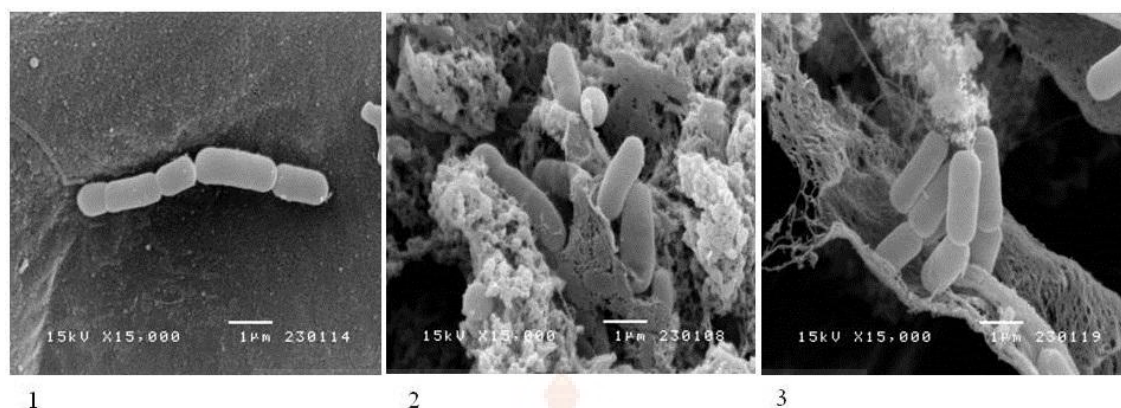


Fig. 4. Scanning electron micrographs of pineapple in pineapple yogurt (1), papaya in papaya yogurt (2), and mango in mango yogurt (3) after kept at $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 3 weeks with magnification of 15000 X.

4.3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตผลไม้ที่แปรรูปของผลไม้

จากการแปรรูปของผลไม้ในโยเกิร์ตผลไม้ เป็น 3 ชนิด คือโยเกิร์ตสับปะรด โยเกิร์ตมะละกอ และโยเกิร์ตมะม่วง ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1) แสดงให้เห็นว่า ชนิดของผลไม้มีผลกลิ่น กลิ่นรส และความชอบรวมของโยเกิร์ตผลไม้ อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยโยเกิร์ตสับปะรด และโยเกิร์ตมะม่วงมีคะแนนด้านกลิ่น กลิ่น รส และความชอบรวมมากกว่าโยเกิร์ตมะละกอ และโยเกิร์ตปราศจากผลไม้ นอกจากนั้นจากการทดลองยัง พบว่าชนิดของผลไม้ไม่มีผล ต่อคะแนนทางด้าน ลักษณะปรากฏ สี และเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ต

Table 1 Sensory properties of fruit yogurt and various kinds of fruit.

Characteristics	Yogurt without fruit	Pineapple yogurt	Papaya yogurt	Mango yogurt
Appearance ^{ns}	7.14±1.52	6.96±1.66	7.12±1.27	6.90±1.49
Color ^{ns}	6.62±1.80	6.81±1.02	6.75±1.48	6.57±1.22
Odor	6.48±1.40 ^b	7.57±1.19 ^a	6.52±1.05 ^b	7.06±1.13 ^{ab}
Texture ^{ns}	7.56±1.21	7.21±1.30	7.54±1.37	7.38±1.15
Flavor	6.40±0.54 ^{bc}	7.44±1.05 ^a	6.26±0.92 ^c	7.26± 1.33 ^{ab}
Overall preference	6.13±1.07 ^b	7.34±0.92 ^a	5.76±1.45 ^b	7.05±1.10 ^a

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไบโอโยเกิร์ตผสมเนื้อผลไม้ ด้วยเชื้อ *Bifidobacterium* สรุปได้ว่าชนิดของผลไม้ไทย มีผลต่อสมบัติทางประสาทสัมผัส และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกในโยเกิร์ตผลไม้ ดังนี้

