เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในการผลิตโยเกิร์ต

นางสาวอรพิน บุญเกิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION IN YOGURT PRODUCTION

Miss Orrapin Bunkoed

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในการผลิตโยเกิร์ต
โดย	นางสาวอรพิน บุญเกิด
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน)

อรพิน บุญเกิด : เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในการผลิตโยเกิร์ต (EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION IN YOGURT PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุเทพ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.รมณี สงวนดีกุล, 104 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ รวมถึง ผักดอง น้ำผลไม้ และนมดิบ สามารถคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียรวมทั้งสิ้น 53 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 15 ไอโซเลตเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตได้ ผลการศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า สามารถจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้เป็น 3 สกุล คือ *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* เมื่อคัดเลือกเฉพาะสกุลที่คาดว่าจะเป็น *Streptococcus* และ *Lactobacillus* พบว่ามีทั้งหมด 10 ไอโซเลตได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 โดยไอโซเลต L30 ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดเป็น 19.38 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดมีสมบัติคล้ายกัน คือ มีความสามารถละลายน้ำได้ปานกลาง ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานพบว่า L39 และ L47 คือ *Lactobacillus rhamnosus* ไอโซเลต L42, L44 และ L53 คือ *L. helveticus* ไอโซเลต L50 คือ *L. casei* ทั้งหมดนี้มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคสและอื่นๆ ที่มีประจุเป็นกลาง มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใกล้เคียงกับแซนแทนกัม มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ทั้งหมดนี้ไอโซเลต L42 และ L50 มีความเหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตโดยมีค่าความหนืดปรากฏที่อัตราเฉือนที่สูงที่ 50 s^{-1} เท่ากับ 131 และ 135 mPa s ตามลำดับ และมีลักษณะที่ปรากฏโดยรวมเหมาะสม คือ ไม่มีการแยกของน้ำเวย์บนผิวหน้า มีสีขาวปกติ มีกลิ่นกรดที่ไม่ฉุน และมีกลิ่นโยเกิร์ต เมื่อนำไอโซเลต L42 และ L50 เป็นหัวเชื้อร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ตคือ *Streptococcus thermophilus* TISTR 894 (ST) และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (LB) ในการผลิตโยเกิร์ต แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ชุด ได้แก่ 1) ST + LB เป็นชุดควบคุม 2) ST + L42 3) ST + L50 4) LB + L42 5) LB + L50 6) ST + LB + L42 และ 7) ST + LB + L50 พบว่าโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดมีลักษณะทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเล็กน้อย ปริมาณกรดทั้งหมดและปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำเวย์ไม่แตกต่างกัน และไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ที่ผิวหน้า มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 123.25-138.39 mPa s และมีค่าความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นทุกตัวอย่าง ในขณะที่โยเกิร์ตชุดควบคุมมีค่าลดลง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5572171323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: EXOPOLYSACCHARIDE / LACTIC ACID BACTERIA

ORRAPIN BUNKOED: EXOPOLYSACCHARIDE FROM LACTIC ACID BACTERIA AND APPLICATION IN YOGURT PRODUCTION. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., 104 pp.

In the present study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from various sources including: Thai fermented vegetables, fruit juices and raw milks in which 53 isolates were obtained. Among these, 15 isolates demonstrated their potential of using as starter culture for yoghurt production. From morphological, physiological and biochemistry studies, the strains obtained were identified as genera *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Enterococcus*. Ten isolates from genus *Streptococcus*, *Lactobacillus*; L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 and L53 were selected. The highest yield was from L30 of 19.38 g/LEPS. Chemical and physical analyses of polysaccharides obtained demonstrated similar properties among them of partly water soluble, insoluble in organic solvents and low water holding capacity. Taxonomic studies and 16S rDNA analysis revealed isolate L39 and L47 as *Lactobacillus rhamnosus*, L42, L44 and L53 as *L. helveticus* and L50 as *L. casei*. EPSs from strain L39, L42, L44, L47, L50 and L53 consist of glucose or other sugars with neutral charge, good emulsifier comparable to xanthan gum as well as good antioxidant. Isolates L42 and L50 were selected as starter for yogurt production owing to their viscosity of 131 and 135 mPa s at shear rate of 50 s^{-1} couple to their good appearance, no separation of whey on the surface, a yogurt flavor was produced without acidic odor. Each of the chosen isolates L42 and L50 was mixed with starter yogurt (*Streptococcus thermophilus* TISTR 894 (ST) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (LB)) to obtain seven treatments; ST + LB (control yogurt), ST + L42, ST + L50, LB + L42, LB + L50, ST + LB + L42 and ST + LB + L50 for yogurt production. The yoghurt obtained showed similar chemical and physical properties to control yogurt. After 7 days of storage at 4 °C, all 7 yoghurt treatments resulted in slightly decrease in pH. The yogurt showed increase in total lactic acid as well as total bacteria count. However, they didn't show any whey separation on surface neither any differences on syneresis percentage. Their apparent viscosity were slightly increased between 123.25-138.39 mPa s with firmness texture for all samples tested while control yogurt showed a decreasing result.

