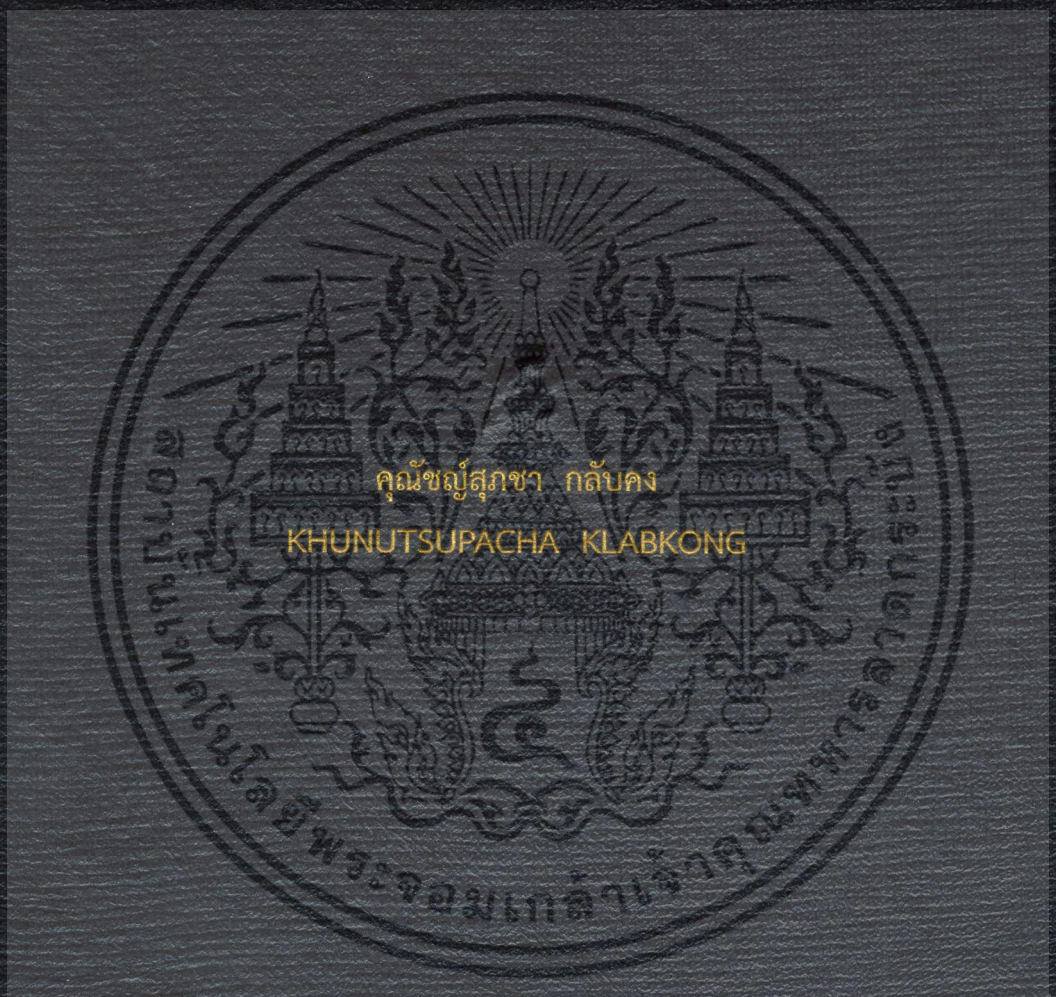
การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ และสมบัติในการหมัก

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM MURRAH BUFFALO'S MILK AND THE FERMENTATION CHARACTERISTICS



คุณัชญ์สุภชา กลับคง

KHUNUTSUPACHA KLABKONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-ED-M-241-081

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ และสมบัติในการหมัก

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM MURRAH BUFFALO'S MILK AND THE FERMENTATION CHARACTERISTICS

คุณัชญ์สุภชา กลับคง

KHUNUTSUPACHA KLABKONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาครุศาสตร์เกษตร

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-ED-M-241-081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM MURRAH BUFFALO'S MILK AND THE FERMENTATION CHARACTERISTICS

KHUNUTSUPACHA KLABKONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL EDUCATION
FACULTY OF INDUSTRIAL EDUCATION
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-ED-M-241-081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015
FACULTY OF INDUSTRIAL EDUCATION
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์และสมบัติในการหมัก Isolation of Lactic Acid Bacteria from Murrah Buffalo's Milk and the Fermentation Characteristics
นักศึกษา	นางสาวคุณัชญ์สุภชา กลับคง
รหัสประจำตัว	53631001
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	ครุศาสตร์เกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.ปิ่นมณี ชวัญเมือง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา บุนนาค

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรวนิภา	ศิวะพิรุฬห์เทพ	
รศ.ดร.ปิ่นมณี	ชวัญเมือง	
รศ.ดร.จินตนา	บุนนาค	
ผศ.ดร.สีหนาท	ประสงค์สุข	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ	30 มิถุนายน 2558 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป
สถานที่สอบ	ณ ห้องเรียนปริญญาเอก คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.พีระวุฒิ สุวรรณจันทร์)
คณบดี คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม
วันที่ 23 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์และสมบัติในการหมัก
นักศึกษา	นางสาวคุณัชญ์สุภชา กลับคง
รหัสประจำตัว	53631001
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	ครุศาสตร์เกษตร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร.ปิ่นมณี ขวัญเมือง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ. ดร.จินตนา บุนนาค

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1. เพื่อคัดแยกและเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ 2. จำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ และ 3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการหมักโยเกิร์ตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือและตรวจสอบการยอมรับของผู้บริโภค ผลการศึกษาพบว่าคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ที่มีลักษณะของโคโลนี กลม นูน ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีความมันวาว ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อนำมาศึกษาต่อด้วยการย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย และการมีเอนไซม์คะตะเลสหรือไม่ สามารถคัดเลือกได้เพียง 8 ไอโซเลต ศึกษาต่อโดยนำมาทดสอบการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีน มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถย่อยเคซีนได้ ดังนั้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบการหมักโดยดูจากลักษณะเคิร์ดสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 2 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียรหัส Mbmf np 3 และ Bml2 เมื่อนำแบคทีเรียไปจัดจำแนกในระดับสปีชี่ส์โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบเอพีไอพบว่า แบคทีเรียรหัส Mbmf np 3 ไม่สามารถจัดจำแนกได้ ส่วนแบคทีเรียรหัส Bml2 จัดจำแนกออกมาเป็น *Lactobacillus rhamnosus* การศึกษาคุณสมบัติการหมักโยเกิร์ตของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต ที่บ่มในอุณหภูมิ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการหมัก 41 องศาเซลเซียส ให้ลักษณะการเกิดเคิร์ดที่ดี และการศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมกระบือจากตัวอย่างที่ใช้ *L. rhamnosus* เป็นสตาร์ทเตอร์มากกว่าตัวอย่างที่ใช้ Unknown (Mbmf np 3) เป็นสตาร์ทเตอร์

คำสำคัญ : นมกระบือมูร่าห์ หัวเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติก โยเกิร์ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Isolation of Lactic Acid Bacteria from Murrah Buffalo's Milks and The Fermentation Characteristics
Student	Miss Khunutsupacha Klabkong
Student ID.	53631001
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Education
Year	2558
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Pinmanee KwanMuang
Thesis Co-Advisor	Assoc.Prof.Dr.Jintana Bunnak

ABSTRACT

The purposes of this reserch were to isolate and select pure culture of lactic acid bacterias from Murrah buffalo's milk, identify selected bacterias specie, and study the temperature level to ferment Murrah milk yogurt and do sensory test. The characteristics of all 10 isolates were small round shape, embossed, white, and glossy colony. After gram staining and enzyme catalase testing there were only 8 isolates could be selected. The testing of lactose fermentation and casein digestion were performed which found that 1 isolate could not digest casein. Then, the 7 bacteria isolates were used in fermentation process to evaluate curd forming. Finally, there were only 2 selected pure lactic acid bacteria isolates (Mbmf np 3 and Bml 2) in this study which met the qualification of lactic acid bacteria.The API kit was used to identify bacteria species. The Bml 2 selected bacteria isolate could be identified as *Lactobacillus rhamnosus*. However, the Mbmf np3 could not be identified. The selected lactic acid bacterias from this study were used to ferment Murrah milk for finding the optimum temperature in yogurt fermentation and the consumer acceptance. The results showed that the temperature of 41 $^{\circ}$C was suitable to ferment Murrah milk yogurt. The consumers preferred the yogurt fermented with *Lactobacillus rhamnosus* bacteria more than Unknown (Mbmf np3) bacteria.

Keywords : Murrah Buffalo's milk, Starter culture, Lactic acid bacteria, Yogurt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.ปิ่นมณี ขวัญเมือง และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.จินตนา บุนนาค ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลือแก้ไขปัญหาในสิ่งต่างๆ ตั้งแต่เริ่มต้นของการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างราบรื่น จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และยังเป็นประสบการณ์ใหม่ที่ผู้วิจัยได้เรียนรู้ถึงความอดทนต่อปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำวิจัย ทำให้เกิดการเรียนรู้วิธีการแก้ปัญหา

ขอขอบคุณ รศ.ดร.พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเรื่องสถิติ การวางแผนการทดลอง คอยอบรมและตักเตือนให้เป็นคนมีความรับผิดชอบ รวมถึงคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ร่วมตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่อง พร้อมเสนอแนะองค์ความรู้ต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้การอนุเคราะห์ในเรื่องน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ หากไม่มีน้ำนมกระบือเพื่อใช้กับการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้วิทยานิพนธ์เรื่องคงมิสามารถเกิดได้

ขอขอบคุณโรงเรียนกาสรกสิวิทย์ จังหวัดสระแก้ว และแหล่งการเรียนรู้นอกระบบอื่น ๆ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ชี้แนะความรู้เรื่องของกระบืออย่างละเอียด รวมถึงสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (วว.) ที่ให้ความรู้เรื่องเชื้อจุลินทรีย์ และข้อมูลการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณครอบครัวนายนรากร ผังวิไล ที่มีส่วนร่วมในการช่วยเหลือด้านการเดินทาง และยานพาหนะในการรับวัตถุดิบระหว่างการวิจัย รวมถึงนายนวรุจ ยวงทอง นางสาวนลินี รัตนสุวรรณ และมิตรสหายของข้าพเจ้าท่านอื่นๆ ที่ให้กำลังใจช่วยเหลือซึ่งกันและกัน คอยฟันฝ่าอุปสรรคต่างๆ ไปด้วยกันระหว่างการเรียนจนสิ้นสุดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ลำดับสุดท้ายเป็นบุคคลที่ผู้วิจัยมิอาจละเว้นได้ คือ บิดา และมารดา รวมถึงพี่สาวอันเป็นที่รักของผู้วิจัย ผู้ซึ่งเสียสละทุกสิ่งทุกอย่าง คอยอบรม บ่มนิสัย ลำบาก ตรากตรำ เพื่อสนับสนุนการศึกษาให้ผู้วิจัยมีความเจริญก้าวหน้าไปในทิศทางที่ดี และคอยให้กำลังใจอยู่ไม่ห่าง ซึ่งพระคุณนี้หาใครเปรียบมิได้ สำหรับคุณค่าและคุณงามความดีใด ๆ ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอมอบเพื่อทดแทนพระคุณ บิดามารดาและครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ถ่ายทอดประสบการณ์ดี ๆ และคอยให้ความช่วยเหลืออนุเคราะห์ด้านต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย ด้วยความเคารพยิ่ง

คุณัชญ์สุภชา กลับคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....VI
สารบัญภาพ.....VII
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.3 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย.....3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....4
1.5 สมมติฐานของการวิจัย.....4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
1.7 นิยามศัพท์เฉพาะในงานวิจัย.....4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6
2.1 กระบือ.....6
2.2 น้ำนมกระบือ.....8
2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกและการจัดจำแนก.....11
2.4 กล้าเชื้อและการใช้ประโยชน์.....13
2.5 ผลิตภัณฑ์นมหมัก.....20
2.6 กระบวนการทางชีวเคมีในการหมัก.....22
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....24

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....28
3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์ทำการวิจัย.....28
3.2 การรับตัวอย่างน้ำนมและวิธีการเก็บรักษาน้ำนมดิบ.....29
3.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือและการตรวจสอบ.....29
3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากน้ำนมกระบือ.....31
3.5 การนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกและคัดเลือกได้มาศึกษาสมบัติในการหมักโยเกิร์ต.....31

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....33
4.1 การศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือ.....33
4.2 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกในระดับสปีชี่ส์.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการหมักโยเกิร์ตจากเชื้อที่คัดเลือกได้.....40

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....48
5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย.....48
5.2 ข้อเสนอแนะ.....48

บรรณานุกรม.....49

ภาคผนวก.....53
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....54
ภาคผนวก ข วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ และการย้อมสีแกรม.....58
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์ของโยเกิร์ต.....60
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์.....63

ประวัติผู้เขียน.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการระหว่างนมกระบือและนมโค.....7
2.2 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมจากสัตว์แต่ละชนิดเทียบกับน้ำนมคน...8
4.1 ผลการทดสอบคะตะเลสและลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....33
4.2 ผลการศึกษาการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีน.....37
4.3 เกิดเคิร์ดและลักษณะทางประสาทสัมผัสในการหมักโยเกิร์ต.....39
4.4 เปรียบเทียบค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และจำนวนเชื้อในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 0 ชั่วโมง.....41
4.5 อิทธิพลร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดและอุณหภูมิที่มีผลต่อคุณภาพการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ เวลาการบ่มที่ 0 ชั่วโมง.....41
4.6 เปรียบเทียบค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และจำนวนเชื้อในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง.....42
4.7 อิทธิพลร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดและอุณหภูมิที่มีผลต่อคุณภาพการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ เวลาการบ่มที่ 8 ชั่วโมง.....42
4.8 ลักษณะเคิร์ดจากการหมักน้ำนมกระบือโดยใช้เชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส อายุการหมัก 8 ชั่วโมง.....44
4.9 ค่าเฉลี่ยของการทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือด้วยเชื้อ 2 สายพันธุ์.....46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะกระบือปลัก.....6
2.2 ลักษณะกระบือแม่น้ำ.....7
2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมัก.....18
2.4 วิถีการหมักกลูโคสแบบ homofermentative และ heterofermentative ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....23
4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง.....44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบือ (buffalo) เป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความสำคัญต่อเกษตรกร ในอดีตกระบือถูกใช้เป็นแหล่งแรงงานในการเกษตร มีการใช้มูลเป็นปุ๋ยและเมื่อมีความจำเป็นก็สามารถขายเป็นรายได้อีกทางหนึ่งด้วย กระบือสามารถแยกได้เป็นสองกลุ่มคือกระบือป่า และกระบือบ้าน สำหรับกระบือบ้านแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือกระบือปลัก (swamp buffalo) และกระบือแม่น้ำ (river buffalo) ความแตกต่างของกระบือทั้ง 2 ชนิด คือ กระบือปลักใช้เพื่อเป็นแรงงานและเลี้ยงเพื่อบริโภคเนื้อ ส่วนกระบือแม่น้ำเลี้ยงไว้เพื่อให้น้ำนมเพราะให้น้ำนมที่ดีและมีขนาดเต้านมใหญ่กว่ากระบือปลัก น้ำนมของกระบือแม่น้ำสามารถนำมาทำผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย ซึ่งในประเทศไทยการเลี้ยงกระบือแม่น้ำในการให้น้ำนมคือกระบือกลุ่ม murrah และ กลุ่ม gujarat (กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์. 2553 ก: online)

นมกระบือ (buffalo's milk) เป็นของเหลวที่ได้จากเต้านมของกระบือโดยปราศจากน้ำนมเหลือง ซึ่งผ่านการรีดอย่างสมบูรณ์ จุดเด่นของน้ำนมกระบือ คือ มีสารอาหารสูงกว่าน้ำนมโค ทั้งโปรตีน ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส และวิตามินเอ รวมถึงน้ำนมกระบือมีลักษณะสีขาวข้นเนียน ไม่มีกลิ่นคาว ดื่มง่ายกว่านมแพะ ส่วนของไขมันเนยในน้ำนมกระบือมีมากเป็นสองเท่าของน้ำนมวัว มีระดับคลอเรสเตอรอลต่ำกว่า นอกจากนั้นยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (natural antioxidant) เหมาะสำหรับผู้แพ้แลคโตสในน้ำนมโค (ศุภวัฒน์ คุณานุวัฒน์. 2552 : online) องค์ประกอบของน้ำนมจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสัตว์ พันธุ์ คุณลักษณะจำเพาะของสัตว์ ระยะการให้นม ช่วงเวลาการรีดนม ฤดูกาล อาหาร และโภชนาการ อุณหภูมิและสภาพแวดล้อม โรคของสัตว์ให้นม และปัจจัยอื่น ๆ เช่น อายุ น้ำนมจัดว่าเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์ และมีคุณสมบัติหลายประการในการนำไปประกอบอาหาร หรือผสมกับอาหารอื่น ๆ ได้ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550 ข: 26) (วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2538 : 46) กล่าวถึงน้ำนมว่า น้ำนมจะมีกลิ่นเฉพาะตัว รสหวานเล็กน้อย มีรสชาติมันเนื่องจากไขมันและโปรตีนที่ประกอบอยู่ ไม่ควรมีสิ่งสกปรกปะปน เพราะจุลินทรีย์ที่ปะปนจะทำให้คุณสมบัติของน้ำนมสูญเสียไปในขณะแปรรูป ขณะเดียวกันจุลินทรีย์บางชนิดที่ปะปนมากับน้ำนมอาจให้ประโยชน์ในทางบวก เช่น เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในน้ำนมสามารถนำไปใช้ผลิตเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นมหมักและผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่น ๆ ได้

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria : LAB) เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต อาจมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalace) ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อสภาวะความเป็นกรด ต้องการสารอาหารในการเติบโตสูง (Axelsson, 1998) แบคทีเรียกรดแลคติกแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่หนึ่งเรียกว่า homofermentative pathway กลุ่มนี้จะให้ผลิตภัณฑ์หลังกระบวนการหมักที่เป็นกรดแลคติก (lactic acid) เท่านั้น สำหรับกลุ่มที่สองเรียกว่า heterofermentative pathway หลังจากกระบวนการหมักจะได้กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีอยู่ในสภาพธรรมชาติมากมายหลายแหล่ง ทั้งในพืชผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์นมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ที่มีน้ำตาลแลคโตส หรือกลูโคส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารหลายชนิด ทั้งในระดับอุตสาหกรรมอาหาร และระดับครัวเรือน (อานัฐ ตันโช. 2551 : online) เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากน้ำนมที่ผ่านกระบวนการโฮโมจีไนซ์ เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลงหรือไม่ก็ได้ ทำการฆ่าเชื้อโดยการให้ความร้อนด้วยวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ หรือสเตอริไลซ์ จากนั้นหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วเรียกว่ากล้าเชื้อหรือหัวเชื้อ (Starter culture) เป็นจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้ในการหมัก และเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง อาจเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ หรือทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน ในด้านลักษณะการหมักของนมเป็นการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติก (Latic acid fermentation) ซึ่งจะให้กลิ่นรสเฉพาะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ ลักษณะการหมักผลิตภัณฑ์นมแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ acid type เป็นชนิดที่หมักให้กรดอย่างเดียว และ kefir type เป็นชนิดที่การหมักจะให้กรดและแก๊ส อาจมีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นเล็กน้อย (ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550 : 93 ก) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้จากตัวอย่างอาหาร เช่น ผัก ผลไม้ น้ำนม เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ปัจจุบันได้นำแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารโดยการหมัก ซึ่งน้ำนมกระบือเป็นแหล่งวัตถุดิบจากสัตว์ประเภทหนึ่งที่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจการแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้และนำมาใช้ประโยชน์

การศึกษานี้เป็นการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์แล้วนำมาจำแนกชนิดและสายพันธุ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติในด้านต่าง ๆ และนำเชื้อที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมกระบือหมัก ตลอดจนศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างน้ำนมกระบือจนได้เชื้อบริสุทธิ์

1.2.2 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาสมบัติในการหมักโยเกิร์ตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากน้ำนมกระบือ และการทดสอบชิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 กรอบแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 นำตัวอย่างน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์จากมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา บ่มให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญและแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจนได้เชื้อบริสุทธิ์

1.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาและทางชีวเคมี จากนั้นจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมกระบือ โดยชุดทดสอบ API 50 CHL

1.4.3 นำแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่จัดจำแนกได้มาศึกษาสมบัติในการหมักโยเกิร์ตและทดสอบชิม

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

ตัวอย่างน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์จากมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา มีแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ใช้ประโยชน์ในการหมักโยเกิร์ตจากน้ำนมกระบือได้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ดีที่แยกจากนมกระบือเหมาะต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการหมักโยเกิร์ต

1.6.2 กล้าเชื้อที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการหมักผลิตภัณฑ์ที่มีกระบวนการทางชีวเคมีในการหมักลักษณะเดียวกันกับโยเกิร์ต

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะในงานวิจัย

1.7.1 กระบือพันธุ์มูร่าห์ (river or riverine buffalo) หมายถึง กลุ่มกระบือแม่น้ำที่มีนิสัยชอบน้ำสะอาด ไม่ชอบลงแช่โคลน เป็นกระบือนมเลี้ยงไว้เพื่อรีดนม เป็นกระบือที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างแข็งแรง ลักษณะทั่วไปมีผิวหนังสีดำ หัวสั้น หน้าผากนูน เขาสั้น และบิดม้วนงอ ส่วนลำตัวจะลึกมาก มีขนาดเต้านมใหญ่กว่ากระบือปลัก

1.7.2 น้ำนมกระบือ (buffalo milk) หมายถึง ของเหลวที่ได้จากเต้าของกระบือแม่น้ำโดยปราศจากน้ำนมเหลือง และผ่านการรีดอย่างสมบูรณ์มีสารอาหารสูงมีสีขาวเนียน อีกทั้งยังมีความข้นกว่าน้ำนมโค

1.7.3 นมหมัก (fermented milk) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมมาจากน้ำนมผ่านการให้ความร้อนด้วยวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) จากนั้นหมักต่อด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ลักษณะการหมักของนมเป็นแบบ latic acid fermentation ให้กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสเฉพาะตามคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก

1.7.4 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria : LAB) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรคาริโอต (prokaryote) มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกัน เช่น รูปร่างกลมหรือรูปร่างรี (cocci) และรูปร่างท่อน (Rod) เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ ย่อยสลายเคซีนได้ ขาดเอนไซม์คะตะเลส (catalase) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(hseudocatalase) เช่น *Tetragenococcus* sp. มีความสามารถในการทำให้น้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดแลคติก (lactic acid fermentation) ขาดไซโตโครม (cytochrome) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative LAB ถ้าเปลี่ยนน้ำตาลด้วยกระบวนการหมักไปเป็นกรดแลคติก มากกว่า 85% ขึ้นไป จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative LAB หรือที่เรียกสั้นๆ ว่า homo LAB สามารถทนต่อสภาวะที่มีอากาศ (aerotolerant) สามารถทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเติบโต และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาลเพื่อที่สามารถนำไปหมักเป็นโยเกิร์ต

1.7.6 สมบัติของโยเกิร์ต หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของน้ำนมระหว่างการหมัก ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) การเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์

- การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่างในโยเกิร์ตที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก
- การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) หมายถึง เป็นค่าที่ใช้บอกความเข้มข้นจากของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลาย
- การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก หมายถึง ปริมาณความเป็นกรดที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นภายในโยเกิร์ต เมื่อเริ่มกิจกรรมการหมักจนสิ้นสุดอายุการหมัก ซึ่งทำการหาค่าโดยการใช้ชุดไตเตรท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่อง นมเปรี้ยว ระบุว่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในโยเกิร์ตจะต้องมีไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.6
- การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ หมายถึง การเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักโยเกิร์ตตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก จนครบอายุการหมัก ซึ่งประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องนมเปรี้ยว ระบุว่า จุลินทรีย์ที่ใช้ในกรรมวิธีการหมักคงเหลือในนมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังหมัก 1 กรัม ไม่น้อยกว่า 10,000,000 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระบือ

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

กระบือแยกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กระบือป่า และกระบือบ้าน สำหรับกระบือบ้านแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ กระบือปลัก (swamp bufffalo) กระบือแม่น้ำ (River buffalo) กระบือทั้งสองชนิดจะอยู่ในเผ่าพันธุ์และตระกูลเดียวกัน คือ Bubalina และ Bubalus มีชื่อวิทยาศาสตร์เดียวกันคือ *Bubalus bubalis* มีความแตกต่างกันทางสรีระวิทยา รูปร่าง และผลผลิตต่าง ๆ ชัดเจน จากการศึกษาทางด้านชีวภาพโมเลกุลพบว่า กระบือปลักมีจำนวนโครโมโซม 24 คู่ ส่วนกระบือแม่น้ำจะจำนวนโครโมโซม 25 คู่ และสามารถผสมข้ามพันธุ์ระหว่างทั้งสองชนิดนี้ได้ (กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์. 2553ก : online)

2.1.2 ชนิดของกระบือ

2.1.2.1 กระบือปลัก

กระบือชนิดนี้นิยมเลี้ยงกันในประเทศต่าง ๆ โดยเฉพาะทางตะวันออกในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม พม่า กัมพูชา และลาว เป็นต้น ในอดีตการใช้เทคโนโลยีในการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมยังไม่แพร่หลาย กระบือชนิดนี้จึงเลี้ยงเพื่อใช้แรงงานในงานด้านการเกษตร และเมื่อกระบืออายุมากขึ้นก็จะส่งเข้าโรงฆ่าเพื่อใช้เนื้อเป็นอาหาร

ภาพที่ 2.1 ลักษณะกระบือปลัก
ที่มา กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์ (2553ก)

ลักษณะทั่วไปของกระบือปลัก คือ ชอบนอนแช่ปลัก มีรูปร่างล่ำสัน ผิวหนังมีสีเทาเข้มเกือบดำ อาจมีสีขาวเผือก มีขนเล็กน้อย ลำตัวหนาลึก ท้องใหญ่ หัวยาวแคบ ขวัญของกระบืออยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของร่างกายตั้งแต่ 1 - 9 ขวัญ พบมากที่หัว ไหล่ และซอกขา แต่มักไม่พบแถวคอหน้าอก และหน้า ส่วนเขามีลักษณะแบบโค้งไปข้างหลัง เมื่อมองดูด้านตัดของเขากระบือลักษณะที่เห็นคล้ายรูปสามเหลี่ยม ที่ส่วนแบนของเขากระบืออายุมาก มีร่องและสันขึ้นสลับกันหลายสัน ซึ่งใช้เป็นบอกอายุกระบืออย่างคร่าว ๆ ได้ โดย 1 สันเท่ากับ 1 ปี หน้าสั้น หน้าผากแบบราบ ตานูนเด่นชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงระหว่างรูจมูกทั้งสองข้างกว้าง คอยาว และบริเวณใต้คอมีขนขาวเป็นรูปตัววี (chevlon) หัวไหล่และอกนูนเห็นชัด

2.1.2.2 กระบือแม่น้ำ

กระบือชนิดนี้เรียกทั่วไป คือ กระบือแขก พบได้ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน อียิปต์ ประเทศในยุโรปตอนใต้ และยุโรปตะวันออก เป็นกระบือที่ให้นมมาก เลี้ยงไว้เพื่อรีดนม ลักษณะนิสัยไม่ชอบลงแช่โคลน แต่จะชอบน้ำสะอาด กระบือแม่น้ำแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่ม Murrah ได้แก่พันธุ์ Murrah, Nili/Ravi, Kundi
- กลุ่ม Gujarat ได้แก่พันธุ์ Surti, Mehsana, Jafarabadi
- กลุ่ม Uttar Pradesh ได้แก่พันธุ์ Bhadawari, Tarai
- กลุ่ม Central Idian ได้แก่พันธุ์ Nagpuri, Pandharpuri, Manda, Jerangi, Kalahandi, Sambalpur
- กลุ่ม South Indian ได้แก่พันธุ์ Toda, South Kanara

ภาพที่ 2.2 ลักษณะกระบือแม่น้ำ
ที่มา กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์ (2553ก)

ในประเทศไทยมีกระบือแม่น้ำ ได้แก่ พันธุ์มูร่าห์ และพันธุ์เมซานี ลักษณะของกระบือประเภทนี้จะมีขนาดใหญ่ รูปร่างแข็งแรง ลักษณะทั่วไปจะมีผิวหนังสีดำ หัวสั้น หน้าผากนูน เขาสั้นและบิดม้วนงอ ส่วนลำตัวจะลึกมาก มีขนาดเต้านมใหญ่กว่ากระบือปลัก ให้น้ำนมเฉลี่ย 2,000 ก.ก. ต่อ 9 - 10 เดือน ของช่วงการให้นม โดยส่วนใหญ่จะนิยมเลี้ยงกระบือพันธุ์มูร่าห์เพราะให้น้ำนมสูงกว่าพันธุ์อื่น มีไขมันเฉลี่ย 7% โดยเพศเมียจะให้น้ำนมเฉลี่ย 2,200 กิโลกรัม ต่อระยะให้นม 500 วัน สถิติสูงสุด 4,500 กิโลกรัม ด้านน้ำหนักตัว ตัวผู้หนักประมาณ 550 กิโลกรัม ตัวเมียหนักประมาณ 450 กิโลกรัม (วิวัฒน์ ชวนะนิกุล. 2531 : 3)

กระบือพันธุ์มูร่าห์

เป็นกระบือหนึ่งในกลุ่มของกระบือแม่น้ำ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในรัฐหรยาณา และรัฐปัญจาบ ประเทศอินเดีย เริ่มมีการเลี้ยงไว้เพื่อผลิตน้ำนมในหลายประเทศ เช่น อียิปต์ ฟิลิปปินส์ ปากีสถาน อิตาลี และประเทศในแถบยุโรปบางส่วน มีลักษณะลำตัวสีดำ ค่อนข้างใหญ่ หน้าผากนูน เขาสั้นและม้วนงอ เป็นกระบือที่รักสะอาด ชอบที่จะแช่ในน้ำเพื่อทำความสะอาดร่างกาย แตกต่างจากอุปนิสัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบือปลักที่จะชอบเล่นโคลนปลัก โดยแม่พันธุ์ 1 ตัว ามารถผลิตน้ำนมได้ประมาณ 1,300-2,300 ลิตรต่อ 1 รอบ และให้นมได้นานถึง 8-10 เดือน (รัญจวน เฮงตระกูล. 2554 : online)

2.2 น้ำนมกระบือ

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

นมกระบือ (buffalo milk) เป็นของเหลวที่ได้จากเต้าของกระบือโดยปราศจากน้ำนมเหลืองผ่านการรีดอย่างสมบูรณ์ เป็นผลผลิตที่ได้จากสัตว์อีกชนิดหนึ่งนอกเหนือจากเนื้อและไข่เป็นผลิตผลจากสัตว์ที่สำคัญ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550 ข: 26) มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีรสหวานเล็กน้อย มีรสชาติมันเนื่องจากไขมันและโปรตีนที่ประกอบอยู่ในน้ำนม ทั้งนี้ต้องไม่ควรมีสิ่งสกปรกปะปนโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่ ทำให้คุณสมบัติของน้ำนมสูญเสียไปขณะแปรรูป (วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2538 : 46) ลักษณะของน้ำนมจะมีสีขาวเนียน ไม่มีกลิ่นคาว ดื่มง่ายกว่านมแพะ และไขมันเนยในน้ำนมกระบือมีมากเป็นสองเท่าของน้ำนมวัว ในขณะที่มีระดับคลอเรสเตอรอลต่ำกว่า นอกจากนั้นยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (natural Antioxidant) เหมาะสำหรับผู้แพ้แลคโตสในน้ำนมโค ซึ่งวิตามินเอในน้ำกระบือไม่ได้อยู่ในรูปของแคโรทีนเหมือนกับอาหารทั่วไป แต่ได้รับก็ต่อเมื่อมีการดื่มน้ำนมเข้าไปโดยตรงเท่านั้น (ศุภวัฒน์ คุณานุวัฒน์. 2552 : online)

2.2.2 คุณค่าทางโภชนาการ

น้ำนมกระบือ มีสารอาหารสูงกว่านมโค ทั้งโปรตีน ธาตุเหล็กฟอสฟอรัส วิตามินเอ ฯลฯ องค์ประกอบของน้ำนมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของสัตว์ พันธุ์ คุณลักษณะจำเพาะของสัตว์ ระยะการให้นม ช่วงเวลาการรีดนม ฤดูกาล อาหารและโภชนาการ อุณหภูมิและสภาพแวดล้อม โรคของสัตว์ให้นม และปัจจัยอื่น ๆ เช่น อายุ น้ำนมเป็นอาหารที่อุดมสมบูรณ์และมีคุณสมบัติหลายประการในการนำไปประกอบอาหาร หรือผสมกับอาหารอื่น ๆ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550 : 26ข) ซึ่งสามารถดูได้จากตารางการเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการระหว่างนมกระบือและนมโคในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการระหว่างนมกระบือและนมโค

ชนิด	ส่วนประกอบในน้ำนม (เปอร์เซ็นต์)			
	ของแข็งทั้งหมด	ไขมัน	โปรตีน	แลคโทส
กระบือแม่น้ำ	17.96	7.45	4.36	4.83
กระบือปลัก	18.34	8.95	4.13	4.78
โคนม	12.15	3.60	3.25	4.60
โคเนื้อ	13.45	4.97	3.18	4.59

ที่มา : อ้างจาก R. E. McDowell, Department of Animal Science, Cornall University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อองค์ประกอบของน้ำนม ซึ่ง ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2550ค: 97 - 98) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่มีผล ดังนี้

2.2.3.1 ชนิดของสัตว์ ทำให้ปริมาณของโปรตีน ไขมัน แลคโตส และเถ้าที่ต่างกัน

2.2.3.2 พันธุ์ สัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กัน ให้น้ำนมในปริมาณที่มีองค์ประกอบต่างกัน

2.2.3.3 คุณลักษณะเฉพาะของสัตว์ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ความพร้อมที่จะให้น้ำนม

2.2.3.4 ระยะเวลาการให้นม ในระยะ 2 ถึง 3 วันแรก คือ น้ำนมเหลือง มีเกลือแร่ โปรตีนและไขมันสูงกว่าปกติ หลังจากนั้นน้ำนมจะค่อยปรับตัวเข้าช่วงปกติ และเหมาะต่อการบริโภคภายในเวลาประมาณ 5 วัน ปริมาณ Milk Solid Not Fat (MSNF) ของน้ำนมค่อนข้างสูงในระยะแรกแล้วค่อย ๆ ลดลงจนถึงเดือนที่ 2 ถึง 3 จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มจนถึงเดือน 6 และเพิ่มจนปลายระยะการให้นม

2.2.3.5 ช่วงเวลาในการรีดนม ปกติน้ำนมช่วงเช้าและช่วงบ่ายมีองค์ประกอบใกล้เคียงกัน ถ้าช่วงเวลาในการรีดห่างเท่า ๆ กัน แต่ถ้ารีดน้ำนมเร็วกว่านั้นน้ำนมจะมีไขมันสูงขึ้น ในระหว่างการรีดนมแต่ละครั้งน้ำนมที่รีดออกมาใหม่ ๆ มีปริมาณไขมันต่ำสุด และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงหยดท้าย ๆ ดังนั้นจึงต้องรีดนมให้หมดเต้า

2.2.3.6 ฤดูกาล มีผลต่อปริมาณของแข็งในน้ำนม ซึ่งของแข็งในน้ำนมจะลดลงมากในช่วงฤดูร้อน ยกเว้นแลคโตสที่เพิ่มขึ้น และเมื่อสารอื่น ๆ เพิ่มขึ้น แลคโตสก็ลดลง อย่างไรก็ตามปริมาณ MSNF ค่อนข้างคงที่ตลอดปี

2.2.3.7 อุณหภูมิและสภาพแวดล้อม มีผลต่อปริมาณน้ำนมรวมถึงลักษณะคุณภาพของน้ำนมที่ได้ เพราะใช้เป็นตัวกำหนดในด้านอารมณ์ของสัตว์ ในการให้น้ำนมในแต่ละครั้ง ซึ่งหากสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ลักษณะความเป็นอยู่ของอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมก็จะต้องแตกต่างกันเช่นกัน

2.2.3.8 โรคของแม่พันธุ์ โดยเฉพาะโรคเกี่ยวกับเต้านม คือ เต้านมอักเสบ น้ำนมที่ได้มีปริมาณของ MSNF แลกโตส และเคซีนลดลง แต่คลอไรด์และโปรตีนซีรั่มเพิ่มขึ้น

2.2.3.9 ปัจจัยอื่น ๆ เช่น อายุ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณไขมัน โดยเฉพาะปริมาณแลคโตส และเคซีนมีผลกระทบมากที่สุด

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมจากสัตว์แต่ละชนิดเทียบกับน้ำนมคน

ชนิด	ส่วนประกอบในน้ำนม (เปอร์เซ็นต์)				
	ของแข็งทั้งหมด	ไขมัน	โปรตีน	แลคโทส	เถ้า
น้ำนมคน	12.57	3.75	1.63	6.98	0.21
น้ำนมโค	12.60	3.80	3.35	4.75	0.70
น้ำนมกระบือ	16.77	7.45	3.78	4.88	0.78
น้ำนมแพะ	13.18	4.24	3.70	4.51	0.78
น้ำนมแกะ	17.00	5.30	6.30	4.60	0.80

ที่มา : ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2550) อ้างถึง Potter (1978)

2.2.4 การใช้ประโยชน์

ส่วนใหญ่น้ำนมจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมนม ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมการผลิตในการส่งเสริมอาชีพให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่ง ผลิตภัณฑ์หลักของอุตสาหกรรมนมส่วนมากเป็นผลิตภัณฑ์นมพร้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดื่ม เพราะการผลิตผลิตภัณฑ์นมผง หางนม เนย และเนยแข็ง รวมถึงผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ มีต้นทุนการดำเนินการสูง ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปน้ำนม ได้แก่

2.2.4.1 นมพร้อมดื่ม อุตสาหกรรมนมพร้อมดื่มแบ่งการผลิตเป็นนมพาสเจอร์ไรซ์ร้อยละ 80 นอกจากนั้นเป็นการผลิตนมยูเอชที และนมสเตอริไลซ์ โดยปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มในวิธีแบบพาสเจอร์ไรซ์ส่วนใหญ่ผลิตมาจากน้ำนมดิบภายในประเทศ กลุ่มผู้บริโภคหลัก คือ นักเรียนในโครงการนมโรงเรียน ส่วนนมแบบอื่น ๆ จะผลิตจากนมผงคืนรูป ผลผลิตนมในเชิงพาณิชย์จะออกมาในรูปแบบนมสดที่มีความหลากหลายในด้านรสชาติ เช่น รสจืดและรสหวาน ในรูปนมปรุงแต่งที่มีการเติมกลิ่นรสต่าง ๆ ตามความนิยมของผู้บริโภค เช่น รสช็อคโกแลต รสกาแฟ และรสสตรอเบอรี่ (ศูนย์อนุรักษ์เพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. 2551 : online)

2.2.4.2 คีเฟอร์ เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่เป็นนมหมัก ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเทือกเขาคอเคซัส (caucacus) ของประเทศรัสเซีย โดยดั้งเดิมผลิตจากนมแพะหรือนมวัว มีการเก็บรักษาไว้ในถุงหนังสัตว์เมื่อระยะเวลาผ่านไปแบคทีเรียและยีสต์ทำให้โปรตีนรวมถึงคาร์โบไฮเดรตในน้ำนมเกิดการตกตะกอนจากของเหลวนั้น แล้วถูกนำไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์หมักนมใหม่ต่อไป ซึ่งก้อนตะกอนที่ได้เรียกว่าก้อนคีเฟอร์ โดยก้อนคีเฟอร์เป็นตัวให้ลักษณะเนื้อสัมผัส รสชาติ และประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมถึงมีการบริโภคคีเฟอร์เพื่อเป็นอาหารที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายมาเป็นระยะเวลาอันยาวนานในยุโรปตะวันออก และปัจจุบันมีการผลิตในเชิงการค้าทางตอนเหนือของอเมริกา ในกระบวนการหมักมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นหลังจากมีการบรรจุผลิตภัณฑ์ เป็นผลทำให้เมื่อดื่มผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทำให้เกิดความซ่าขึ้นในขณะดื่มจึงมีการเปรียบเทียบคีเฟอร์ว่าเป็นเสมือนเหล้าอุ่นขาวจากผลิตภัณฑ์ นมคีเฟอร์จะไม่เหมือนกับโยเกิร์ต เนื่องจากโยเกิร์ตจะต้องการใช้เชื้อแบคทีเรียเพียงแค่สองชนิดในกระบวนการผลิต แต่ลักษณะของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มีความสลับซับซ้อนมากกว่า ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งในการผลิตด้วย จึงเป็นการยากที่จะทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของคีเฟอร์ในแต่ละแหล่ง กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างที่มีการหมัก คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เจริญเติบโตขึ้นในขณะที่เชื้อบางชนิดลดการเจริญเติบโตลง (Jelen and Lutz, 1998)

2.2.4.3 โยเกิร์ต เป็นผลิตภัณฑ์นมอีกประเภทหนึ่งผ่านกระบวนการหมักทำให้มีรสเปรี้ยวและมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ในโยเกิร์ตจะประกอบด้วยแบคทีเรียหลัก ๆ 2 ชนิดด้วยกันคือ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะไปทำปฏิกิริยาเปลี่ยนน้ำนมให้เป็นโยเกิร์ต นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการเติมแบคทีเรีย *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus casei* ในโยเกิร์ตเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย ในด้านคุณประโยชน์ทางด้านสุขภาพที่ได้รับของโยเกิร์ตมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตในโยเกิร์ตในขณะที่รับประทาน ดังนั้นกระบวนการผลิต การบรรจุ การเก็บ ตลอดจนการขนส่ง ล้วนแล้วแต่มีผลต่อคุณภาพของโยเกิร์ต ถึงแม้ว่าไม่มีมาตรฐานที่แน่นอนในการที่กำหนดคุณภาพของโยเกิร์ต แต่โยเกิร์ตที่ดีควรมีจำนวนของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตไม่น้อยกว่า 10,000,000 ล้านตัวต่อปริมาณโยเกิร์ต 1 มิลลิกรัม (Good Health. 2549 : online)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกและการจัดจำแนก

2.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโพรคาริโอต เมื่อมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว มีแนวโน้มที่เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม รูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจมีรูปร่างเป็นท่อนหรือลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดอาจมีความแตกต่างกัน เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์จะมีขนาดเล็ก โดยสามารถวัดขนาดได้โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า ไมโครมิเตอร์ (micrometer) ขาดเอนไซม์คะตะเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารในการเติบโตสูง และผลิตกรดแลคติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล อีกทั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดอาจมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่ม พอร์ไฟริน (porphyrin group) และในสภาวะจำกัดสารอาหารกลุ่ม Streptococci เช่น *Streptococcus brevis* มีการผลิตกรดแลคติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แบคทีเรียกรดแลคติกนี้จะย่อยสลายสารอาหารโดยไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน จุดเด่นนี้ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการสลายน้ำตาลทำให้เกิดกรดแลคติกในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย น้ำตาลจึงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดได้ดี ในสภาวะการหมักที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย รวมถึงความสามารถในการทนกรดที่ตัวเองผลิตขึ้นมาในปริมาณสูง ๆ ได้ (ทิพวรรณ คล้ายบ้านใหม่. 2549 : 11 - 14)

2.3.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแลคติก มีความสำคัญมากในทางอุตสาหกรรมอาหาร หากแบ่งแยกเป็นกลุ่มแล้ว กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญกับอาหาร ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย โดยจะทำการจำแนกตามสมบัติในการย้อมสีแบบติดแกรม เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ย้อมติดสีแกรมบวก (ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต) และแบบที่ย้อมติดสีแกรมลบ (ติดสีแดงของแซฟรานิน) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545 : 24 - 32) ซึ่งการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่

2.3.2.1 *Streptococcus* เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ (Cocci) ไม่มีไซโตโครม (Cytochromes) มีเมตาบอลิซึมแบบหมักย่อย เรียงตัวกันเป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่ คะตะเลส (Catalase) เป็นลบ (ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536 : 37)

