สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี 12 จากถั่วเหลือง

นางสาว พนารัตน์ อรุณรัติยากร
นางสาว ธนิตา รุ่งสรรเสริฐ

ปพ.
พ194ก
2538

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

b1522302

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF DRINKING YOGHURT FROM SOY BEAN WITH INCREASED VITAMIN B_{12}

PANARAT ARUNRATTIYAKORN

THANITA ROONGSANSERT

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut s Institute of technology Ladkrabang

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	**การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี 12 จากถั่วเหลือง**
โดย	**นางสาวพนารัตน์ อรุณรัติยากร**
	นางสาวธนิตา รุ่งสรรเสริฐ
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**รศ.ดร. บุษบา ยงสมิทธ์**
	อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ การศึกษา ตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต

---------- **หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์**

(ดร. อุนเรือน ศิริวานิชกุล)

---------- **ประธานกรรมการ**

(อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี)

---------- **กรรมการ**

(อาจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล)

---------- **กรรมการ**

(อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี 12 จากนมถั่วเหลือง
นักศึกษา	นางสาวพนารัตน์ อรุณรัติยากร นางสาวธนิตา รุ่งสรรเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. บุษบา ยงสมิทธ์ อาจารย์สมชาย ไกรรักษ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2538

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาวิธีเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง พบว่า การนำถั่วเหลืองแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาแปรรูปเป็นน้ำนมถั่วเหลือง จะได้ลักษณะที่ดี มีสีขาวนาลและกลิ่นถั่วเหลืองลดลง ซึ่งเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคยอมรับ จากนั้นจึงนำน้ำนมถั่วเหลืองดังกล่าวมาแปรรูปเป็นนมเปรี้ยวถั่วเหลือง โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง ***Bacillus sp.*** No 4 และ ***Propionibacterium shermanii.*** เพื่อให้ได้นมเปรี้ยว ที่มีปริมาณโปรตีนละลายน้ำและปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น รวมทั้งเปรียบเทียบ ระหว่างนมถั่วเหลืองที่ผ่านการกรองเอา กากออก และไม่ผ่านการกรองเอากากออก พบว่า การใช้อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** No 4 ต่อ ***Propionibacterium shermanii.*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ในน้ำนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการกรองเอากากออก จะให้นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนละลายน้ำสูง มีกลิ่นรสที่ดี และมีปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Production of drinking yoghurt from soy bean with increased vitamin B_{12}

Name Panarat Arunrattiyakorn

Thanita Roongsansert

Special Project Adivisor Dr. Budsaba Yongsmith

MR. Somchai Karirak

Department Applied Biology

Acadamic Year 1995

Abstract

The studies on soy bean milk preparation was found that soy bean seed were steeped in distilled water for 6 hour at 60 °C ,which gave good color and texture of soy bean milk whereas the soy bean smell was reduced. The soy besn milk which preparing from this method was use as a raw material for soy bean yoghurt production that was fermented by mixed culture of ***Bacillus sp.*** No. 4 and ***Propionibacterium shermanii.***

This processes would be enhance soluble protein and increase vitamin B_{12} . Filtrated and unfiltrated soy bean milk was also studied and found the ***Bacillus sp***. No. 4 and ***Propionibacterium shermanii***. ratio at 1:1 in 1 % and used unfiltrated soy bean milk gave high soluble protein and vitamin B_{12} and good smell of soy bean yoghurt.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ซึ่งสำเร็จลงได้ต้องขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้จัดทำเป็นอย่างสูงที่ได้ให้กำลังใจตลอดการทำงาน และต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร.บุษบา ยงสมิทธ์ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์นิสา บุตรดา จากมหาวิทยาลัยบูรพา อาจารย์สมชาย ไกรรักษ์ และอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำงานในครั้งนี้และช่วยตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงเจ้าหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์ในการทำงาน สุดท้ายขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ช่วยเหลือในการทำงานและให้กำลังใจมาตลอด

ผู้จัดทำ

พฤษภาคม 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง	2
2. ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายเมื่อเทียบกับไข่ นม ข้าว	3
3. ส่วนประกอบของน้ำนมถั่วเหลืองเปรียบเทียบกันน้ำนมวัว	4
4. เปรียบเทียบองค์ประกอบกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	4
5. ระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipoxygenase ในพืชต่างๆ	11
6. สารที่ก่อให้เกิดกลิ่นถั่วและกลิ่นเหม็นเขียวในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	12
7. กระบวนการต่างๆ สำหรับการผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์	25
8. วิตามินบี 12 และสารคล้ายวิตามินบี 12 บางตัวที่พบในธรรมชาติ	29
9. คุณสมบัติของวิตามินบี 12 และสารคล้ายวิตามินบี 12	31
10. แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่ไม่กรอง เอากากถั่วออกเพื่อหาอัตราส่วนเชื้อเริ่มต้น	44
11. แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่ไม่กรอง เอากากถั่วออกเพื่อหาเปอร์เซนต์เชื้อเริ่มต้น	45
12. แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่กรอง เอากากถั่วออกเพื่อหาอัตราส่วนเชื้อเริ่มต้น	46
13. แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่กรอง เอากากถั่วออกเพื่อหาเปอร์เซนต์เชื้อเริ่มต้น	47
14. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเริ่มต้น(อัตราส่วน1:1)กับ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออก	48
15. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเริ่มต้น(อัตราส่วน1:1)กับ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออก	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อเริ่มต้น(อัตราส่วน3:4)กับ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออก 49
17. ปริมาณกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย 49
18. ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย 50
19. ปริมาณของแข็งทั้งหมดของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย 50
20. ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย 50
21. ปริมาณวิตามินบี 12 ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	การเปลี่ยนแปลงการละลายตัวของไนโตรเจนของแป้งถั่วเหลืองผ่านความร้อน	6
2.	สูตรโครงสร้างของน้ำตาล stachyose	14
3.	ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ในนมถั่วเหลืองก่อนทำการหมักด้วยเชื้อ	16
4.	การเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย *Lactobacillus cellobiosis.*	17
5.	การวิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Lactobacillus cellobiosis.* ด้วยวิธี gas chromatography	17
6.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแมนนิทอลในนมถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Lactobacillus cellobiosis.*	17
7.	การเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย *Lactobacillus plantarum.*	18
8.	การเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย *Lactobacillus fermenti.*	18
9.	การเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย *Lactobacillus fermenti.* และ *Streptococcus thermophilus.*	19
10.	โครงสร้างทั่วๆ ไปของวิตามินบี 12	28
11.	Pathway ทั่วๆ ไปของการสังเคราะห์วิตามินบี 12	32
12.	กราฟมาตราฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้	63
13.	กราฟมาตราฐานของปริมาณวิตามินบี 12	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
- ถั่วเหลืองและส่วนประกอบของถั่วเหลือง	2
- โปรตีนในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	5
- คุณสมบัติของเชื้อ ***Bacillus subtilis***	8
- การผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองให้ปราศจากกลิ่นถั่ว	13
- ปัญหาหลังการบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง	13
- วิตามินบี 12	20
- หน้าที่และความสำคัญของวิตามินบี 12	21
- ลักษณะรูปร่างของเชื้อ ***Propionibacterium shermanii.***	22
- สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ ***Propionibacterium shermanii.***	23
- การสังเคราะห์และชนิดของวิตามินบี 12 ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย	26
- การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์	33
- โยเกิต	35
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน อุปกรณ์ และวิธีการ	38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารย์	43
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	52
ภาคผนวก	56
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษากรรมวิธีการผลิตนมถั่วเหลืองให้มีกลิ่นถั่วและกลิ่นเหม็นขียวน้อยที่สุด
2. เพื่อปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์โยเกิตจากนมถั่วเหลืองให้มีคุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้น
3. ศึกษาการใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ ***Bacillus sp.*** กับเชื้อ ***Propionibacterium shermanii.*** ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ในการหมักนมถั่วเหลือง เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนและวิตามินบี 12 ในนมถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

เป็นการนำนมถั่วเหลืองมาผลิตเป็นโยเกิตโดยให้มีคุณค่าทางอาหารมากขึ้นและมีกลิ่นรสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการใช้โปรตีนจากพืชทดแทนโปรตีนจากสัตว์
2. ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีคุณค่าทางอาหารและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค
3. เป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงมาก และมีศักยภาพเพียงพอสำหรับนำมาทดแทนแหล่งโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ไข่ และนม ซึ่งมีราคาแพงและมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยก็มีปริมาณสูง มีการนำถั่วเหลืองไปแปรรูปเป็นอาหารมากมาย ตัวอย่างเช่น เต้าหู้ นมถั่วเหลือง ทางการหมักก็มีเต้าเจี้ยว เทมเป้ เป็นต้น จึงมีความคิดที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชที่มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงซึ่งได้แก่ถั่วเหลืองนี้ ให้เป็นอาหารที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและมีคุณค่าทางอาหาร

ปัจจุบันการผลิตโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยทั่วไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลิ่นถั่วและกลิ่นเหม็นเขียว นอกจากนี้ร่างกายของคนเราขาดเอนไซม์ในการย่อยน้ำตาลบางชนิดในถั่วเหลือง ทำให้เกิดอาการท้องอืดหลังจากบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

จากการทดลองนี้จะทำการหาวิธีการต่างๆ เพื่อลดกลิ่นเหม็นเขียวและกลิ่นถั่วลง นอกจากนี้ยังใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง และใช้จุลินทรีย์ในการเพิ่มปริมาณวิตามินบี 12 เนื่องจากว่าเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อร่างกายและต่างจากวิตามินบีคอมแพลกซ์ชนิดอื่นๆ ตรงที่วิตามินบี 12 มีอยู่ในอาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ และพบอยู่ในพืชในปริมาณที่น้อยมาก นอกจากนี้การผลิตให้เป็นนมเปรี้ยวพร้อมดื่มสามารถช่วยผู้บริโภคในเรื่องระบบขับถ่าย และแลคติกแอซิกแบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้น้ำตาลชนิดที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้จึงเป็นการลดปัญหาหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ถั่วเหลือง (soy bean หรือ soya bean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max (L) Merril* นอกจากจะเป็นพืชเศรษฐกิจแล้วก็ยังเป็นพืชอาหารที่สำคัญยิ่ง ทั้งนี้ เนื่องจากเป็นแหล่งสำคัญที่ให้สารอาหารโปรตีน แคลอรี่และสารต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ	ค่าเฉลี่ยต่อถั่วเหลือง 100 กรัม	
Moisture	7	g
Protein	35-45	g
Oil	18-22	g
Carbohydrate	12-14	g
Crude fiber	3.7-5.0	g
Ash	4.6-5.4	g
Calcium	250	mg
Phosphorus	700	mg
Iron	7	mg
Potassium	1553	mg
Sodium	319	mg
Nicotinaic acid	2.1	mg
Thiamine	1000	mcg
Riboflavin	310	mcg
Pyridoxin	1180	mg
Biotin	80	mg
Pantothenic acid	2150	mg
Carotine	18-243	mcg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ต่อ

ส่วนประกอบ	ค่าเฉลี่ยต่อถั่วเหลือง 100 กรัม
Vitamin E	**140 mg**
Vitamin K	**100 mg**

ที่มา : Winarno และคณะ (1976)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนของไข่ นม และข้าว

ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น	ไข่	นม	ถั่วเหลือง	ข้าว
	(หน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ กรัมโปรตีน)			
Isoleucine	**415**	**407**	**340**	**322**
Leucine	**553**	**603**	**480**	**535**
Lysine	**403**	**496**	**400**	**236**
Phenylalanine	**365**	**311**	**310**	**307**
Tyrosine	**262**	**323**	**200**	**269**
Methionine	**197**	**154**	**80**	**142**
Cystine	**149**	**57**	**110**	**80**
Threonine	**317**	**292**	**250**	**241**
Tryptophan	**100**	**90**	**90**	**65**
Valine	**454**	**440**	**330**	**415**

ที่มา : Lie และคณะ (1974)

ด้วยเหตุที่ถั่วเหลืองมีคุณค่าทางอาหารสูง และมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาทดแทนแหล่งโปรตีนจากเนื้อสัตว์ จึงมีผู้คิดนำถั่วเหลืองมาแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่างๆ นมถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากถั่วเหลืองที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำนม ถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับน้ำนมวัวใน 100 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงส่วนประกอบของนมถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับนมวัว 100 กรัม

ส่วนประกอบ	นมถั่วเหลือง		นมวัว	
น้ำ	92.5	g	87.0	g
โปรตีน	3.4	g	3.5	g
ไขมัน	1.5	g	3.9	g
คาร์บอไฮเดรต	2.1	g	4.9	g
เถ้า	0.5	g	0.7	g
แคลเซียม	21.0	mg	118.0	mg
ฟอสฟอรัส	74.0	mg	93.0	mg
เหล็ก	0.7	mg	0.1	mg
thiamine	0.09	mg	0.04	mg
riboflavin	0.04	mg	0.17	mg
niacin	0.80	mg	1.0	mg

ที่มา : ชุมแสง (2537)

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดอะมิโนของนมถั่วเหลือง นมวัว นมมารดา (ร้อยละ)

กรดอะมิโน	นมถั่วเหลือง	นมวัว	นมมารดา
Isoleucine	4.7	7.5	5.5
Leucine	8.1	11.0	9.1
Lysine	6.4	8.7	6.6
Sulfur amino acid	2.1	4.2	4.0
Aromatic amino acid	9.0	11.5	9.5
Threonine	3.9	4.7	4.5
Tryptophan	1.1	1.5	1.6
Valine	5.0	7.0	6.2

ที่มา : Smith และ Circle (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งที่มีปริมาณโปรตีนสูงมากและมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ทดแทนแหล่งโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ไข่ และนม โดยเราพบว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ โปรตีนในน้ำนม 100 กรัม พบว่าในน้ำ นมวัวมีปริมาณโปรตีนอยู่ 3.5 กรัม ส่วนน้ำนมถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีน 3.4 กรัม (บุญจันทร์ , 2530)

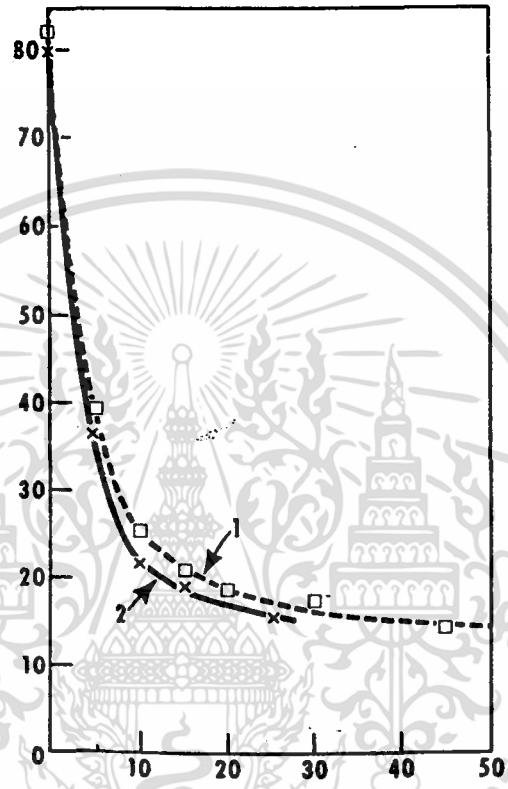
โปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกสะสมอยู่ในเซลล์ของเนื้อถั่วเหลือง โดยสะสมกันเป็น protein bodies หรือ storage protein ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 2-20 ไมครอน แต่ส่วนใหญ่มีขนาด 5-8 ไมครอนและมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงของ 200,000-600,000 ในสภาวะธรรมชาติโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่เหล่านี้ ยังสามารถจับตัวกันเป็นโมเลกุล ขนาดใหญ่ได้ด้วยการเชื่อมกันของ disulfide linkage polymer และโปรตีนที่แยกมาได้เพื่อทำเป็น ผลิตภัณฑ์นั้น จะเป็นชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนสภาพ โดยการเกิดปฏิกิริยาที่ซับซ้อนรวมกันอยู่ โดยที่อย่างน้อย 7 ชนิดของโปรตีนจะจับกันเป็น subunit ซึ่งอาจถูกทำให้โมเลกุลเปลี่ยนขนาด ไปโดยสภาวะต่าง ๆ

โปรตีนในถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นโปรตีนประเภท globulin ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นชัดอันหนึ่งคือ จะไม่ละลายน้ำในสภาวะที่ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงที่เรียกว่า isoelectric point ซึ่งเป็นจุดที่มีค่าความเป็น กรด-ด่าง ประมาณ 4.2-4.6 แต่ยังละลายได้ในกรณีที่เติมเกลือ ของโซเดียมหรือแคลเซียมคลอไรด์ลงไป ถ้าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าจุด isoelectric point globulin ก็ยังสามารถละลายได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลืออยู่ และจากการทดลองโดยใช้โปรตีน ถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วนำมาละลายน้ำที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 พบว่า 85 เปอร์เซนต์ของส่วนประกอบที่เป็นไนโตรเจนซึ่งส่วนใหญ่เป็นโปรตีน จะละลายได้และเมื่อ ใส่ด่างลงไปจะพบว่าค่าของการละลายจะเพิ่มขึ้นอีก 5-10 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าใส่กรดลงไป ค่าการละลายจะลดลงทันที และค่าการละลายมีค่าต่ำสุดที่ความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.2-4.6 ซึ่งเป็นช่วงของ isoelectric point และโปรตีนที่ไม่ละลายที่จุดนี้ เมื่อเพิ่มปริมาณกรด ลงไปอีกจนเลยจุด isoelectric pH จะพบว่าโปรตีนกลับมาละลายได้อีก โปรตีน globulin สามารถเปลี่ยนคุณสมบัติการไม่ละลายน้ำที่จุด isoelectric point ได้โดยใช้เอนไซม์เปปซิน ซึ่งเอนไซม์นี้จะต้องมีขนาดของโมเลกุลเล็ก ซึ่งในการทำเป็น modified globulin ก็จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในอาหารที่มีกรดร่วมอยู่ด้วย