1. ชนิดของผลไม้ ไม่มีผลต่อคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัส ทางด้านลักษณะปรากฏ สี และเนื้อสัมผัส ของโยเกิร์ตผลไม้ แต่มีผลต่อ คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัส ทางด้านกลิ่น กลิ่นรส และความชอบรวม ของโยเกิร์ตผลไม้ โดยโยเกิร์ตมะละกอมะละกอจะมีคะแนนต่ำกว่าโยเกิร์ตสับปะรด และโยเกิร์ตมะม่วง
2. ชนิดของผลไม้ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยโยเกิร์ตมะละกอ มีอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากมะละกอเป็นผลไม้ที่เนื้อโครงสร้างพรุนกว่า เนื้อเชื้อของสับปะรด และมะม่วง จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าไปแทรกอาศัยอยู่ได้ดีกว่า



เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- ไชยวัฒน์ ไชยสุตและคนอื่นๆ .(2553). **สุขภาพดีด้วยโปรไบโอติก**. ปทุมธานี : ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อสังคม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- จักรกฤษณ์ วัชรราชกูร์. (2552). **การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมแพะผสมน้ำนมวัวที่มีการเติมแบคทีเรียโปรไบโอติกและผลของการบริโภคต่อการผลิตอิมมูโนโกลบูลินเอ ในวัยรุ่นที่มีสุขภาพดี**. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ภวัต สังขวัฒน์. (2544) **การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก**. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศรินทิพย์ พงษ์สว่าง (2550) **การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตผลไม้รวม โดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลอง**. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ปิ่นนรี ชินวรรณวงศ์ (2551) **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีมโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง**. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- วิมล ศรีสุข. (มปป). 4 ขั้นตอน การเลือกโปรไบโอติกส์ ในความรู้สู่ประชาชน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุญาณี พงษ์ธนาภิกร. (2549). **โปรไบโอติกและโปรไบโอติก ใน อาหารสุขภาพ: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**.
- อุทัย แก้วเย็น. (2549). **โปรไบโอติกส์ ใน สงขลานครินทร์เวชสาร : คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**.
- CODEX Alimentarius Commission.: CODEX standard for fermented milks.
Codex Stan 243-2003. Retrieved June 6, 2013, from /http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf
- FAO/WHO.: Guidelines for the evaluation of probiotics in food 2002. Retrieved July 6, 2013, from /ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.
- Gilliland, S. E.: Probiotics. In B. Caballero, (Chief Ed), Encyclopedia of Food Science and Nutrition (2nd edition), New York: Academic press. 2003.
- IDF.: *In Standard: Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) standard of identity*. Brussels, Belgium, 1997: 41(4).
- Kailasapathy, K.: Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their

- effect on the sensory properties of yoghurt. LWT-Food Science and technology, 39, 2006, pp. 1221-1227
- Kailasapathy, K., Harmstorf, I., and Phillips, M.: Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* in stirred fruit yogurts. LWT-Food Science and technology, 41, 2008, pp.1317-1322.
- Larmond, E.: Laboratory methods for sensory evaluation of food. Publication No. 1637. Ottawa: Food Research Institute, Canada Department of Agriculture, 1982.
- Lee, Y. J., Yu, W.K. and Heo, T. R. 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Vol. 21: 340-346.
- Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J.: The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. Int. Dairy J., 8, 1998, pp.749-758.
- Sadaghdar, Y., Mortazavian, A. M., and Ehsani, M. R.: Survival and activity of 5 probiotic *Lactobacilli* strains in 2 types of flavored fermented milk. Food Sci. Biotechnol., 21(1), 2012, pp. 151-157.
- Saxelin, M., Grenov, B., Svensson, U., Fonden, R., Reniero R., and Mattila-Sandholm, T.: The technology of probiotics. Trends Food Sci. Tech., 10, 199, pp. 387-392.
- Shah, N.: Yogurt/The product and its manufacture. In B. Caballero, (Chief Ed.), Encyclopedia of Food Science and Nutrition (2nd edition), New York: Academic press. 2003.
- Shah, N. P.: Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci., 83, 2000, pp. 894-907.
- Srisuvar, N., Chinprahast, N., Prakitchaiwattana, C., and Subhimaros, S.: Effect of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yogurt with probiotic-cultured banana purée. LWT-Food Science and technology, 51, 2013, pp. 30-36.
- Tamine, A. Y.: Microbiology of starter cultures. In R. K. Robinson, (Ed), Dairy Microbiology Handbook (3th edition), New York: John Wiley and Sons. 2002.