2.3.2.2 *Vagococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่เซลล์เรียงตัวกันเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย บางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 35 องศาเซลเซียส (Stiles และ Holzapfal, 1997 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

2.3.2.3 *Lactococcus* ลักษณะเซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ บางชนิดมีรูปร่างกึ่งแท่งกึ่งกลม เซลล์เรียงตัวกันเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิดเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส (Teuber, 1995 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 3)

2.3.2.4 *Enterococcus* เซลล์รูปร่างไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตกรดแลคติก ชนิด L (+) สามารถเจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส บางชนิดอาจสามารถเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสแก่คนได้ (ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536 : 36)

2.3.2.5 *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมมีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนอากาศ (Axelsson, 1998 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.6 *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *Pediococcus halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหาร มีเกลือโซเดียมคลอไรค์สูงถึง 18% (Simpson และ Taguchi, 1995 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

2.3.2.7 *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* ในลักษณะ 2 ทิศทางบนอากาศโดยประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *Aerococcus urinae* (Stiles และ Holzapfal, 1997 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

2.3.2.8 *Leuconostoc* เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส เป็นพวกหมักย่อยให้ผลผลิตหลายชนิด(Heterofermentative type) เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *lactobacilli* (ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536 : 32)

2.3.2.9 *Oenococcus* โดยประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* มีการเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วย ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนต่อกรด และทนเอทานอลปริมาณสูง (Dicks และคณะ. 1995 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

2.3.2.10 *Weissella* แบคทีเรียสกุลนี้ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้ายแบคทีเรียในสกุล *leuconostoc* (leuconosdoc - like bacteria) รูปร่างของเซลล์เป็นแท่งและกลม โดยมีสปีชีส์เดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* (Stiles และ Holzapfal, 1997 อ้างโดยน้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 4)

2.3.2.11 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใหญ่ที่สุด และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มออกจากแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้ มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืชและน้ำทิ้ง เป็นต้น เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ส่วนกลุ่ม Obligately Homofermentative Lactobacilli หมักน้ำตาลแลกโตส (มากกว่า 85 %) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1 , 6 Biphosphate – Aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ Phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนทไม่ได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์ในกลุ่ม Facultatively Heterofermentative Lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส เป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง Aldolase และ Phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ อีกกลุ่มคือ Obilgately Heterofermentative Lactobacilli หมักน้ำตาล เฮกโซส และเพนโทส โดยผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนท ซึ่งเป็นแลคเตทเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์ *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโพรไบโอติกส์ (Probiotics) จัดเป็นแบคทีเรียในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่เมื่อนำไปผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก หรือการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมต่าง ๆ ความสามารถของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหาร และมีความสามารถในการผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ให้กับมนุษย์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน ไวตามินเค ไวตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

2.3.2.12 *Carnobacterium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างและลักษณะเป็นท่อนตรงมีขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (slender rod) ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม anterococci มากกว่าแบคทีเรีย carnobacterium (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545 : 25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 แหล่งของแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ เนื้อสัตว์หรือในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ รวมถึงในร่างกายของคนและสัตว์ ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย และมีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่ให้โทษกับอาหารบางชนิด (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545 : 283) การแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องเลือกให้ตรงตามชนิด และความต้องการที่จะนำมาใช้ โดยต้องระวังเชื้อชนิดอื่นมาปะปน เรียกว่า mixed culture ซึ่งการนำมาใช้ประโยชน์ได้นั้นสิ่งสำคัญ คือ ต้องแยกเชื้อแบคทีเรียออกมาให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่เรียกว่า pure culture หมายถึง แบคทีเรียที่มาจากเซลล์เดียว หรือกล้าเชื้อ (ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536 : 29)

2.4 กล้าเชื้อและการใช้ประโยชน์

2.4.1 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นภา โล่ห์ทอง (2534 : 122) ได้กล่าวว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการหมักอาหารหลายชนิดด้วยกัน โดยจะแบ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มของ homofermentative เป็นกลุ่มที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคลิติก ส่วนกลุ่ม heterofermentative เป็นกลุ่มที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดแลคติก เอธทานอล กรดแอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสฟอคีโตเลส (phosphoketolase pathway) นอกจากนั้นยังมีเชื้อหลายสายพันธุ์สามารถเมแทบอไลซ์กรดซิตริกหรือเกลือซิเตรทให้ได้สารพวกไดอแซธิล (diacetyl) แอซิโตอิน (acetoin) และบิวธีลลีนไกลคอน (2, 3 - Butylene glycol) ดังนั้นบทบาทสำคัญของการหมักอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ การผลิตกรด ทำให้เกิดรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมของสารต่าง ๆ ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์

มนุษย์มีการรู้จักการถนอมอาหารหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นเวลานานไม่น้อยกว่าการหมักโดยใช้เชื้อรา และยีสต์ การหมักอาหารในยุคก่อนมีการพัฒนาโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่อาศัยเชื้อจากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเอื้อการพัฒนาโดยให้เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการมีการเจริญเติบโต ซึ่งอาหารบางอย่างใช้วิธีเก็บบางส่วนจากการหมักรุ่นก่อนไว้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการหมักรุ่นต่อไป จนประมาณ ค.ศ. 1880 ได้มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผลิตเนยแข็งเป็นครั้งแรกในประเทศเดนมาร์ค มีการพัฒนาวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างต่อเนื่องจนเกิดเป็นอุตสาหกรรม คุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไป โดยนภา โล่ทอง (2534 : 123) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนี้

1. สามารถใช้น้ำตาลที่อยู่ในวัตถุดิบและผลิตได้ตามระยะเวลาหรือปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์นั้น ๆ
2. ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้น ๆ
3. อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปเป็นกล้าเชื้อจะสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ดี
4. การปลอดจากฝาจก์ (phage) ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธีด้วยกันได้แก่

- เตรียมกล้าในรูปแบบเชื้อผสมโดยมีเหตุผลว่าในขณะนำไปใช้ หากเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่มีความเฉพาะกับฝาจก์ชนิดนั้นพอที่จะดำเนินกิจกรรมต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกัน
- คัดเลือกเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อฝาจก์ เช่น การใช้สายพันธุ์ที่มีการผ่าเหล่า (phage Resistant Mutant)
- เตรียมกล้าโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของฝาจก์
- ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณกล้าก่อนใช้งาน (Bulk Starter) ต้องระวังการปนเปื้อนของฝาจก์

2.4.2 กล้าเชื้อผลิตภัณฑ์นม

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก นอกจากหมักน้ำตาลกลูโคสได้แล้ว จำเป็นต้องหมักแลคโตสที่เป็นน้ำตาลในน้ำนมได้ด้วย โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำน้ำตาลแลคโตสเข้าสู่เซลล์ได้ 3 วิธี และกระบวนการเมแทบอไลท์ให้เกิดเป็นกรดแลคติกแตกต่างกัน ทั้งนี้นอกจากกรดแล้วกล้าเชื้อผลิตภัณฑ์นมหมักยังต้องมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์แต่ละอย่าง เช่น ไดอะซิธิล และอเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ซึ่งเกิดจากการเมตาโบไลซ์ ซิเตรท หรือกรดอะมิโน เช่น ทรีโอนีน การจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการนั้น หลายผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องใช้กิจกรรมร่วมของเชื้อมากกว่าชนิดหนึ่งชนิด ซึ่งกล้าที่ใช้อาจอยู่ในรูปเชื้อผสมหรือผลิตเป็นกล้าเชื้อเดี่ยวแต่ละชนิด แล้วนำมาใช้ร่วมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทั้งนี้นภา โล่ห์ทอง (2534 : 133) ได้อธิบายอีกว่าแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก มีทั้งกลุ่มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส เรียกว่า thermophilic starter และกลุ่มที่เจริญได้ดีเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ คือระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เรียกว่า mesophilic starter และมีเชื้อที่นำมาใช้ในการผลิตเพียง 3 สกุลเท่านั้น ได้แก่ *Streptococcus* (Lactococcus) *Leuconostoc* และ *Lactobacillus*

***Streptococcus* (*Lactococcus*)** เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไพโอเจน (pyogen) กลุ่มวิริแดน (viridan) กลุ่มเอนเทอโรคอคคัส (*Enterococcus*) และกลุ่มแลคติก เฉพาะกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตอาหารเท่านั้น เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นรูปกลม หรือรูปไข่ อยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ หรืออาจต่อกันเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ ต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เติบโตได้ดีในอุณหภูมิที่ 10 - 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญเติบโตในอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส พบได้ในนมและผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram Positive Bacteria) เป็นสกุลของแบคทีเรียในวงศ์ *Streptococcaceae* ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Pediococcus* มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม หรือรูปไข่ต่อกันเป็นสายหรือเป็นคู่ มีความสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลแลคโตส (Lactose) ให้เกิดกรดแลคติกมักพบร่วมกับ *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียประเภท facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming bacteria) มักจะไม่เคลื่อนที่ ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรทได้เด็กซ์แทรน (dextran) ทำให้เกิดเมือก เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำตาลสูง (osmophilic bacteria) หลายสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ 1 - 2 องศาเซลเซียส จึงเป็นสาเหตุให้อาหารแช่เย็นเสื่อมเสีย แหล่งที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในลำไส้ น้ำลาย อุจจาระของมนุษย์ และสัตว์ ผัก ผลไม้ อาหารสัตว์ เครื่องมือที่ใช้ในโรงนม

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกประเภท Facultative Anaerobe ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก มีความสามารถในการหมักเช่นเดียวกับ *Leuconostoc* มักพบร่วมกับ *Leuconostoc* มีความสำคัญในอาหารใช้ประโยชน์จากการหมักด้วยแบคทีเรียกลุ่มนี้ เพื่อถนอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารหลายประเภท ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากนม เช่น โยเกิร์ต (yogurt) นมเปรี้ยว (fermented milk) ผลิตภัณฑ์หมักจากเนื้อสัตว์ เช่น แหนมไส้กรอกเปรี้ยว ซาลามี (salami) ผลิตภัณฑ์หมักจากผักผลไม้ เช่น ผักผลไม้ดอง กิมจิ (kimchi) แตงดอง (pickle) ซาวเคราท์ (sauerkraut) ทั้งนี้ยังส่งผลเสียอันเป็นสาเหตุทำให้มีการเสื่อมเสียของอาหารหลายชนิด เช่น อาหารกึ่งแห้ง การเสื่อมเสียของนม การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ โดยทำให้เกิดรสเปรี้ยว การเกิดเมือกในนม เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม เบคอน (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2553 : online)

Steptococcus เป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เนยแข็ง ได้แก่ *Steptococcus themophilus* มีลักษณะเด่น คือ เจริญในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจน เป็นแบคทีเรียที่ชอบความร้อน (thermophilic bacteria) เจริญในอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญในอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดด่าง 9.6 และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตส (lactose) ในน้ำนมเป็นกรดแลคติกและสร้างกรดฟอร์มิก (formic acid) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus*

Enterococcus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดใหม่ที่เริ่มมีการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นมหมักและเนยแข็ง แต่ยังมีข้ออภิปรายถึงแหล่งที่พบและความปลอดภัย เนื่องจากบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรค สายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อร่วมในการผลิตเนยแข็ง และใช้เป็นโพรไบโอติก คือ *Enterococcus faecium* มีลักษณะเด่น คือ เชื้อจุลินทรีย์นี้สามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และยังสามารถใช้เป็นโปรไบโอติก เพื่อเข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียอันตรายในระบบทางเดินอาหารได้ (น้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542 : 9)

2.4.3 ชนิดของกล้าเชื้อและการผลิตกล้าเชื้อ

กล้าเชื้อและการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้มีการพัฒนาจนสามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม และมีการแบ่งชนิดกล้าออกตามความเหมาะสมในการใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น

1. กล้าเชื้อที่นำไปใช้ได้โดยไม่ต้องมีการเพิ่มปริมาณเชื้อ เช่น กล้าเชื้อที่ใช้ในเนยแข็ง เชดด้า คอทเทจชีส และโยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น

2. กล้าเชื้อที่ต้องนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนใช้ กล้าเชื้อชนิดนี้ก่อนนำไปใช้โรงงานอาหารหมักแต่ละแห่งจะต้องนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอ โดยกล้าเชื้อที่เพิ่มปริมาณเชื้อแล้วนี้เรียกว่า Bulk Starter ซึ่งเฉพาะโรงงานอุตสาหกรรมนมหมักเท่านั้นที่นิยมใช้วิธีนี้

กล้าเชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวมีทั้งแบบกล้าเชื้อเข้มข้น (concentrate starter) และ กล้าเชื้อที่ไม่เข้มข้น (unconcentrate starter) ในรูปแบบแตกต่างกัน เช่น เป็นกล้าที่อยู่ในรูปแช่แข็ง (frozen culture) ไลโอฟิไลส์ (freez-dried culture) และเชื้อผงแห้ง (dried culture) (นภา โล่ห์ทอง. 2534 : 124) การผลิตกล้าเชื้อ ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย (2536 : 29) อธิบายถึงการผลิตกล้าเชื้อว่า โดยทั่วไปจะทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ชนิดเดียวซึ่งทำได้หลายวิธีคือ

- พอร์เพลส (pour plate) มีวิธีการคล้ายคลึงกับ spread plate ต้องทำการเจือจางเชื้อก่อน และวิธีนี้เป็นการผสมเชื้อเข้ากับอาหารในจานเพาะเชื้อในขณะที่อาหารนั้นยังไม่แข็ง โดยอุณหภูมิของอาหารจะประมาณอยู่ที่ประมาณ 45 องศาเซลเลเซียส หรือต่ำกว่า เหมาะกับเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ และไม่ใช้อากาศในการหมัก แต่ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนในการหมัก

- สเปรดเพลส (spread plate) เป็นการเกลี่ยเชื้อให้กระจายลงบนอาหารแข็ง ซึ่งจะต้องทำการเจือจางเชื้อก่อน จากนั้นจึงใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเขี่ยเชื่อให้ทั่ว เหมาะต่อการคัดแยกเชื้อเหมือนกันกับวิธีแรก คือ จุลินทรีย์ที่ชอบอากาศ

- สตรีคเพลส (streak plate) หรือการใช้ลูปเขี่ยเชื้อขีดเป็นเส้นหลายๆ ครั้งบนอาหารแข็ง เหมาะกับจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ

- อันริชเม้นท์เคาเจ้อ เทคนิค (enrichment – culture technique) วิธีนี้ใช้อาหารที่ให้แบคทีเรียที่ต้องการเจริญได้ แต่แบคทีเรียที่ไม่ต้องการเจริญไม่ได้หรือเจริญได้ช้ากว่า

- ซีเรียล ไดรูชั่น เทคนิค (serial dilution technique) วิธีนี้จะนิยมนำมาใช้แยกแบคทีเรียที่ต้องการซึ่งมีจำนวนมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยการทำให้เจือจางลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำให้เจือจางมากจะเหลือแบคทีเรียอยู่ชนิดเดียวที่ต้องการ ทดสอบโดยการ Streak หรือ Spread ลงในอาหารแข็ง

- ซิงเกิ้ล เซลล์ ไอโซลูชั่น เทคนิค (single – cell isolation technique) วิธีนี้ต้องอาศัยเครื่องมือเข้ามาช่วย ซึ่งเครื่องมือชนิดนี้เรียกว่า Micromanipulator ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์เพื่อจะเลือกเอาแบคทีเรียเดี่ยว ๆ ออกมาจากตัวอย่าง โดยอาศัย Micropipette หรือ Microprobe เลือกหาแบคทีเรียที่ต้องการออกมาได้ วิธีนี้ต้องอาศัยการฝึกฝนจนชำนาญ ทั้งนี้การผลิตกล้าเชื้อเบื้องต้นนั้นโดยทั่วไปจะใช้การผลิตกล้าเชื้อโดยวิธีที่หนึ่ง วิธีที่สอง และวิธีที่สาม เพราะทำได้ง่าย สะดวก ไม่ยุ่งยาก

ซึ่งหลักการผลิตกล้าเชื้อโดยทั่วไปจำเป็นต้องมีสิ่งที่ต้องคำนึงถึง โดยนภา โล่ห์ทอง (2534 : 123 - 136) ได้กล่าวไว้ดังนี้

1. เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด
2. ในกรณีที่จะผลิตกล้าชนิดเข้มข้น จะเลือกวิธีที่เหมาะสมในการทำให้เชื้อเข้มข้น
3. เลือกรูปแบบและวิธีการในการเก็บเชื้อตามความสะดวกนำไปใช้ เช่น การแช่แข็ง การไลโอฟิลล์ไลซ์ การทำให้แห้ง เป็นต้น
4. ทุกขั้นตอนของการทำงานต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของฝาจก์

ประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อ

1. ลดระยะเวลาในการหมัก สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการหมักผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจใช้เวลานาน
2. สามารถควบคุมการหมัก และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น
3. ลดการสะสมของสารบางชนิดที่อาจจะก่อให้เกิดผลเสียแก่ผลิตภัณฑ์ และผู้บริโภคในระยะสั้นและระยะยาว
4. ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการทำลายเชื้อบางอย่าง อันเป็นสาเหตุทำให้อาหารเสื่อมเสีย

2.4.4 การนำกล้าเชื้อไปใช้ประโยชน์

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แต่มีบทบาทมากทั้งด้านการก่อโทษและก่อประโยชน์แม้แต่แบคทีเรียชนิดเดียวกันก็ยังสามารถให้โทษและประโยชน์ได้เช่นกัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในขณะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตแสดงบทบาทอยู่ สำหรับประโยชน์ของแบคทีเรียและการประยุกต์ใช้นั้น รังสินี โสธรวิทย์ (2550 : 187 – 195) ได้กล่าวไว้ ดังนี้

2.4.4.1 ด้านอาหารและเครื่องดื่ม กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบเพื่อใช้ในการปรับสภาพความเป็นกรดเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวตามต้องการ และมีการใช้กรดแลคติกร่วมกับกรดซิตริก รวมทั้งกรดโพรพิโอนิก (Propionic Acid) เพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยวในอาหาร แต่อาจมีความจำเป็นต้องใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียวสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการกลิ่นและรสชาติที่จำเพาะ ซึ่งการผลิตอาหารหมักนั้นจะได้มาจากแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ซึ่งมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม โดยแบ่งผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์ ได้แก่เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ โดยจะมีผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ เบียร์ไวน์ สาเก เหล้าขาว ฯลฯ ซึ่งจะใช้ยีสต์ในการผลิต โดยยีสต์จะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และคาร์บอกไดออกไซด์ในสภาพที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจนดังสมการ คือ

$$\underset{\text{น้ำตาลกูลโคส}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{แอลกอฮอล์}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{2CO_2}$$

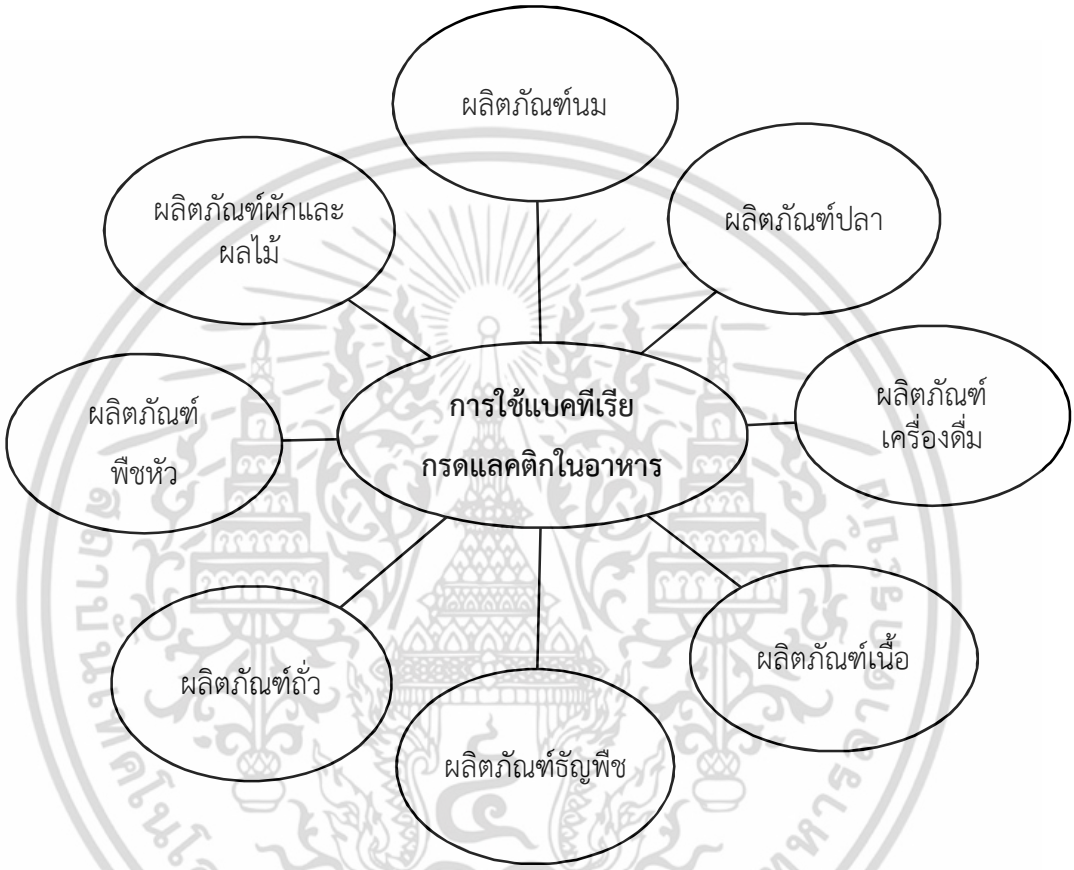
- **เครื่องปรุงอาหาร** ในที่นี้จะหมายถึงน้ำส้มสายชู ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ซึ่งน้ำส้มสายชูมีอยู่ 3 ชนิด คือ