ในการนำถั่วเหลืองไปเป็นอาหาร จำเป็นจะต้องนำไปผ่านขั้นตอนของความร้อนต่าง ๆ ซึ่งมีผลทำให้สภาพของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และทำให้เกิดลักษณะต่าง ๆ เช่น การไม่สลายตัวของโปรตีนในน้ำ หรือ ในสารละลายเกลือ เป็นต้น โปรตีนจะมีการละลายได้ในน้ำลดลงอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว จากการที่ถูกความร้อนโดยลดลงจากร้อยละ 80 เหลือเพียงร้อยละ 20-25 ในการให้ ความร้อนเพียง 10 นาที ซึ่งแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงการละลายตัวของไนโตรเจนของแป้งถั่วเหลืองหลังผ่านความร้อน เส้นที่ 1 เป็นแบบแยกไขมันออก เส้นที่ 2 เป็นแบบไม่แยกไขมันออก

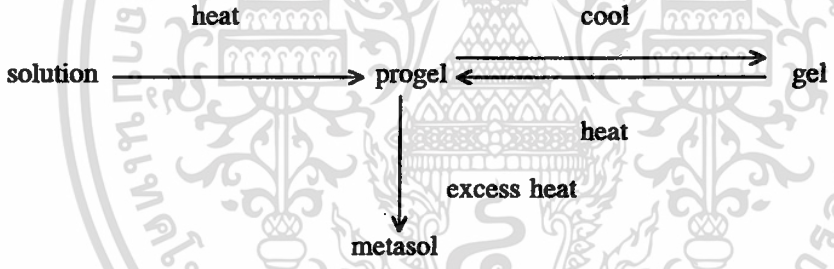
ที่มา: ชุมแสง (2537)

ในการวิเคราะห์และคำนวณหาค่าหรือปริมาณของโปรตีน ที่เปลี่ยนสภาพไปนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น solubility method , dispersibility method และระยะหลัง อาจใช้ enzymatic hydrolysis method เป็นต้น การให้ความร้อนกับสารละลายของโปรตีนที่มี ความเข้มข้นสูงประมาณ ร้อยละ 7 ก็จะทำให้ค่าของความหนืดเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดเป็นวุ้น แข็งได้ ซึ่งการให้ความร้อนนี้จะใช้เพียง 10-30 นาทีที่อุณหภูมิ 70-100 องศาเซลเซียส แต่ถ้า ให้ความร้อนสูงขึ้นเป็น 125 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส วุ้นนี้ก็จะกลายสภาพเป็นสารละลายได้อีก หรือการ ใช้สารเพิ่มการละลายเช่น Cysteine , Sodium sulfite ก็จะช่วยลดความหนืด และป้องกัน การเกิดเป็นวุ้นได้ ทั้งนี้การเกิดเป็นวุ้นของโปรตีน เนื่องจากการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล ของโปรตีน ที่เรียกว่าพันธะ disulfide และ sulfhydryl-disulfide interchange ก็จะช่วยให้เกิดความอยู่ตัวของ protein network รวมทั้ง intramolecular disulfide bonding

ในการให้ความร้อน เพื่อให้เกิดเป็นวุ้นของโปรตีน ประเภท acid precipitated globulins พบว่าความร้อนจะทำให้ solution เปลี่ยนสภาพโดยไม่กลับเป็น progel ซึ่งเมื่อทำให้เย็น ลงก็จะกลายเป็นวุ้น (gel) ซึ่งวุ้นนี้จะกลายสภาพเป็น progel ได้โดยการให้ความร้อนใหม่ และ ระหว่างให้ความร้อนใหม่เพื่อทำให้วุ้น เป็น progel นี้ ความหนืดจะเพิ่มขึ้นตาม อุณหภูมิที่ให้จนกระทั่งถึงจุดสูงสุด และเมื่อถึงจุดนี้แล้วความหนืดก็จะเริ่มลดลง เป็นผล ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ย้อนกลับไม่ได้ เป็น metasol หรือไม่เป็นวุ้นอีกเมื่อเย็นลงทั้ง นี้เพราะสารที่เป็นพวก disulfide-cleving agents จะเปลี่ยน progel เป็น metasol ดังสมการ



ที่มา: ชุมแสง (2537)

ด้วยสาเหตุต่าง ๆ ที่ทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก สามารถละลายน้ำได้ เปลี่ยนสภาพไปเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ไม่สามารถละลายน้ำได้ โดยเฉพาะความร้อน ดังนั้นในการนำถั่วเหลืองไปผลิตเป็นอาหาร เช่น นมเปรี้ยวถั่วเหลืองจะทำให้โปรตีนส่วนใหญ่ อยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ ซับซ้อน ผู้บริโภคจึง ต้องย่อยโมเลกุลที่มีโครงสร้างซับซ้อนเหล่านี้ให้อยู่ในรูปที่มีขนาดเล็ก และสามารถละลายน้ำได้ เช่น ในรูป กรดอะมิโนต่าง ๆ เป็นต้น จึงสามารถนำไปใช้ในการเผาผลาญเพื่อสร้าง พลังงานให้แก่ร่างกายได้ แต่ถ้าโปรตีนในนมถั่วเหลือง ส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนรูปให้มาอยู่ใน รูปที่ละลายน้ำมากขึ้นแล้ว เมื่อนมเปรี้ยวถั่วเหลืองผ่านความร้อนในขบวนการ pasteurization โปรตีนเหล่านี้ไม่สามารถรวมตัวกันเป็นโปรตีนที่มีขนาดโหญ่และมีโครงสร้างซับซ้อนได้อีก ซึ่ง โปรตีนที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำเหล่านี้จึงมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยตรง คือร่างกายสามารถย่อยง่าย และนำไปใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเผาผลาญ เพื่อสร้างพลังงานได้สะดวก และรวดเร็วกว่า จึงเป็นการ พัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองขึ้นไปอีกระดับหนึ่ง

สำหรับการเปลี่ยนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำนั้น วิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้คือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยการใช้เชื้อ ***Bacillus subtilis*** สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองได้สูง ซึ่งมาจากแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติ เพื่อใช้ในการหมัก นมถั่วเหลือง เพื่อให้เชื้อชนิดนี้เปลี่ยนโครงสร้างของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ โครงสร้างซับซ้อน และไม่ละลายน้ำ ให้มีโครงสร้างที่มีขนาดเล็ก ไม่ซับซ้อน และสามารถละลายน้ำได้ดี

ลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติของ *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว ไม่สร้างเส้นใย สร้างเอนไซม์catalase สามารถสร้างสปอร์ได้ภายในเซลล์ เคลื่อนที่ได้โดยอาศัย flagella เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ และเจริญได้ในสภาพไร้อากาศถ้าอยู่ในอาหารที่ซับซ้อน การแตกออกของสปอร์อยู่ที่ศูนย์กลางของเซลล์ เซลล์หนึ่งเซลล์สามารถสร้างสปอร์ได้หนึ่งสปอร์เท่านั้น และตำแหน่งของสปอร์ภายในเซลล์จะคงที่ ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้นจะมีลักษณะผิวขรุขระ มีสีครีม เชื้อชนิด นี้สามารถเจริญได้ง่ายทั้งที่ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน และเจริญได้ในสภาพอาหารที่เป็นกรด กลาง หรือด่างก็ได้ และที่สำคัญนั้นพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถสร้าง extracellular enzyme ที่สำคัญ ๆ เช่น amylase, protease นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ไม่ทำให้เกิดโรคหรืออันตรายต่อมนุษย์ด้วย

ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นจึงมีการนำเชื้อชนิดนี้มาใช้ร่วมในการหมักนมเปรี้ยวถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ แต่พบว่าปัญหาสำคัญต่อการใช้เชื้อนี้คือ การสร้างสปอร์ ของเชื้อ โดยสปอร์อาจสามารถงอกและเจริญเป็น vegetative cell ใหม่ได้ ซึ่งเป็น สาเหตุที่ทำให้นมเปรี้ยวถั่วเหลืองเสียได้ง่าย

Endospore

endospore คือโครงสร้างที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียทุก species ของ family Bacillaceae ซึ่งได้แก่ Bacillus และ Clostridium

คุณสมบัติของ Endospore

- สะท้อนแสงได้ดีและไม่ติดสีย้อม นอกจากจะใช้ความร้อนช่วยในการย้อมจึงสามารถติดสีย้อมได้
- ทนความร้อนได้ดี เช่น อุณหภูมิน้ำเดือด แต่จะถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
- ทนรังสีชนิดต่าง ๆ ได้ดีโดยเฉพาะรังสีอุลตราไวโอเลต และรังสีเอกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สามารถอยู่ในสภาพ dormant หรือ inactive ที่เรียกว่า cryptobiotic ได้เป็นร้อยปี

- ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถงอกกลับมาเป็นเซลล์ เจริญได้ภายในไม่ถึง 1 ชั่วโมง ที่เรียกว่า spore germination

- มีความคงตัวสูงกว่าเซลล์ปกติ

- มี metabolism ต่ำกว่าเซลล์ปกติ

- เป็น antigen ที่ดี

- ไม่ถือเป็นโครงสร้างสำหรับการขยายพันธุ์ หรือเพิ่มจำนวนเหมือนในยีสต์ และ รา

<u>โครงสร้างของ endospore มี 4 ชั้น</u> ได้แก่

1. exosporium เป็นชั้นที่อยู่นอกสุด มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มบาง ๆ ประกอบด้วยโปรตีน และ ไขมัน พบในบางสปอร์เท่านั้น และยังไม่รู้หน้าที่ที่แน่นอน

2. spore coat อยู่ถัดจากชั้นแรกเข้ามา เป็นชั้นที่เซลล์แม่สร้างขึ้นเพื่อห่อหุ้มสปอร์ ประกอบด้วยส่วนที่คล้ายโปรตีนคือ keratin ที่มีกลุ่ม disulfide ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็น องค์ประกอบที่ช่วยให้เกิด cross-link ระหว่างชั้นโปรตีน และมีบทบาทต่อการทน ต่อสารเคมีที่เป็นพิษของสปอร์

3. cortex เป็นชั้นที่ประกอบด้วย peptidoglycan ที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างให้ต่างจาก peptidoglycan ที่ผนังเซลล์

4. core เป็นชั้นในสุดประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ นิวครีออยด์ และอื่น ๆ ดังนั้น สปอร์จึงแตกต่างจาก vegetative cell ตรงที่มีโครงสร้างชั้นนอกเพิ่มขึ้นมา

องค์ประกอบทางเคมีอย่างหนึ่งที่พบเฉพาะในสปอร์ แต่ไม่พบใน vegetative cell คือ กรด dipicolinic (DPA) ซึ่งพบในสปอร์ทุกสปอร์ในชั้นของ core นอกจากนี้ก็มีแคลเซียมอิออน ซึ่งพบมากในชั้น core เหมือนกันและมีแนวโน้มที่จะจับกับกรด dipicolinic ได้เป็น calcium dipicolinate ซึ่งมีบทบาททำให้สปอร์ทนต่อความร้อนสูงกว่า vegetative cell ทั่วไปมาก

ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสปอร์กับการเจริญของแบคทีเรีย คือแบคทีเรียจะเริ่มสร้างสปอร์หลังจากกลูโคสในอาหารหมดลง และเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary แล้ว

กระบวนการสร้างสปอร์ประกอบด้วยขั้นตอนที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ไม่สามารถมีการเจริญและแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ เนื่องจากเกิดสภาวะขาดแคลนสารอาหาร ที่จำเป็น เช่น เซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อเกิดการขาดกลูโคส การเจริญของ vegetative cell จะหยุดลงและเซลล์จะเริ่มสร้างสปอร์ แต่ถ้ามีการเติมกลูโคสลงไป ก็จะสามารถหยุดยั้งการสร้างสปอร์ได้ วิธีนี้เรียกว่า catabolitic repression

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง exponential growth ของเซลล์ น้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น กรดอินทรีย์ โดยกระบวนการหมัก ทำให้ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลง เมื่อกลูโคสถูก ใช้หมดไป เซลล์จะมีการเจริญแบบ oxidative มีการสร้างเอนไซม์สำหรับ วัฏจักรของกรดซิตริก และใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานแทนกลูโคสที่หมดไป ทำให้มีการดึงเอาออกซิเจนเข้าไป และความเป็นกรด-ด่างจะเริ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มจะสังเกตเห็น spore septum และมีการ ย่อยสลายโปรตีนในไซโตพลาสซึมเพื่อนำเอากรดอะมิโนไปสร้าง spore proteins และเป็นแหล่ง พลังงาน ในระยะนี้พลังงานที่ใช้ในการสร้างสปอร์จะมาจากโปรตีน และ Poly-B-Hydroxybutyrate (PHB) นอกจากนี้ยังมีการสร้าง mRNA ชนิดใหม่ขึ้นมาเพื่อนำไปสร้าง เอนไซม์ในสปอร์ ซึ่งกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ ใช้เวลานานหลายชั่วโมงกว่าจะได้สปอร์ที่ สมบูรณ์ออกมา (ชุมแสง , 2537)

ได้มีผู้ทำการศึกษากลไกการสร้างสปอร์ของ ***Bacillus subtilis*** จนรู้กลไกว่า nutient stress หรือปริมาณกลูโคสที่หมดไปจะเป็นสัญญาณที่เข้าไปยัง transmitter ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ nutient stress ยังเป็นตัวการทำให้ระดับของ GRT หรือ GPP ในเซลล์ลดต่ำลง อันเป็นเหตุกระตุ้นให้มีการส่งสัญญาณจาก transmitter ต่อไปยังยีนที่ควบคุมการสร้างสปอร์ (Sporulation genes) คือ Spo OA และ Spo OF เมื่อ Spo OA ถูกกระตุ้นก็จะส่งสัญญาณ ไปกระตุ้น Operation genes อื่น ๆ ไม่ให้สร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซล

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งที่มีปริมาณโปรตีนสูงมาก แต่การบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยทั่วไป เนื่องมาจากกลิ่นถั่วและพวก secondarily ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุของอาการท้องอืดหลังจากบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

<u>กลิ่นถั่วหรือกลิ่นเหม็นเขียวในถั่วเหลือง</u>

Wilken และคณะ (1967) รายงานว่าการเกิดกลิ่นถั่วในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จาก ถั่วเหลือง เกี่ยวข้องกับสารประกอบที่ระเหยได้ อันมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ lipoxygenase ซึ่งมีอยู่ แล้วในถั่วเหลืองตามธรรมชาติ เอนไซม์นี้นอกจากพบในถั่วเหลืองแล้วยังพบในธัญพืชชนิดอื่น เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ ข้าวสาลี เป็นต้น แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ชนิดนี้แล้ว พบว่าจะ พบปริมาณสูงสุดในถั่วเหลืองดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งเป็นการแสดงระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipoxygenase ในพืชต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipoxygenase ในพืชต่างๆ

พืช	ระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อเทียบกับถั่วเหลือง(ร้อยละ)
ถั่วเหลือง	100
ถั่วเขียว	14
ถั่วลันเตา	13
ถั่วแขก	28
ข้าวสาลี	3

ที่มา : Obaidy and Siddhiqui (1981)

เอนไซม์ Lipoxygenase หรือ linoleate : oxygen oxidoreductase หรือ E.C. 1.99.2.1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductase โดย Surrey (1960) พบว่า เอนไซม์ชนิด นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 108,000 มีโครงสร้างย่อยที่ประกอบด้วยส่วนประกอบ 2 ส่วน คือ ร้อยละ 85 เป็น 2.8 S ที่เหลือเป็น 6.3 S (Swedburg unit) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการ oxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่อยู่ 2 คู่ ในรูป cis form โดย substrate ที่ดีที่สุดของ เอนไซม์พวกนี้คือกรดลิโนเลอิก ลิโนเลนิก อราซิโดนิก และพวกลิโนลิเอท หรือลิโนลิเนท ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น conjugated diene hydroperoxide ซึ่งสารตัวนี้ ยังสามารถสลายตัวต่อให้สารประกอบที่ระเหยได้และทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเขียวขึ้นในผลิตภัณฑ์ (Holmsn และคณะ 1969) inhibitor ที่สำคัญที่สุดคือพวก lipidantioxidant เช่น tocopherol ,propyl gallate, hydroguinone,napthol,nordihydroguaiaretic acid (NDGA) และความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์นี้อยู่ในช่วง 6.5-9 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะแก่การทำงานอยู่ในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส (Surrey , 1960)

Hsich and Huang (1981) ศึกษาสารประกอบที่ให้กลิ่นรสจากแป้งถั่วเหลือง ที่สกัดไขมันแล้วโดยวิธี Infrared และ Mass Spectrometry พบว่าส่วนที่ก่อให้เกิดกลิ่นถั่ว และกลิ่นเหม็นเขียวในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองแสดงดังตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงส่วนที่ก่อให้เกิดกลิ่นถั่วและกลิ่นเหม็นเขียวในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

Alcohol	aldehyde
3-methyl butanol	pentanal
1-pentanol	hexanal
1-hexanol	1-2hexenal
2-hexanol	heptanai
3-hexanol	2-4-heptadienal
1-2-hexen-1-ol	1-2-octenai
1-2-hepten-1-ol	
1-octen-3-ol	
2-octen-1-ol	
Ketone	**Amyl vinyl ketone**
ethyl vinyl ketone	furan
2-methyl cyclopentanone	2-pentyl furan
methyl ethyl cyclopentanone	
3-methyl-2-cyclopentanone	
2-heptanone	
2-6-dimethyl-3-heptanone	
3-octanone	

ที่มา: Hisch and Huang (1981)

ในการทำน้ำนมถั่วเหลืองโดยการใช้น้ำสกัดเป็นวิธีการที่ใช้กันมานานจนถือว่าเป็นวิธีการที่เก่าแก่ที่สุดวิธีหนึ่งและเป็นวิธีที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมครัวเรือนและอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ โดยการใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดมาแช่น้ำให้นิ่ม และจะพอง ตัวขึ้นอีก 1-2 เท่า ระยะเวลาการ แช่เพื่อให้ถั่วนิ่มตัวอาจใช้เวลาตั้งแต่ 1-20 ชั่วโมง แล้วแต่ อุณหภูมิของน้ำที่แช่ถั่วเหลือง คือ ถ้าใช้น้ำที่อุณหภูมิสูงก็จะนิ่มตัวเร็วกว่าการใช้น้ำ อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นจะทำการบดถั่วรวม กับน้ำตามอัตราส่วนที่ต้องการ และกรองเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ออกไป น้ำที่กรองออกมาได้จะ มีลักษณะคล้ายน้ำนมและมีกลิ่นเหม็นเขียวได้มีผู้ทำการวิจัยหลายคนพยายามทดลองคิดค้นที่จะทำลายกลิ่นถั่วเหลือง ซึ่งจัดว่าเป็นความรู้สึกที่ไม่ต้องการให้มีอยู่ในน้ำนมถั่วเหลือง ให้หมดไปโดย วิธีการต่าง ๆ ซึ่งผลก็เป็นที่ทราบกันว่า อุณหภูมิ เวลา หรือสารเคมี ที่ใช้ในการแช่ถั่ว เป็นวิธีการ กำจัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือลดความรุนแรงของกลิ่นถั่วเหลืองในการผลิตนมถั่วเหลืองได้ ขณะเดียวกันก็พบว่าการใช้ความร้อนที่เหมาะสมยังทำให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ในถั่วเหลืองที่ไม่ต้องการ ถูกทำลายหรือสลายตัวไปได้

การผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองที่ปราศจากกลิ่นถั่ว

Wilken และคณะ (1967) ศึกษาพบว่า ถ้าบดถั่วกับน้ำที่อุณหภูมิระหว่าง 80 และ 100 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมินี้ไว้ประมาณ 10 นาที จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase ได้อย่างสมบูรณ์ และได้นมถั่วเหลืองที่ปราศจากกลิ่นเหม็นเขียว

Mustakas และคณะ (1969) ได้ใช้วิธีการให้ความร้อนแห้ง 212 องศาฟาเรนไฮต์แก่เนื้อ ถั่วเหลืองก่อนบดเป็นแป้ง พบว่าสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ lipoxygenase ได้ และเมื่อ วิเคราะห์พบว่าแป้งถั่วเหลืองที่ได้มีปริมาณ เปอร์ออกไซด์ คอนจูเกตไดอีน และกรดไขมัน อิสระต่ำ

Kon และคณะ (1970) รายงานว่าการบดถั่วกับน้ำภายใต้สภาพเป็นกรด พีเอช 2.2-3.85 สามารถยับยั้งเอนไซม์ lipoxygenase ได้ และได้ของผสมที่ไม่มีกลิ่นแปลกปลอมหรือกลิ่น เหม็นเขียว นอกจากประโยชน์ในการกำจัดกลิ่นถั่วแล้ว สภาพเป็นกรดที่ พีเอช 2.2 นี้ สามารถสกัดโปรตีนได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดถั่วแห้งด้วยน้ำ

Helson และคณะ (1971) รายงานว่าถั่วเหลืองในสภาพทั้งเมล็ดนั้นไม่มี สารประกอบที่ ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเขียวหรือกลิ่นถั่วขึ้น แต่ถ้าบดถั่วหรือทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย แล้วจะเกิดกลิ่นเหม็นเขียว ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์และ substrate ทำปฏิกิริยากัน

ปัญหาหลังการบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

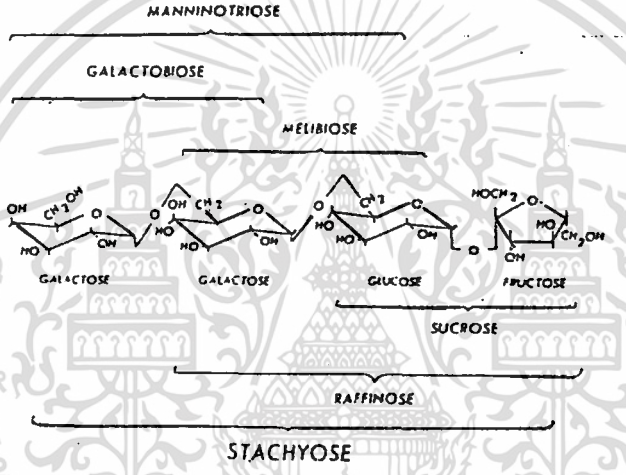
จากการศึกษาของ Hang และ Jackson (1967); Matsouka และคณะ (1968) พบว่าพวก secondarily ในถั่วเหลือง เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดอาการท้องอืดหลังจากการบริโภคถั่ว เหลือง และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง และการเตรียมถั่วเหลืองให้เป็นอาหารหมัก มีผลต่อการปรับ ปรุงให้ผลิตภัณฑ์ จากถั่วเหลืองเป็นที่ยอมรับได้มากขึ้น

Angeles และ Marth (1971) รายงานว่านมถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่ดี สำหรับการเจริญของพวกแลคติคแอซิดแบคทีเรีย และการผลิตกรดที่เพียงพอนี้ เป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการผลิตอาหารหมัก และการผลิตกรดยังขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการใช้คาร์บอไฮเดรตที่มีอยู่ในอาหาร การหมักคาร์บอไฮเดรตในถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองได้เป็นพวก โอลิโกแซคคาไรด์ที่มวลโมเลกุลต่ำ ๆ เช่น sucrose ,raffinose,stachyose (Kawamura, 1967; Shallenberger et al., 1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอไฮเดรตในถั่วเหลืองส่วนใหญ่ได้แก่พวก sucrose,raffinose และ stachyose เมื่อบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองในปริมาณมากๆ raffinose และstachyose จะสามารถทำให้เกิดอาการท้องอืดขึ้นได้ (Cristofero et al., 1974)

stachyose เป็น tetrasaccaride ที่ประกอบด้วย simple sugar 3 ชนิด ได้แก่ fructose glucose และ galactose ดังแสดงในรูปที่ 2 น้ำตาลเหล่านี้มารวมกันเป็น manner ของโมเลกุล stachyose ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่า stachyose ประกอบด้วย nonreducing sugar คือ sucrose และ raffinose และ reducing sugar คือ galactobiose , melibiose และ manninotriose



รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำตาล stachyose

ที่มา: B.K.Mital และ K.H.Steinkraus. (1975)

เมื่อ galactosido-sucrose ถูกย่อย เอนไซม์ 2 ตัวสุดท้าย ที่จะทำให้เกิดการ ไฮโดรไลซ์ที่สมบูรณ์และได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเอนไซม์ 2 ตัวสุดท้ายนี้ได้แก่ invertase [EC 3.2.1.26] ซึ่งต้องการในการไฮโดรไลซ์ น้ำตาลซูโครส และเอนไซม์ α-galactosidase [EC 3.2.1.22] ซึ่งต้องการในการไฮโดรไลซ์ ส่วนที่เหลือของโมเลกุล

ในลำไส้ของมนุษย์ไม่พบเอนไซม์ α-galactosidase (Gitzelmann and Auricchio, 1965) จึงทำให้ขบวนการ metabolic galacto-oligosaccharides ในถั่วเหลืองไม่สมบูรณ์ เป็นสาเหตุที่ ทำให้เกิดอาการท้องอืด

Richards และ Steggerda (1966) ทำการทดสอบกับสุนัข พบว่าบริเวณลำไส้มีการผลิตแก๊สหลังจากบริโภคถั่วเหลือง

Steggerda และ Dimmick (1966) ศึกษาผลของการบริโภคถั่วเหลืองของมนุษย์ พบว่าอาการท้องอืดมีความสัมพันธ์กับส่วนประกอบทางเคมีมากกว่าปริมาณเส้นใย (fiber)ในผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Steggerda และคณะ (1966) รายงานว่าปัจจัยสำคัญในการผลิตแก๊สคือพวกโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ๆ ในถั่วเหลือง มีรายงานวิจัยต่างๆ พบว่า raffinose และ stachyose อาจจะมีผลต่อการทำให้เกิดอาการท้องอืดจากการบริโภคถั่วเหลือง (Kackis et al.,1967 ; Murphy, 1969 ; Rack et al., 1970)

อย่างไรก็ตาม Rockland และคณะ (1969) พบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการท้องอืด เนื่องจากการบริโภคถั่วเหลืองคือตัวอื่นๆ มากกว่าที่จะเป็น simple sugar

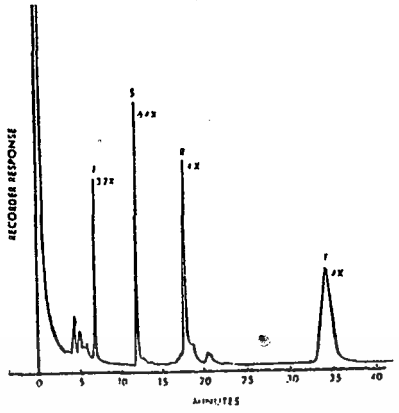
มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างที่ทำการหมักถั่วเหลือง Shallenberger และคณะ (1967) พบว่าปริมาณ stachyose ลดลง ในระหว่างที่ทำการหมัก tempeh จากการศึกษาของ Sugimoto และ Buren (1970) พบว่า เมื่อทำการสกัดเซลล์ของ ***Aspergillus saitoi*** ให้บริสุทธ์จะพบเอนไซม์ invertase และ α-galactosidase นอกจากนี้ activity ของเอนไซม์โปรตีเอส อิสระในนมถั่วเหลืองมีผลให้เกิดการ hydrolysis ของ galacto-oligosaccharides ได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาของ East และคณะ (1972) and Hsu และคณะ (1973) รายงานว่าไม่พบ raffinose และ stachyose ในถั่วเหลืองที่กำลังงอก

มีการทดลองต่างๆ เพื่อลดปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้ โดยใช้วิธี leaching (Wagner et al., 1975) และวิธี enzymic hydrolysis (Sugimoto and van Baren, 1970) อย่างไรก็ตาม ทั้งสองวิธีที่ได้กล่าวมานี้มีข้อเสีย คือ ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงมาก และ ต้องเสี่ยงต่อการสูญเสียคุณค่าโปรตีน ในระหว่างขบวนการ

เนื่องจากวิธีดังกล่าวนั้น ยังเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการลดปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่ทำให้เกิดปัญหาหลังจากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง จึงมีผู้คิดค้นหาวิธีที่ดีกว่า

B.K.Mital และ K.H.Steinkraus (1975) ประสบความสำเร็จในการนำเชื้อจุลินทรีย์ มาลดปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้ โดยในระหว่างที่ทำการหมักนมถั่วเหลืองด้วย แลคติค แอซิก แบคทีเรียนั้นเชื้อสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นประโยชน์ในการผลิตอาหารหมักจากนมถั่วเหลือง (Mital et al., 1974) โดยแลคติคแอซิกแบคทีเรียบางชนิดมีเอนไซม์ α-galactosidase และอาจจะใช้ galacto-oligosaccharides เช่น raffinose และ stachyose ในการเจริญเติบโตหรือเพื่อการผลิตกรด(Mitel et al., 1973) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงให้เห็นถึงปริมาณ oligosaccharide ในนมถั่วเหลืองก่อนทำการหมัก

ที่มา: B.K. Mital และ K.H. Steinkraus (1975)

จากรูป เมื่อนำนมถั่วเหลืองมาวิเคราะห์โดยใช้ Gas chromatography พบว่ามีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 0.48 raffinose ร้อยละ 0.07 และ stachyose ร้อยละ 0.39

จากการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus cellobiosis*** นั้น ปรากฏว่า มีการใช้ซูโครสและ raffinose อย่างสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 20 ขณะเดียวกันปริมาณของ stachyose ลดลง 35 เปอร์เซนต์ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงอีกต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4 นมถั่วเหลืองก่อนการหมักนั้นจะไม่พบปริมาณของ แมนนิทอล หลังจากหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***L. cellobiosis*** เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะพบแมนนิทอลและเพิ่มปริมาณขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 20 ซึ่งเป็นเวลาที่มีการใช้ซูโครสหมดอย่างสมบูรณ์

การย่อยสลายของซูโครสทำให้ปริมาณของกลูโคสและฟรุคโตสเพิ่มขึ้น แลคติคแอซิกแบคทีเรีย พวก โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และ เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเตทีฟ จะมีความสัมพันธ์ต่อ การหมักฟรุคโตส ต่างกัน (Horecker, 1962)

สายพันธุ์พวก เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเตทีฟ มีเอนไซม์ แมนนิทอล ดีไฮโดรจีเนส (mannitol:NAD oxidoreductase) (EC 1.1.1.67) สามารถเกิดปฏิกิริยาดังนี้

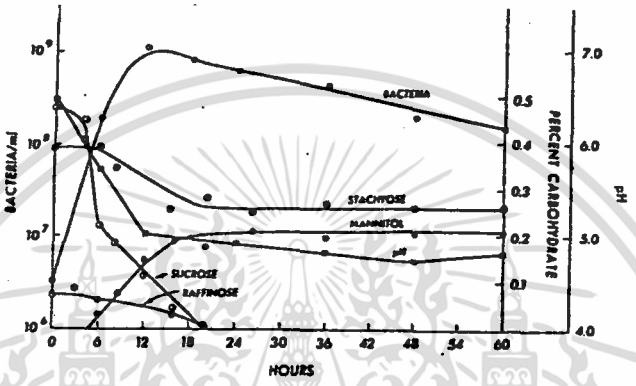
$$\text{Fructose} + \text{NADA}^{+} + \text{H}^{+} \rightarrow \text{Mannitol} + \text{NAD}$$

เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเตทีฟ แลคโตบาซิลัส สามารถเปลี่ยนฟรุคโตสไปเป็นแมนนิทอลได้ จากการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus cellobiosis*** จากรูปที่ 5 และ 6 จะพบน้ำตาล แมนนิทอลซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

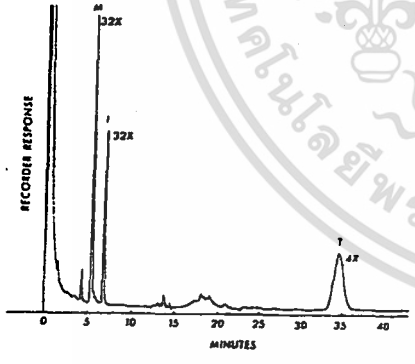
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

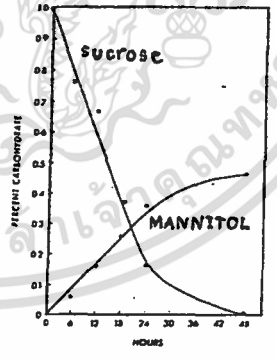
การหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus plantarum*** ปริมาณของ raffinose ลดลงน้อยมากในระยะแรกของการหมักหลังจากนั้นค่อนข้างจะคงที่ต่อไป ส่วนปริมาณของ stachyose ลดลงน้อยมาก และปริมาณของซูโครสจะหมดลงหลังจากผ่านการหมักไป 30 ชั่วโมง และพบว่าได แซคคาไรด์ที่ถูกรีดิวซ์ในระหว่างชั่วโมงที่ 35-60 คือ melibiose ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus cellobiosis***

ที่มา: B.K. Mtal และ K.H. Steinkraus (1975)





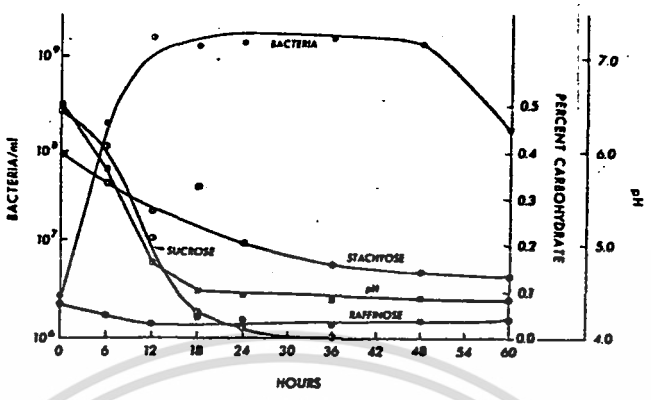
รูปที่ 5 **รูปที่ 6**

รูปที่ 5 แสดงการวิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่หมักด้วย ***L. cellobiosis*** ด้วยวิธี gas chromatography

รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณแมนนิทอลในนมถั่วเหลืองที่หมักด้วย ***L. cellobiosis***

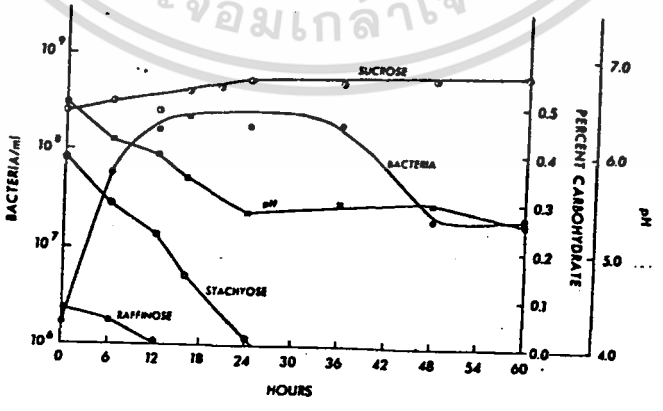
ที่มา: B.K. Mital และ K.H. Steinkraus (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus plantarum***
ที่มา: B.K. Mital และ K.H. Steinkraus (1975)

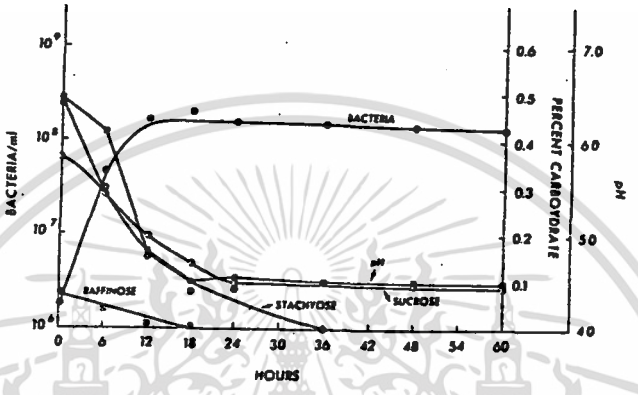
การเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus fermenti*** พบว่าเชื้อชนิด นี้สามารถใช้ raffinose และ stachyose ได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากผ่านการหมักไป 12 และ 25 ชั่วโมง และในการหมักครั้งนี้ไม่พบแมนนิทอล เนื่องจากเชื้อนี้ไม่สามารถหมักซูโครสได้ Rogosa และ Sharpe,1959 ; Sub-Committee of the International Comittee on Nomenclature of Bacteria of the international Association of Microbiological Societies, 1968 แสดงให้เห็นว่าบางสายพันธุ์ของ ***L. fermenti*** สามารถหมักซูโครสได้ อย่างไรก็ตาม ***L. fermenti*** สายพันธุ์ (NRRL-B-585)ที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่สามารถทำการหมักซูโครส และความเข้ม ข้นของซูโครสในนมที่ผ่านการหมักเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องมาจากการย่อยสลายของ raffinose และ stachyose ซึ่งจะให้น้ำตาลซูโครสออกมา ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus fermenti***
ที่มา: B.K. Mital และ K.H. Steinkraus (1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการหมักนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อผสมของ ***Streptococcus thermophilus*** และ ***Lactobacillus fermenti*** แสดงให้เห็นว่า ไม่พบ raffinose และ stachyose และพบกลูโคส คงเหลืออยู่ 0.08 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำนมก่อนการหมัก ดังรูปที่ 9 อย่างไรก็ตาม การหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***S. thermophilus*** จะเกิดการใช้ซูโครสอย่างสมบูรณ์ ขณะเดียวกัน ปริมาณของ raffinose และ stachyose จะคงอยู่ไม่เปลี่ยนแปลง