Department:	Microbiology	Student's Signature	.....
Field of Study:	Industrial Microbiology	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดทั้งช่วยปรับปรุงและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนปรับปรุงเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาคจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้ต่างๆ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ให้ความเอ็นดู และคอยอำนวยความสะดวกต่างๆ จนทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ห้อง 1804/12 ตลอดทั้งพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้ความรู้ในการทำวิจัย และคอยเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด ทำให้เป็นช่วงเวลาที่น่าประทับใจตลอดการทำงานวิจัย ณ ภาคจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนในการเรียนต่อปริญญาโท และเป็นกำลังใจเสมอมา จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูป ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ประวัติความเป็นมา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ 4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 5
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) 5
2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharides) 7
2.3 แลกติกแอซิดแบคทีเรีย และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย 13
2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมอาหาร 19
2.5 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ 21
2.6 สมบัติการไหล (Rheological properties) 21
2.7 โยเกิร์ต (yogurt) 23
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง 28
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 28
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 32
3.3.1 การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่าง 32
3.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาและการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 32
3.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 33
3.3.4. การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตโยเกิร์ต 33
3.3.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก 34
3.3.6 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 36
3.3.7. การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ 37
3.3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) 38
3.3.9 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ 39
3.3.10 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต 41
3.3.11 การประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต 41
บทที่ 4 ผลการทดลอง 43
4.1 การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่าง 43
4.2 การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต 44
4.3 การจัดจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก 48
4.4 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก 55
4.5 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ 56
4.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ 56
4.5.2 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ 57

หน้า

4.5.3 ความสามารถในการอุ้มน้ำ 59
4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) 61
4.7 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก 63
4.7.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ 63
4.7.2 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ 65
4.7.3 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ 66
4.7.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 68
4.8 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในโยเกิร์ต 69
4.9 การประยุกต์ในโยเกิร์ต 71
4.9.1 ตรวจสอบค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณแบคทีเรีย 71
4.9.2 ตรวจสอบการแยกน้ำ (% syneresis) ของโยเกิร์ต 73
4.9.3 ความหนืดของโยเกิร์ต 74
4.9.4 ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ต 75
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 76
รายการอ้างอิง 85
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 95
ภาคผนวก ข สารเคมี 98
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 100
ภาคผนวก ง ตัวอย่างกราฟความหนืด 101
ภาคผนวก จ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๕๓) พ.ศ. ๒๕๕๖ 102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 104

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ 6

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 12

ตารางที่ 2.3 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 16

ตารางที่ 2.4 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 17

ตารางที่ 2.5 เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ *Lactobacillus* 18

ตารางที่ 2.6 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ประยุกต์ใช้ในอาหาร 19

ตารางที่ 2.7 แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม 20

ตารางที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักนม 25

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลตของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมด 43

ตารางที่ 4.2 การติดสีแกรม การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส และผลการทดสอบ litmus milk 45

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก 49

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก 53

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ 57

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 58

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ 60

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 61

ตารางที่ 4.9 ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ 65

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.11 ค่า % scavenging activity ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 68

ตารางที่ 4.12 ค่าความเป็นกรดเบส ค่าความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) กลิ่นและสีของนมหมัก 70

ตารางที่ 4.13 ค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเชื้อ (cfu/ml) ของโยเกิร์ต ... 72

ตารางที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การแยกน้ำของโยเกิร์ต 73

ตารางที่ 4.15 ความหนืดปรากฏที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} ของโยเกิร์ต 74

ตารางที่ 4.16 ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ต 75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของพอลิแซ็กคาไรด์ 5

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเดกซ์แทรน 8

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของมิวแทน 9

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอัลเทอแนน 9

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของลีแวน 10

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของอินนูลินชนิดฟรุกแทน 10

รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแซนแทน 11

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเจลแลน 11

รูปที่ 2.9 ลักษณะการไหลของของเหลว 23

รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตโยเกิร์ตชนิดคงรูป (set yogurt) และชนิดคน (stirred type yogurt) 24

รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบ litmus milk 45

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร 55

รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมแสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ 64

รูปที่ 4.4 ตัวอย่างผลวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาประเทศไทยมีการขยายตัวทางเศรษฐกิจอย่างมาก โดยในแต่ละปีจะมีการส่งสินค้าออกไปทั่วโลกซึ่งทำรายได้เข้าประเทศ และในอีกไม่กี่ปีข้างหน้าประเทศไทยจะเข้าสู่การรวมเป็นตลาดเดียวของประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน แต่ยังมีกลุ่มสินค้า บางประเภทที่มีศักยภาพในการแข่งขันต่ำ เนื่องจากขาดแคลนวัตถุดิบ ต้องนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศ ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ได้มีการนำเข้าสารประเภทไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ที่ใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร (food additive) ที่ถูกนำมาใช้อย่างมากในอาหารหลายประเภท เพื่อให้อาหารมีสมบัติทางกายภาพที่ดีขึ้น และเป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภคมากขึ้น สารเหล่านี้บางชนิดสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีต้นทุนการผลิตไม่สูงมาก ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถผลิตสารเหล่านี้ได้จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง ทำให้เพิ่มโอกาสและศักยภาพในการผลิตในประเทศให้มีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น