1. น้ำส้มสายชูหมัก ได้จากการนำธัญชาติ ผลไม้ หรือน้ำตาลมาหมักกับยีสต์แล้วหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามวิธีธรรมชาติ
2. น้ำส้มสายชูกลั่น ได้จากนำแอลกอฮอล์กลั่นเจือจาง (dilute distilled alcohol) มาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูแล้วนำไปกลั่น (distillation) ซึ่งจะมีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ลดลงตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเหมือนกัน คือ แอลกอฮอล์กลั่น โดยปกติชนิดกลั่นจะมีคุณภาพใกล้เคียงกัน ทั่วไปแล้วน้ำส้มสายชูกลั่นจะต้องมีลักษณะใส ไม่มีตะกอนและมีปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4%
3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเอากรดน้ำส้ม (acetic acid) ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี เป็นกรดอินทรีย์มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนมีความเข้มข้นประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ มาเจือจางจนได้ปริมาณกรด 4 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 27 องศาสเซลเซียส ในการหมักน้ำส้มสายชูนั้นวัตถุดิบที่ใช้โดยทั่วไป คือ องุ่น แอปเปิ้ล เมล็ดธัญชาติ หรือผลไม้ต่าง ๆ น้ำตาล กากน้ำตาล เป็นต้น

ในส่วนของซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว เป็นเครื่องปรุงที่ประกอบด้วยคาร์โบรไฮเดรตในรูปของน้ำตาลรีดิวส์ โปรตีน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนหลายชนิดที่ได้จากถั่วเหลือง ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์หมักจากนม เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการนำเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกหมักกับน้ำตาลแลกโตสในน้ำนมโดยแบคทีเรียจะสร้างสารให้เกิดกรดแลคติก ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ ซึ่งกรดนี้จะตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม เรียกว่า เคิร์ด ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสดี และช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของน้ำนม ผลิตภัณฑ์หมักจากนมที่สำคัญได้แก่ โยเกิร์ต เป็นนมเปรี้ยวที่ใช้แบคทีเรียในการหมัก โดยแบคทีเรียที่ใช้จะเจริญได้ดีที่อุณภูมิสูง แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ในด้านสมบัติทางกายภาพ และกิจกรรมทางชีวเคมี มีผลทำให้นมหมักมีคุณค่าทางอาหาร และมีผลต่อสุขภาพที่แตกต่างกัน ซึ่งในส่วนของผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่สามารถเห็นได้ทั่วไปและคุ้นเคยกันดี ได้แก่ ครีมเปรี้ยว เนยแข็งหรือชีส นมบัตเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลิตภัณฑ์หมักจากเนื้อสัตว์ ได้แก่ แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งได้มาจากการนำเนื้อสัตว์นำมาปรุงรส และคลุกเคล้าเครื่องเทศให้เข้ากัน แล้วนำมาบรรจุ โดยแหนมจะทำการห่อโดยใช้ถุงพลาสติกหรือใบตอง แต่ไส้กรอกจะเป็นการอัดบรรจุเข้าไปในไส้อ่อนของหมูสด ซึ่งจะมีการหมักไว้ 2 ถึง 3 วัน เพื่อแบคทีเรียกรดแลคติกทำงานในการสร้างให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีรสชาติ และกลิ่นเฉพาะขึ้นมา ต่อมาคือผลิตภัณฑ์ ซาลามิ เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านการหมักของชาวอิตาลี ซึ่งมีส่วนผสมหลัก ๆ ได้แก่ เนื้อหมูหรือเนื้อวัวบด ไวน์ เกลือ สมุนไพร และเครื่องเทศ



ภาพที่ 2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมัก

ที่มา : ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2546)

- ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มาจากพืช เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากผัก ผลไม้ และธัญชาติ ได้แก่ ผักและผลไม้ส่วนใหญ่ที่นำมาดองเปรี้ยว เช่น กะหล่ำปลี ผักกาดเขียว แตงกวา หน่อไม้ ผักเสี้ยน มะม่วง มะยม และมะนาว ฯลฯ โดยนำมาหมักกับแบคทีเรียตามธรรมชาติที่อาศัยอยู่ในผัก ผลไม้ เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกโดยไม่ต้องเติมเชื้อ แต่จำเป็นต้องปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่มักเห็นตามท้องตลาดทั่วไป มักจะเป็นผักและผลไม้ที่มีการดองเกลือ และการแช่อิ่ม ในส่วนของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้หมักอื่น ๆ นั้น ได้แก่ กิมจิ แตงกวาดอง มะนาวดอง บ๊วยดอง ฯลฯ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **ธัญชาติ** ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากธัญชาติ เช่น ขนมปัง และข้าวหมาก ในด้านของขนมปัง ส่วนใหญ่การหมักจะเกิดขึ้นในระหว่างการนวดแป้งกับน้ำให้ฟูจนได้โด และจะใช้ยีสต์เป็นตัวช่วยในการที่จะทำให้แป้งขนมปังฟู หลังจากการนวดแล้วพักแป้งประมาณ 2 ชั่วโมง ก้อนแป้งจะเริ่มมีลักษณะที่ใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อย และจะเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 2 ถึง 4 ชั่วโมง และจะลดลงในช่วง 4 ถึง 6 ชั่วโมง การหมักจะเริ่มต้นขึ้นเมื่อยีสต์ถูกผสมกับแป้งจนนำไปอบ การอบจะทำให้ยีสต์หยุดทำงาน ทำให้ขนมปังเริ่มความเหนียวและยืดหยุ่น รวมถึงมีกลิ่นรสที่เกิดจากสารที่ยีสต์ผลิตออกมา ต่อมาผลิตภณฑ์ที่มักพบในท้องถิ่นคือข้าวหมาก เป็นอาหารพื้นเมืองของไทย บริโภคเป็นของหวาน โดยใช้เชื้อที่มีชื่อว่า ลูกแป้ง เป็นตัวหมัก ซึ่งลูกแป้งจะทำมาจากข้าวเจ้า หรือข้าวเหนียวผสมกับสมุนไพรต่าง ๆ เช่น กระเทียม ชะเอม ลูกจันทร์ ก้านพลู ข่า เมล็ดผักชี ลักษณะของข้าวหมักจะมีกลิ่นแอลกอฮอล์ รสหวาน (รังสินี โสธรวิทย์. 2550 : 187 - 195)

2.4.4.2 ด้านการเกษตร ปัจจุบันกรดแลคติกมีบทบาทที่สำคัญมากทางการเกษตรเนื่องบุคคลบางกลุ่มเริ่มหันมาสนใจด้านการรักษาสิ่งแวดล้อม ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้มีการใช้กรดแลคติกในการลดปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเสีย เพื่อต้องการหาวิธีเพิ่มมูลค่าและมีการใช้ประโยชน์จากน้ำเสียโรงนมให้ได้มากที่สุดจากกระบวนการหมักทำให้ได้สารมูลค่าเพิ่มซึ่งเป็นตะกอนโปรตีน ที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์และสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพรวมถึงการใช้กรดแลคติกในด้านอื่น ๆ เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด (พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์. 2553: online)

2.4.4.3 ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ กล่องโฟม ถุงพลาสติกใส ฟิล์มสำหรับหีบห่อเม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

2.4.4.4 ด้านเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ Noo-Woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อม เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

2.4.4.5 ด้านยานยนต์ เช่น อุปกรณ์ลดแรงกระแทก (bumpers) แผ่นรองพื้น (floor mats) และอุปกรณ์ตกแต่งภายใน

2.4.4.6 ด้านการแพทย์ นำมาใช้ในการผลิตวัสดุทางการแพทย์เช่นไหมเย็บแผล (Sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgicalimplants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยาซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.4.4.7 ด้านเอนไซม์ ในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อการค้าหลายชนิดเช่น อะไมเลส กลูโคอะไมเลส เพคติเนส เซลูเลส โปรติเนส และอินเวอร์เทส เป็นต้น

2.4.4.8 ด้านการผลิตกรดอินทรีย์ สามารถนำกรดแลคติกมาใช้ผลิตกรดได้ 2 ประเภทคือ กรดอินทรีย์ที่ใช้ปรุงแต่งอาหาร เช่น กรดซิตริก กรดแลคติก และกลูตามิก และอีกประเภท คือ กรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมพลาสติก เช่น กรดฟูมาริก และกรดอิตาโคนิค นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่สำคัญสามารถใช้ในการเสริมคุณค่าทางอาหาร คือ กรดอะมิโน เช่น ไลซีน ทรีโอนีน เมทไทโอนีน เป็นต้น

2.4.4.9 ด้านวิตามินและฮอร์โมน แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถสร้างวิตามินได้เช่น วิตามินบี 2 วิตามินบี 12 วิตามินเอ และฮอร์โมนจิบเบอร์เรลลิน (จารุวรรณ มณีศรี. 2551: online)

2.4.4.10 ด้านอื่น ๆ คือการนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตร หรือที่เรียกว่า การผลิตพอลิแลคติก (มาลิน จุลศิริ และอุษณีย์ วงศ์ทองศรี. 2536 : 229)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ผลิตภัณฑ์นมหมัก

ผลิตภัณฑ์นมหมัก เป็นผลิตภัณ์ที่นำเชื้อแบคทีเรียมาหมักกับน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม ซึ่งแบคทีเรียจะสร้างสารให้เกิดกรดแลคติกเป็นสารเมแทบอไลต์ ซึ่งกรดนี้จะตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมได้เป็นเคิร์ด ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสดี และช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของน้ำนม ผลิตภัณฑ์นมหมักที่สำคัญ ได้แก่

2.5.1 โยเกิร์ต

โยเกิร์ต มีการถูกค้นพบโดยบังเอิญ อันเป็นผลจากการดื่มนมที่ถูกเก็บไว้โดยวิธีการดั้งเดิมในสภาพอากาศอบอุ่น ซึ่งเริ่มมีการคิดค้นหลายพันปีมาแล้วตั้งแต่สมัยยุคหินใหม่ มีวิธีการทำโดยการนำน้ำนมสัตว์มาหมักโดยเอนไซม์ที่พบขึ้นตามธรรมชาติจากลำไส้ หรือกระเพาะของสัตว์ ทำให้เกิดลักษณะเป็นเคิร์ด หลังจากนั้นจึงเกิดความนิยมในตัวโยเกิร์ตจนทำให้การผลิตโยเกิร์ตมีความต้องการและความแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน ทำให้ไม่เพียงพอต่อผู้ที่บริโภค จึงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในเชิงพาณิชย์ (Makeyourownyogurt, 2554 : online) สำหรับโยเกิร์ตเพิ่งเข้ามาปรากฏในประเทศไทยเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา แต่ปัจจุบันนี้ผู้คนรู้จักโยเกิร์ตเป็นอย่างดี เล่ากันว่ามีการผลิตโยเกิร์ตกันตั้งแต่เมื่อหลายพันปีมาแล้ว เหตุที่โยเกิร์ตเป็นที่นิยมรับประทาน เพราะว่าโยเกิร์ตมีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ เช่น แก้ปัญหาการขับถ่าย ช่วยเพิ่มสุขภาพเหงือก และเชื่อว่าโยเกิร์ตไขมันต่ำช่วยลดน้ำหนักได้ด้วย การผลิตโยเกิร์ตนิยมผลิตจากแบคทีเรียสองชนิด คือ *Streptococcus thermophiles* และ *Lactobacillus bulgaricus* (ธวัชชัย ดุลยสุจริต. 2553 : online) แบคทีเรียเหล่านี้จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนนมให้เป็นโยเกิร์ต นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการเติมแบคทีเรีย *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus casei* ในโยเกิร์ตเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร สำหรับคุณค่าทางอาหารของโยเกิร์ตจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตในโยเกิร์ต ดังนั้นกระบวนการผลิต การบรรจุ การเก็บ ตลอดจนการขนส่งล้วนแล้วแต่มีผลต่อคุณภาพของโยเกิร์ตทั้งสิ้น (Good Health, 2549 : online) ชนิดของโยเกิร์ตจะมี 3 ชนิด คือ แบบบอลข่าน (คงรูป) เป็นการนำนมที่อุ่นมาหมักกับจุลินทรีย์โดยไม่มีการกระทำใด ๆ ให้เสียรูปจากเดิมหลังจากการหมัก ซึ่งโยเกิร์ตชนิดนี้มีรูปแบบที่ธรรมชาติ ไม่มีรสชาติ มักรับประทานคู่กับอาหารต่าง ๆ เช่น อะโวคาโด และสลัดไก่ หรือนำมาใช้ในการประกอบอาหาร แบบสวิส (กวน) เป็นการหมักนมในถังขนาดใหญ่ มีการระบายความร้อน และกวนให้เป็นเนื้อครีมค่อนข้างละเอียด ซึ่งโยเกิร์ตชนิดนี้อาจมีการเติมผลไม้และกลิ่นรสผลไม้ เพื่อสร้างรสชาติให้กับตัวของผลิตภัณฑ์ ซึ่งนิยมนำโยเกิร์ตชนิดมาเป็นเครื่องดื่ม หรือเป็นส่วนประกอบในการทำขนม หรือสามารถรับประทานได้โดยแช่เย็น และแบบกรีก (เนื้อข้น) เป็นโยเกิร์ตที่มีลักษณะข้นมาก ซึ่งจะมีลักษณะดีขึ้นเมื่อถูกความร้อน เหมาะกับการนำมาประกอบอาหารมาก โดยโยเกิร์ตชนิดนี้ยังชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า mediterranean yogurt หรือ โยเกิร์ตแบบเมดิเตอร์เรเนียน (Dairygoodness. มปป: online)

วิธีการทำโยเกิร์ต ทำโดยตุ๋นน้ำนมในหม้อตุ๋นหรือใช้หม้อ 2 ใบซ้อนกัน โดยหม้อจะมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งหม้อใบนอกต้องมีขนาดใหญ่กว่าจะใส่น้ำเพื่อต้มน้ำให้เดือด และหม้อใบข้างในจะนำนมใส่ลงไปเพื่อป้องกันการไหม้จากนั้นอุ่นน้ำนมให้อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดอันเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร จากนั้นลดอุณหภูมิของน้ำนมโดยใช้วิธีการปล่อยน้ำไหลผ่าน หรือแช่น้ำแข็ง จนน้ำนมมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุ่นพอที่จะทนได้เมื่อทดสอบโดยการหยดนมลงบนหลังมือ จากนั้นนำเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป (นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและเชิงพาณิชย์) หากทำรับประทานเองที่บ้านอาจใช้โยเกิร์ตรสธรรมชาติเป็นกล้าเชื้อทำการกวน หรือคนให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในภาชนะที่เตรียมไว้โดยมีการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ปิดฝาบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ถึง 6 ชั่วโมง ถ้าไม่มีตู้บ่มสามารถใช้กล่องที่สามารถเก็บความร้อน เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง หรือบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 8 ถึง 10 ชั่วโมง จนกว่าจะได้เนื้อโยเกิร์ตที่ เปรี้ยวตามที่ต้องการ (Michael Reeps, 2011 : online)

2.5.2 คีเฟอร์

เป็นนมเปรี้ยวพื้นบ้านของรัสเซีย มีแหล่งผลิตแรกเริ่มแถบภูเขาคอเคซัส ปัจจุบันมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในประเทศรัสเซีย ยุโรป และอเมริกา ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดนี้ต่างจากนมเปรี้ยวชนิดอื่นๆ ที่นอกเหนือจากมีรสเปรี้ยวของกรดแลคติกที่เป็นองค์ประกอบอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ และยังมีกลิ่นเหล้าอ่อนๆ เนื่องจากมีเอทธิลแอลกอฮอล์ประกอบอยู่ 0.8 ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ การผลิตทำได้โดยใส่กล้าเชื้อคีเฟอร์ที่เรียกว่า คีเฟอร์เกรน หรือบัวหิมะ (kefir grain) ประมาณ 50 ถึง 60 กรัมลงในน้ำนม 1 ลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 18 ถึง 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ถึง 28 ชั่วโมง นำไปกรองด้วยที่กรองลักษณะเดียวกับกระชอนเพื่อแยกคีเฟอร์เกรนไว้ใช้ต่อไป ลักษณะของคีเฟอร์เกรนจะเป็นก้อนเชื้อที่ผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ซึ่งฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกูลโคสและกาแลคโตส เรียกว่า คีเฟอร์แรน เชื้อผสมนี้มีลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำเป็นเมือกตะปุ่มตะป่ำ มีสีขาวขนาดแตกต่างกัน เมื่ออยู่ในน้ำนมคีเฟอร์เกรนจะสามารถเพิ่มจำนวนและขนาดได้ โดยทั่วไปจะมีขนาดประมาณเท่าเมล็ดถั่ว ในขณะที่เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นจะมีการสร้างเซลล์โพลีแซคคาไรด์ไปด้วย ดังนั้นคีเฟอร์เกรนจึงเป็นเสมือนเชื้อผสมตรึงตัวเองอยู่บนก้อนสารเมือกทำให้สามารถใช้เป็นกล้าได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด (นภา โล่ห์ทอง. 2534 : 114 - 115)

2.5.3 เนยแข็งหรือชีส

เป็นอาหารชนิดหนึ่งประเภทนมหมัก สามารถใช้เป็นอาหารว่างหรือนำมาประกอบอาหารอย่างหลากหลายในอาหารจานโปรด โดยผลิตภัณฑ์ชีสมีความหลากหลายอย่างมากไม่ว่าจะเป็นชีดด้า (cheddar) มอซซาเรลลา (mozzarella) หรือ เฟต้า (feta) ฯลฯ ชีสได้เกิดขึ้นเมื่อ 7,000 ปีก่อน เริ่มมีการผลิตขึ้นในประเทศแคนนาดาจากการแนะนำแรกของโคซามูเอลเดอ ซึ่งแคนนาดาเป็นประเทศที่มีการทำปศุสัตว์มาก โดยแต่เดิมมีการนำน้ำนมของสัตว์มาแยกของแข็งออกจากของเหลวในนมโดยใช้แบคทีเรียที่มีอยู่ในกระเพาะอาหารสัตว์ ซึ่งปัจจุบันสารสำคัญที่เป็นตัวทำน้ำนมให้เกิดชีสคือ เรนเนท (rennet) โดยเป็นสารที่สกัดจากกระเพาะสัตว์ มีส่วนทำให้สามารถผลิตผลิตชีสได้จำนวนมากและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสามารถสกัดได้จากเอนไซม์ผัก ผลไม้บางชนิด หรือส่วนประกอบของพืชบางส่วน การผลิตชีสเป็นการหมักน้ำนมโดยการแยกน้ำและแลคโตสออกจากกันมี 4 ขั้นตอน คือ 1. เคิร์ดลิ่ง (curdling) 2. เดรนนิ่ง (draining) 3. เพลสซิ่ง (pressing) 4. ริเพนนิ่ง (ripening) เมื่อทำ 4 ขั้นตอนนี้แล้ว ชีสจะได้รับการทำให้มีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับลักษณะต่าง ๆ เช่น ชนิดของนม การเกิดเคิร์ด การขึ้นรูปของนมเปรี้ยวและความสามารถในการตัด ลักษณะการทำให้สุกและแบคทีเรียหรือเชื้อราที่เป็นตัวกำหนดสำคัญของชีส (Dairygoodness. มปป ก : online)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 ครีมเปรี้ยว

เป็นซาวร์ครีม (sour cream) ลักษณะคล้ายโยเกิร์ตและนมเปรี้ยว จัดอยู่ในจำพวก single cream เพราะมีไขมันเนยประกอบอยู่ไม่น้อยกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ วิธีการทำครีมเปรี้ยวแต่เดิมนั้น ใช้วิธีทิ้งให้จุลินทรีย์ในนม (ครีม) ทำปฏิกริยากับอากาศจนเกิดรสเปรี้ยว และมีการจับตัวเป็นก้อนตามธรรมชาติ (ปัจจุบันในประเทศรัสเซียและบางประเทศในยุโรปทางตอนเหนือก็ยังใช้วิธีนี้กันอยู่) โดยปัจจุบันวิธีการผลิตซาวร์ครีมแบบอุตสาหกรรม ใช้วิธีผ่านกระบวนการเพื่อให้ครีมมีรสเปรี้ยว โดยการอุ่นนมให้ร้อน จากนั้นก็ทำการเพาะจุลลินทรีย์ลงไป โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วรอให้ครีมเกิดรสเปรี้ยว และจับตัวกันเป็นก้อน จึงนำออกจำหน่ายซาวร์ครีมค่อนข้างมีประโยชน์มากในการทำอาหารฝรั่งทั้งคาวหวาน เพราะว่าช่วยให้อาหารจานนั้น ๆ มีรสชาติที่ค่อนข้างพิเศษ คือ ทำให้อาหารมีรสชาติดีกว่าการใช้ครีมธรรมดา แต่ให้รสเข้มข้น และรสชาติมันกว่าการใช้โยเกิร์ต ครีมชนิดนี้สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้ประมาณ 1 อาทิตย์ อย่าเก็บนานเกินกว่านั้น เพราะซาวร์ครีมหากยิ่งมีระยะเวลาการเก็บมาก ก็จะยิ่งทำให้เปรี้ยวมาก (รังสินี โสธรวิทย์. 2550 : 191)