รูปที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงในการหมักนมถั่วเหลืองด้วย ***Lactobacillus fermenti*** และ ***Streptococcus thermophilus***

ที่มา: B.K.Mital และ K.H. Steinkraus (1975)

จากการทดลองเหล่านี้ มีผลเนื่องมาจากว่า แลคติคแอซิกแบคทีเรีย มีเอนไซม์ α - galactosidase จึงมีความสามารถในการใช้ galacto-oligosaccharide ที่มีอยู่ในนมถั่วเหลือง ดังนั้นจึงสามารถใช้การหมักนมถั่วเหลืองด้วยแลคติคแอซิกแบคทีเรีย เพื่อลดปริมาณของ raffinose และ stachyose ที่เชื่อว่าเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องอืดหลังการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

Delente และ Ladenberg (1972) รายงานว่า ถ้าใช้เอนไซม์ α-galactosidase และ invertase กับน้ำนมถั่วเหลืองพบว่า ทำให้พวกโอลิโกแซคคาไรด์ เปลี่ยนเป็น โมโนแซคคาไรด์ได้ และได้ melibiose และ manninotriose เป็น intermediate product

จากการศึกษาของ Sugimoto และ Van Buren (1970) แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์จาก ***Aspergillus saitoi*** ในนมถั่วเหลือง ทำให้โอลิโกแซคคาไรด์ ทั้งหมดมีการเปลี่ยนเป็น โมโนแซคคาไรด์ และมี melibiose และ manninotriose เป็น intermediate product

Mital และคณะ (1973) พบว่าการใช้เอนไซม์ที่เตรียมจาก ***Lactobacillus cellobiosis*** กับ stachyose จะทำให้ได้พวกโมโนแซคคาไรด์ มากขึ้น โดยมี manninotriose เป็น intermediate product แต่ความเข้มข้นลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินบี12

วิตามินบี12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำได้ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึมสีแดง ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า (5,6-dimethylbezimidazole cobamide cyanide หรือ Cyanocobalamine) (Hariss, 1968) วิตามินบี12 ในธรรมชาติได้จากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เท่านั้น สัตว์และพืชชั้นสูงไม่สามารถสังเคราะห์ได้ แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างวิตามินบี12 ได้ ในเนื้อเยื่อของสัตว์ เช่น ตับ จะมี cobimide ประมาณ 1 ส่วนในล้านส่วน (Perlman,1978) วิตามินบี12 พบทั่วไปในเนื้อเยื่อของสัตว์ ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์หรือจากการกินสัตว์เป็นอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหารหรือสัตว์เคี้ยวเอื้อง จะได้รับวิตามินบี12 ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในทางเดินอาหาร

นอกจากนี้วิตามินบี12 ยังเป็นวิตามินที่มีโมเลกุลใหญ่ ร่างกายจึงดูดซึมได้ยาก ผิดกับวิตามินบีอื่นๆ เช่น วิตามินบี1 และวิตามินบี2 ซึ่งโมเลกุลมีขนาดเล็ก ร่างกายดูดซึมได้ง่าย ด้วยเหตุดังกล่าวนี้ ร่างกายจึงขาดวิตามินบี12 ได้ง่าย ทำให้เกิดโรคโลหิตจางเพอร์นิเชียส (pernicious anemia) ซึ่งรู้จักกันมาตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1926 ในระยะนั้นถือว่าเป็นโรคที่ร้ายแรงมาก ไม่มียารักษาและผู้ป่วยต้องเสียชีวิตทุกราย

การค้นพบที่ถือว่ามีความสำคัญในทางโภชนาการ และช่วยสนับสนุนว่า โรคภัยไข้เจ็บหลายประเภทมิได้เกิดจากเชื้อโรค แต่มีพื้นฐานมาจากการขาดโภชนาสาร ซึ่งนายแพทย์แห่งมหาวิทยาลัยฮาร์วาร์ดสองท่าน คือนายแพทย์ยอร์ช มิโน และ วิลเลียม เมอร์ฟี ทดลองใช้ตับดิบรักษาคนไข้ ในปี ค.ศ. 1926 แพทย์ทั้งสองรายงานว่าตับดิบๆ สามารถใช้รักษาคนไข้ที่ป่วยเป็นโรคโลหิตจางเพอร์นิเชียสได้ ซึ่งสารในตับที่มีผลต่อการรักษาโรคนี้ เรียกว่า Antipernicious animia factor หรือ APA

การขาดวิตามินบี12 มีสาเหตุอยู่หลายประการ แต่อาจกล่าวได้ว่าโรคโลหิตจางเพอร์นิเชียสเป็นผลจากการที่ร่างกายไม่สามารถดูดซึมวิตามินบี12 ได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากวิตามินบี12 มีลักษณะโมเลกุลที่ซับซ้อนดังกล่าวมาแล้ว จึงทำให้ไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายๆ เหมือนโภชนาสารอื่นๆ ปัจจุบันเชื่อกันว่าวิตามินบี12 จะถูกดูดซึมเข้าร่างกาย ก็ต่อเมื่อกระเพาะปล่อยสารชนิดหนึ่งออกมา เรียกกันว่า อินทรินซิกแฟกเตอร์ (intrinsic factor) ซึ่งจะไปยึดกับวิตามินบี12 ถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ไปได้ นักวิทยาศาสตร์การแพทย์เชื่อว่า บางคนร่างกายจะขาดอินทรินซิกแฟกเตอร์ หรือร่างกายผลิตอินทรินซิกแฟกเตอร์น้อยไป คนเหล่านี้จะขาดวิตามินบี12 ได้ง่ายมาก

หน้าที่และความสำคัญของวิตามินบี12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินบี 12 มีส่วนสำคัญในการสร้างเม็ดเลือดแดงและการทำงานของระบบประสาท นอกจากนี้วิตามินบี12 ยังจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์

ความต้องการวิตามินบี12 ที่กำหนดไว้ในสหรัฐอเมริกา ประมาณ 6 ไมโครกรัมต่อวัน ทั้งๆ ที่ร่างกายมนุษย์ต้องการวิตามินบี12 ในปริมาณที่น้อยมากเช่นนี้ แต่ก็มีบทบาทสำคัญอยู่หลายประการ มีหลักฐานที่แสดงว่า วิตามินบี12 มีส่วนในการสร้างกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นพื้นฐานของกรรมพันธุ์ ในสัตว์ทดลองที่กินอาหารที่ขาดวิตามินบี12 ปริมาณของกรดนิวคลีอิกในอวัยวะที่สำคัญๆ เช่น ตับ ไขสันหลัง จะลดต่ำลงอย่างมาก นอกจากนี้ การศึกษา ณ สถาบันวิจัยต่างๆยังแสดงว่า วิตามินบี12 มีส่วนในการช่วยเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นไขมัน และมีส่วนช่วยให้ร่างกายสามารถนำไขมัน คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนไปใช้ได้อย่างสมบูรณ์ และยังมีส่วนช่วยในการทำงานของระบบประสาท นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่า วิตามินบี12 ช่วยป้องกันการเป็นหมัน

ถึงแม้ว่าร่างกายจะต้องการวิตามินบี12 น้อยมากเพียง 6 ไมโครกรัมต่อวัน แต่ถ้าปริมาณดังกล่าวนี้ขาดไปจากอาหาร ก็จะมีผลเสียต่อร่างกาย การขาดวิตามินบี12 จะมีผลให้เกิดอาการทางระบบประสาท

ในระยะหลังๆ นี้ มีผลการวิจัยจากหลายสถาบันที่สนับสนุนว่า วิตามินบี12 มีผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกายเด็กๆ การทดลองลูกหนูที่เกิดจากแม่ที่ได้รับวิตามินบี12 จำนวนสูงกว่าปกติ จะมีน้ำหนักสูงกว่าปกติ และในปีแรกลูกหนูเหล่านี้จะมีน้ำหนักตัวสูงกว่าลูกหนูที่แม่กินวิตามินบี12 ปริมาณไม่สูง นอกจากนี้ ลูกหนูเหล่านี้ยังมีปริมาณโปรตีนในตัวสูงกว่าและมีปริมาณไขมันในตัวน้อยกว่าลูกหนูที่เกิดจากแม่ที่กินอาหารปกติ การศึกษาดังกล่าวนี้ยังแสดงต่อไปอีกว่า ลูกหนูที่เกิดจากแม่ที่กินวิตามินบี12 ปริมาณสูง จะมีอัตราการตายต่ำกว่า และทนต่อการเกิดโรคได้ดีกว่าลูกหนูที่เกิดจากแม่ที่ได้วิตามินบี12 ในปริมาณปกติ

วิตามินบี12 มีความสำคัญต่อสัตว์ที่กำลังเจริญมากกว่าพวกที่เจริญเต็มที่แล้ว ถ้าขาดวิตามินบี12 จะทำให้สัตว์เจริญช้าลง และมีอัตราการตายสูง ในพวกเป็ดไก่ นอกจากจะทำให้การเจริญช้าลงแล้ว ยังทำให้สัตว์มีขนน้อยและไตอาจเสียหายได้ ไก่ที่ไม่ได้รับวิตามินบี12 แล้วยังเจริญและแข็งแรงดี แต่การฟักไข่จะไม่ดี ส่วนในลูกสุกรที่ขาดวิตามินบี12 จะเจริญช้าลงและขาหลังเสีย ส่วนสุกรที่โตแล้วขาดวิตามินบี12 จะมีผิวหนังหยาบและมีผลต่อการเจริญบ้าง ลูกสัตว์ เช่นโค กระบือ และแกะ ก็ต้องการวิตามินบี12 แต่พอเจริญเติบโตขึ้นจุลินทรีย์ในลำไส้สัตว์พวกนี้จะสังเคราะห์วิตามินบี12 ให้พอกับความต้องการ ถ้าหากได้อาหารเสริมที่มีปริมาณโคบอลท์เพียงพอ ถ้าลูกโค กระบือ ขาดวิตามินบี12 จะทำให้การเจริญลดลง และกินอาหารได้น้อยลง (Mc Donald, 1973; Maynard, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสำคัญของวิตามินบี12 ต่อสัตว์ คือ ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ในปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับการสร้าง methyl group จาก one-carbon precursor ในสัตว์เคี้ยวเอื้องวิตามินบี12 จะมีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของกรดโพรพิโอนิค คือ โคเอนไซม์วิตามินบี12 มีความสำคัญในการเปลี่ยน methyl malonyl Co A ไปเป็น succinyl Co A ในสัตว์เคี้ยวเอื้องการขาดวิตามินบี12 จะทำให้การเมตาบอไลซ์กรดโพรพิโอนิค ซึ่งเป็นผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักในลำไส้ลดลง ในการเมตาบอไลซ์กรดโพรพิโอนิคจะเปลี่ยนไปเป็น propionic Co A ซึ่งเปลี่ยนเป็น methylomalonyl Co A แล้วเปลี่ยนไปเป็น succinyl Co A เข้าสู่ tricarboxylic acid cycle เอนไซม์ methyl malonyl Co A isomerase ซึ่งเกี่ยวข้องในการเมตาบอไลซ์กรดโพรพิโอนิคนี้ ต้องการวิตามินบี12 ถ้าขาดวิตามินบี12 จะทำให้กรดโพรพิโอนิคเสียไป ผลคือ ทำให้ระดับกรดโพรพิโอนิคในร่างกาย และ methyl malonic acid ในปัสสาวะสูง การขาดวิตามินบี12 จะเหนี่ยวนำให้เกิดการขาดกรดโฟลิค โดยการยับยั้งการให้สารประกอบของโฟลิค ปฏิกิริยา methyl transferase ต้องการวิตามินบี12 ในการย้ายหมู่ methyl จาก methyltetrahydroforic acid (methyl-THFA)และ homocystein ไปเป็น THFA และ methionine ถ้าขาดวิตามินบี12 จะทำให้ methyl-THFA เพิ่ม นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีนและเมตาบอลิซึมของpurine (Maynard, 1979)

วิตามินบี 12 แตกต่างจากวิตามินบีคอมเพลกซ์ชนิดอื่นๆ ตรงที่วิตามินบี 12 มีอยู่ในอาหารที่ได้จากสัตว์ วิตามินบี12 มีอยู่ในพืชน้อยมาก อาหารที่มีวิตามินบี12 มากๆ ได้แก่ นม ไข่ เนื้อ เนยแข็ง และตับ ในบรรดาอาหารเหล่านี้ ตับมีวิตามินบี12 มากที่สุด

ด้วยเหตุที่วิตามินบี12 ไม่มีในพืช ผู้กินอาหารมังสวิรัติ จึงมีโอกาสขาดวิตามินบี12 ได้ง่ายมาก เนื่องจากงดเว้นการกินเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามผู้กินอาหารมังสวิรัตที่กินไข่และนม จะไม่ขาดวิตามินบี12 เท่ากับผู้กินอาหารมังสวิรัตที่ไม่ กินไข่และนม บุคคลประเภทหลังนี้จึงควรกินวิตามินบี12 เสริมเป็นอย่างยิ่ง

<u>ลักษณะรูปร่างและคุณสมบัติของเชื้อ *Propionibacterium shermanii.*</u>

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีรูปร่างได้หลายแบบ อาจเป็นรูปร่างเล็กกลม ท่อนยาว ท่อนไม้กระบอง (club-shape) การเรียงตัวอาจเป็นเซลเดี่ยว ๆ เป็นคู่ สายสั้น หรือเป็นกลุ่ม เจริญได้และทนในสภาวะที่มีอากาศ สามารถหมักกรดแลคติก กรดไพรูวิค และคาร์บอไฮเดรต ได้กรดโพรพิโอนิค กรดซิตริก และคาร์บอนไดออกไซด์ (Buchanan, 1974) คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี12 ได้ในส ภาพที่ไม่มีอากาศ หรือมีอากาศเล็กน้อย ดังนั้น จึงไม่ต้องมีการให้อากาศหรือการกวนในถังหมัก ซึ่งเป็นการประหยัดพลังงานและค่าใช้จ่าย การเลือกเชื้อชนิดนี้ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มาก เพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ ทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนซึ่งมักจะเกิดในกระบวนการหมัก การที่สามารถลดการปนเปื้อน (contaminate) และการติดเชื้อ (infection) ได้ เพราะว่าในระหว่างการหมักในสภาพไม่มีอากาศนั้น calciumpropionate มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยตัวสารเองไม่เป็นพิษต่อ ***P. shermanii*** (Noyes, 1969 and Rudy, 1963)

<u>สภาวะที่เหมาะสมต่อ การเจริญและการผลิตวิตามินบี12 ของเชื้อ *Propionibacterium shermanii*</u>

สภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ***Propionibacterium sp*** . อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 แต่เจริญได้ดีสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 (Prescott and Dunn, 1959) ต้องรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4-9 (ที่เหมาะสม 6-7) เพราะค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี12 เนื่องจากโคบาลามินไม่คงตัวหรือถูกทำลายไป (Noyes, 1969)

อุณหภูมิ เชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-40 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อนี้ (Prescott and Dunn, 1959)และเหมาะแก่การผลิตวิตามินบี12 ด้วย

การให้อากาศ Speedie และ Hull (1960) ศึกษากระบวนการผลิตวิตามินบี12 ของ ***Propionibacterium sp.***พบว่ามีอยู่สองช่วง ช่วงแรกปรับให้อยู่ในสภาพไม่มีอากาศ ทำได้โดยการผ่านกาซไนโตรเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหาร หรือรักษาระดับกาซเหนืออาหารโดยไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการละลายออกซิเจนในอาหาร ต่อมากาซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักจะช่วยรักษาสภาพไม่มีอากาศของอาหาร ในช่วงนี้เป็นการหมักธรรมดาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ส่วนช่วงหลังปรับให้อากาศสัมผัสอาหารในสภาพ microaerophilic โดยจะให้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 70-80 ชั่วโมง จะเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 ได้มาก แต่การให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตวิตามินบี12 ลดลง

Perlman และคณะ (1961) พบว่า สภาพการหมักมีผลต่อชนิดของวิตามินบี12 ที่สังเคราะห์ได้ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ ***Propionibacterium sp.*** ที่เจริญในสภาพไม่มีอากาศจะสังเคราะห์ cobinamide (incomplete cobamide) สะสมในเซลล์ เมื่อให้อากาศแก่เซลล์จะมีผลเปลี่ยน cobinamide เป็น5,6-dimethylbenzimidazole cobamide ดังนั้น การเติมสารสังเคราะห์ 5,6-dimethylbenimidazole (DBI) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงควรเติมในช่วงหลังของการหมัก เพราะว่าถ้าเติม DBI ในช่วงสภาพไม่มีอากาศจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์วิตามินบี12 (Feirdman and Cagen, 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Perlman และคณะ (1960) ศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ ***Propionibacterium sp.*** หลายสายพันธุ์พบว่า ถ้ามีการเติมกลูโคสและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้อยู่ในระดับพีเอช 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ อย่างสม่ำเสมอ จะมีผลให้เซลล์มีการเจริญสูง และมีปริมาณวิตามินบี12 สะสมในเซลล์สูงด้วย สภาพการให้อากาศไม่มีผลต่อการเพิ่มวิตามินบี12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 กระบวนการต่าง ๆ สำหรับการผลิตวิตามินบี12 ของจุลินทรีย์

Microorganism	Ingredients	Yield[1/]	Comments
Bacillus megaterium	Beef molasses; ammonium phosphate; cobalt salt; inorgamic salts	0.45	Aerated fermentation (18 h)
Propionibacterium freudenreichii	Corn-stee liquor;glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4OH	19.00	Three days anaerobic and three days aerobic
Propionibacterium freudenreichii	Corn-stee liquor (or autolysed *Penicillium mycelium*); glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4OH	8.00	Continuous two stage fermentation; 33 h retention time
Propionibacterium shermanii	Corn-steep liquor; glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4OH	23.00	Three days anaerobic and four days aerobic
Streptomyces spp.	Soybean meal; glucose;cobalt salt; K_2HPO_4	5.70	Six-day aerated fermentation
Micromonospora spp.	Soybean meal; glucose; $CaCo_3$ cobalt salt	11.50	Seven-day aerated fermentation
Pseudomonas denitrificans	Sucrose; betaine; glutamic acid cobalt salt; 5,6-dimethybenzimidazole; salt	15.00	Two-day aerated fermentation
Butyribacterium rettgeri	Corn-steep liquor; cobalt salt; glucose; pH 7 with NH_4OH	5.00	Four-day anaerobic fermentation