Tamine, A. Y. and Robinson, R. K.: Yoghurt Science and Technology. Pergamon Press Ltd. Exeter, Great Britain. 1985.

Ventura, M., Elli, M., Reniera, R. and Zink, R., 2001. Molecular microbial analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, Vol. 36: 113-121.



ภาคผนวก
ร่างบทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารต่างประเทศ





Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences

Effect of Thai fruits on Sensory properties of Fruit Yogurt and Survival of Yogurt Starter Culture added with Probiotic Strains in Fruit Yogurt

Duangrutai Thumrongchote*

Rajamangala University of Technology Krungthep, Faculty of Home-Economics Technology, Department of Food
Technology and Nutrition 149 Chareon Krung Rd., Yannawa, Sathorn, Bangkok 10120, Thailand

ABSTRACT

The effect of Thai fruits on the sensory properties of fruit yogurt, and the survival of yogurt starter culture, with added probiotic strains in fruit yogurt, were studied at a refrigerated temperature ($5 \pm 2^{\circ}\text{C}$) during 3 weeks of storage. The purpose of this research was to study the influence of Thai fruits, including pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr.), papaya (*Carica papaya* L.), and mango (*Manifera Indica* Linn.), on both the sensory properties and survival of fruit yogurt. The results revealed that the addition of Thai fruit purée was not significantly different ($p > 0.05$) on the accepted mean score of fruit yogurt. The highest average mean score was fruit yogurt with pineapple (7.14), while fruit yogurt with mango and papaya had an average mean score 6.98 and 6.93. The decline of probiotic bacteria cells in pineapple fruit yogurt and mango fruit yogurt were significantly greater than papaya fruit yogurt. The morphology of fruit in yogurt after being stored for three weeks at a temperature of $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, after examination with an Electron microscope, revealed that papaya has a more porous structure than mangos and pineapples. Therefore, probiotic bacteria can be embedded and survive in papaya longer than in the other types of fruit purée.

Keywords: Probiotics; survival of probiotic bacteria; fruit yogurt; pineapple yogurt; papaya yogurt; mango yogurt.

*Corresponding author

INTRODUCTION

Yogurt is defined as a product resulting from milk by fermentation with the mixed starter culture consisting of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* [1, 2]. It is normally produced using skimmed milk as a raw material. Yogurts differ according to their chemical composition, the method of production, the type of flavoring used, and the nature of the post incubation process. There are many types of yogurt; flavored yogurt or fruit yogurt, frozen yogurt, low-lactose yogurt, and heated yogurt.

In Thailand, yogurt containing beneficial microorganisms or probiotic cultures, such as lactobacilli and bifidobacteria, have become more popular. Probiotic bacteria in yogurt, which are living microorganisms that survive their passage through the digestive system, and help to restore microflora balance in the gut [3, 4]. There are many benefits of probiotic bacteria on the consumer health, such as control of number of bacteria in the colon, stimulation of the human immune system, the inhibition of some types of tumor cells, the reduction of cholesterol, and the symptoms of diarrhea [5, 6]. The Food and Drug Administration of Thailand declared that probiotic bacteria should be viable, active, and abundant (at least 10^7 CFU/mL) in fermented milk yogurt to the date of minimum duration [7]. The viability of probiotic bacteria in yogurt depends on strain, product acid, dissolved oxygen, fermentation time, storage temperature, incubation temperature, nutrients, the concentration of sugars, and food additives.

Lactobacilli are Gram positive and rod-shaped, while bifidobacteria are Gram positive rods of variable morphology that show branching and pleomorphism. Bifidobacteria were first isolated by Tissier at the Pasteur Institute, France, and dominate the gut flora of breast-fed infants. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. are difficult to propagate because of their specific nutritional requirements. Bifidobacteria are anaerobic, and therefore high oxygen levels may affect their growth and viability. However, *Lactobacillus acidophilus* is reported to have a high cytoplasmic buffering capacity (pH 3.72 to 7.74), which allows it to resist changes in cytoplasmic pH and to gain stability under acidic conditions. *Lactobacillus acidophilus* is more tolerant of acidic conditions than Bifidobacteria. The growth of *Bifidobacterium* spp. is significantly retarded below pH 4.0 [1, 8].