2.6 กระบวนการทางชีวเคมีในการหมัก

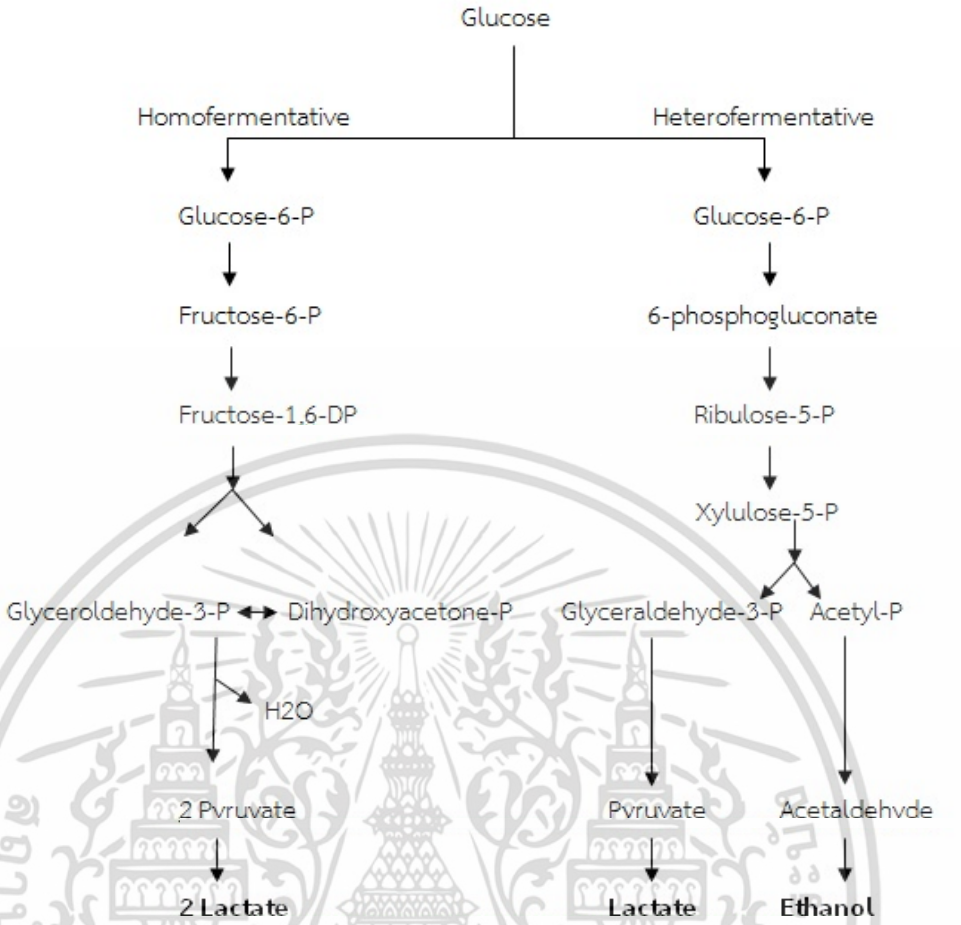
การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่มีกระบวนการตรงกันข้ามกับการถนอมอาหารวิธีอื่น ๆ ซึ่งการหมักเป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ หรือยับยั้งกิจกรรมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในอาหาร โดยกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ homofermentative lactic acid และ heterofermentative lactic acid

1. การหมักแบบ homofermentative lactic acid เป็นการหมักที่ประกอบด้วยแบคทีเรีย *Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* ในบาง สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัวอื่นๆ ได้กรดแลกติกประมาณ 95 % โดยส่วนที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการหมักแบบ homofermentative กลูโคสถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นไพรูเวทผ่านกระบวนการเอมเดนเมอเยอฮอฟพาร์นาส (Embden Meryerhof Parnas pathway; EMP) (Franz et al., 1999 อ้างโดย ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547: 6)

2. การหมักแบบ heterofermentative lactic acid bacteria เป็นการหมักที่ประกอบด้วยแบคทีเรียประกอบด้วย *Leuconostoc, Weissella* และ *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้กรด แลกติก ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอลประมาณ 20 - 25 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 20 - 25 เปอร์เซ็นต์ โดยกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปตามวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase Pathway) หรือวิถี เพนโตส (Pentose Pathway) ซึ่งได้พลังงานเพียงครึ่งหนึ่งในกระบวนการ Homofermentative (ภาพที่ 2.4) (Axelsson, 1998 อ้างโดย ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547 : 6)

โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสม และสภาวะการเกิดเมตาบอลิซึมเป็นตัวสำคัญในการหมัก ซึ่งกระบวนการทางชีวเคมีในการหมักมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 วิถีการหมักกลูโคสแบบ homofermentative และ heterofermentative ของแบคทีเรียกรดแลกติก

ที่มา : Caplice and Fitzgerald (1999) อ้างโดย ศิริรัตน์ ตันไสว (2547 : 6)

2.6.1 การสร้างกรดแลคติก (Lactic Acid Production)

การสร้างกรดแลคติกเป็นกระบวนการสำคัญมากในระหว่างการหมัก ซึ่งมีแบคทีเรียเป็นองค์ประกอบในการสร้างขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการหมักวัตถุดิบ และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการดำเนินกิจกรรมการหมัก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมเลกุลสารทั้งสภาวะกายภาพ และชีวภาพของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรท หรือ สารประกอบอื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน อาจเกิดได้ทั้งภายใต้สภาพที่มีออกซิเจน (aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) เช่น การเปลี่ยนจากเอธิลแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มโดยแบคทีเรีย acetobacter เป็นสภาพที่มีออกซิเจน ส่วนการเปลี่ยนแปลงจากน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติคโดยแบคทีเรีย *Lactococcus* เป็นสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งการสร้างกรดแลคติกเป็นส่วนช่วยในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร โดยสามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้สูงขึ้น ทำให้เนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติของอาหารเปลี่ยนแปลงไป หากการดำเนินกิจกรรมของแบคทีเรียในการสร้างกรดแลคติกเป็นไปในทิศทางที่ดี มีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสมก็จะส่งผลทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีตามไปด้วย (ตรี วาทกิจ. มปป : online)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 แลคโตสไฮโดรไลส์ (Lactose Hydrolyzed)

เป็นการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิตอาหารหมักประเภทนมหมักซึ่งอาจมีแลคโตสบางส่วนยังไม่ได้ถูกหมัก ทำให้ผู้ที่ไม่สามารถใช้แลคโตสได้จำเป็นต้องมีการลดระดับแลคโตสดังกล่าวลงซึ่งทำได้โดยการไฮโดรไลท์ด้วยเอนไซม์บีตากาแลคโตซิเดส (แลกเตส) (รังสินี โสธรวิทย์. 2550 : 67)

2.6.3 โปรตีนโฮโดรไลส์ (Protein Hydrolyzed)

กระบวนการนี้เริ่มขึ้นเมื่อแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการหมัก มีการสร้างกรดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ได้โพลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่มีขนาดสั้นลง เนื่องจากพันธะเปปไทม์ถูกทำลาย ทำให้เกิดรสของเปบไทด์ (peptide) ที่เกิดจากไฮโดรไลซีส (hydrolysis) ของโปรตีน (proteolysis) มักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ

2.6.4 การเกิดกลิ่นรสและเนื้อสัมผัส (Flavor Production)

สิ่งสำคัญกระบวนการทางชีวเคมีในการหมักคือ การที่แบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการหมักส่งเสริมให้เกิดกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และรูปลักษณะของอาหาร กล่าวคือ หากแบคทีเรียที่ทำการหมักมีคุณภาพก็จะส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ดีตามไปด้วย โดยการเกิดกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ทั้งด้านวัตถุดิบ กรรมวิธีการผลิต สภาวะภายนอก อุณหภูมิ รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ และลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่นการทำให้น้ำนมถูกเปลี่ยนเป็นเนยแข็ง (cheese) น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ และผักเปลี่ยนเป็นผักดอง เป็นต้น ซึ่งแต่ละผลิตภัณฑ์ที่กล่าวมาล้วนแล้วแต่มีความแตกต่างทางด้านกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสแทบทั้งสิ้น

2.6.5 การเปลี่ยนแปลงไขมัน (Lipolysis)

ส่วนใหญ่เกิดขึ้นได้ในพวกน้ำนม เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในนมเองหรือเป็นเอนไซม์ที่เกิดจากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวสร้างกลิ่นและรสชาติ แม้ว่าการสลายลิปิดในนมหมักจะมีเพียงเล็กน้อยก็ตาม

2.6.6 การเปลี่ยนแปลงของสี

แบคทีเรียที่ใช้ในการหมักสามารถทำให้สีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป อาจมีการเปลี่ยนแปลงไปตามส่วนประกอบทางเคมีและทางกายภาพของนม เช่น สีเหลืองเกิดจากไขมันในนม และขึ้นอยู่กับที่อาหารที่วัวกินเข้าไป ส่วนใหญ่มักเห็นได้ชัดในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง (ศศิธร วงเรือง และคณะ. 2554 : online)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก มีดังนี้

อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ จีรชัย กาญจนพฤฒิพงศ์ (2551 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาถึงการคัดเลือกและจำแนกแบคเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลางของประเทศไทยวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อคัดเลือก และจำแนกแบคเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลางของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตจากน้ำนมแพะ การศึกษานี้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 304 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่มีรูปร่างท่อนจำนวน 185 ไอโซเลต และรูปร่างกลม 119 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกโดยการเทียบเคียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในการสร้างกรดเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology สามารถจำแนกออกได้เป็น 78 ไอโซเลต การจำแนกในระดับสกุลของแบคทีเรียกรด แลคติกสามารถจำแนกออกเป็น 5 กลุ่ม คือ Streptococcus (34.61 %), Lactobacillus (35.90 %), Lactococcus (5.13 %), Enterococcus (16.66 %), Leuconostoc (7.70 %) และจำแนกในระดับสายพันธุ์เป็น *Streptococcus thermophillus* (27 ไอโซเลต), *Lactobacillus bulgaricus* (13 ไอโซเลต), *Lactobacillus lactis* (7 ไอโซเลต), *Lactobacillus brevis* (2 ไอโซเลต), *Lactobacillus plantarum* (6 ไอโซเลต), *Lactococcus lactis* sub *Staptococcus lactis* (4 ไอโซเลต), *Entercoccus faecalis* (13 ไอโซเลต) และ *Leuconostoc mesenteroid* (6 ไอโซเลต)

ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2546 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาถึงการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมของไทย รวบรวมแหนมจำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคโดยใช้อาหารแข็ง MRS ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติค จัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยาและการสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติคที่พบในตัวอย่างแหนมอยู่ระหว่าง 61 - 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซนต์ตัวอย่างแหนมทั้งหมดคิดเป็น 75.66 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่มีรูปแท่งและมีการสร้างกรดแบบ Homofermentative 64.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบมากจากตัวอย่างแหนมทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมามีรูปกลมและมีการสร้างกรดแบบ Homofermentative 14.13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีการสร้างกรดแบบ Heterofermentative รูปแท่งพบ 16.84 เปอร์เซ็นต์ รูปกลมพบ 4.90 เปอร์เซ็นต์ การจัดจำแนกสายพันธุ์ที่พบเป็นจำนวนมากคือ *Lactobacillus jonhsonii* สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* และ *pediococcus acidilactici* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองจีนัสพบได้ในอาหารหมักและนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จุฑาทิพย์ บุญเกิด (2549 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาถึงการคัดเลือก และจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมข้าวเพื่อผลิตโยเกิร์ต การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งรูปร่าง กลมและแท่ง โดยมีรูปร่างกลม 84 ไอโซเลต รูปร่างแท่ง 4 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม Homofermentative และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด จากนั้นพบว่ามี 10 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตโยเกิร์ตได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ ให้ลักษณะเคิร์ดเรียบเนียน ให้กลิ่นรสชาติที่เหมาะสม ผลิตกรดได้ปริมาณสูงและให้ค่าพีเอชต่ำ ผลการจำแนกโดยเทียบเคียงลักษณะทางสรีรวิทยา และปฏิกิริยาชีวเคมีกับแบคทีเรียมาตรฐาน จำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* KUS1, *Pediococcus pentosaceus* KUR1 และ *Pediococcus pentosaceus* KUR2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมจะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตจากน้ำนมข้าวทางการค้าตราสิริณ คือ *L. plantarum* KUS1 และ *P. pentosaceus* KUR2 สำหรับโยเกิร์ตจากน้ำนมข้าวทางการค้าตราวีฟิท ใช้เชื้อผสมระหว่าง *L. plantarum* KUS1 และ *P. pentosaceus* KUR1 จากนั้นได้ทำการปรับปรุงผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมข้าวที่ได้โดยเติมน้ำตาลซูโครส และน้ำเชื่อมฟรุกโตส พบว่าผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมข้าวที่เติมน้ำตาลซูโครสให้ผลดีกว่าการใช้น้ำเชื่อมฟรุกโตส ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมข้าวที่เติมน้ำตาลซูโครสมีระดับความเป็นกรดด่างต่ำ เปอร์เซ็นต์กรดสูงกว่าการใช้น้ำเชื่อมฟรุกโตสที่ความเข้มข้นเดียวกัน ลักษณะเนื้อสัมผัสกลิ่นรสเหมาะสำหรับผลิตเป็นโยเกิร์ตน้ำนมข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปทุมพร ฉิมเอนก และคณะ (2551 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กระทง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ *Enterococcus faecium* PR-2, *Rumen bacterium* MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1 และ *Lactobacillus plantarum* IG-3 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี สามารถทนความเป็นกรด - ด่าง (pH) และน้ำดีในระดับที่พบในลำไส้ไก่ได้ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ไปเสริมในอาหารของไก่กระทง แล้วศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนไอเลียม (ileum) และซีกัม (cecum) ของไก่ ผลการทดลองพบว่าโพรไบโอติกที่ใช้มีอิทธิพลต่อจำนวนประชากร *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ของไก่กระทง โดยในไก่ที่เสริมด้วยโพรไบโอติกทั้งทางการค้า โพรไบโอติกในรูปเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมมีแนวโน้มประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกทีมีในลำไส้ส่วนไอเลียมสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.01$) และประชากร *Escherichia coli* ในลำไส้ส่วนซีกัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.01$) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่า *E. coli* ทั้งในส่วนไอเลียมและซีกัมของไก่ และไม่พบ *Salmonellaspecies* ในลำไส้ของไก่ที่ใช้ทดลอง

จิราพัชร กงภูธร และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2548 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาถึงการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Enterococcus faecium*KUA29, *Pediococcus pentosaceus*KUB3, *Pediococcus pentosaceus*KUC1 และ *Lactobacillus plantarum*KUC7 ที่แยกได้จากน้ำนมถั่วเหลืองใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นผลิตโยเกิร์ตที่มีการเติมโปรตีนถั่วเหลืองสกัดร้อยละ 2 หมักที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (pH) ปริมาณกรดแลคติกและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ระหว่างกระบวนการหมัก พบว่า ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีลักษณะที่ดีกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยหัวเชื้อเริ่มต้นผสมระหว่าง *Pediococcus pentosaceus*KUC1 และ *Lactobacillus plantarum*KUC7 ทำให้ค่าพีเอชลดลงจาก 6.53 เป็น 4.05 ปริมาณแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.14 เป็น 0.63 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเท่ากับ 9.81 Log CFU/ml ไม่พบโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ยีสต์และรา มีค่าความหนืด เท่ากับ 1,176 เซนติพอยต์ ปริมาณโปรตีนร้อยละ 4.10 ลักษณะเนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว สี กลิ่น เป็นที่ยอมรับได้ของผู้ทดสอบและเหมาะที่จะเป็นอาหารเพื่อสุขภาพแบบใหม่

Ao X, et al. (2012 : abstract) ได้ศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียกรดแลคติกในนมจามรีหมักแบบดั้งเดิมและการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่แยกได้จากนมจามรีหมักแบบดั้งเดิมในที่ราบสูงมณฑลเสฉวนทางตะวันตกของประเทศจีน มีทั้งหมด 53 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม มีความคล้ายคลึงกัน 87% โดยใช้การวิเคราะห์ระดับ 16S rDNA และการวิเคราะห์ ATPA สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่พบได้แก่ *Durans enterococcus*, *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus paracasei* คิดเป็น 45.3, 22.6 และ 17.0% ของเชื้อตามลำดับ เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในนมหมัก พบว่าสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของนมหมัก คือ SCA16 (Durans) และ SCA52 (*Lactobacillus fermentum*) ซึ่งมีคะแนนสูงสุดในด้านคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยรวม ลักษณะนมหมักที่ได้มีความหนืดสูงค่อนข้าง มีความเป็นกรดระดับปานกลาง มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี และจำนวนเซลล์ค่อนข้างสูง ทั้งนี้แบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์เน่าเสียอย่างน้อย 1 ใน 9 โดยกรดแลคติกเป็นปัจจัยหลักที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเน่าเสีย อีกทั้งสายพันธุ์ SCA52 (*Lactobacillus fermentum*) และ SCA7 (*Lactobacillus plantarum*) เป็นปฏิปักษ์กันบางส่วน โดยตัวชี้วัดระบุว่า 2 สายพันธุ์อาจผลิตสาร Bacteriocin เหมือนกัน ซึ่งคาดว่าการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมจามรีหมักแบบดั้งเดิม จะทำให้ได้นมหมักที่มีรสชาติ เนื้อสัมผัสที่ดี และคล้ายคลึงกัน

Yantyati Widyastuti and Rohmatussolihat (2014 : abstract) ได้ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกในนมหมัก พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการหมักอาหารทั่วโลก โดยการหมักนมเป็นกระบวนที่จำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกในการเปลี่ยนแปลงของน้ำนม ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์นมหมัก การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักนมสามารถทำได้ทั้งที่เป็นธรรมชาติ หรือใช้เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น จากการสำรวจการหมักใน 2 ลักษณะ มีบทบาทสำคัญเพื่อการผลิตกรด เป็นสารกันบูด และสร้างรสชาติของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถผลิต Exopolysaccharides ที่มีความจำเป็น เช่น การสร้างพื้นผิว อีกทั้งยังมีคุณสมบัติช่วยในการส่งเสริมสุขภาพ โดยพิจารณาจากรายงานที่มีอยู่หลาย ๆ อย่าง ซึ่งมีการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย (GRAS) บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกนี้ จึงนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ของนมหมัก

Wen Yi Zhang, et al. (2008 : abstract) ได้ศึกษาถึงการแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่พบมากในนมแพะหมักแบบวิธีธรรมชาติในภูมิภาคของมณฑลชิงไห่ประเทศจีน พบว่าจากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การวิเคราะห์ทางสรีรวิทยา และชีวเคมี เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมแพะหมัก 11 ตัวอย่าง มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 33 สายพันธุ์ ซึ่งนมแพะถูกหมักในธรรมชาติใช้วิธีการแบบดั้งเดิม โดยเรียกเก็บจากผู้ประกอบการที่แตกต่างกันของแต่ละบุคคลในภูมิภาคของมณฑลชิงไห่ ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเฉลี่ยเป็น $2.5 \times 10^{8} > 3.0 \times 10^{9}$ CFU / มิลลิลิตร ในขณะที่ยีสต์เป็น $2.6 \times 10^{6} > 1.6 \times 10^{8}$ CFU / มิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* susp. lactis 7 สายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus และ *acidophilus* 4 สายพันธุ์ *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์ *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis 1 สายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* 12 สายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* 1 สายพันธุ์ *Pediococcus acidilactici* 3 สายพันธุ์ และ *aerococcus* 2 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างนมกระบือพันธุ์มูร่าห์และการนำแบคทีเรียที่แยกได้มาใช้ประโยชน์ โดยมีวิธีดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์ทำการวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 ตัวอย่างน้ำนมกระบือพันธ์มูร่าห์ จากมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่

3.1.1.2.1 MRS agar
3.1.1.2.2 Glucose-Yeast Extract-Peptone
3.1.1.2.3 Nutrient Broth
3.1.1.2.4 Plate Count Agar (PCA)
3.1.1.2.5 Potato Dextrose Agar
3.1.1.2.6 Whey permeat

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 สารละลายกรดทาร์ทาริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3.1.3.2 สารละลายไอโอดีน
3.1.3.3 สารละลายฟีนอฟทาลีน
3.1.3.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
3.1.3.5 สารละลายไกลซีน
3.1.3.6 แคลเซียมคาร์บอเนต
3.1.3.7 โบรโมครีซอลเพอร์เพิล
3.1.3.8 ไฮเดรเจนเพอร์ออกไซด์

3.1.4 เครื่องมือ

3.1.4.1 เครื่องชั่งละเอียด จุดทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ AND รุ่น HR200)
3.1.4.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Bionazard Laminar Flow) ยี่ห้อ Clean รุ่น V5-V6
3.1.4.3 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
3.1.4.4 เครื่องมือวัดความหวาน (Hand Refractometer รุ่น TAP-25E)
3.1.4.5 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
3.1.4.6 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W 8540 Schwabach
3.1.4.7 กระดาษวัดพีเอช
3.1.4.8 ตู้อบลมร้อน
3.1.4.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.10 ชุดย้อมสีแบคทีเรีย
3.1.4.11 ชุดไตเตรท
3.1.4.12 ตู้เย็น (refrigerator) ยี่ห้อ SUPER CHILL รุ่น UN 617 D

3.1.5 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

3.1.5.1 ปีเปต (pipette) ขนาด 1 มล. และ 5 มล.
3.1.5.2 ไฟเซ็ค
3.1.5.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.1.5.4 เตาความร้อน
3.1.5.5 หม้อสแตนเลส
3.1.5.6 หลอดทดลอง
3.1.5.7 บิวเรต (burette)
3.1.5.8 บีกเกอร์ (Beaker)
3.1.5.9 ขวดรูปชมพู่ (flask)
3.1.5.10 เหยือกตวงของเหลว ขนาด 1000 มล. และ 2000 มล.
3.1.5.11 กระบอกตวง ขนาด 50 มล. และ 25 มล.
3.1.5.12 ขวดดูแลน ขนาด 250 มล. 500 มล. และ 1000 มล.
3.1.5.13 เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
3.1.5.14 ห่วงเขี่ยเชื้อและเข็มเขี่ยเชื้อ
3.1.5.15 จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

3.2 การรับตัวอย่างน้ำนมและวิธีการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

รับตัวอย่างน้ำนมกระบือดิบพันธุ์มูร่าห์ จากมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยน้ำนมดิบจะถูกส่งมายังมูร่าห์เฮ้าส์ (Murrah House) โดยรับน้ำนมกระบือดิบ 3 ครั้ง กำหนดรหัสเป็น Mbmf (รับน้ำนมกระบือดิบครั้งที่ 1) Bml (รับน้ำนมกระบือดิบครั้งที่ 2) ML-NP (รับน้ำนมกระบือดิบครั้งที่ 3) ตามลำดับ ทำการควบคุมอุณหภูมิของน้ำนมโดยการบรรจุในกล่องสูญญากาศบรรจุน้ำแข็ง เพื่อรักษาอุณหภูมิน้ำนมดิบคงที่ระหว่างการขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีนี้จะอยู่ได้ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำนมดิบที่ได้มาทำการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อไป

3.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือและการตรวจสอบ

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ดำเนินการโดยนำตัวอย่างน้ำนมกระบือดิบจากข้อ 3.2 มาบ่มในอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้จนเกิดเคิร์ด จากนั้นนำตัวอย่างที่บ่มแต่ละสภาวะมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เลือกการเจือจางที่ 10^{-3} และ10^{-5} หยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีโบรโมครีซอลเพอร์เพิล (bromocresol purple) เป็นอินดิเคเตอร์ ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร ทำการสเปรด (spread) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จนเกิดการเจริญของเชื้อเป็นโคโลนี (colony) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียโดยสังเกต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และมีบริเวณใสรอบโคโลนี นำเชื้อที่เลือกไว้มาเขี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่โดยวิธีสตีกเพลท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเกิดโคโลนีเดี่ยว ทำซ้ำจนกระทั่งได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปศึกษาการตรวจสอบคะตะเลส การย้อมสีแกรม ตรวจสอบการสร้างแก๊ส ตรวจสอบคุณสมบัติการหมักแลคโตส ตรวจการย่อยสลายเคซีน และตรวจสอบการสร้างเคิร์ดในน้ำนม

3.3.2 การตรวจสอบสมบัติเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อบริสุทธ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ตามขั้นตอน 3.3.1 มาเพาะบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง เพื่อนำเชื้อที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้น ดังนี้

3.3.2.1 การตรวจสอบคะตะเลสและการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อบริสุทธ์ที่แยกได้มาตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลส โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากจานอาหารเพาะเชื้อแล้วแตะลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อที่อยู่บนแผ่นสไลด์ 2 - 3 หยด หากโคโลนีที่คัดเลือกเกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวกซึ่งจะไม่จัดอยู่กลุ่มแบคที่เรียที่สร้างกรดแลคติก แต่หากไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียให้ผลคะตะเลสเป็นลบ ซึ่งจัดอยู่ในคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก จากนั้นศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการย้อมสีแบบแกรม (วิธีตามภาคผนวก ข) นำไปส่องดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 1000 เท่า คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต

3.3.2.2 การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่

- ตรวจการสร้างแก๊ส เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่หลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือวางไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หากเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative bacteria จะพบแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative bacteria จะไม่พบแก๊สในหลอดดักแก๊ส

- ตรวจคุณสมบัติการหมักน้ำตาลแลกโตส เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส แคลเซียมคาร์บอเนต และโบรโมครีซอลเพอร์เพิล 2.0 1.0 และ 0.0004 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีแสดงว่าหมักน้ำตาลแลคโตสได้

- ตรวจสอบการย่อยสลายเคซีน เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง whey permeate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนม

3.3.2.3 ตรวจสอบการสร้างเคิร์ดในน้ำนม โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ในน้ำนมที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด (milk total solids) 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดเคิร์ดหรือลิ่มนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากน้ำนมกระบือ

3.4.1 การวินิจฉัยเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในระดับสปีชีส์

ดำเนินการเตรียมตัวอย่างโดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดทดลองที่เก็บรักษาตัวอย่างไว้ นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาสตรีคลงบนอาหารแข็งสูตร MRS บ่มในอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ส่งไปยังสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพื่อวินิจฉัยในระดับสปีชีส์ โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอพีไอ) ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL

3.4.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการทำโยเกิร์ต

ทำได้โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากโคโลนีเดี่ยวที่ได้ผลจากการวินิจฉัยในข้อที่ 3.3.3 มาแทงในอาหารสูตร MRS ที่มีผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และมีแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการต่อเชื้อซ้ำทุก 1 เดือน กรณีต้องการนำเชื้อมาศึกษาการหมักโยเกิร์ตหรือนำมาใช้ประโยชน์ในการนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ ให้ทำการสตรีคเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อต่อไป

3.5 การนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกและคัดเลือกได้มาศึกษาสมบัติในการหมักโยเกิร์ต

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำน้ำนมกระบือมาผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 3.3.4 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS นาน 24 - 48 ชั่วโมง ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร โดยใส่เชื้อประมาณ 5 ลูป ผสมเชื้อแบคทีเรียกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเติมในน้ำนมที่ทำการพาสเจอร์ไรซ์แล้ว โดยใช้สารละลายเชื้อ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำนม 100 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อในการหมักต่อไป

3.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ต

นำน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ใส่หัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำนม 100 มิลลิลิตร นำไปศึกษาการบ่มโยเกิร์ตในอุณหภูมิที่แตกต่างกันโดยใช้อุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบชนิดของเชื้อ x อุณหภูมิ factorial ที่มีปัจจัยการทดลอง 2 ชนิด คือ

1. ชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้
2. อุณหภูมิในการหมัก 3 อุณหภูมิ คือ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส

จากนั้นเก็บตัวอย่างวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักที่อายุการหมัก 0 และ 8 ชั่วโมง ได้แก่

3.5.2.1 การวิเคราะห์ค่าพีเอช โดยนำตัวอย่างนมกระบือหมักแต่ละอุณหภูมิใส่ลงในบีกเกอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้เครื่องวัด (pH meter) จุ่มลงไปในตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ อ่านค่าและบันทึกผล (AOAC, 2000)

3.5.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Suspended Solids : TSS มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์) โดยใช้เครื่องมือวัดความหวาน (Hand Refractometer) รุ่น TAP-25E ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อ่านค่าและบันทึกผลจากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย (AOAC, 2000)

3.5.2.3 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก นำตัวอย่างนมกระบือหมักแต่ละอุณหภูมิปริมาณ 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร หยดฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ จดบันทึกและคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย (AOAC, 2000)

3.5.2.4 ตรวจนับจำนวนเซลล์กรดแลคติกที่มีชีวิต โดยนำน้ำนมกระบือหมัก 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า ความเจือจางละ 3 ซ้ำ หยดสารละลายนมหมักปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง MRS Agar ทำการเสปรดเพลท นำไปบ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น นำมาหาค่าเฉลี่ย (มีหน่วยเป็นโคโลนี/มิลลิลิตร) (AOAC, 2000)

3.5.2.5 ตรวจสอบการเกิดเคิร์ดโดยพิจารณาจาก สี กลิ่น รส ลักษณะเนื้อสัมผัส และความแน่นเนื้อเพื่อคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

3.5.3 ทำการผลิตโยเกิร์ตจากเชื้อและสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.2 เพื่อทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ทำการทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ของโยเกิร์ตโดยใช้แบบทดสอบตามวิธี 9 - point hedonic scale Test ให้คะแนนความชอบระดับ 1 - 9 (คะแนน 9 = ชอบมากที่สุด และคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) ตามลักษณะสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ผู้ชิมเป็นกลุ่มผู้บริโภคที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545 : 92) ได้แก่ กลุ่มนักศึกษาภาควิชาครุศาสตร์เกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผลการทดสอบชิมที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบค่าของตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือ

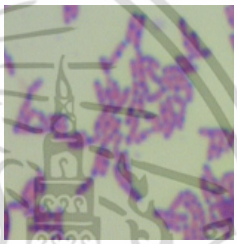
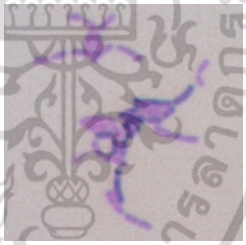
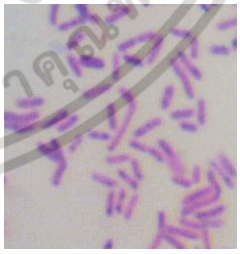
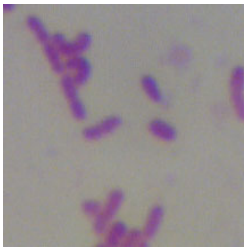
จากการนำน้ำนมกระบือดิบพันธุ์มูร่าห์จากมูร่าห์ฟาร์ม จังหวัดฉะเชิงเทรา มาบ่มจนเกิดเคิร์ด นำมาแยกเชื้อบนอาหารแข็ง MRS พบว่า ลักษณะของโคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก ขอบเรียบ กลมนูน สีขาวขุ่น และมีความมันวาว คัดเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอาหาร MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากนั้นนำมาสตรีคเพลทบนจานอาหารใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 10 ไอโซเลต) ได้แก่ Mbmf np1, Mbmf np3, Mbmf np4, Bml 1, Bml 2, Bml 3, Bml 4, ML-NP1, ML-NP2 และML-NP3 ตามลำดับ นำไปศึกษาการตรวจสอบคะตะเลส และการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 ผลการศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและการย้อมสีแกรม (ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม)

ผลการศึกษาการทดสอบคะตะเลสและลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามตารางที่ 4.1 พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง มีบริเวณใสรอบโคโลนี และนำมาตรวจหาเอนไซม์คะตะเลสมีจำนวนทั้งหมด 10 ไอโซเลต ให้ผลเป็นลบคือไม่มีเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ เมื่อนำมาย้อมสีแกรมพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (ติดสีแดงของเซฟรานิน) จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ Bml 4 และ ML-NP3 และ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 8 ไอโซเลต (ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต) ได้แก่ Mbmf np1, Mbmf np3 Mbmf np4, Bml 1, Bml 2, Bml 3, ML-NP1 และ ML-NP2 ตามลำดับ ลักษณะการจัดเรียงตัวและการกระจายตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเชื้อที่พบส่วนใหญ่มีรูปร่างของเซลล์เป็นท่อนสั้น เรียวบาง มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นโซ่สั้นๆ ซึ่ง Larsen et al, (1993) อธิบายว่า เชื้อแบคทีเรียที่ใช้กับอาหารหมัก มักอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลมรี มักพบในธรรมชาติและพบมากในน้ำนม และสอดคล้องกับอัจฉราพร เกิดกุล (2554: 4) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวพร้อมดื่มโยเกิร์ต และนมผง พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาพที่มีออกซิเจน หรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ อากาศจึงเป็นปัจจัยหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ผ่านกระบวนการที่แตกต่างกัน การทำผลิตภัณฑ์นมหมักส่วนใหญ่จะเน้นแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างแก๊สในวิถีการหมัก มีคุณสมบัติการหมักน้ำตาลแลคโตส และการย่อยเคซีนที่ให้ผลเป็นบวก ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียที่เลือกไว้จำนวนทั้งหมด 8 ไอโซเลต มาศึกษาสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

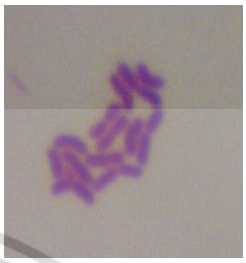
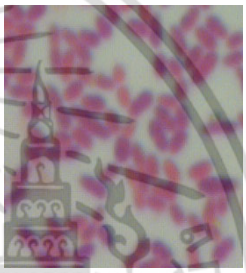
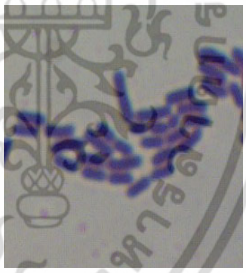
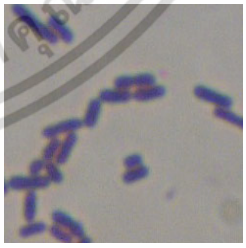
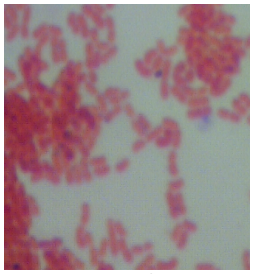
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบคะตะเลสและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษา รหัส	ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส	การติดสีของเซลล์ และรูปร่าง	รูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์	หมายเหตุ
Mbmf np 1	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีม่วงคริสตัลไวโอเลต		
Mbmf np 3	-	ท่อนสั้น / ติดสีม่วงคริสตัลไวโอเลต		
Mbmf np 4	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		
Bml 1	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		
Bml 2	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

การศึกษา รหัส	ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส	การติดสีของเซลล์และรูปร่าง	รูปภาพจากกล้องจุลทรรศน์	หมายเหตุ
Bml 3	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		
Bml4	+	กลมรี / เซลล์ติดสีแดงของแซฟรานิน		
ML-NP1	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		
ML-NP2	-	ท่อนสั้น / เซลล์ติดสีคริสตัลไวโอเลต		
ML-NP3	+	ท่อนสั้น / ติดสีแดงของแซฟรานิน		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

นำเชื้อที่แยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต มาสตรีคบนจานอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง นำไปศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่สมบัติการสร้างก๊าซ การหมักน้ำตาลแลคโตส และการย่อยเคซีน

4.1.2.1 ผลการศึกษาสมบัติของเชื้อแบคทีเรียโดยทดสอบการสร้างแก๊ส

ผลการทดสอบการสร้างแก๊สของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่า กิจกรรมภายในหลอดอาหารเหลวของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลต เป็นไปอย่างต่อเนื่องจนครบระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง โดยช่วงระยะการหมักที่ 24 ชั่วโมง ลักษณะอาหารเลี้ยงในหลอดทดลองของเชื้อแต่ละไอโซเลตเริ่มมีความขุ่นเล็กน้อยและมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อครบเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง โดยเชื้อทั้งหมดไม่มีการสร้างฟองอากาศภายในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อที่แยกได้ไม่มีคุณสมบัติในการสร้างแก๊ส ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มวิถีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเทชั่น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2 สอดคล้องกับกับงานวิจัยของ จินตนา ต๊ะย่วน (2553 : 29 - 30) อธิบายว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเทชั่น หรือ โฮโมเฟอร์เมนเทเทีฟ จะมีกระบวนการหมักน้ำตาลกูลโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอมเดน เมเยอร์ฮอฟ พามาส (Emden-Meyerhof-Pamas หรือ EMP) หรือ ไกลโคไลติก พาทเวย์ (glycolytic pathway) ซึ่งสามาถรผลิตกรดแลคติกได้ 95 เปอร์เซ็นต์ จากการหมักกลูโคส แลคโตส หรือกาแลคโตส 1 โมเลกุล เมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวท และจะเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจะส่งผลกับผลิตภัณฑ์ทำให้ค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์ลดลง จากการทดสอบการสร้างแก๊สในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลต ไม่มีการสร้างแก๊ส 8 ไอโซเลต

4.1.2.2 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียโดยทดสอบการหมักแลคโตส

ผลการทดสอบการหมักแลคโตสของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่า เชื้อที่แยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลต มีการสร้างกรดออกมารอบโคโลนี ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองรอบๆ โคโลนีและเกิดบริเวณใส โดยวงใสจะมีความกว้างเล็กน้อย ตั้งแต่ระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง และจะชัดเจนมากขึ้นเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลต มีคุณสมบัติในการหมักแลคโตส อีกทั้งแลคโตสยังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตพื้นฐานที่สำคัญต่อกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2

ทั้งนี้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมจะเป็นตัวช่วยในกระบวนการย่อย โดยใช้เอนไซม์แลคเตสมีการย่อยแลคโตส แล้วเปลี่ยนเป็นกลูโคส และกาแลคโตส ส่งผลทำให้น้ำนมเกิดผลิตภัณฑ์ใหม่คือ โยเกิร์ต นอกจากนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ส่งเสริมการย่อยแลคโตสในผลิตภัณฑ์นม ยังช่วยลดอาการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้ ซึ่งทั่วโลกมีประชากรประมาณร้อยละ 70 ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากการขาดเอนไซม์แลคเตส โดยส่วนใหญ่อาการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโตสได้อย่างสมบูรณ์พบในเด็กเล็ก จะลดลงหลังจากที่ให้รับประทานโยเกิร์ตที่มีเชื้อจุลินทรีย์กรดแลคติกมากกว่าการบริโภคนมธรรมดา (Naidu et al, 1999 : 126)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีน

รหัส	การสร้างแก๊ส	คุณสมบัติการหมักน้ำตาลแลคโตส	การย่อยเคซีน
Mbmf np 1	-	+	+
Mbmf np 3	-	+	+
Mbmf np 4	-	+	+
Bml1	-	+	-
Bml 2	-	+	+
Bml 3	-	+	+
ML-NP 1	-	+	+
ML-NP 2	-	+	+

4.1.2.3 การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียโดยทดสอบการย่อยเคซีน

ผลการทดสอบการย่อยเคซีนของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่า เชื้อที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี บนอาหารแข็ง Whey permeate มีจำนวนทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส Mbmf np1 Mbmf np3 Mbmf np4 Bml2 Bml3 ML-NP1 และ ML-NP2 โดยวงใสจะมีความกว้างเล็กน้อยเมื่อถึงระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง และจะชัดเจนมากขึ้นเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงว่าเชื้อที่แยกได้จำนวน 7 ไอโซเลต มีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน ยกเว้นรหัส Bml1 ที่ไม่มีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน โดยส่วนใหญ่เชื้อที่คัดเลือกในการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักน้ำนมจำเป็นต้องย่อยสลายเคซีนได้ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลโดยตรงต่อการเมแทบอไลซ์องค์ประกอบในน้ำนม ที่ส่งผลต่อคุณภาพในการทำให้เกิดกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์นม (โยเกิร์ต) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบสอดคล้องกับ Walstra, et al (2006) ที่ได้อธิบายว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักจำเป็นต้องมีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน เพื่อใช้ในการแยกเคซีนออกจากน้ำนม โดยเคซีน หรือ คาเซอีน เป็นโปรตีนนมที่รวมตัวกับแคลเซียม อยู่ในรูปแคลเซียมคาซีเนท (calcium caseinate) โมเลกุลของเคซีนทำให้มองเห็นน้ำนมเป็นสีขาว ซึ่งเคซีนจะแทรกตัวอยู่ในน้ำนมภายใต้สภาวะที่เรียกว่า แขวนลอย (colloid) โดยรวมตัวอยู่กับแร่ธาตุในน้ำนม คือ แคลเซียม และฟอสฟอรัส เมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกมีการสร้างกรดในระหว่างกระบวนการหมัก จะส่งผลให้แร่ธาตุดังกล่าวเคลื่อนย้ายไปรวมตัวกับกรดแทน น้ำนมจึงมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น โปรตีนนมจึงไม่สามารถแทรกตัวอยู่ในสภาวะแขวนลอยอีกต่อไปได้ และพีเอชในน้ำนมลดลง เคซีนที่อยู่ในน้ำนมจึงตกตะกอนออกเป็นก้อนขาวเรียกว่าเคิร์ด และมีน้ำใส ๆ สีเหลืองแยกตัวออกมา เรียกว่าเวย์ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการย่อยเคซีนบางชนิด มีส่วนช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotension coverting enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการเกิดภาวะความดัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โลหิตสูง และเคซีนที่ถูกย่อยสลายบางส่วนยังมีประโยชน์ทางโภชนาการ เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดได้

ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลต มีผลในการสร้างแก๊สเป็นลบ และมีคุณสมบัติในการหมักแลคโตสทั้งหมด แต่ในการย่อยสลายเคซีนมีเพียงเชื้อรหัส Bml1 ที่ไม่สามารถย่อยสลายเคซีนได้ ผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีนสรุปว่าแบคทีเรียที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อ เพื่อนำมาคัดเลือกการสร้างเคิร์ดในน้ำนมมีจำนวนทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ Mbmf np1 Mbmf np3 Mbmf np4 Bml2 Bml3 ML-NP1 และ ML-NP2 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Whittenbury (1964 : 24) กล่าวว่าการหมักผลิตภัณฑ์นมส่วนใหญ่มักใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างแก๊สเป็นลบ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีกระบวนการการหมักแบบไม่ใช้อากาศเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก เรียกว่าการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเทชั่น หรือ โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ โดยมีการย่อยกลูโคสผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส ทั้งยังต้องมีคุณสมบัติการหมักน้ำตาลแลคโตสหรือน้ำตาลนมเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญพบในนมเพียงอย่างเดียว สลายตัวได้ง่าย ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ยังต้องมีการย่อยสลายเคซีนได้ สุวรรณา กิจภากรณ์ (2525 : 11 - 12) อธิบายอีกว่าเคซีน เป็นโปรตีนชนิดฟอสโฟโปรตีน (Phosphoprotein) ในน้ำนม สามารถแยกออกจากน้ำนมโดยการตกตะกอนด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ทำให้น้ำนมมีลักษณะข้นหนืด หรือเกิดเคิร์ดในน้ำนมนั้นเอง ทั้งนี้การที่จะได้ผลิตภัณฑ์นมหมัก (โยเกิร์ต) ที่ดี จำเป็นต้องมีกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนน้ำนมให้เกิดเคิร์ด ให้กลิ่นรสและเนื้อสัมผัสที่ดี โดยเชื้อแต่ละชนิดอาจจะให้ลักษณะกลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 7 ไอโซเลต มาศึกษาการสร้างเคิร์ดในน้ำนมกระบือต่อไป

4.1.2.4 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างเคิร์ดของเชื้อแบคทีเรีย

ผลการสร้างเคิร์ดของเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 7 ไอโซเลต ได้เชื้อ 2 ไอโซเลต ได้แก่ Mbmf np 3 และ Bml2 ที่มีลักษณะกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการสร้างเคิร์ดใกล้เคียงกับโยเกิร์ตมากที่สุด ซึ่งเชื้อแบคทีเรียอีก 5 ไอโซเลตได้แก่ รหัส Mbmf np1, Bml3, Mbmf np4, ML-NP1 และ ML-NP2 มีลักษณะที่ไม่ดีเนื่องจากในด้านกลิ่น กลิ่นนมหมักที่ได้มีกลิ่นฉุนของแอมโมเนียทั้งหมด ด้านรสชาติ มีรสจืด และขมเฝื่อนลิ้น มีความมันของไขมันนมทั้งหมด ด้านเนื้อสัมผัส เคิร์ดของนมหมักที่เกิดขึ้นแตกกระจายไม่เกาะกัน มีการแยกตัวของน้ำค่อนข้างมาก เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบางรหัสออกไปทางเละ ต่างจากเชื้อแบคทีเรีย Mbmf np 3 และ Bml2 ที่ให้คุณลักษณะที่ดีต่อการหมักน้ำนม ด้านกลิ่น มีกลิ่นของนมหมักชัดเจน ไม่มีกลิ่นฉุนปะปน ด้านรสชาติ มีรสมันของไขมันนม รสหวานและเปรี้ยวออกมาเล็กน้อย ด้านเนื้อสัมผัส ลิ่มนมที่เกิดขึ้นอ่อนนุ่ม จับตัวกันไม่แข็งไปและไม่เละไป มีลักษณะคล้ายเต้าฮวย ซึ่งผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเกิดเคิร์ดและลักษณะทางประสาทสัมผัสในการหมักโยเกิร์ต