1/Yield of vitamin B_{12} (mg/l)

ที่มา: Perlman (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์และชนิดของวิตามินบี12 ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย

วิตามินบี 12 มีลักษณะโครงสร้างซับซ้อนกว่าวิตามินชนิดอื่นๆ โดยมีการศึกษาโครงสร้างของวิตามินบี12 โดยใช้เทคนิคการ X-ray (Rainbow and Rose 1955)

โมเลกุลวิตามินบี12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ planar group และ nucleotide group ส่วนที่เป็น planar group เป็นส่วนแกนกลางของโครงสร้างเรียกว่า corri ringซึ่งประกอบด้วย pyrrole ring 4 วงเชื่อมกัน และมีโคบอลท์เป็นนิวเคลียส ส่วน nucleotide group คือ 5,6-dimethylbenzimidazole จะเชื่อมกับ corri ring 2 phosphate group ของนิวคลีโอไทด์ ด้วย 2 L-amino 2- propanol bridge และ ไนโตรเจน ของ นิวคลีโอไทด์ จะเชื่อมกับอะตอมของโคบอลท์ในแนวเกือบตั้งฉากกับ corri ring (Conn and Stumpf 1976) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นอยู่กับสูตรโครงสร้างของแกน Y ดังแสดงไว้ในภาพที่ 10 คำว่า โคบาลามินหมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี12

การสังเคราะห์วิตามินบี12 เสนอโดย Boretti และคณะ (1960) แบ่งออกได้ 2 ขั้นตอนที่สำคัญคือ

-การสังเคราะห์ส่วน corri ring

-การเชื่อมต่อของส่วน corri ring กับส่วน nucleotide

การสังเคราะห์ pyrrole ring เริ่มจากการรวมตัวของ succinate กับ glycine เป็น δ-aminolevulinic acid แล้ว δ-aminolevulinic acid 2 โมเลกุลจะเชื่อมกันเป็น porphobilinogen ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของMacro ring สาร porphobilinogen จะถูกเปลี่ยนเป็น Uroporphyrinigen ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปโดยการ methylation decarboxylase และเชื่อมด้วยโคบอลท์เป็น cobyrinic acid ต่อไปจะมีกลุ่ม L-amino-2-propanol มาเชื่อมเพื่อเปลี่ยนเป็น cobinamide-GDP ซึ่งเป็นตัวกลางที่สำคัญในการสังเคราะห์วิตามินบี12 ขั้นต่อไปเป็นการเชื่อมต่อของ dimethylbenzimidazol กับ corri ring และในที่สุดจะได้วิตามินบี12 (Perlman , 1978)

วิตามินบี12 ปกติจะผลิตในรูปไซยาโนโคบาลามิน ซึ่งมีคุณสมบัติอยู่ตัวกว่าวิตามินบี12 ในรูปอื่น (Friedman Cagen ,1970)แต่ในสภาพธรรมชาติการสังเคราะห์วิตามินบี12 โดยจุลินทรีย์จะเกิดในรูปผสมของโคเอนไซม์บี12 (5-deoxyadenosylcobalamin),hydroxocobalamin, methylcobalamine ดังแสดงในภาพที่ 10

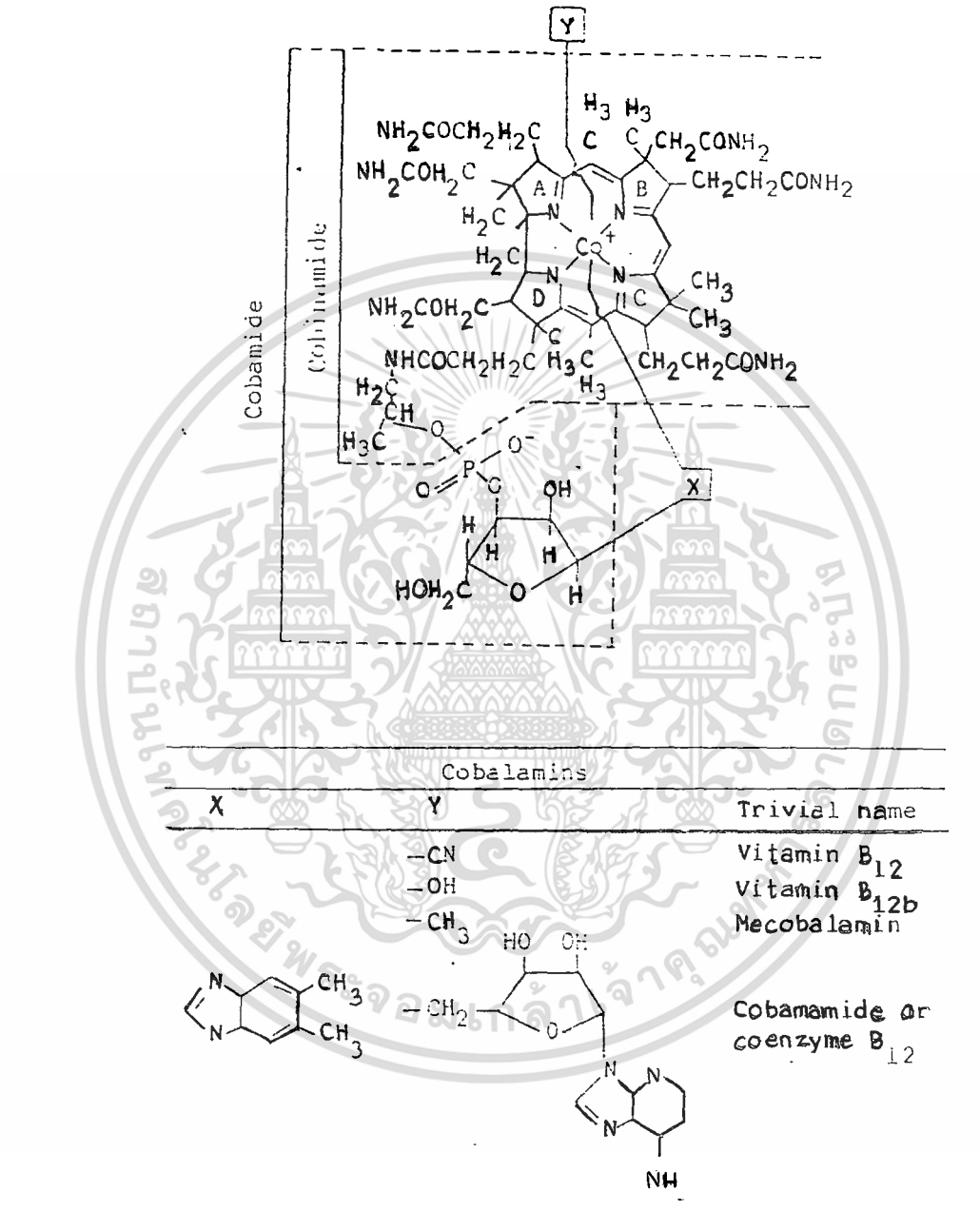
Leviton และHargrove (1952) วิเคราะห์วิตามินบี12 ที่สกัดได้จาก ***Propionibacterium freudenreichii*** โดยวิธี paper chromatography พบว่าร้อยละ 80 ของวิตามินบี12 อยู่ในรูปไซยาโนโคบาลามิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barker และคณะ (1960) พบว่าวิตามินบี12 ที่แยกได้จากเซลล์ของเชื้อ *Propionibacterium* อยู่ในรูปไฮดรอกไซค์หรืออนุพันธ์ไซยาไนด์นั้น ขึ้นอยู่กับการแตกสลายของโคเอนไซม์ระหว่างขบวนการแยกสารออกจากเซลล์

Weissbach และ คณะ (1955) พบว่า ในสภาพธรรมชาติวิตามินบี12 ที่สังเคราะห์ได้ภายในเซลล์ของ ***Propionibacterium*** อยู่ในรูปโคเอนไซม์บี12 (Heinrinch , 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 สูตรโครงสร้างทั่วๆไปของวิตามินบี12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 วิตามินบี12 และสารคล้ายวิตามินบี12 บางตัวที่พบในธรรมชาติ

Tribial name	Systematic name	Base of nucleotide	Occurrences
Vitamin B_{12}	5,6-dimethylbenzimida-zole cobamide	5,6-dimethylbenzimida-zole	***Bacillus;*** ***Propionibacterium;*** sewage; ***Streptomyces***
Pseudovitamin B_{12}	Adenyl cobamide	Adenine	sewage sluges; marine algae; ***Propionibacterium shermanii;*** ***P. arabinosum;*** ***P. pentosaceum***
Factor A(vitamin B_{12} pseudo-vitamin)	2-methyl adenyl cobamide	2-methyladenine	calf gut contents; calf and pig faeces; sewagesludge; marine algae; ***Propionibacterium***
Factor B (Etiocobalamin)	Cobioamide	no nucleotide	***Propionibacterium;*** ***Streptomyces;*** rumen samples
Factor C (Nocardia Factor I)	Guanyl cobamide	Guanine	calf faeces; ***Nocadia rugosa***
Factor G	Hypoxanthyl cobamide	Hypozanthine	pig faeces
Factor H	2-methyl hypoxan-thylcobamide	2-methyl hypoxanthine	pig and calf faeces
Factor I (vitamin B_{12}III)	5-hydroxybenzimi-dazolyl cobamide	5-hydroxybenzimidazole	***Propionibacterium;*** pig faeces; sewage sludge
-	5-methylbenzimi-dazolyl cobamide	5-methylbenzimidazole	***Propionibacterium;***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

			sewage
-	Benzimidazolyl-cobamide	Benzimidazole	***Propionibacterium;*** sewage

ที่มา: Goodwin (1963) , Perlman (1959) และ Perlman และคณะ (1962)

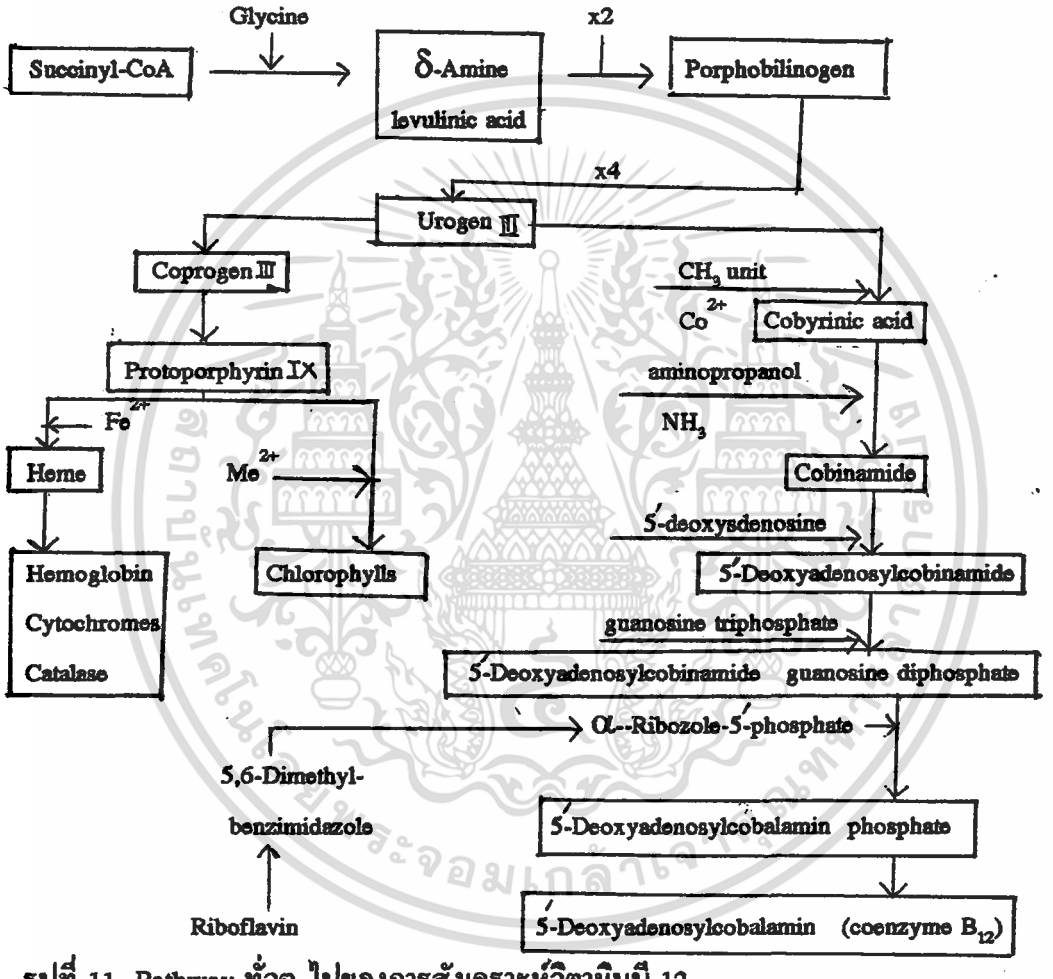
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 คุณสมบัติบางประการของวิตามินบี12 และสารคล้ายวิตามินบี12 บางตัวที่พบในธรรมชาติ

Name	Base of nucleotide	Microbiological tube assay			
		Orchromonas malhamensis	***Euglena gracilis***	***Escherichia coli***	***Lactobacillus leichmannii***
Cyanocobalamin	5,6-dimethylbenzimidazole	100	100	100	100
Factor A	2-methyladenine	0	60	50	40
Factor B	(none)	0	0	20	0
Factor G	Hypoxanthine	0	-	-	20-100
Factor H	2-methylhypoxanthine	0	-	40	15-40
Factor I (vit. B_{12} III)	5-hydroxybenzimidazole	?	-	50	35
Pseudovit. B_{12}	Adenine	0	100	10	50
Assay range	(as cyanocobalamin g/ml)	0.5-50	0.3-50	40-250	1.0-20

ที่มา: Sebrell Hamis (1968)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 Pathway ทั่วๆ ไปของการสังเคราะห์วิตามินบี 12

ที่มา: Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12 โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี12 คือ ***Lactobacillus leichmanii*** **ATCC 4797,** ***Lactobacillus leichmanii*** **ATCC 7830,*Euglena gracilis* ,*Orchromonas malhamensis*** ซึ่งมีการเจริญที่ตอบสนองวิตามินบี12 รูปต่างๆ

1. *Lactobacillus lactis* Donor (LLD) หรือ *L. leichmanii* ATCC 7830

ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี12 แทน เนื่องจากการใช้ ***L. lactis*** Donor มีข้อยุ่งยากเพราะต้องมีการแตกสลายของเซลล์ ทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ วิธีการวิเคราะห์ที่นิยมใช้สำหรับ **Lactobacillus** คือ วิธีการวัดความขุ่น โดยวัดความขุ่นของเซลล์หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-40 ชั่วโมง หรือโดยการไตเตรตหาปริมาณกรดแลคติกจากเชื้อหลังจากเจริญได้ 72 ชั่วโมง ปัญหาการใช้ Lactobacillus ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี12 คือ จุลินทรีย์พวกนี้มีความไวต่อดีออกซีไรโบไซด์และเกลือแกง และสามารถใช้สารที่คล้ายวิตามินบี12 เช่น Factor A ,Psuedo vitamin B_{12} และสารอื่นๆ ที่พบใน rumen,sewage sludge สิ่งต่างๆ ในลำไส้ การวิเคราะห์วิตามินบี12 ต้องอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1.0-20 ไมโครกรัมต่อลิตร ในรูปไซยาโนโคบาลามิน ถ้าปริมาณสูงเกินไปต้องทำให้เจือจางก่อนไปวิเคราะห์ (Sebrell และ Harris, 1968)

2. *Escherichia coli* (mutant type)

โดยปกติจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี12 ในการเจริญ แต่ Davis และ Mingioli (1950) ได้แยก ultraviolet-induced stable mytant No 113-3 ของ *E. coli* ที่ต้องการเมธิโอนิน และวิตามินบี12 ในการเจริญ สามารถตอบสนองต่อ Factor B หรือสารคล้ายคลึงวิตามินบี12 ไม่ตอบสนองต่อดีออกซีไรโบไซด์ ปกติใช้ ***E. coli*** (mutant) วิเคราะห์วิตามินบี12 ด้วยวิธี plate assay หรือ agar diffusion assay ปริมาณวิตามินบี12 ที่วิเคราะห์ได้กำหนดจำนวนไว้ระหว่าง 40-250 ไมโครกรัมต่อลิตร ในรูปไซยาโนโคบาลามิน (Sebrell และ Harris, 1968)

3. *Euglena gracilis* Var. bacillarus

เป็นพวก green photosynthetic flagellate ซึ่งต้องการวิตามินบี12 และ ไธอะมิน เป็นสารจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อนี้ ซึ่งจะใช้ในรูปอิสระเท่านั้น ส่วนวิตามินบี12 ที่ติดกับโปรตีนใช้ไม่ได้ เชื้อนี้มีคุณสมบัติต่างจาก ***Lactobacillus*** คือถ้าอาหารมีไธมิดีน หรือ ดีออกโซไรโบไซด์ ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อลิตรจะไม่เจริญ เชื้อนี้สามารถใช้ไฮดรอกโซโคบาลามินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยตรง ดังนั้น จึงไม่จำเป็นต้องใช้ไซยาไนด์ช่วยให้คงตัว การตรวจหาปริมาณวิตามินบี12 ทำได้โดยวัดความขุ่นหรือไตเตรตด้วยด่างหลังจากบ่มไว้ 8 วัน แต่สามารถลดเวลาลงเหลือ 5-6 วัน หากมีการปรับปรุงอาหารและสภาวะในการเจริญ (Sebrell และ Harris, 1968)

4. *Orchromonas malhamensis*

เป็น photosynthetic chrysomonas ซึ่งตอบสนองต่อวิตามินบี12 ได้คล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูง การใช้เชื้อตัวนี้ ตรวจหาปริมาณวิตามินบี12 ในอาหารได้ค่ามากกว่าใช้ ***L. leichmanii*** แสดงว่า ***O. malhmensis*** ตอบสนองต่อสารอื่นด้วย (Sebrell และ Harris, 1968) ***O.malhamensis*** สามารถตอบสนองวิตามินบี12 ได้ดีมาก แม้ว่าปริมาณวิตามินบี12 ในตัวอย่างมีเพียง 0.05 มิลลิไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อนี้ได้ ปริมาณวิตามินบี12 ที่วิเคราะห์ได้กำหนดจำนวนไว้ระหว่าง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อลิตร ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี12 โดยเชื้อชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยม เนื่องมาจากใช้เวลาในการบ่มเชื้อนาน 5-7 วัน และยังเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ได้ยากเพราะจะถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย (Sebrell และ Harris, 1968)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โยเกิต