Furthermore, Sadaghar *et al.* [9] reported that the type of fruit effects the decline in cell count of probiotic bacteria in fruit fermented milk. They found that the decline in cell count of Lactobacilli strains in strawberry fermented milk was significantly greater than that of peach fermented milk. The twin objectives of this study were to assess the impact of adding Thai fruits to the sensory qualities of fruit yogurt, and to investigate the survival of probiotic cultures in fruit yogurt after being stored at a temperature of $5 \pm 2^\circ\text{C}$ for three weeks.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

Strains

Freeze-dried yogurt starter culture (Lyofast SAB442B) was obtained from Clerici-Sacco, Italy. The culture consisted of yogurt starter bacteria (*Streptococcus thermophilus*) and probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*).

Starter culture

The starter culture was prepared by mixing the yogurt starter culture in homogenized and sterilized milk at the ratio of milk: starter culture of 100:0.5 (w/w). The mixture was held overnight at a temperature of $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Thai fruit preparation

The Thai fruits in this research consisted of three types; pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.), papaya (*Carica papyra* L.), and mango (*Manifera Indica* Linn.). The fruit was peeled and cut into small pieces $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$. The fruits were cooked in boiled 20 % (w/w) sucrose solution for 10 minutes, and then cooled to a temperature of $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Yogurt preparation

Homogenized and sterilized milk was heated to a temperature of $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and skim milk powder (SMP) was added with high-speed stirring, to make 180g/l total solids in yogurt. The mixture was heated to $85 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and held at this temperature for 30 minutes, and then cooled to $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The yogurt starter culture (no. 2.2) was added to the yogurt mixture at ratio of 0.5 L starter culture: 2 L mixture and dispersed by mixing. The 100 mL yogurt mixture was poured in 4 oz plastic cup, which has 10 g Thai fruit (no. 2.3) in the bottom of cup, and incubated at $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 5 hours, after that the fruit yogurt was kept at $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 3 weeks.

METHODS

Determination of pH

The pH of fruit yogurt samples was determined using a digital pH meter (Eutech, Cyberscan 1000, Singapore). The pH meter was calibrated using reference pH 4.0 and 7.0 buffer solution. An analysis to evaluate the pH level was made after the storage of fruit yogurt at a temperature of $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 0, 1, 2, and 3 week periods. All samples were analyzed in triplicate.



Sensory evaluation

Fruit yogurt samples were coded with three digit random numbers and served at 10 ± 2 °C to 30 untrained panelists, consisting of students from the Department of Food Technology and Nutrition, Rajamangala University of Technology Krungthep. A nine-point hedonic scale was used for appraising the sensory traits, viz. appearance, odor, texture, flavor and overall preference [10].

Microbiological analysis

The viability of probiotic microorganisms in fruit yogurt samples were analyzed by viable plate count method under anaerobic conditions [11] after the storage of fruit yogurt at a temperature of 5 ± 2 °C for 0, 1, 2, and 3 week periods. A one gram yogurt sample was weighed directly into a sterile 10 mL tube and mixed with 9 mL of peptone water (1.0g/L) and spread inoculated in duplicate onto plates of MRS agar (Merck, Germany). The inoculated plates were incubated at 37 °C for 72 hours under anaerobic conditions. All samples were analyzed in triplicate.

Scanning Electron Microscope (SEM)

The samples of fruit set in yogurt, after being stored at a temperature of 5 ± 2 °C for a three week period were analyzed with a SEM microscope (JEOL model JSM-6510, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 15kV and a magnification rate of 15000 X.

RESULTS AND DISCUSSION

pH changes during fruit yogurt storage

The pH changes in fruit yogurt samples during storage at 5 ± 2 °C for a period of 3 weeks were not significantly different in all samples (in Fig. 1). The decline in pH of all the stored fruit yogurts occurred during the shelf life study. The decrease of pH levels in stored fruit yogurt had a tendency to decrease more than in yogurt without fruit. The initial pH value of the yogurt samples was around 4.50, while the final pH value of yogurt without fruit, pineapple yogurt, papaya yogurt, and mango yogurt were 4.22, 4.14, 4.26, and 4.20 respectively. This result was consistent with the findings of Sadaghdar et al. [9]; Kailasapathy, K. [12] and Saxelin et al. [13]. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the pH at day 0 and day 21 across all types of stored yogurt samples. The decrease in the pH value of yogurt, throughout its shelf life, may be due to the fact that the pH value of yogurt is dependent on factors including nutrient composition, and continued fermentation by yogurt bacteria in yogurt samples [14, 15]. In the initial phase of yogurt fermentation, *Streptococcus thermophilus* grows rapidly, reducing the pH value to approximately 5.4, which then stimulates the growth of *Lactobacillus* spp., which is both acid-tolerant and produces lactic acid, therefore reducing the pH value. *Sc. thermophilus* uses oxygen during its growth, which makes its oxidation-reduction potential more favorable for *Lactobacillus* spp., and it also produces formic acid, which stimulates the growth of