รหัส	ลักษณะการเกิดเคิร์ด	ลักษณะทางประสาทสัมผัส		
		กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัสของเคิร์ต
Mbmf np 3		มีกลิ่นของนมหมักปกติ	รสจืด นุ่มลิ้น มีรสมันของไขมันนม รสหวานออกมาเล็กน้อย	เคิร์ดที่เกิดขึ้นอ่อนนุ่ม มีลักษณะคล้ายเต้าฮวย
Bml2		มีกลิ่นหอมหวานของนมหมัก (คล้ายโยเกิร์ต)	รสจืด มีรสมันของไขมันนม รสหวานและเปรี้ยวออกมาเล็กน้อย	เคิร์ดที่เกิดขึ้นอ่อนนุ่ม จับตัวกันไม่แข็งไปและไม่เละ

จากการทดสอบการสร้างเคิร์ดในน้ำนมกระบือของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมีการสร้างเคิร์ดในน้ำนมทั้งหมด แต่แบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้คุณภาพในด้านกลิ่น รส เนื้อสัมผัส ของนมหมักดีและใกล้เคียงกับโยเกิร์ตที่สุดมีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ แบคทีเรียกรดแลคติกรหัส Mbmf np3 และ Bml2 ซึ่งคุณภาพของนมหมักที่ดีควรมาจากแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยโปรตีนในน้ำนม และคุณสมบัติที่สำคัญของกล้าเชื้อที่ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์นมหมัก ต้องมีความสามารถในการสร้างเคิร์ดที่มีลักษณะที่ดี ให้กลิ่น รส เนื้อสัมผัสที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับ Nauth K.R. (2004) ได้อธิบายว่า โยเกิร์ตที่ดีควรมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ไม่หดตัวเป็นก้อนแยกอยู่ต่างหาก มีสีขาวนวล มีกลิ่นหอมของนมหมักและมีรสเปรี้ยว วัดค่าพีเอช ได้เท่ากับ 4.6 หรือวัดในรูปความเข้มข้นของกรดแลกติกได้ร้อยละ 0.9 โดยเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจส่งผลต่อคุณภาพของเคิร์ดต่างกันไป และจำเป็นต้องนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ Mbmf np3 และ Bml2 ตรวจสอบเพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชี่ส์ต่อไป

4.2 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกในระดับสปีชี่ส์

นำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลต คือ Mbmf np3 และ Bml2 มาสตรีคบนจานอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชี่ส์ และนำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในข้างต้นส่งไปวินิจฉัยระดับสกุลและสปีชี่ส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำจานเพาะเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต ปิดด้วยพาราฟิล์มโดยรอบเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นที่จะเข้ามาปะปน ใส่ถุงร้อน บรรจุลงในกระติกที่มีน้ำแข็ง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะอุณหภูมิคงที่ระหว่างการนำส่ง ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับสปีชี่ส์ นำส่งไปที่สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วว.) จำแนกด้วยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอพีไอ)

จากผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ จำนวน 2 ไอโซเลต ด้วยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอพีไอ) ของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วว.) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ รหัส Mbmf np 3 ผลออกมาไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์สกุลอะไร ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ Bml2 ผลออกมาชี้ชัดว่าเป็นเชื้อจุลิทรีย์สกุล *Lactobacillus rhamnosus* 99.4% ในการชี้ชัด ซึ่งดูได้ในภาคผนวก ง. โดยชลลดา ศิริเสตสุวรรณ (2551: 12) อธิบายว่าเชื้อแบคทีเรียสกุล *L. rhamnosus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์หมักดอง ในช่องปาก ลำไส้ อุจจาระ และ ช่องคลอดของมนุษย์เป็น facultative anaerobe รูปร่างเป็นท่อน ต่อกันเป็นสายไม่มี flagella จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยตัวเอง เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ 15 - 40 องศาเซลเซียส และสามารถใช้สับเทรตเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้คราวละมาก ๆ อีกทั้ง Nase et al, (2001) ได้ทำการศึกษาการรับประทานนมที่มี และไม่มีเชื้อแบคทีเรีย *L. rhamnosus* ในเด็กอายุ 1 - 6 ขวบ จำนวน 594 คน นาน 7 เดือน พบว่า เด็กที่ได้รับประทานนมที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส มีการผุของฟันน้อยลง โดยอุทัย เก้าเอี้ยน (2549: 316) ได้อธิบายว่า แบคทีเรียสกุล *L. rhamnosus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัสที่มีการนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกส์ที่สำคัญ การผลิตโพรไบโอติกส์ให้มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยจะผลิตในลักษณะของ functional food อีกทั้งแบคทีเรียสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่มโพรไบโอติกในตระกูลแลคโตบาซิลลัสชนิดที่มีประโยชน์ ทั้งยังเป็นชนิดที่สำคัญที่ใช้ในปศุสัตว์ และคน ซึ่งได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัยโดยเฉพาะการนำมาบริโภค ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โภชนเภสัชภัณฑ์ (Donohue et al, 1998) รวมทั้งการทำผลิตภัณฑ์นมหมัก โดยแบคทีเรียที่ใช้จำเป็นต้องมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ได้แก่ สามารถคงสภาพสิ่งมีชีวิตที่มีกลิ่นและรสชาติดีหลังการหมัก คงสภาพกรดอ่อนๆ ตลอดช่วงการเก็บ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์นมหมักมีคุณภาพที่ดี รวมถึงอุณหภูมิที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการของอุณหภูมิ และความต้องการของน้ำตาลในระหว่างการหมักที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาทดสอบการเจริญเติบโตในน้ำนม เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับโยเกิร์ตต่อไป

4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการหมักโยเกิร์ตจากเชื้อที่คัดเลือกได้

4.3.1 การศึกษาการหมักโยเกิร์ตน้ำนมของเชื้อที่คัดเลือกโดยใช้อุณหภูมิ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส

นำน้ำนมกระบือดิบมาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเติมกล้าเชื้อ Unknown (Mbmf np 3) และ กล้าเชื้อ Bml 2 (*Lactobacillus rhamnosus*) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำนม 100 มิลลิตร จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักที่อายุการหมัก 0 และ 8 ชั่วโมง ได้แก่ การนับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเซลล์ระหว่างการหมัก วัดค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์, °Bx) ตลอดจนลักษณะการเกิดเคิร์ด และกลิ่นรส เพื่อทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และจำนวนเชื้อในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 0 ชั่วโมง

Trait	Bacteria		SE	Temp			SE.	P-value		
	Mbmf np3	Bml2		37	41	45		Bacteria	Temp	Bacteria * Temp
pH	6.577	6.552	0.020	6.500	6.585	6.608	0.030	0.000	0.000	0.000
TSS (°Bx.)	11.778	11.778	0.136	12.000	11.833	11.500	0.167	1.000	0.139	0.397
%กรด	0.300	0.289	0.016	0.383	0.233	0.267	0.019	0.626	0.000	0.215
จำนวนเชื้อ (CFU/mL)	12.000	38.556	5.268	29.667	5.500	40.667	6.451	0.040	0.070	0.039

ตารางที่ 4.5 อิทธิพลร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดและอุณหภูมิที่มีผลต่อคุณภาพการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ เวลาการบ่มที่ 0 ชั่วโมง

Trait	Mbmf np3			SE	Bml2			SE	P-value
	37	41	45		37	41	45		
pH	6.500	6.593	6.637	0.003	6.500	6.577	6.580	0.003	0.000
TSS (°Bx.)	12.000	12.000	11.333	0.236	12.000	11.667	11.667	0.236	0.397
%กรด	0.367	0.233	0.300	0.027	0.400	0.233	0.233	0.027	0.215
จำนวนเชื้อ (CFU/mL)	16.333	5.667	14.000	9.124	43.000	5.333	67.333	9.124	0.039

จากการศึกษาการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ โดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้ 2 ชนิด ในการหมักภายใต้การบ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เวลาการบ่มเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง ในทุกทรีทเม้นต์ ค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก จำนวนเชื้อแบคทีเรียเหมือนกันหมดในทุกทรีทเม้นต์ แสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าพีเอช ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และจำนวนเชื้อในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง

Trait	bacteria		SE.	Temp			SE.	P-value		
	Mbmf np3	Bml2		37	41	45		bacteria	Temp	bacteria * Temp
pH	5.186	5.196	0.020	4.517^{c}	5.102^{b}	5.953^{a}	0.003	0.005	0.000	0.000
TSS (°Bx.)	6.220	6.220	0.157	6.166	6.166	6.333	0.192	1.000	0.783	0.023
%กรด	0.867	0.867	0.021	0.967^{a}	0.933^{b}	0.633^{c}	0.025	0.156	0.000	0.579
จำนวนเชื้อ (CFU/ml.)	235.220	178.330	15.693	152.666	203.833	263.830	19.220	0.025	0.500	0.279

<u>หมายเหตุ</u> ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.7 อิทธิพลร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดและอุณหภูมิที่มีผลต่อคุณภาพการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ เวลาการบ่มที่ 8 ชั่วโมง

Trait	Mbmf np3			SE	Bml2			SE	P-value
	37	41	45		37	41	45		
pH	4.493	5.087	5.977	0.004	4.540	5.117	5.930	0.004	0.000
TSS (°Bx.)	5.667	6.333	6.667	0.272	6.667	6.000	6.000	0.272	0.023
%กรด	1.000	0.967	0.633	0.036	0.933	0.900	0.633	0.036	0.579
จำนวนเชื้อ (CFU/ml.)	155.333	250.333	300.000	27.181	150.000	157.333	227.667	27.181	0.279

จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 การศึกษาการหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ โดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้ 2 ชนิด ในการหมัก ภายใต้การบ่มอุณหภูมิที่ 37 41 45 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 8 ชั่วโมง พบว่า ค่าพีเอชของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยเชื้อ Unknown (Mbmf np3) มีค่าเท่ากับ 5.186 และค่าพีเอชของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) มีค่าเท่ากับ 5.196 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ที่หมักด้วยเชื้อ Unknown (Mbmf np3) มีค่าเท่ากับ 6.220 และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์, °Bx) ที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) มีค่าเท่ากับ 6.220 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยเชื้อ Unknown (Mbmf np3) มีค่าเท่ากับ 0.867 และการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) มีค่าเท่ากับ 0.867 และ จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่มของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่

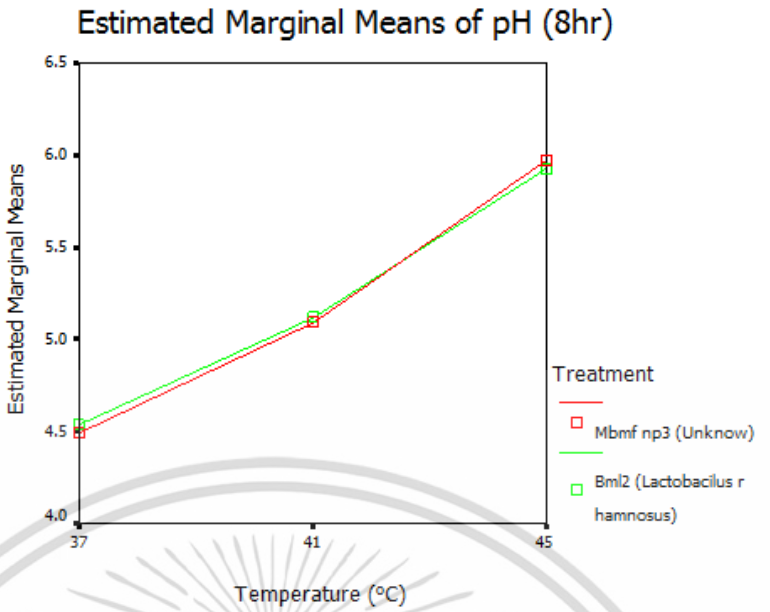
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักด้วยเชื้อ Unknown (Mbmf np3) มีค่าเท่ากับ 235.22 (โคโลนี/มิลลิลิตร, CFU/ml) และจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่มของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) มีค่าเท่ากับ 178.33 (โคโลนี/มิลลิลิตร, CFU/ml) แสดงในตารางที่ 4.6

ผลของการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าจากการศึกษาค่าพีเอชของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ใช้กล้า 2 ชนิด ในอุณหภูมิบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 4.517 การบ่มอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 5.102 และการบ่มอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 5.953 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์, °Bx) ของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ใช้กล้า 2 ชนิด ในอุณหภูมิบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 6.166 การบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 6.166 และการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 6.333 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ใช้กล้า 2 ชนิด ในอุณหภูมิบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.967 การบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.933 และการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.633 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่มของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ใช้กล้า 2 ชนิด ในอุณหภูมิบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 152.66 (โคโลนี/มิลลิลิตร, CFU/ml) การบ่มที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 203.833 (โคโลนี/มิลลิลิตร, CFU/ml) และการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 263.830 (โคโลนี/มิลลิลิตร, CFU/ml) แสดงในตารางที่ 4.6 จากการทดสอบทางสถิติ พบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเชื้อและอุณหภูมิที่หมักต่อค่าพีเอช และค่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์, °Bx) แสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.1 แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีอิทธิพลร่วมกันแต่ผลการหมักที่ให้โยเกิร์ตคุณภาพดี คือการหมักที่ 41 องศาเซลเซียส การหมักที่อุณหภูมินี้ได้โยเกิร์ตที่มีพีเอชประมาณ 5 และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกประมาณ 0.9 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมกับการผลิตโยเกิร์ตเพราะค่าพีเอชไม่สูงเกินไป ซึ่งผู้วิจัยเลือกอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้หมักโยเกิร์ตสำหรับทดสอบชิมต่อไป

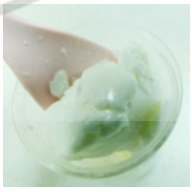
ผลการศึกษาทั้งหมด พบว่าค่าพีเอชของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ใช้กล้า 2 ชนิด ในอุณหภูมิบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ลดลงมากกว่าอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งชลลดา ศิริเสตสุวรรณ (2551: 12) อธิบายว่า เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัสบางชนิด เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ 15 - 40 องศาเซลเซียส ซึ่งบางชนิดอาจทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์, °Bx) ระหว่างการหมักภายใต้การบ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ลดลงในทุกอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่ง Yumoto et al, (1995 : 543) อธิบายว่าแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัสบางชนิด จะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 37 - 45 องศาเซลเซียส และการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกระหว่างการหมัก พบว่า อุณหภูมิที่ 41 และ 37 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นมากกว่าการบ่มอุณหภูมิที่ 45 นอกจากนั้นจำนวนเซลล์ในระหว่างการหมักมีอัตราการเจริญเติบโตของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นในทุกอุณหภูมิ ตลอดระยะเวลาการหมัก 8 ชั่วโมง ทั้งนี้ผลของเคิร์ดในการหมักน้ำนมกระบือจากเชื้อ 2 ชนิด ภายใต้การบ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีลักษณะเคิร์ดในอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส ดีกว่าอุณหภูมิที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในการหมักน้ำนมกระบือด้วยหัวเชื้อ Unknown (Mbmf np3) และ *Lactobacillus rhamnosus* (Bml2) บ่มอุณหภูมิที่ 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.8 ลักษณะเคิร์ดจากการหมักน้ำนมกระบือโดยใช้เชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 41 และ 45 องศาเซลเซียส อายุการหมัก 8 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	ลักษณะเคิร์ดของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ			
	Unknown (Mbmf np3)		*Lactobacillus rhamnosus* (Bml2)	
37 °C		ค่อนข้างเปรี้ยว ลิ่มนมจับตัวกับดี แต่มีการแยกตัวของน้ำมากออกไปทางเล		เปรี้ยวกว่าตัวอย่างอื่น ลิ่มนมจับตัวกับดี แต่มีการแยกตัวของน้ำ เนื้อเคิร์ดละเอียด มีความมันมาก
41 °C		เนื้อเคิร์ดละเอียด มีรสเปรี้ยว และกลิ่นเหมือนโยเกิร์ตทั่วไป มีความมันของไขมันนม		เนื้อเคิร์ดละเอียด จับตัวกันดี มีความยืดหยุ่นกว่าโยเกิร์ตในตัวอย่างอื่นๆ มีรสเปรี้ยวและกลิ่นเหมือนโยเกิร์ตทั่วไป
45°C		มีการแยกตัวของน้ำมาก เคิร์ดและมีรสจืด กลิ่นหมักลดลง		มีการแยกตัวของน้ำมาก เคิร์ดและมีรสจืด กลิ่นหมักลดลง ความมันมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักโยเกิร์ตที่อุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส เคิร์ดที่ได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมินี้ให้ลักษณะที่ดีกว่าและการสร้างเคิร์ดในระหว่างการหมักของอุณหภูมินี้ มีการดำเนินไปอย่างช้า ๆ จึงทำให้เคิร์ดที่ได้มีผิวเนียน เนื้อละเอียด คล้ายเต้าฮวย มีสีขาวที่มาจากน้ำนม รองลงมาเป็นเคิร์ดที่ได้จากการบ่มในอุณหภูมิที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักนมส่วนใหญ่ มักอยู่ภายใต้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดไม่สามารถทนต่อสภาวะในอุณหภูมิที่สูงได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aportela et al, (2005) ได้ศึกษาการผลิตโยเกิร์ตในช่วงการบ่มอุณหภูมิที่ 40 - 42 องศาเซลเซียส โดยอธิบายว่าช่วงอุณหภูมิการหมักนี้จะส่งผลต่อการเกิดเคิร์ตของโยเกิร์ต ทำให้เคซีนในน้ำนมมีการจับตัวดีที่สุด รวมถึงการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียมีกิจกรรมการผลิตที่สูงในระหว่างการหมักน้ำนม อีกทั้งเคิร์ดที่เกิดขึ้นมีความยืดหยุ่นดี ผลการเกิดเคิร์ตที่ได้ในอุณหภูมิการบ่มที่ 41 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับค่าพีเอชข้างต้นแสดงภาพ ที่ 4.1 เนื่องจากค่าพีเอชของโยเกิร์ตโดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 5.0 – 5.5 หากค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปจะส่งผลต่อลักษณะของโยเกิร์ต อีกทั้งค่า พีเอชในช่วงนี้ จะมีสารอาหารที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทำให้เชื้อมีการสร้างกรด แลคติดที่มากพอ ที่จะสร้าง Acetaldehyde ซึ่งเป็นตัวให้กลิ่น รสเฉพาะของโยเกิร์ตได้ (ธารารัตน์, 2542) สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่มีการเพิ่มขึ้นในทุกอุณหภูมิ ซึ่งจะนำอุณหภูมิที่ได้จากการบ่มที่ 41 องศาเซลเซียสไปใช้ในการศึกษาการทดสอบการยอมรับของผู้ชิมต่อไป

4.3.1 การศึกษาการยอมรับโยเกิร์ตน้ำนมกระบือโดยเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดที่คัดเลือกได้ และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 41 องศาเซลเซียส

การศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อน้ำนมกระบือหมักโดยใช้เชื้อ 2 ชนิด บ่มในอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ใช้แบบทดสอบตามวิธี 9 - point hedonic scale Test ให้คะแนนความชอบระดับ 1 - 9 (คะแนน 9 = ชอบมากที่สุด และคะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) ตามลักษณะสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ผู้ชิมเป็นกลุ่มผู้บริโภคที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545 : 92) ได้แก่ กลุ่มนักศึกษาภาควิชาครุศาสตร์เกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ให้ผู้ชิมทำการทดสอบชิมตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด โดยผู้ชิมทำการชิมตัวอย่างที่ 1 แล้วบันทึกผลการชิม เสร็จแล้วบ้วนปากด้วยน้ำเปล่า รอประมาณ 2 นาที จึงทำการทดสอบชิมตัวอย่างที่ 2 แล้วบันทึกผล ผลการทดสอบชิมที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี independent t-test ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส แสดงในตารางที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบด้านต่างๆ ที่ผู้ชิมมีต่อโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์

คุณลักษณะ	ชนิดของแบคทีเรีย				P-value
	Unknown (Mbmf np3)		*Lactobacillus rhamnosus* (Bml2)		
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	
กลิ่น	6.27	1.41	6.20	1.94	0.783
สี	6.30	1.09	6.40	1.38	0.448
รสชาติ	5.60[b]	1.48	6.37[a]	1.16	0.003
ความแน่นเนื้อ	6.73	1.26	7.17	1.02	0.119
ความชอบโดยรวม	6.47[b]	1.01	7.20[a]	0.92	0.000

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.9 ผู้ชิมให้คะแนนเรื่องกลิ่นของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือจากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) เท่ากับ 6.20 มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่าโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) เท่ากับ 6.27 แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

คะแนนเรื่องสีของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ พบว่า โยเกิร์ตที่ได้จากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) เท่ากับ 6.40 มีค่าเฉลี่ยมากกว่าโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) เท่ากับ 6.30 แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

คะแนนเรื่องรสชาติของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ พบว่า โยเกิร์ตที่ได้จากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) เท่ากับ 6.37 มีค่าเฉลี่ยมากกว่าโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) 5.60 มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

คะแนนเรื่องลักษณะความแน่นเนื้อของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ พบว่า โยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) เท่ากับ 7.17 มากกว่าค่าเฉลี่ยของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) เท่ากับ 6.73 แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$)

คะแนนเรื่องความชอบโดยรวมของโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ พบว่า โยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) เท่ากับ 7.20 มากกว่าโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่ได้จากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) เท่ากับ 6.47 มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ผลจากการศึกษาการยอมรับโยเกิร์ตน้ำนมกระบือโดยเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดที่คัดเลือกได้ ทำการบ่มอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส จากผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝน พบว่า ผู้ทดสอบให้การยอมรับโยเกิร์ตที่ทำการหมักจากเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) มากกว่าเชื้อ Unknown (Mbmf np3) อาจเป็นผลมากจากลักษณะเคิร์ดของเชื้อ *L. Rhamnosus* (Bml2) มีลักษณะที่ดีกว่า โดย Naidu et al, (1999) อธิบายว่าเชื้อชนิดนี้มีกระบวนการหมักแลคโตสในนม ซึ่งจะช่วยส่งเสริมคุณลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์นมหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงเป็นกลุ่มแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถเข้าไปพัฒนา และสามารถเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ และการใช้ประโยชน์ ผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

1. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมกระบือพันธุ์มูร่าห์ พบเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ทั้งหมดมีลักษณะของโคโลนีกลม นูน ขนาดเล็ก ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีความมันวาว ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อตรวจสอบต่อด้วยการย้อมสีเพื่อดูกลุ่มแกรมของแบคทีเรีย และการมีเอนไซม์คะตะเลสหรือไม่ สามารถคัดเลือกได้เพียง 8 ไอโซเลต ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อนำมาทดสอบการสร้างแก๊ส การหมักแลคโตส และการย่อยเคซีน มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถย่อยเคซีนได้ ดังนั้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มาทดสอบการหมักเพื่อดูลักษณะเคิร์ด สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 2 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส Mbmf np 3 และ Bml2 เมื่อนำไปจัดจำแนกในระดับสปีชี่ส์โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี รหัส Mbmf np 3 ไม่สามารถจัดจำแนกได้ ส่วน Bml2 ผลการจัดจำแนกออกมาเป็น *Lactobacillus rhamnosus*

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักโยเกิร์ต โดยใช้น้ำนมกระบือเป็นวัตถุดิบของเชื้อทั้ง 2 ชนิด พบว่าอุณหภูมิในการหมักที่ 41 องศาเซลเซียส ให้ลักษณะปรากฏของโยเกิร์ตที่ดี

3. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ 2 ชนิด พบว่าผู้ชิมให้การยอมรับลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และเนื้อสัมผัส ความชอบโดยรวมของโยเกิร์ตที่หมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* มากกว่าเชื้อ Unknown (Mbmf np3)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ควรดำเนินการจัดจำแนกเพิ่มเติมโดยวิธีทางชีวโมเลกุลคือการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส (16s rDNA Identification by DNA sequencing) ซึ่งให้ผลที่ละเอียดกว่าการจำแนกโดยชุดทดสอบ API 50 CHL โดยขั้นตอนนี้จำต้องมีการจำแนกสายพันธุ์ให้ชัดเจน ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ให้แก่ผู้บริโภคต่อไป เนื่องจากเชื้อ Unknown (Mbmf np3) ยังไม่ทราบผลที่แน่ชัดว่าเป็นเชื้อสกุลอะไร แต่ผลในการทดลองนำเชื้อมาผลิตโยเกิร์ตพบว่าเชื้อรหัส Unknown (Mbmf np3) นี้มีผลในการหมักเป็นโยเกิร์ตในทิศทางที่ดี

2. ควรศึกษาต่อในเรื่องการนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ที่แยกได้จากน้ำนมกระบือมาหมักโยเกิร์ตน้ำนมกระบือ โดยเปรียบเทียบกับโยเกิร์ตน้ำนมกระบือที่หมักโดยใช้เชื้อทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2556. **มาตรฐานโยเกิร์ตเรื่อง นมเปรี้ยว**. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เล่มที่ 130 น. 79

กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์. 2553ก. **การเลี้ยงกระบือ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http:// www.dld.go.th/service/buffalo/buffalo0.html.

กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์. 2553ข. **การเลี้ยงกระบือ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http:// www.dld.go.th/Public/buff01.html

ขจร เจริญศิริ และ ฉัตรชัย ศรไชย. 2536. การจำแนกแบคทีเรีย. **แบคทีเรียพื้นฐาน**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศิริยอด.

จารุวรรณมณีศรี. 2551. จุลินทรีย์กับการหมัก. **เทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โปรเพช.

จุฑาทิพย์ บุญเกิด. 2549. “การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกจากน้ำนมข้าวเพื่อผลิตโยเกิร์ต.” หน้า 480-488. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44.** กรุงเทพฯ : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จินตนา ต๊ะย่วน. 2553. “รายงานวิจัยการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์และการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแล็กติก.” มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ.

จิราพัชรกงภูธร และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2548. “**การพัฒนาโยเกิร์ตน้ำนมถั่วเหลืองโดยแบคทีเรียกรดแลกติก**.” หน้า 411-418. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43.** คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชลดา ศิริเสตสุวรรณ. 2551. การผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นภา โล่ห์ทอง. 2534. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ: ฟันนี่ พลับริชชิ่ง.

น้อมจิตต์ แก้วไทย. 2542. การคัดเลือกและจำแนกแบคเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อโยเกิร์ต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

ปทุมพร ฉิมเอนก และคณะ. 2551. **คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กระทง**. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550 ก. การผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตร. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550ข. ประเภทของผลิตผลทางการเกษตร. **วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลทางการเกษตร**. งานตำราและเอกสารการพิมพ์. คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2550ค. ผลิตผลทางการเกษตรจากสัตว์และประมง. **วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลทางการเกษตร**. งานตำราและเอกสารการพิมพ์ คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 254น.

ตรี วาทกิจ. มปป. จุลชีววิทยาทั่วไป. **เอกสารประกอบการสอนวิชา จุลชีววิทยา**. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยนครพนม.

ทิพวรรณ คล้ายบ้านใหม่. 2549. การศึกษาแบคทีเรีย. **เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาทั่วไป**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยวิทยาเขตนครศรีธรรมราช.

ธวัชชัย ดุลยสุจริต. 2553. **ท่องโลกโยเกิร์ต อาหารเพื่อสุขภาพ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://update.seed.com/ebook/issue-278/web-278.pdf.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2013. **การหมัก (fermentation).** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0316/fermentation-การหมัก.

พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์. 2553. **ผลงานวิจัยเรื่องการประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเพื่อการบำบัดน้ำเสียและการนำสารที่มีประโยชน์กลับคืน**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.prcmu.cmu. ac.th/perin_detail.php?perin_id=187.

มาลิน จุลศิริ และอุษณีย์ วงศ์ทองศรี. 2536. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้. **แบคทีเรียพื้นฐาน**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศิริยอด.

รังสินี โสธรวิทย์. 2550. หลักการทางเคมีและจุลวิทยาของอาหาร. **เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัญจวน เฮงตระกูล. 2554. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.murrahfarm.com/th/what-murrah.html

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2538. การตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นของนมดิบ. **ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม**. กรุงเทพฯ: สหมิตรออฟเซท.

วิวัฒน์ ชวนะนิกุล. 2531. ความรู้ปัจจุบันเรื่องกระบือ. **กระบือ**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547. **การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกทนร้อนที่ผลิตสารไบโอเจนิกเอมีนจากอาหารหมักไทย**. กรุงเทพ ฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร วงเรือง, กนกวรรณ ปวงคำ, จิณภัทร ใจคำ, กิตติพร เปล่งเสริมทรัพย์, หัทยา อรุโณทยานันท์ และศรวิษฐ์ อินทะพันธุ์. 2554. **บทบาทของจุลินทรีย์ในอาหาร**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://202.28.24.44/e_books/602122/Elearning%20PDF/Sasithon3.pdf.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุวรรณา กิจภากรณ์. 2525. **ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม**. กรุงเทพฯ : คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพโรจน์ วิริยาจารี. 2545. การประเมินทางประสาทสัมผัส. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศุภวัฒน์ คุณานุวัฒน์. 2552. **มาทำความรู้จักกับควายนม.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http:// kroobannok.com/blog/22003.

ศูนย์อนุรักษ์เพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. 2551. **อุตสาหกรรมนม**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://fic1.nfi.or.th:81/th/thaifood/product52-dairy.asp.

อานัฐ ตันโช. 2551. **แนวคิด หลักการ เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย เกษตรธรรมชาติประยุกต์.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.maejonaturalfarming.org.

อัจฉราพร เกิดกุล และคณะ. 2554. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติคเพื่อการผลิตแคปซูล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

อัญชลินทร์ สิงห์คำและจีรชัย กาญจนพฤฒิพงศ์. 2551. การคัดเลือกและจำแนกแบคเรียกรดแลคติกจากน้ำนมดิบของแพะในเขตภาคกลางของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

อุทัย เก้าเอี้ยน. 2549. **“โปรไบโอทิคส์.” สงขลานครินทร์เวชสาร.** 24(4) : 316.

AOAC. 2000. Official Methods of Analytical. 17th ed AOAC International, Gaithersburg. MD.

Ao X, Zhang X, Zhang X, Shi L, Zhao K, Yu J, Dong L, Cao Y, and Cai Y. 2012. “Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products.” **Journal of Dairy Science.** 95(3) : 1073-1084.

Aportela-Palacios, A., Sosa-Morales, M.E., and Velez-Ruiz, J.F. 2005. “Rheological and Physiochemical Behavior of Fortified Yogurt with Fiber and Calcium.” **Journal of Texture Studies.** 36 : 333-349.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria. Classification and physiology, pp. 1-72. In Salminen S, and Von Wright A, (editors). **Lactic acid bacteria :** Microbiology and Functional Aspect. 2nd ed. New York : Marcel Dekker.

Dairygoodness. มปป. **Yogurt.** [online]. Available : http://www.dairygoodness.ca/ **yogurt**.

Dairygoodness. มปป. **Cheese.** [online]. Available : http://www.dairygoodness.ca/cheese.

Donohue DC, Salminen S, and Marteau P. Safety of probiotic bacteria. 1998. p. 369 - 383. In : Salminen S, and Von Wright A, (editors). **Lactic acid bacteria : Microbiology and functional aspects**. New York: Marcel Dekker.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Farnworth, ER. 2001. **Probiotics and Prebiotics**, In Handbook of Nutraceuticalsand Functional Foods. Wildman, REC, Ed., CRCPress, USA.

Good Health. 2549. โยเกิตร์. [online]. Available: http://goodhealth.co.th/new_page_68.htm.

Jelen,P., Lutz, S. 1998. **Functional Milk and Dairy Products**. In Functional Foods, Biochemical&Processing Aspects.Massa, G,Ed., Technomic Publishing Co., Inc,USA.

Larsen AG, Vogensen FK, and Josephsen J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs:purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produce by lactobacillus bavaricus MI 401. J. Appl. Bacteriol. 75 : 113

Michael Reeps. 2011. How to Make Yogurt. [online]. Available : http://www.makeyourownyogurt.com/.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 39: 13-126.

Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. 2006. **Dairy Science and Technology**. CRC Press Boca Raton, FL, USA, pp. 497–512

Wen Yi Zhang. 2008. "Isolation and identification of dominant microorganisms involved in naturally fermented goat milk in Haixi region of Qinghai, China." [Online]. Available : http://link.springer.com/article/10.1007/BF03175319.

Whittenbury, R. 1964. "Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria." **Journal of General Microbiology**. 35 : 13 - 26.

Yantyati Widyastuti, Rohmatussolihat , Andi Febrisiantosa. "The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation." [Online]. Available : http://www.scirp.org/journal/PaperInformation. aspx?PaperID=42817 #.VYOeG1JP-9Z.

Yumoto, Isao, and Koji Ikeda. 1995. "Direct fermentation of starch to L - (+) latic acid using Lactobacillus amylophilus." **Biotechnol Lett** 17(5) : 543-546.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
ภาคผนวก ข วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ และการย้อมสีแกรม
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์ของโยเกิร์ต
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Lactobacillus MRS Agar (MRS) ต่อส่วนผสม 1,000 มิลลิลิตร

1. Proteose peptone	10	กรัม
2. Beef Extract	10	กรัม
3. Yeast Extract	5	กรัม
4. Dextrose	20	กรัม
5. Polysorbate 80	1	มิลลิลิตร
6. Ammouium citrate	2	กรัม
7. Sodium acetate	5	กรัม
8. Magnesium sulphate	0.1	กรัม
9. Manganese sulphate	0.05	กรัม
10. Dipotassium phosphate	2	กรัม
11. Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. GYP-Medium

1. Glucose	20	กรัม
2. Yeast Extract	5	กรัม
3. Peptone	10	กรัม
4. Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Plate Count Agar (PCA)

1. Casein Peptone	5	กรัม
2. Glucose	1	กรัม
3. Yeast Extract	2.5	กรัม
4. Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Nutrient Broth

1. Lactobacillus MRS	8.0	กรัม
2. น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Whey-Permeate medium

1. Skim milk	15	กรัม
2. Glucose	5	กรัม
3. Casitone	1	กรัม
4. Sodium caseinate	5	กรัม
5. Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสม และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาน

สารเคมี

1. สารละลายกรดทาร์ทาริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ละลายกรดทาร์ทาริกเข้มข้น 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการกรอง

2. สารละลายไอโอดีน

ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5.0 กรัม และไอโอดีน 6.6 กรัม ในน้ำกลั่นโดยปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับน้ำปริมาณเท่าๆกัน ใส่ขวดทิ้งไว้ประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้ส่วนมี่ไม่ละลายตกตะกอน จากนั้นใช้ส่วนใสมาเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ Stock Solution ประมาณ 8 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานโปแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potossium hydrogen phthalate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายฟีนอฟธาลีน

ละลายฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทีละหยดจนหยดแรกให้สีชมพูเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

5. สารละลายไกลซีน

ละลายไกลซีน (glycine) 3.75กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ และการย้อมสีแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

1. Spread plate technique

นำน้ำนมกระบือมาบ่มในอุณหภูมิที่ 41 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนเกิดเคิร์ด จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลตร เติมลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันใช้ ปิเปตดูดตัวอย่างของค่าเจือจางที่เหมาะสม (Dilution) เช่น 10^{-1} 10^{-3} 10^{-5} อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่เทอาหารแข็งไว้ก่อนหน้า แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้สักครู่ให้เย็น ทำการสเปรดโดยเกลี่ยตัวอย่างให้แผ่กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงแข็ง ซึ่งทำได้โดยใช้มือหนึ่งช่วยหมุนจานโดยแตะแท่งแก้วไว้บนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมทั้งผลักจานหมุนไปรอบๆ ระวังอย่าให้วุ้นแตก หลังจากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เพื่อให้สารละลายตัวอย่างแห้งและซึมเข้าในวุ้นให้หมด เพื่อป้องกันการปนเปื้อน บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งทั้งหมด

2. Streak - Plate technique

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 โดยเลือกโคโลนีที่เกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และมีบริเวณใสรอบโคโลนี มาเขี่ยบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยวแล้วทำซ้ำอีกครั้ง และนำเชื้อที่ได้มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยวิธี Streak-Plate ทำได้โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แล้วลากหรือขีดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4 - 5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรก ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีอยู่หนาแน่น จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลาก เป็นระนาบที่สอง 4 - 5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบวิธีนี้เรียกว่า cross streak plate

3. การย้อมสีแกรม

เตรียมแผ่นสไลด์ล้างให้สะอาด รอจนแห้ง แล้วหยดน้ำกลั่นประมาณ 1 หยด จากนั้นคัดเลือกเชื้อจากข้อ 2 โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อเล็กน้อย แตะลงบนแผ่นสไลด์ทำการสเมียร์ และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน นำไปหยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทำการย้อมทับด้วยการหยดสี safranin o ให้ท่วมรอสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที ชะล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% จนสีย้อมออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง รอจนแห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์ของโยเกิร์ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก (AOAC, 2000)

เตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างลงในฟลาสปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน (phenolphthalein indicator) 2 - 3 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หยดสารละลายลงฟลาสตัวอย่างที่เจือจางไว้อย่างช้า ๆ พร้อมแกว่งเบา ๆ ไปในทิศทางเดียวกัน จนกระทั่งถึงจุดยุติหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดแลคติกโดยสมการ

สูตรการคำนวณปริมาณกรด (ร้อยละ)

$$\text{ปริมาณกรดแลคติก} = \frac{(N \times V1 \times 90 \times 100)}{1{,}000 \times V2}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)
V1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต (มิลลิลิตร)
V2 = ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร/กรัม)

2. การวิเคราะห์ค่าพีเอช (AOAC, 2000)

เปิดเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้สัญญาณเสถียร จากนั้นปรับเทียบค่าพีเอชโดยจุ่มอิเลคโทรด (pH electrode) ลงในบัฟเฟอร์ตัวที่ 1 (pH7) รอจนกระทั่งหน้าจอปรากฏข้อความ “change bufferbuffer 2” ทำความสะอาดอิเลคโทรดด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ เปลี่ยนใส่ buffer ตัวที่ 2 (pH 4.01) เมื่อหน้าจอทำการอ่านค่าเป็นอันพร้อมใช้งาน จากนั้นทำการวัดค่าพีเอชโดยเตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตน้ำนมโค และน้ำนมกระบือใส่ลงในบีเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำอิเลคโทรดจุ่มลงตัวอย่าง รอจนกว่าค่าพีเอชไม่เปลี่ยนแปลงจึงอ่านผลที่ได้ จดบันทึกผล

3. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (AOAC, 2000)

นำเครื่อง Hand refractometer หยดน้ำกลั่นเพื่อปรับมาตรฐานของเครื่อง (calibration) ค่าที่อ่านให้เท่ากับ 0 (ปรับมาตรฐานก่อนการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดทุกครั้ง) ใช้กระดาษทิชชู่ซับน้ำกลั่น จากนั้นนำตัวอย่างโยเกิร์ตน้ำนมโค และน้ำนมกระบือหมักมาวัดค่า ซึ่งเครื่องมือจะมีสเกลวัดค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0 – 32 องศาบริกซ์ จดบันทึกค่าที่อ่านได้ในหน่วยขององศาบริกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

1. ตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยง MRS (ภาคผนวก ก ข้อ 1)

1.2 วิธีวิเคราะห์ เตรียมตัวอย่างโยเกิร์ตน้ำนมโคและน้ำนมกระบือปริมาณ 1 มิลลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) เริ่มต้นความเจือจาง 10-1 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ใส่ต่อลงไปในทดลองใหม่ที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ทำต่อไปจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งเลือกใช้เฉพาะความเจือจางที่ 10-1 10-3 และ 10-5 จากนั้นนำปิเปตดูดสารละลายโยเกิร์ตที่เตรียมไว้ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ MRS Agar ทำการ spread plate เกลี่ยตัวอย่างให้แผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้วุ้นแตก บ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น (มีหน่วยเป็นโคโลนี/มิลลิลิตร) โดยจำนวนจุลินทรีย์ต่อจานที่เหมาะสมในช่วง 25-300 โคโลนี จดบันทึกผลแล้วนำไปคำนวณ

1.3 การคำนวณ

จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor (โคโลนีต่อกรัม)

2. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

2.2 วิธีวิเคราะห์ เตรียมความเจือจางโดยใช้วิธีวิเคราะเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เตรียมไว้ ใส่ลงในจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง PCA การ spread plate เกลี่ยตัวอย่างให้แผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยง เชื้อระวังอย่าให้วุ้นแตก บ่มอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-300 โคโลนี จดบันทึกผลแล้วนำไปคำนวณ ใช้วิธีการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วว.

คำขอบริการที่ I 66/56 ที่ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์
ให้แก่
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การทดสอบ / วิเคราะห์ จัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย

วิธีทดสอบ / วิเคราะห์ ระบบจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี (เอพีไอ)

ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ 37 °C ความชื้นสัมพัทธ์ - %

วันที่ทดสอบ / วิเคราะห์ 18 มีนาคม 2556

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

ผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรีย:

Mbmf Np 3*: Unidentification

Bml 2*: *Lactobacillus rhamnosus* 99.4% Identification

(รายละเอียดดังตารางแนบ)

หมายเหตุ: * ตัวอย่างเป็นเชื้อสด

ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์
นางสาวพิราวรรณ ศรีศิลป์

ผู้ตรวจสอบ (2)
(นางสาว[illegible] วรรณิสสร)

ผู้ตรวจสอบ (1)
(นางสาวฉัตรฤดี สุวรรณชาติ)

ผู้รับรอง
วว
(นางฉันทรา พูนศิริ)
ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
วันที่ 4 เมษายน 2556

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำขอบริการที่ I 66/56

วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. Characteristics of the bacterial strain Mbmf Np 3: Unidentification

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from:	
Glycerol	-
Erythritol	-
D-arabinose	+
L-arabinose	-
D-ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-
D-galactose	+
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	+
Dulcitol	+
Inositol	-
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-α-D-mannopyranoside	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	-
N-acetylglucosamine	+
Amygdaline	+
Arbutine	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
\+ = Positive reaction
\- = Negative reaction

วว.

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำขอบริการที่ I 66/56

วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 1. Characteristics of the bacterial strain Mbmf Np 3: Unidentification

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from: (continued)	
Esculine ferric citrate	+
Salicine	+
D-cellobiose	+
D-maltose	-
D-lactose (bovine origin)	+
D-melibiose	-
D-saccharose (sucrose)	-
D-trehalose	+
Inuline	-
D-melezitose	+
D-raffinose	-
Amidon (starch)	-
Glycogene	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	+
D-fucose	-
L-fucose	+
D-arabitol	-
L-arabitol	+
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
\+ = Positive reaction
\- = Negative reaction

วว.

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำขอบริการที่ I 66/56

วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. Characteristics of the bacterial strain Bml 2: *Lactobacillus rhamnosus*

99.4% Identification

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
Fermentative production of acid from:	
Glycerol	-
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	-
D-ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-
D-galactose	+
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	+
Dulcitol	+
Inositol	-
D-mannitol	+
D-sorbitol	+
Methyl-α-D-mannopyranoside	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	+
N-acetylglucosamine	+
Amygdaline	+
Arbutine	+

Remark : + ve = Gram positive bacteria
\+ = Positive reaction
\- = Negative reaction

วว.

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำขอบริการที่ I 61/56

วว.

รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์

Table 2. Characteristics of the bacterial strain Bml 2: *Lactobacillus rhamnosus*

99.4% Identification

Characteristics	Reaction
Fermentative production of acid from: (continued)	
Esculine ferric citrate	+
Salicine	+
D-cellobiose	+
D-maltose	-
D-lactose (bovine origin)	+
D-melibiose	-
D-saccharose (sucrose)	-
D-trehalose	+
Inuline	-
D-melezitose	+
D-raffinose	-
Amidon (starch)	-
Glycogene	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	+
D-lyxose	-
D-tagatose	+
D-fucose	-
L-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

Remark : + ve = Gram positive bacteria
\+ = Positive reaction
\- = Negative reaction

วว.

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองผลเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย
การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่าการ วว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวคุณัชญ์สุภชา กลับคง
วัน เดือน ปีเกิด	15 พฤษภาคม 2530 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช
ที่อยู่	61 ค่ายเสนาณรงค์ ซ.หลังเขา ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112 โทร 086-694-8878
ประวัติการศึกษา	2551 ครุศาสตร์บัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร (เกียรตินิยมอันดับ2) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ความชำนาญเฉพาะด้าน	ออกแบบสื่อสิ่งพิมพ์, วาดรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้