โยเกิต เป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในคาบสมุทรบอลข่านเขตตะวันออกกลาง เคยรู้จักกันในลักษณะที่เป็นโยเกิตซึ่งไม่ได้เสริมแต่งกลิ่น รส

โยเกิตในทางการค้าแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. โยเกิตจืด (plain หรือ natural yoghurt)
2. โยเกิตที่ปรุงแต่งด้วยผลไม้ (fruit yoghurt)
3. โยเกิตที่ปรุงแต่งด้วยสารสังเคราะห์ (flavoured yoghurt)

ซึ่งทั้งสามแบบนี้ได้ทำการผลิตออกมาได้ทั้งแบบไม่ต้องกวน (set yoghurt) และแบบกวน (stirred yoghurt) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแบบกวนเป็นชนิดที่มีความนิยมมากกว่าแบบไม่ต้องกวน

นมเปรี้ยวกับโยเกิต

นมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์น้ำนมที่ได้จากการเติมเชื้อบักเตรีบางชนิดลงไปเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดแลคติค มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นของเหลวและชนิดแข็งตัวเป็นลิ่ม

ปัจจุบันนิยมดื่มหรือรับประทานนมเปรี้ยวกันอย่างแพร่หลาย เพราะมีคุณค่าทางอาหารไม่ยิ่งหย่อนกว่าน้ำนมสด และมีโปรตีนที่ย่อยง่ายกว่า นอกจากนี้ยังป้องกันมิให้คนที่ไม่มีเอนไซม์แลคแตส (lactase) ท้องเสียเนื่องจากดื่มนมสด

ตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 46 (พุทธศักราช 2523) เรื่องนมเปรี้ยว กำหนดว่า นมเปรี้ยว หมายถึง นมหรือผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากนมที่หมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรือไม่ทำให้เกิดพิษ และจุลินทรีย์ดังกล่าวยังคงมีชีวิตเหลืออยู่จากกรรมวิธีการหมักนั้น อาจจะเติมวัตถุอื่นที่จำเป็นต่อกรรมวิธีการผลิต หรืออาจปรุงแต่งสี กลิ่น รส ด้วยก็ได้

การผลิตนมเปรี้ยวนี้ มีในทุกประเทศที่ดื่มนมเป็นอาหารหมัก บางชนิดก็เป็นของพื้นเมือง บางชนิดก็เป็นสากล แต่ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ โยเกิตซึ่งเป็นนมเปรี้ยว ที่มีการผลิตมาตั้งแต่สมัยโบราณแถบบัลกาเรีย โยเกิตเป็นภาษาพื้นเมืองของภูมิภาคนี้ มีความหมาย ว่า ยา อายุวัฒนะ นอกจากโยเกิตแล้ว ยังมีนมเปรี้ยวอีกหลายประเภท เช่น บัตเตอร์มิลค์ คัลเจอร์บัตเตอร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมวิธีการผลิต

แม้ว่านมเปรี้ยวแต่ละชนิดจะมีลักษณะ มีกรรมวิธีในการผลิตและบักเตรีที่นำมาใช้ใน การผลิต ต่างกัน แต่โดยทั่วไปกรรมวิธีในการผลิตนมเปรี้ยวมีดังนี้

1. ทำการพาสเจอไรส์หรือสเตอริไลส์น้ำนมหรือหางนมเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่

2. เติม starter ซึ่งมีบักเตรีที่ต้องการใช้ในการหมักลงไปใช้ใน substrate ประมาณ 0.5-3.0 เปอร์เซนต์ เพื่อให้มีการเริ่มต้นของการหมัก มีกรดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีการเปลี่ยนแปลงตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ starter ที่ใช้ควรมีปริมาณกรดประมาณ 0.8-0.85 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นระยะที่บักเตรีอยู่ในสภาพว่องไว ถ้าเปอร์เซนต์กรดต่ำกว่านี้บักเตรีที่เป็น starter จะไม่อยู่ในสภาพว่องไว ในกรณีที่ใช้บักเตรี 2 ชนิดในการหมัก ถ้า starter มีเปอร์เซนต์กรดต่ำกว่านี้บักเตรีที่ ให้กลิ่นรสดีจะมีอยู่น้อย หลังจากเติม starter แล้วปล่อยให้เกิดการหมักจนน้ำนมกลายเป็นนม เปรี้ยวซึ่งจะเห็นมีตะกอนแข็งตัวเป็นลิ่ม(curd) สีขาวๆ ในระยะนี้ถือว่าเสร็จสิ้นกรรมวิธีในการผลิต สำหรับนมเปรี้ยวบางชนิด แต่สำหรับนมเปรี้ยวบางชนิดมีกระบวนการผลิตต่อในข้อ 3 ,4และ 5

3. นำนมเปรี้ยวที่ได้ในข้อ 2 ไปผ่านกระบวนการโฮโมจีไนส์ เพื่ออัดฉีดให้นมแตกกระจายเป็นผงละเอียดละลายตัวอยู่ในน้ำนม

4. นำน้ำนมที่อัดฉีดแล้วไปปรุงแต่งกลิ่นรสและสีให้พอเหมาะ เช่น ผสมน้ำตาล รสผลไม้โดยใช้ผลไม้นั้น

5. บรรจุขวด สำหรับผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจมีการกรองและพาสเจอไรส์ก่อนที่จะนำมาบรรจุขวด

ชนิดของบักเตรี

การผลิตนมเปรี้ยวอาจใช้บักเตรีซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ 1 หรือ 2 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของนมเปรี้ยว โดยปกติการผลิตนมเปรี้ยวนิยมใช้บักเตรี 2 ชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากพบว่าถ้าใช้บักเตรีเพียงชนิดเดียวจะไม่ได้กลิ่นรสที่ต้องการ และเมื่อใช้บักเตรี 2 ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตร่วมกันได้ ดี บักเตรีชนิดหนึ่งจะให้กรดแลคติค ส่วนอีกชนิดหนึ่งจะให้กลิ่นรส ทำให้นมเปรี้ยว ที่ได้มีลักษณะและกลิ่นรสที่ดี บักเตรีให้กรดแลคติคที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปได้แก่ ***Streptococcus lactis*** หรือ ***Streptococcus cremoris*** ส่วนบักเตรีที่ให้กลิ่นรส ได้แก่ ***Leuconostoc citrovorum*** หรือ ***Leuconostoc dextranicum*** บักเตรีทั้ง 2 ชนิดนี้ควรมีอยู่ในนมเปรี้ยวปริมาณใกล้เคียงกันหรืออยู่ในอัตราที่

เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการหมักพบว่า เมื่อนมเปรี้ยวมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดหนึ่งแล้ว บักเตรีที่ให้กรดจะเริ่มตาย ในตอนนี้จำนวนเซลล์จะลดลง แต่ยังมีการสร้างกรดแลคติคอย่างช้าๆ กรดที่เกิดขึ้นนอกจากจะเป็นกรดแลคติคซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูงแล้วยังมีกรดอะซิติคและสารอื่นๆ อีกเล็กน้อย

นมเปรี้ยวต้องมีคุณภาพหรือมาตราฐานดังต่อไปนี้

1. โปรตีนไม่น้อยกว่า ร้อยละ 1.5 ของน้ำหนัก
2. ตรวจไม่พบแบคทีเรีย ***E. coli*** ในอาหาร 0.1 กรัม
3. ไม่ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาล
4. ไม่มีวัตถุกันเสีย
5. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ ไม่มีสารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ลักษณะของโยเกิตที่ดี

1. เคิร์ดของนมเปรี้ยวต้องแข็งไม่อ่อนเหลว
2. เคิร์ดของนมเปรี้ยวต้องไม่หดตัวเป็นก้อนแยกอยู่ต่างหาก
3. นมเปรี้ยวต้องไม่เปรี้ยวเกินไป
4. นมเปรี้ยวต้องมีกลิ่นอะโรมาเฉพาะ
5. นมเปรี้ยวต้องไม่มีรสฝาด ขม

ความบกพร่องของนมเปรี้ยว

1. เมื่อบ่มครบตามเวลาแล้ว ไม่เกิดเคิร์ด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อนมเปรี้ยวอ่อนแอ หรือ นมที่นำมาผลิตเป็นนมแมสไตติส หรือ นมที่นำมาผลิตนั้นมีสารปฏิชีวนะ

2. เคิร์ดของนมเปรี้ยวเป็นเคิร์ดที่อ่อน ทั้งนี้เป็นเพราะนมที่นำมาผลิตเป็นนม ประเภทผิดปกติ หรือ การอุ่นนมใช้ความร้อนสูงนานเกินไป

3. นมเปรี้ยวมีรสชาติไม่ดี ทั้งนี้เป็นเพราะนมที่นำมาผลิตมีคุณภาพไม่ดี หรือเชื้อนม เปรี้ยวไม่บริสุทธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

<u>อุปกรณ์และวิธีการ</u>

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองได้แก่
   - ถั่วเหลือง ตรา ไร่ทิพย์
   - น้ำตาลซูโครส เด็กโตรส
   - ยูนิเพคติน (unipectin)
2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง
   - เชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** ATCC 13673
   - เชื้อ ***Bacilluc sp.* No. 4** จากโครงการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เสริมวิตามินบี 12 จากถั่วเหลือง ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   - เชื้อ **Lactic acid bacteria** YC 380
3. เครื่องมือที่ใช้ได้แก่
   - หม้อนึ่งความดันไอฆ่าเชื้อ (autoclave)
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
   - เครื่องเขย่า (shaker)
   - เครื่องปั่น (waring blender)
   - เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
   - เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (centrifuge)
   - ตู้บ่มเชื้อตั้งอุณหภูมิ (incubater)
   - เครื่องชั่งละเอียด
   - ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
4. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินงาน

1. การเตรียมเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง

- เชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** ATCC 13673 ทำการเลี้ยงในอาหาร Complete Media Broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ stationary flask แล้ววัดค่าความขุ่นของเชื้อ ด้วยเครื่อง spectrophotometerที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ 1.2-1.4

- เชื้อ ***Bacillus sp.*** **No. 4** จากโครงการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี12 จากถั่วเหลือง ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้ววัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometerที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ 0.3-0.4

- เชื้อ **Lactic acid bacteria (YC 380)** โดยทำการชั่งเชื้อมา 0.1 กรัม เลี้ยงในอาหาร MRS broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 43 องศาเซลเซียส ในสภาวะ stationary flaskเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การเตรียมนมถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการทดลอง

2.1 การศึกษาวิธีการแช่ถั่วแบบต่างๆ เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง

- แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 12 ชั่วโมง
- แช่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 6 ชั่วโมง
- แช่สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.113 เปอร์เซนต์ 8ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- แช่ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง
- นึ่งด้วยไอน้ำ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน30 นาที

นำถั่วที่ผ่านการแช่ด้วยวิธีต่างๆ ที่กล่าวมา มาปั่นรวมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยwaring blender ที่ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้อัตรา ส่วนระหว่างถั่วต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 6 หลังจากนั้น นำมาต้มให้เดือดเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ทำการกรองเอากากถั่วออกและเลือกน้ำนมถั่วเหลือง ที่มีลักษณะที่ดีมีกลิ่นถั่วเหลืออยู่น้อย และให้รสชาติดี ก็จะใช้วิธีการแช่ถั่วที่ทำให้เกิด เป็นนมถั่วเหลืองที่มีลักษณะตามความต้องการดังกล่าว มาใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การแปรรูปให้เป็นน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการทดลอง

นำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่ด้วยวิธีที่เราเลือกมาจากข้อ2.1 มาทำการปั่นรวมกับ น้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วย Waring blender ที่ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่างถั่ว ต่อ น้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 6 หลังจากนั้นนำมาต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วทำการแบ่งน้ำนมเป็นสองส่วน ส่วนแรกทำการกรอง เอากากถั่วออกก่อน แล้วตวงใส่ flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อีกส่วน ไม่ต้องทำการกรองเอากากถั่วออก โดยตวงน้ำนมใส่ flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทำการทดลอง

3. การหาอัตราส่วนระหว่างเชื้อ *Bacillus sp.* และ *Propionibacterium shermanii* โดยทำการศึกษาในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้

B=1 : P=1	B=1 : P=2	B=1 : P=3	B=1 : P=4	B=1 : P=5
B=2 : P=1	B=2 : P=2	B=2 : P=3	B=2 : P=4	B=2 : P=5
B=3 : P=1	B=3 : P=2	B=3 : P=3	B=3 : P=4	B=3 : P=5
B=4 : P=1	B=4 : P=2	B=4 : P=3	B=4 : P=4	B=4 : P=5

B= *Bacillus sp.* No. 4

P= *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673

(หน่วยทั้งหมดเป็น มิลลิลิตร ต่อ มิลลิลิตร)

ทำการทดลองโดยนำนมถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 2.2 มา เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซนต์ ในรูปของ syrup ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นทำการใส่เชื้อทั้งสองตามอัตราส่วนที่ได้กล่าวมาแล้ว แล้วบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ stationary flask เป็น เวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาทำการ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ตามวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) โดยจะเลือกอัตรา ส่วนของเชื้อที่ให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูง และมีกลิ่นที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หาเปอร์เซนต์ Inoculum ตามอัตราส่วนของเชื้อที่ได้คัดเลือกมาจากข้อ 3

โดยนำนมที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2 มาเติม ซูโครส 2 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวกับข้อ 3 ส่วนการเตรียมเชื้อทำได้โดย นำเชื้อในอัตราส่วนที่ได้เลือกตามข้อ3 มาผสมกันในอัตราส่วน ที่ได้มา แล้วเติมเชื้อผสมนี้ลงไปในน้ำนม โดยใช้เชื้อผสมนี้ในปริมาณ 1-10 เปอร์เซนต์ตามลำดับ หลังจาก นั้นบ่มในสภาวะ stationary flask ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หา ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) และเลือกปริมาณของเชื้อ ที่ผ่านการหมักในนมแล้วให้น้ำนมมีกลิ่นที่ดี และมีปริมาณโปรตีนที่ ละลายน้ำได้สูง

5. เป็นการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี12

โดยทำการขึ้นรูปน้ำนมถั่วเหลืองตามที่ได้กล่าวมาเติมซูโครส 2 เปอร์เซนต์ในรูปของ syrup เติมเชื้อ ***Bacillus sp.***และ ***Propionibacterium shermanii.*** ในอัตราส่วน และเปอร์เซนต์ที่ได้ผลจากการทดลองข้างต้นหลังจากนั้น บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 แล้วนำไป ทำการ heat up ที่ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วนำนมส่วนที่เหลือมาทำการเติม น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซนต์ และ เด็กโตรส 3 เปอร์เซนต์ ในรูปของ syrup ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้น เติมแลคติคแอซิดแบคทีเรีย ที่ได้ทำการเลี้ยงไว้ใน ปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ ทำการบ่มที่ 43 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำนมมาปั่นด้วย waring blender ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการกรองเอากาก ถั่วออก ผสมนมที่ได้กับ syrup ที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 25 เปอร์เซนต์ และยูนิเพคติน 0.3 เปอร์เซนต์ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำนมกับ syrup เท่ากับ 1 ต่อ 1

วิธีการเก็บตัวอย่างนมเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12 ทำได้โดย นำนมมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.1 เปอร์เซนต์ลงไป 1 มิลลิลิตร เติมอซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 5.5 ลงไป 8 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำมาวิเคราะห์ผลต่อไป

6. การตรวจสอบคุณภาพต่างๆ ของนม

ทำการวิเคราะห์ผลต่างๆ หลังการหมักด้วยแลคติคแอซิกแบคทีเรีย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ก่อนที่จะผสมกับน้ำเชื่อม โดยสิ่งที่เราทำการตรวจสอบได้แก่

- วัดความเป็นกรด (titrable acidity) ในรูปของกรดแลคติค ตามวิธีของ A.O.A.C (1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์
- วัดปริมาณโปรตีนละลายน้ำ ด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)
- วัดปริมาณของแข็งทั้งหมด ตามวิธีของ A.O.A.C (1980)
- วัดปริมาณวิตามินบี12 โดยวิเคราะห์ตามวิธี microbiological assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาวิธีการแช่ถั่วด้วยวิธีการต่างๆ

หลังจากนำถั่วมาปั่นรวมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วย Waring blender ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้อัตราส่วนถั่ว ต่อ น้ำ เท่ากับ 1ต่อ 6 แล้วนำมาต้มให้เดือด และปล่อยให้เย็นลง แล้วนำมากรองเอากากถั่วออก ได้ผลการทดลองคือ

1. น้ำนมที่ได้จากถั่วที่ผ่านการแช่น้ำที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำนมที่มีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นถั่วเล็กน้อย

2. น้ำนมที่ได้จากถั่วที่ผ่านการแช่น้ำที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำนมที่มีสีเหลืองอ่อนและออกขาวกว่า และ มีกลิ่นถั่วน้อยกว่า

3. น้ำนมที่ได้จากถั่วที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.113 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำนมที่เป็นสีเหลืองออกขาว แต่ว่ามีกลิ่นของ สารเคมีอยู่ในน้ำนม จึงไม่เลือกวิธีนี้มาใช้ในการทดลอง

4. น้ำนมที่ได้จากถั่วที่ผ่านการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า ได้น้ำนมที่มีสีเหลือง และมีกลิ่นของถั่วมาก

6. น้ำนมที่ได้จากถั่วที่ผ่านการนึ่งด้วยไอน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ทำการแปรรูปจากถั่วให้เป็นน้ำนมถั่วเหลืองได้ยาก (ปั่นให้ละเอียดได้ยากกว่า) เนื่องมาจากถั่วยังไม่บานเต็มที่และให้นมถั่วเหลืองที่จางเนื่องมาจากไม่มีน้ำช่วยละลายโปรตีนได้มากพอ

2. การแปรรูปให้เป็นน้ำนมถั่วเหลืองโดยไม่ได้ทำการกรองเอากากถั่วออก

2.1 การหาอัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** ได้ผลการทดลองคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) ในนมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากถั่วออกเพื่อหาอัตราส่วนเชื้อเริ่มต้น