Lactobacillus, until the pH decreases to a level of 4.5. During storage at low temperatures, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in fruit yogurt grow more slowly [16].

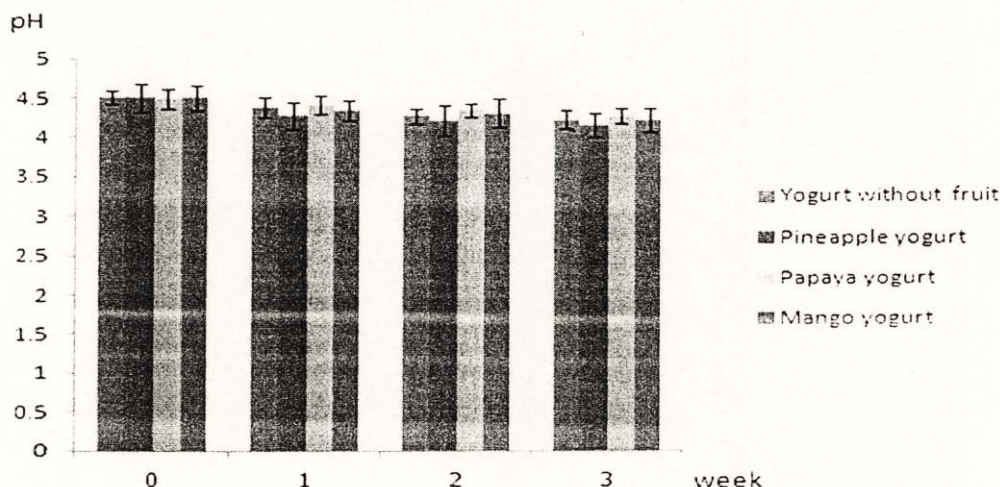


Fig. 1 Changes in pH throughout the shelf life of fruit yogurt samples

Effect of Thai fruit on probiotic viability

Fig. 2 shows the effect of Thai fruit on probiotic bacteria viability (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*) in yogurt samples after storage at a temperature of $5 \pm 2^\circ\text{C}$ for a period of three weeks. The average viability of probiotic bacteria decreased from 3.37×10^9 cfu/g on day 0 to 8.17×10^7 cfu/g on day 21, and all stored yogurt contained a higher amount of probiotic bacteria than the recommended level (10^6 – 10^7 cfu/g) [7, 17]. The viability of probiotic bacteria in papaya yogurt was 1.47×10^8 cfu/g on day 21, which was the highest count. The decline in bacterial counts may be due to the decline in the pH value of yogurt.

The results of the study showed that the survival of probiotic bacteria depends on the type of fruit used in yogurt. The numbers of viable cells in yogurt without fruit and pineapple yogurt decreased more than in papaya yogurt and mango yogurt during storage (Fig. 3). Thus, the type of fruit has an effect on the survival of probiotic bacteria in yogurt samples, especially papaya and mango. This result was consistent with the findings of Kailasapathy et al. [18].

In this study, the morphology of fruit in yogurt samples indicated that fruit tissue promoted the survival of probiotic bacteria in yogurt stored at a temperature of $5 \pm 2^\circ\text{C}$. Papaya tissue was determined to be more porous than that of mango or pineapple tissue, so probiotic bacteria could be inserted into the more porous tissue of papaya in order to survive longer (Fig. 4).

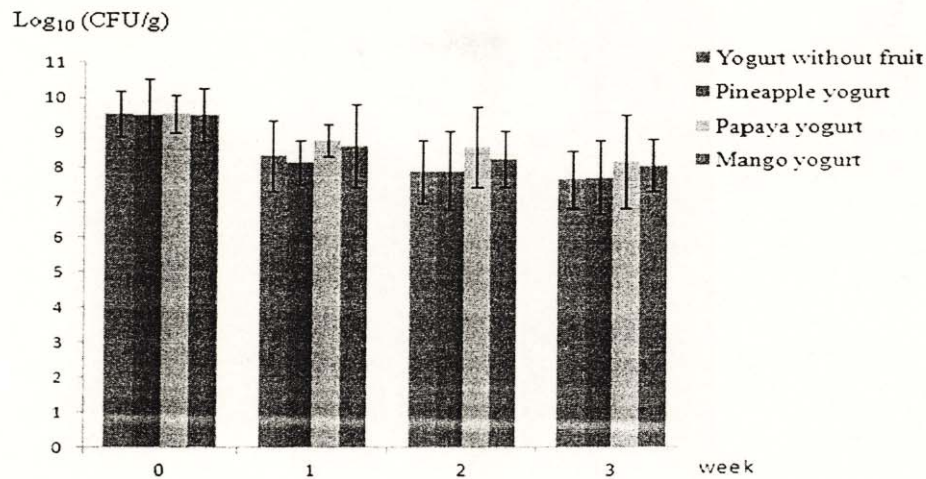


Fig. 2 Viability of probiotic bacteria in fruit yogurt during storage at 5 ± 2 °C

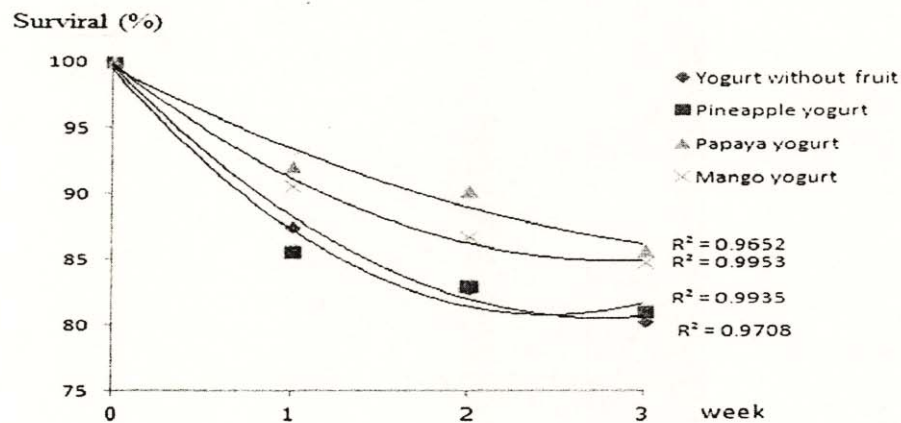


Fig. 3 Survival rate (percentage) of probiotic bacteria in fruit yogurts during storage at 5 ± 2 °C

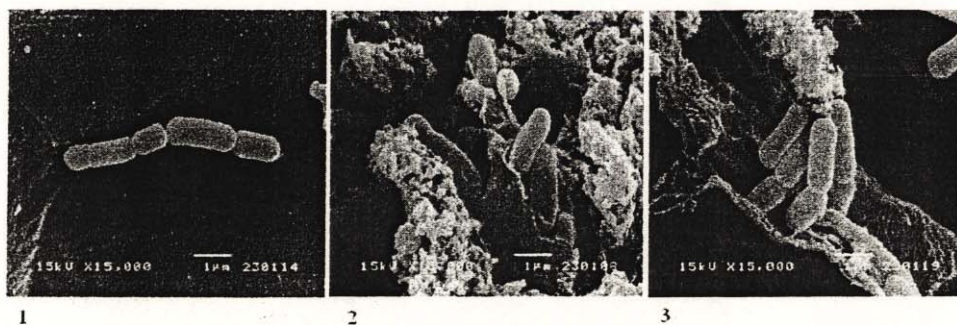


Fig. 4. Scanning electron micrographs of pineapple in pineapple yogurt (1), papaya in papaya yogurt (2), and mango in mango yogurt (3) after kept at 5 ± 2 °C for 3 weeks with magnification of 15000 X.

Sensory evaluation

The sensory scores of the yogurt samples are provided in Table 1. The results showed that the addition of pineapple or mango significantly ($p \leq 0.05$) affected odor, flavor, and overall preference more than yogurt with papaya or without fruit. However, it had no effect on the appearance, color and texture of yogurt. This may be due to the fact that the odor and the flavor of pineapple and mango improved the odor and the flavor of the yogurt more than the papaya did.