P.shermanii (ml) / Bacillus sp (ml)	1	2	3	4	5
1	22.80	22.46	20.19	12.88	9.57
2	19.84	19.23	18.35	11.80	9.88
3	21.27	19.07	18.57	12.92	10.53
4	18.69	15.46	13.99	13.46	11.57

control = 21.04 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ control หมายถึง นมถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที และไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** ได้เท่ากับ 1.201

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ได้เท่ากับ 0.338

จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนของเชื้อที่ให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำมากที่สุดได้แก่ อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ เชื้อ ***Propionibacterium shermanii***เท่ากับ 1 ต่อ 1 และเมื่อทำการทดสอบกลิ่นของนมหมัก พบว่า เมื่อเราใช้เชื้อของ ***Bacillus sp.*** มากกว่า 3 มิลลิลิตร ต่อน้ำนม 100 มิลลิลิตร นมที่ผ่านการหมักจะให้กลิ่นที่ไม่ดี ไม่สามารถยอมรับได้ เช่นเดียวกับเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** เมื่อใช้มากกว่า 3 มิลลิลิตรต่อน้ำนม 100 มิลลิลิตร นมที่ผ่านการหมักให้กลิ่นที่ไม่ดี ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเช่นกัน แต่เมื่อใช้ ***Bacillus sp.***และ ***Propionibacterium shermanii*** อย่างละ 3 มิลลิลิตรหรือน้อยกว่าต่อน้ำนม 100 มิลลิลิตร นมที่ผ่านการหมักให้กลิ่นที่แตกต่างกันไม่มากนัก และสามารถยอมรับในเรื่อง ของกลิ่นได้ จึงได้ทำการคัดเลือกอัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 มาทำการทดลองหาเปอร์เซนต์ inoculum ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ นำน้ำนมถั่วเหลือง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ซึ่งยังไม่ได้ผ่านการหมักด้วยเชื้อ มาหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่ได้มากกว่าการใช้เชื้อผสมของ ***Bacillus sp.***และ ***Propionibacterium shermanii*** บางอัตราส่วน ทั้งนี้เนื่องจากว่า เชื้อ ***Bacillus sp.*** มีเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนให้เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำ จึงสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากขึ้น แต่เชื้อ ***Bacillus sp.***และ ***Propionibacterium shermanii*** ก็สามารถนำโปรตีนส่วนนั้นไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้เช่นกัน ดังนั้น ถ้าเราใช้อัตราส่วนของเชื้อที่ไม่เหมาะสม จะทำให้ได้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำซึ่งเป็นโปรตีนที่ผู้บริโภคสามารถนำไปใช้ได้โดยตรงลดลง

2.2 เป็นการหาเปอร์เซนต์ของเชื้อตามอัตราส่วนที่ได้คัดเลือกมา คือ ***Bacillus sp.*** ต่อ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยทำการผสมเชื้อทั้งสองในอัตราส่วนดังกล่าวและทดลองเติมลงไปในนม 1,2 .... จนถึง 10 เปอร์เซนต์ ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) ในนมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากถั่วออกเพื่อหาเปอร์เซนต์ inoculum ของเชื้อผสม

เปอร์เซนต์ของเชื้อผสม	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
1	23.84
2	21.72
3	22.07
4	21.03
5	21.15
6	21.07
7	18.46
8	21.23
9	20.15
10	21.19

ค่าการดูดกลืนแสงของเริ่มต้นเชื้อ ***Bacillus sp.*** เท่ากับ 0.340

ค่าการดูดกลืนแสงของเริ่มต้นเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1.302

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่า การใช้เปอร์เซนต์ของเชื้อผสม 1,2,3 เปอร์เซนต์ จะให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงจึงทำการคัดเลือกเอาเปอร์เซนต์ของเชื้อผสมเหล่านี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

3. การแปรรูปให้เป็นนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออก

3.1 การหาอัตราส่วนระหว่างเชื้อ ***Bacillus sp.*** กับ ***Propionibacterium shermanii*** ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร)ในนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออกเพื่อหาอัตราส่วนของเชื้อเริ่มต้น

P. shermanii (ml) / Bacillus sp. (ml)	1	2	3	4	5
1	23.92	20.38	20.23	19.76	18.57
2	22.49	20.69	19.76	20.30	20.42
3	21.84	23.07	23.23	20.72	18.88
4	23.46	21.92	21.42	21.61	21.69

ค่าการดูดกลืนแสง ของเชื้อ ***Bacillus sp.*** เท่ากับ 0.385

ค่าการดูดกลืนแสง ของเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1.387

จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 เป็นอัตราส่วนที่ให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงที่สุด แต่เมื่อทำการทดสอบกลิ่นแล้วพบว่า อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***P. shermanii*** เท่ากับ 3 ต่อ 4 ให้กลิ่นของนมหลังผ่านการหมักดีที่สุด จึงนำอัตราส่วนนี้ไปทำการทดสอบหาเปอร์เซนต์ inoculum ต่อไป แต่ทั้ง อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***P. shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 และ 3 ต่อ 4 นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากกว่า นมถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านการหมัก ด้วยเชื้อผสมดังกล่าว

3.2 เป็นการหาเปอร์เซนต์ของเชื้อตามอัตราส่วนที่ได้คัดเลือกมา คือ ***Bacillus sp.*** ต่อ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 3 ต่อ 4 โดยทำการผสมเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน ดังกล่าวและทดลองเติมลงไปในนม 1,2 .... จนถึง 10 เปอร์เซนต์ ได้ผลการทดลองแสดง ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร)ในนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออกเพื่อหาเปอร์เซนต์ inoculum ของเชื้อผสม

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณโปรตีน(กรัมต่อลิตร)
1	19.88
2	20.99
3	20.19
4	19.49
5	21.99
6	19.88
7	19.65
8	17.76
9	17.57
10	17.23

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Bacillus sp.*** เท่ากับ 0.340

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1.382

พบว่า ที่ปริมาณของเชื้อผสมเท่ากับ 2-5 เปอร์เซนต์ เป็นช่วงที่ให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาก และในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และนมที่ได้ให้กลิ่นที่ยอมรับได้ จึงคัดเลือกปริมาณเชื้อในช่วงดังกล่าวมาทำการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การผลิตให้เป็นโยเกิตและผสมกับไซรับให้เป็นนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Bacillus sp.*** เท่ากับ 0.342

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1.335

4.1 ผลการทดลองจากนมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากออก ใช้อัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 ได้ผลการทดลองคือ

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp*** และ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 กับปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) ในนมที่ไม่กรองเอากากถั่วออก

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณโปรตีน(กรัมต่อลิตร)
1	23.07
2	2042
3	20.30

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Bacillus sp.*** เท่ากับ 0.342

ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1.335

4.2 ผลการทดลองจากนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากออก ใช้อัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 เนื่องจากว่าเป็นอัตราส่วนที่ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้มาก ได้ผลการทดลองคือ

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp*** และ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 กับปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) ในนมที่กรองเอากากถั่วออก

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณโปรตีน(กรัมต่อลิตร)
1	20.88
2	19.46
3	18.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดลองจากนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากออก ใช้อัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 3 ต่อ 4 เนื่องจากว่าเป็นอัตราส่วน ที่ให้กลิ่นของนมหมักที่ดี ได้ผลการทดลองคือ

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp*** และ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 3 ต่อ 4 กับปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) ในนมที่ กรองเอากากถั่วออก

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณโปรตีน(กรัมต่อลิตร)
2	18.15
3	17.65
4	18.34
5	20.42

5. การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มด้วยแลคติกแอซิกแบคทีเรีย

เมื่อนำมาผลิตเป็นนมเปรี้ยวพร้อมดื่มและทำการทดสอบชิม พบว่า นมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออกและที่ไม่ได้กรองเอากากถั่วออก ไม่มีความแตกต่างในด้าน กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสจึงคัดเลือกแบบที่ไม่กรองเอากากถั่วออกมาใช้ทำการทดลองต่อไป เนื่องจากจะให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับนมที่กรองเอากากถั่วออก

นำนมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากถั่วออกมาทดลองต่อไป โดยใช้อัตราส่วนของเชื้อ ***Bscillus sp.***ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 และใช้เชื้อผสมในปริมาณ 1,2 และ 3 เปอร์เซนต์ ซึ่งทำการวิเคราะห์ก่อนเติมไซรับ โดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ รวมทั้งปริมาณ วิตามินบี12 ดังแสดงในตารางที่ 17,18,19,20 และ 21

ตารางที่ 17 ปริมาณกรดแลคติค (ร้อยละ) ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณกรดแลคติค (ร้อยละ)
1	0.76
2	0.79
3	0.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
1	3.36
2	3.36
3	3.37

ตารางที่ 19 ปริมาณของแข็ง (ร้อยละ) ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ปริมาณของแข็ง (ร้อยละ)
1	27.93
2	27.76
3	27.66

ตารางที่ 20 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ก่อนลงเชื้อแลคติค (กรัมต่อลิตร)	หลังลงเชื้อแลคติคแล้วบ่ม 24 ชั่วโมง(กรัมต่อลิตร)
1	25.04	6.653
2	20.42	6.423
3	20.31	6.346

ตารางที่ 21 ปริมาณวิตามินบี 12 ของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย

เปอร์เซนต์เชื้อผสม	ก่อนลงเชื้อแลคติก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	หลังลงเชื้อแลคติกแล้วบ่ม 24 ชั่วโมง(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	2.87×10^{-2}	1.94×10^{-3}
2	3.07×10^{-2}	2.40×10^{-3}
3	3.5×10^{-2}	2.34×10^{-3}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

control = $9.5x10^{-4}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ control หมายถึง นมถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที และไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเป็นการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี12 โดยขั้นแรกเป็นการ **หาวิธีการแช่ถั่วด้วยวิธีการต่างๆ** โดยเมื่อนำถั่วมาแปรรูปให้เป็นนมถั่วเหลืองแล้ว มีรสชาติดี และมีกลิ่นเหม็นเขียวของถั่วเหลือน้อยที่สุด จากการทดลองพบว่า

1. การนำถั่วมาล้าง ให้สะอาดและเลือกเมล็ดเสียออก นำมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำมาแปรรูปให้เป็นนมถั่วเหลืองตามกรรมวิธี พบว่าได้นมถั่วเหลืองสีขาวนวล มีกลิ่นเหม็นเขียวเหลืออยู่น้อยกว่าวิธีอื่นๆ

2 การนำถั่วมาแช่ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต จะให้นมถั่วเหลืองที่มีกลิ่นของ สารเคมีหลงเหลืออยู่

3. การนำถั่วมาล้างแล้วนึ่งด้วยไอน้ำเป็นเวลา 30 นาที ให้นมถั่วเหลือง ที่มีลักษณะจางเนื่องมาจากว่า ถั่วยังพองตัวไม่เต็มที่ และมีน้ำที่จะไปละลายโปรตีน ในถั่วออกมาได้น้อย จึงเป็นวิธีการที่ไม่ดี

4. การนำถั่วเหลืองมาแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงนั้น ให้นมถั่วเหลืองที่มีลักษณะคล้ายกับน้ำนมที่มาจากถั่วที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่ว่ามีกลิ่นของถั่วเหลืออยู่มากกว่า และใช้เวลาในการแช่ถั่วที่นานกว่า จึงเลือกการแช่ถั่วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงมาใช้ทำการทดลองต่อไป

การหาอัตราส่วนระหว่างเชื้อ *Bacillus sp.* กับเชื้อ *Propionibacterium shermanii*

1. นมถั่วเหลืองที่ทำการกรองเอากากถั่วออก พบว่าอัตราส่วนของเชื้อทั้งสองเท่ากับ 3 ต่อ 4 โดยใช้เชื้อผสมในอัตราส่วนดังกล่าวปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ จะทำให้นมหลัง จากผ่านการหมักด้วยเชื้อทั้งสองแล้วมีกลิ่นที่ดี และมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่ในน้ำนมมาก แต่เมื่อใช้อัตราส่วนของเชื้อทั้งสองเท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยใช้เชื้อผสมในอัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 1 เปอร์เซนต์ จะให้นมหลังผ่านการหมักมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากที่สุด แต่ให้กลิ่นถั่วอยู่ มากกว่าที่อัตราส่วนของเชื้อเท่ากับ 3 ต่อ 4 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **นมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากออก** พบว่าอัตราส่วนของเชื้อที่ใช้เท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยใช้เชื้อผสมในอัตราส่วนดังกล่าวในปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ จะให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่ในน้ำนมสูง และมีกลิ่นที่ดี

แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่อยู่ในน้ำนมหลังผ่านการหมักด้วยเชื้อดังกล่าว ระหว่างนมถั่วเหลืองที่กรองเอากากถั่วออก โดยใช้อัตราส่วนเชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 3 ต่อ 4 ตามลำดับ ในปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ กับนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้ทำการกรองเอากากถั่วออก โดยใช้อัตราส่วนและเปอร์เซนต์เชื้อ ***Bacillus sp.*** ต่อ ***Propionibacterium shermanii*** เท่ากับ 1 ต่อ 1 ในปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ พบว่าในนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้ทำการกรองเอากากถั่วออกให้ปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่ในน้ำนมสูงกว่า นมถั่วเหลืองที่ทำการกรองเอากากถั่วออก

จากการทดลองนี้ พบว่า การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมวิตามินบี12 จากนมถั่วเหลือง ที่ไม่ได้กรองเอากากถั่วออก ใช้อัตราส่วนของเชื้อ ***Bacillus sp.*** และ ***P. shermanii*** อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร หมักในนมถั่วเหลือง 18 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ stationary flask และเติมเชื้อแลคติคในปริมาณ 5 เปอร์เซนต์ หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 43 องศาเซลเซียสจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุด

สรุปขั้นตอนการผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่ได้จากการทดลอง

ถั่วเหลือง

↓ **แช่น้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง**

สะเด็ดน้ำให้แห้ง

ปั่นรวมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วย waring blender

ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 5 นาที ใช้อัตราส่วน ถั่วต่อน้ำ= 1ต่อ 6

นมถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตร

↓ **ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส 15นาที**

cooling แล้วเติม sucrose 2 %

Bacillus sp. **อายุ 18 ชั่วโมง OD 0.3-0.4 0.5 มิลลิลิตร**

Propionibacterium shermanii **อายุ 48 ชั่วโมงOD 1.2-1.4 0.5 มิลลิลิตร**

↓ **บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นมถั่วเหลืองหมัก

↓ **heat up ที่ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที**

cooling แล้วเติม sucrose 2 % dextrose 3 %

Lactic acid bacteria 5 % บ่มที่ 43 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

โยเกิตนมถั่วเหลือง

↓ **ปั่นด้วย waring blender ความเร็วเบอร์ 5 เป็นเวลา 2 นาที แล้วกรองเอากากถั่วออก เติม syrup 100 มิลลิลิตร (syrup ประกอบด้วย sucrose 25 % และ unipectin 0.3%)**

นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

ด้วยกรรมวิธีในการผลิตข้างต้นสามารถลดกลิ่นถั่วในผลิตภัณฑ์ลงได้ สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนละลายน้ำและปริมาณวิตามินบี12 ได้มากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. รสชาติ กลิ่นและเนื้อสัมผัสพบว่า เมื่อนำนมทั้งสองแบบ คือแบบที่กรอง เอากากถั่วออก และไม่กรองเอากากถั่วออกโดย ใช้อัตราส่วนของเชื้อดังที่ได้กล่าวมามาทำเป็นนมเปรี้ยวพบว่ามิได้ให้ข้อแตกต่างที่ชัดเจน และยอมรับได้ทั้งสองแบบ

2. ในการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนของเชื้อ และเปอร์เซนต์ของเชื้อตามที่ได้กล่าวมานั้น ก่อน inoculum เชื้อที่ใช้ในการทดลอง ต้องทำการฆ่าเชื้อนมถั่วเหลืองด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ซึ่งพบว่าการทำเช่นนี้ จะทำให้นมถั่วเหลืองเกิดการ over cook ทำให้การลดกลิ่นถั่วเป็นไปได้ยาก เมื่อปฏิบัติงานจริงจึงควรใช้การพาสเจอไรส์หรือสเตอริไลส์ น้ำนมถั่วเหลืองก็เป็นการเพียงพอ

3. เวลาที่ใช้ในการหมักเชื้อผสมของ ***Bacillus sp.*** และ ***Propionibacterium shermanii*** เป็นเวลา 18 ชั่วโมงนั้น อาจยังเป็นช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสม ควรทำการทดลองเพื่อหาช่วง ระยะเวลาในการหมักเชื้อทั้งสองในนมถั่วเหลืองที่จะให้มีปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้อยู่มาก และให้ปริมาณของวิตามินบี12 อยู่มากเช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงว่า เชื้อ ***Bacillus sp.*** เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งถ้าในผลิตภัณฑ์นั้นมีสปอร์ของเชื้ออยู่จะทำให้ผลิตภัณฑ์ เสียเร็วขึ้น และเชื้อ ***P. shermanii*** ก็สามารถสร้างกรดได้เช่นเดียวกัน ถ้าใช้ระยะเวลาในการหมัก ไม่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของนม ลดต่ำลงจนยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาระยะเวลาในการหมักต่อไป

4. หลังจากทำการหมักเชื้อ ***Bacillus sp.*** และ ***P. shermanii*** ในนมถั่วเหลืองที่ไม่กรองเอากากถั่วออกจนครบเวลา จึงทำการปั่นนมอีกครั้งแล้วทำการกรองเอากากถั่วออก เนื่องจากว่านมที่ได้ในขั้นตอนนี้มีลักษณะข้นเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นปัญหากับการเจริญและการสร้างกรดของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย หรือกากถั่วอาจจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าว เพราะจากการทดลองนี้ไม่ได้นำนมมาปั่นและกรองเอากากออกก่อนการ heat up ทำให้หลังผ่านการหมักด้วยแลคติคแอซิกแบคทีเรีย จึงมีการผลิตกรดแลคติคเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหรืออาจเนื่องมาจากการเจริญของเชื้อ ***P. shermanii*** ในนมทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของนมต่ำลง เนื่องจากเชื้อชนิด นี้สามารถสร้างกรดได้จนทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของนมไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ แลคติคแอซิกแบคทีเรีย แต่เมื่อนำมาผลิตเป็นนมเปรี้ยวนั้นพบว่า ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวพอกับผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวในท้องตลาด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของกรดโพรพิโอนิคและกรดอื่นๆ จากเชื้อ ***Propionibacterium shermanii*** ที่ใช้ในการทดลองเพราะเชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างกรดได้

5. นอกจากนี้ควรเพิ่มอัตราส่วนของถั่วต่อน้ำที่ใช้ในการทดลอง เป็น 1 ต่อ 8 หรือ 1 ต่อ 10 หรือมากกว่านี้ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากว่าหลังจากเสร็จสิ้นการผลิตยัง มีปริมาณของกาก ถั่วเหลืองเหลืออยู่มาก

6. น้ำตาลที่ใช้ในการทดลองก็มีผลต่อการเจริญและการทำงานของเชื้อ และยังมีผลต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ด้วยจึงควรหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลให้เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของเชื้อ และให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่น รส ที่ดี โดยทั้งนี้ต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตด้วย

7. นอกจากนี้อาจมีการผสมโยเกิตกับน้ำผลไม้หรือแยมผลไม้ เพื่อเสริมคุณค่าทางอาหารและ ปรุงแต่งกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. COMPLETE MEDIUM ประกอบด้วย

Acid hydrolysate of casein (casemino acid)	1.0 กรัม
Casitone	1.5 กรัม
NaH_2PO_4	1.6 กรัม
K_3PO_4	1.6 กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10.0 มก.
$CoSO_4.7H_2O$	12.0 มก.
Biotin	3.0 มก.
Pantothenic acid	4.0 มก.
Glucose	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
ปรับปริมาตรเป็น	1000.0 มล.