Table 1 Sensory properties of fruit yogurt and various kinds of fruit

Characteristics	Yogurt without fruit	Pineapple yogurt	Papaya yogurt	Mango yogurt
Appearance ^{ns}	7.14±1.52	6.96±1.66	7.12±1.27	6.90±1.49
Color ^{ns}	6.62±1.80	6.81±1.02	6.75±1.48	6.57±1.22
Odor	6.48±1.40 ^b	7.57±1.19 ^a	6.52±1.05 ^b	7.06±1.13 ^{ab}
Texture ^{ns}	7.56±1.21	7.21±1.30	7.54±1.37	7.38±1.15
Flavor	6.40±0.54 ^{bc}	7.44±1.05 ^a	6.26±0.92 ^c	7.26±1.33 ^{ab}
Overall preference	6.13±1.07 ^b	7.34±0.92 ^a	5.76±1.45 ^b	7.05±1.10 ^a

CONCLUSION

The types of Thai fruits used in the yogurt affected some sensory properties, as well as the survival rate of the probiotic bacteria in the yogurt. The sensory scores, in terms of order and flavor, ranked pineapple yogurt and mango yogurt higher than papaya yogurt and yogurt without fruit ($p \leq 0.05$). In addition, the type of fruit can significantly improve the survival rate of probiotic bacteria in fruit yogurt stored at a temperature of at 5 ± 2 °C for three weeks. The decrease in percentage of the survival rate of probiotic bacteria in yogurt without fruit was greater than that of both papaya yogurt and mango yogurt. Furthermore, this study also revealed that the viability of probiotic bacteria was influenced by the type of fruit tissue.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by the Research and Development Institute at Rajamangala University of Technology, Krungthep. The author would like to acknowledge the valuable help provided by the Department of English for International Communication in the Faculty of Liberal Arts, at Rajamangala University of Technology, Krungthep, for proofreading this paper.

REFERENCES

- [1] Shah N. In B. Caballero, (Chief Ed.), Encyclopedia of Food Science and Nutrition (2nd edition), New York: Academic press, 2003; 6252-6258.



- [2] Olivera MN, Sodini I, Remeuf F and Corrieu G. *Int Dairy J* 2001; 11:935-942.
- [3] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food 2002; from [/ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf).
- [4] McCartney AL. In B. Caballero, (Chief Ed.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2nd edition), New York: Academic press, 2003; 463-470.
- [5] Ouwehand A C and Salminen S J. *Int Dairy J.* 1998; 8:749-758.
- [6] Gilliland S E. In B. Caballero, (Chief Ed), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition* (2nd edition), New York: Academic pres, 2003; 4792-4797.
- [7] [/http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf).
- [8] Magarinos H, Selaive S, Costa M, Flores M, and Pizarro O. *Int J Dairy Technol.* 2007; 60: 128-134.
- [9] Sadaghdar Y, Mortazavian A M and Ehsani M R. *Food Sci Biotechnol* 2012; 21(1): 151-157.
- [10] Larmond E. *Laboratory methods for sensory evaluation of food.* Publication No. 1637, 1982.
- [11] IDF. In *Standard: Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) standard of identity.* Brussels, Belgium, 1997: 41(4).
- [12] Kailasapathy K. *LWT-Food Sci Technol* 2006; 39: 1221-1227.
- [13] Saxelin M, Grenov B, Svensson U, Fonden R, Reniero R, and Mattila-Sandholm, T. *Trends Food Sci Tech* 1999; 10: 387-392.
- [14] Srisuvor N, Chinprahast N, Prakitchaiwattana C, and Subhimaros S. *LWT-Food Sci Technol* 2013; 51: 30-36.
- [15] Rezaei R, Khomeiri M, and Aalami M. *J Food Sci Technol* 2012; DOI 10. 1007/S13197-012-0751-7.
- [16] Lin F M, Chiu C H and Pan T M. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 2004; 31: 559-564.
- [17] Shah NP. *J Dairy Sci* 2000; 83: 894-907.
- [18] Kailasapathy K, Harmstorf I, and Phillips M. *LWT-Food Sci Technol* 2008; 41:1317-1322.