2. NUTRIEN BROTH ประกอบด้วย

Beef extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
ปรับปริมาตรเป็น	1000.0 มล.

3. MRS BROTH ประกอบด้วย

Beef extract	10.0 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
K_2HPO_4	2.0 กรัม
$MnSO_4 .7H_2O$	0.05 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
Triammonium citrate	2.0 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yween 80	1.0 มล.
ปรับปริมาตรสารละลายเป็น	000.0 มล.
มะเขือเทศ	40.0 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีของโยเกิต ตามวิธีของ A.O.A.C (1984)

1. pH ของโยเกิต

ใช้ Glass electrod จุ่มลงในเนื้อของนมเปรี้ยวแล้วอ่านค่า pH ออกมา

2. การหาของแข็งทั้งหมดในโยเกิต (% total solid in yogurt)

- ใช้กระดาษฟอยล์ซึ่งสอดไส้ด้วยกระดาษกรอง แล้วชั่งจนได้น้ำหนักคงที่
- เกลี่ยโยเกิตโดยประมาณ 1 - 2 กรัมลงบนกระดาษกรองแล้วชั่งหาน้ำหนักคงที่ของโยเกิต
- อบใน hot air oven อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 - 2 ชั่วโมง
- ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์ของของเข็งต่อไป

$$\% \text{ ของแข็งทั้งหมด} = \frac{\text{น้ำหนักของโยเกิตที่ชั่งได้ครั้งสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักของโยเกิตที่ใช้}} \times 100$$

3. การวิเคราะห์หาความเป็นกรดในโยเกิต (%lactic acid)

สารเคมี

- น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือดนาน 30 นาที
- สารละลายมาตรฐาน 0.1 N เตรียมจาก NaOH 4 กรัมเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 30 มล. เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตราฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลคติกดังนี้

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัมต่อ 100 กรัม)} = \frac{N \times V \times 90.08 \times 100}{1000 \times 2}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตราฐาน 0.1 N NaOH

V = มล.ของสารละลายมาตราฐาน 0.1 N NaOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนละลายน้ำ โดยใช้ Lowry method (1951)

1. Na_2CO_3 2 % ใน 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร
2. 2.7 % (w/v) sidium potassium tartrate 1 มิลลิลิตร
3. 1 % (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ 1 มิลลิลิตร
4. Alkaline copper solution ประกอบด้วย สารข้อ 1. จำนวน 100 มิลลิลิตรและสารข้อ 2. และ3. อย่างละ 1 มิลลิลิตร
5. 1 N Folin - Ciocalteau reagent ผสมกับน้ำกลั่น 1:1 ก่อนใช้

วิธีการ

- เก็บตัวอย่างนมมา 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที
- ดูดส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่แห้งและสะอาด
- เติม Alkaline ข้อ 4. จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที
- เติม Folin - Ciocalteau reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- วัด OD. ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การเตรียมสารและการวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน บี 12

1. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ในตัวอย่างที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อใน complete medium broth เป็นเวลา 4 วัน โดยวิธี Turbidimetric method of microbiological assay (american type culture collection , 1972) ใช้เชื้อ ***Lactobacillus leichmanii*** (ATCC 7830) เป็น test organism ใช้ assay medium ของ Difo (B 12 Assay medium USP for Lactobacillus)

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม 0.1% KCN 1 มิลลิลิตร และ 0.1 M acetrate buffer pH 5.5 จำนวน 8 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วย vortex mixture ทันทีแล้วนำไปให้ความร้อน 100 - 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์ต่อไป เพราะว่าใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะที่นึ่งอยู่ cobalamin จะถูปล่อยออกจากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนใส ข้างบน เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากวิตามินบี 12 ให้อยู่ในช่วงที่สามารถอ่านค่าได้ โดยเจือจางเป็นอัตราส่วน 1:10, 1;100, 1:1000 สำหรับเตรียมวิเคราะห์ต่อไป ในขณะเดียวกันก็นำเชื้อมาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่น

1.2 การเตรียมสารละลายวิตามินบี 12 มาตราฐาน

1.2.1 วิธีเตรียม stock solution

ละลายผลึกของวิตามินบี 12 (cyonocobalamin) ของบริษัท Merck+Co;Inc 1 มิลลิกรัม กับ KCN 1 กรัมใน 0.1 M acetrate buffer pH 5.5 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลอมปลาย ampule ให้ติดกัน นำไปต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น stock solution มีวิตามินบี 12 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2.2 วิธีเตรียม working standard ของวิตามินบี 12

วิธีเตรียม solution A ดูดสารละลายวิตามินบี 12 จากหลอด ampule 0.5 มิลลิลิตร และ KCN 0.05 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร จะได้ working standard มีวิตามินบี 12 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 เตรียมเครื่องแก้วที่ใช้ เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ต้องปราศจาก วิตามินบี 12 ต้องนำไปแช่ใน cleaning solution 6 - 12 ชั่วโมงหรือล้างให้สะอาดด้วยผงขัด แล้วล้างน้ำประปาให้หมดกรดหรือผงขัด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง ทำให้แห้ง นำเข้าตู้อบ 180 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง

1.4 การเตียม L. leichmanii ATCC 7830

ถ่ายเชื้อ stock culture ลงในอาหาร Bacto B 12 inoculum agar (อาหารสูตรเดียวกับภาคผนวก ก ข้อ 3) โดยวิธี stab บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 40 ชั่วโมง (ถ้าจะให้ดีใช้ 24 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อต่อเนื่องกัน 7 - 10 ครั้ง

1.5 การเตรียม inoculum

ถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ลงใน micro inoculum broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18 - 40 ชั่วโมง นำไปปั่นให้เซลตกที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 - 20 นาที รินน้ำใสทิ้ง ล้างเซลด้วย single strenghtassay medium 10 มิลลิลิตร หรือ normal suline 30 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วนำไปเจือจางเป็น 1:1000 หรือเจือจางจนวัดได้ 0.045 ด้วย single strenght assay medium หรือ normal suline

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

การทำ standard calibration curve ดูด working standard solution B ของวิตามินบี 12 ซึ่งวิตามินบี 12 เข้มข้น $5*10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดวิเคราะห์ปริมาตร 0 , 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ละหลอดเจือจางเป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นเติม assay medium หลอดละ 1 มิลลิลิตร รวมปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม เขย่าให้เข้ากัน

สำหรับตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ดูดตัวอย่างที่เตียมได้จากข้อ 1.1 ใส่ในหลอดวิเคราะห์ปริมาตร 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม assay medium หลอดละ 1 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 2 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

นำ standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำให้เย็นทันที

ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ทุกครั้งจะต้องทำ standard curve พร้อมกันไปทุกครั้ง เนื่องจากสภาพที่นึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ***L.leichmanii*** (ATCC 7830)

การ inoculate เชื้อ ***L.leichmanii*** (ATCC 7830)

inoculate เชื่อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.5 ลงใน standard assay tube และ sample assay tube หลอดละ 1 หยด ใช้ long tip pipette ยกเว้นหลอดที่เป็น blank บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 40 ชั่วโมง

การวัดการเจริญของ ***L.leichmanii*** (ATCC 7830)

วัดการเจริญด้วยเครื่อง spectinic 20 (Baush & Lomb) ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดแสงของ suspention ในแต่ละหลอด

การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

ปริมาณวิตามินบี 12 หาได้จาก standard curve และสูตร

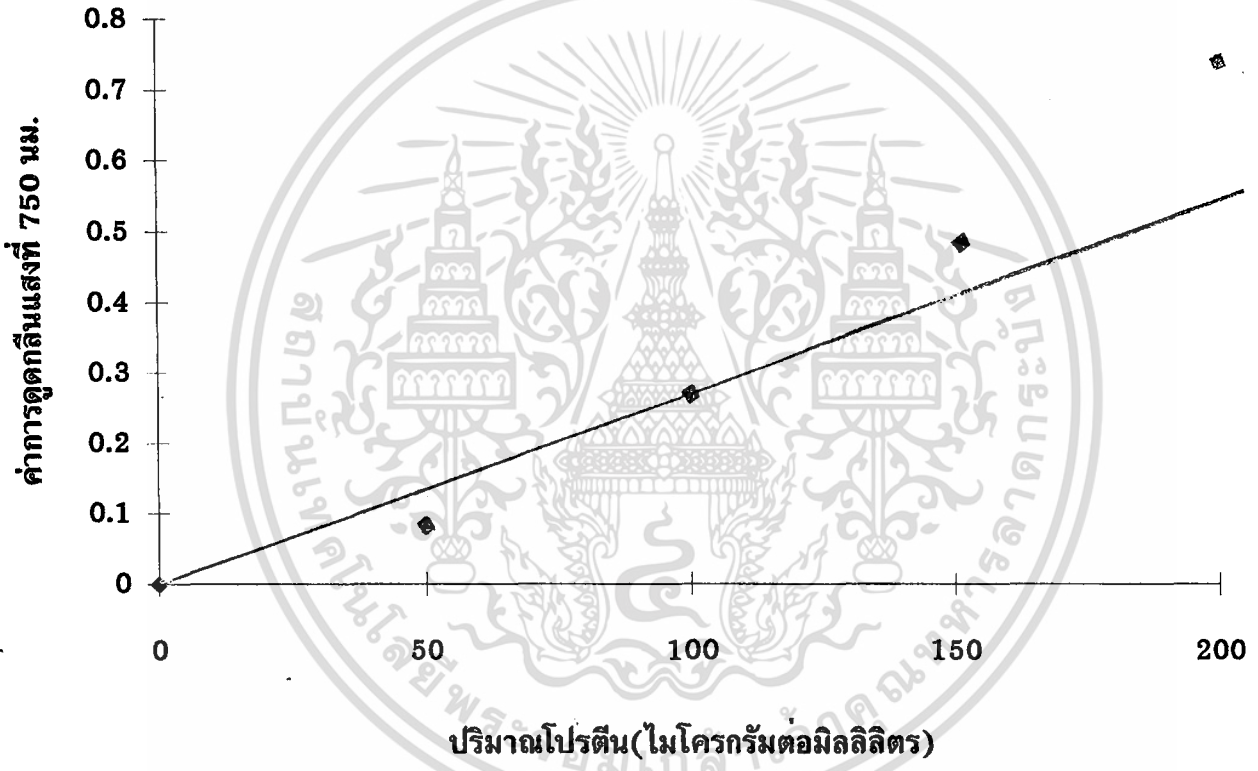
$$\text{ปริมาณวิตามินบี 12 } (5 \times 10^{-5} \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยวิตามินบี 12}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง}} \times \text{dilution factor}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

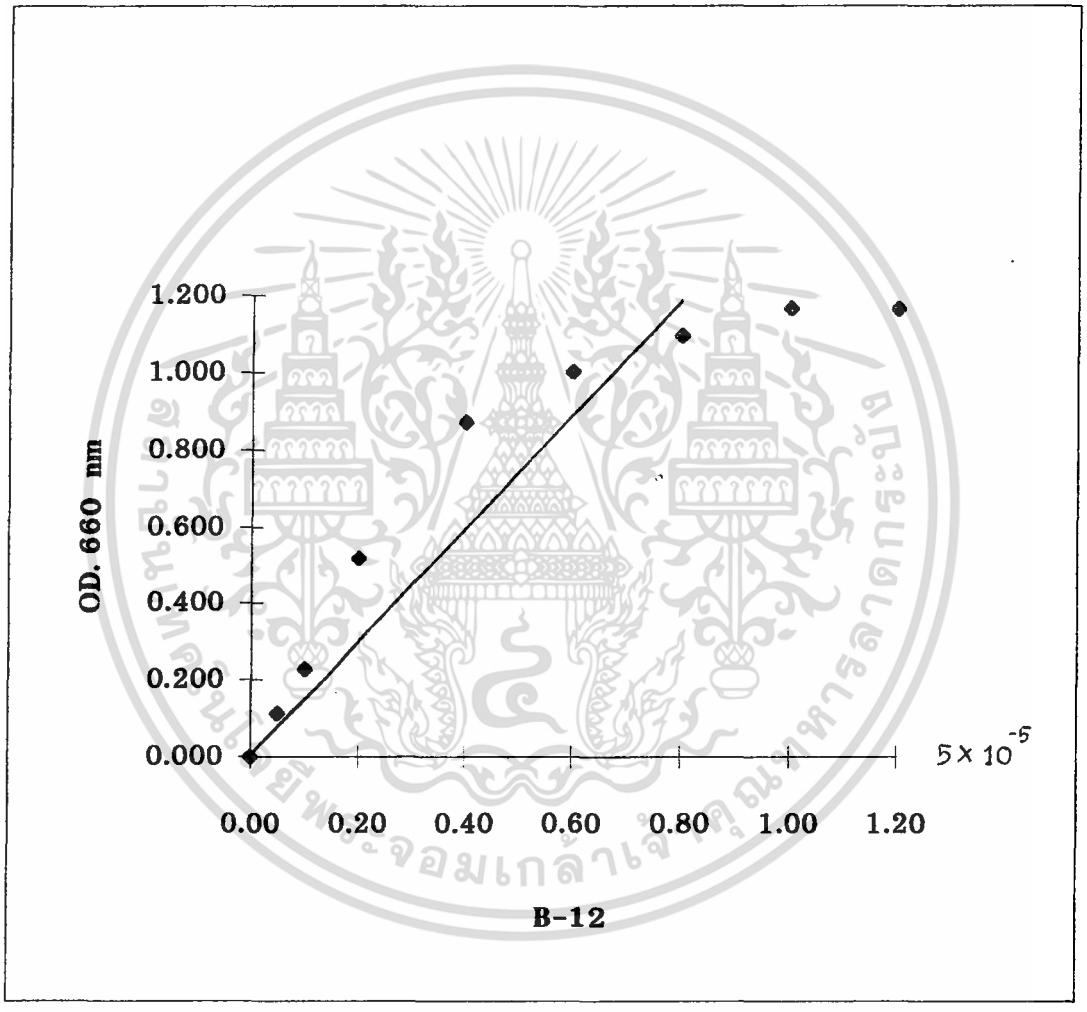
2. <u>วิธีการย้อมแกรม</u>

เกลี่ยเชื้อจากตัวอย่างลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาผ่านเปลวไฟไปมา 2 - 3 ครั้ง หยดสี crystral violet ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % จนหมดสี จากนั้นหยด sulfanin - o ลงบริเวณที่มีเชื้อนาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำไปส่องดูการติดสีแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้



รูปที่ 13 กราฟมาตราฐานของปริมาณวิตามินบี12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชุมแสง วิภาพเสถียรกุล. 2537. รายงานสัมมนาเรื่อง การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการสร้างสปอร์ของ ***Bacillus subtilis.*** เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลือง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2520. การศึกษาทดลองทำเครื่องดื่มนมเปรี้ยวจากถั่วเหลือง. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(บางเขน).

โอวาท นิติพัฒน์ประภาศ. 2529. อาหารเพื่อสุขภาพ พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิชย์จำกัด

Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1980. Official Method of Analysis. Georage Banta Co., Ltd., Washington, D.C. 1094 p.

Ariyama, H. 1963. Process for manufacture of synthetic yogurt from soybean. U.S. Patent. 3,096,177 July, 2.

Deeth, H.X. and Tamime,A.Y. 1981. Yogurt:Nutritive and Therapeutec Aspects. J. of Food Protection. 44 : 78-86.

Grigoroff, S. 1905. La Lyophilisation des Culture de Yogurt, p.289-290. In A.Y. Tamime and R.K. Robinson. Yogurt: Science and Technology. Pergamon Press, Oxford.

Jacques delente and Kurt ladenburg. 1975. Oligosaccharides in Soybean Meal. J. Fd. Sci. 40: 114-118.

Kanda, H. , wang,H.L.,Hesseltine, C.W. and Warner,K. 1976. Yogurt Production by Lactobacillus Fermentation of Soybean Milk. Process Chemistry. may, 23.

Kooranee Tuitemwong and Daniel Y.C. Fung. 1991. Microbiological Study of Tofu. J. Food Protection. 54 No. 3: 212-216.

Lee, G.J. and Jugo,G.R. 1978. Role of acetaldehyde in metabolism. J. of Dairy Sci. 61: 1209-1216.

Metchnikoff, E. 1910. The Prolongation of life. p.115-128. *in* A.Y. Tamime and R.K. Robinson. Yogurt:Science and Technology. Pergamon Press, Oxford.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mital, B.K. and Steinlraus,K.H. 1976. Flavor acceptability of unfermented and lactic fermented soy milks. J. Milk Food Technology. 39: 342-344.

Orla-Jensen, S. 1931. Dairy Bacteriology. p. 259-270. *In* Tamime,A.Y.and Robinsin,R.K. Yogurt:Science and Technology. Pergamon Press, Oxford.

Robert Macrae and Ahmad Zand-Moghaddam. 1978. Oligosaccharides of Lupinseeds. J. Sci. Fd. Agric. 29: 1083-1086.

Smith, A.K. and Circle,J. 1978. Soybean: Chemistry and Technology. The AVI Publishing Co. , Connecticyt. p. 470.

Tamime, A.Y. 1977. In Some Aspects of the Priduction of Yogurt and Condense Yogurt, p. 11-14. *In* Tamime,A.Y. and Robinsin, R.K. Yogurt:Science and Technology. Pergamon Press. Oxford.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้