สารไฮโดรคอลลอยด์ที่ถูกนำมาใช้ในอาหารส่วนใหญ่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากหน่วยย่อยที่เป็นมอโนแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลชนิดเดียวกัน และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลต่างชนิดกัน พอลิแซ็กคาไรด์ถือเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่ง สามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Venugopal, 2011) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่าการผลิตในพืชและสาหร่าย โดยไม่ขึ้นกับภาวะดินฟ้าอากาศ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล มีขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์ที่ง่าย (อัยรา พันอนุ, 2549) และสามารถควบคุมคุณภาพได้ (Khan และคณะ, 2007) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ กลูแคน พูลลูแลน แซนแทน และเจลแลน เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2007) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จะสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ เรียกว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide, EPS)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณลักษณะต่างๆ ให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เป็นสารให้ความข้นหนืด (viscosifying) สารให้ความคงตัว (stabilizing) สารก่อเจล (gelling) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifying) เป็นต้น (Jolly และคณะ, 2002) และยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่น เช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก และผลิตภัณฑ์ซักผ้า

สิ่งทอ กาว กระดาษ สี ยา เครื่องสำอาง และอื่นๆ (Prasertsan และคณะ, 2006) ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในทางการค้า เช่น แซนแทนกัม ผลิตจาก *Xanthomonas* sp., เจลแลน ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. และแอลจิเนต ผลิตจาก *Azotobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Freitas และคณะ, 2011) และจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria หรือ LAB) มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005)

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่เคลื่อนที่ สามารถหมักน้ำตาลได้กรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น (Axelsson, 2004) แลกติกแอซิดแบคทีเรียหลายสปีชีส์จัดเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) คือมีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Ruas-Madiedo และคณะ, 2009) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย แบ่งออกเป็นสองชนิด คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วย มอนอแซ็กคาไรด์ชนิดเดียว ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโทส เช่น α-กลูแคน และ β-กลูแคน ส่วนเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส แรมโนส เป็นต้น (De Vuyst และ Degeest, 1999, Duboc และ Mollet, 2001) แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น แป้งหมัก ไส้กรอก ชีส โยเกิร์ต คีเฟอร์ ผลิตภัณฑ์นมหมักต่างๆ และอาหารพื้นเมืองบางชนิด เป็นต้น (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) ปริมาณผลผลิตของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยในการหมัก เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารอาหารอื่นๆ ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (Mende และคณะ, 2013)

งานวิจัยที่ผ่านมาในห้องปฏิบัติการเดียวกัน สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์ (2551) ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ EN02 ที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างอ้อย และพบว่า สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 8.75 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของ EN02 พบว่าเป็น *Enterobacter cloacae* ในปีต่อมา ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์ (2552) ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 จากตัวอย่างผลไม้ และพบว่า สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 2.38 กรัมต่อลิตร จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสายพันธุ์ CU-CH4 พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Klebsiella* จากงานวิจัยข้างต้นแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค หากนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

อาจไม่เป็นที่ยอมรับ วิชุชดา วิไลรัศมี (2555) ได้คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากผักดอง พบว่าไอโซเลต L06 และ L07 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด เท่ากับ 11.20 และ 11.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของไอโซเลต L06 และ L07 พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Weissella* เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลตดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในอาหารเบื้องต้นพบว่ามีความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ และสารคงตัวอิมัลชันในน้ำสลัดที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอกได้

นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ (Guzel-Seydim และคณะ, 2005) ที่ได้ศึกษาผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยหัวเชื้อโยเกิร์ต พบว่าช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตชนิดคงตัวเมื่อบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำ (35 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่ใช้หัวเชื้อที่ไม่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Purwandari และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus thermophilus* ในโยเกิร์ตชนิดคงตัว พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อความหนืดและการไหล และการแยกชั้นของน้ำเวย์ของโยเกิร์ต นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม เช่น Broadbent และคณะ (2001) ใช้หัวเชื้อที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในชีสไขมันต่ำ และศึกษาลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* และ *Lactobacillus* และนำมาประยุกต์ใช้ในเชดดาร์ชีส (Lynch และคณะ, 2014)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ชีส ครีมหมัก (Duboc และ Mollet, 2001) เนื่องจากผู้บริโภคต้องการผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เนียน นุ่ม ลักษณะคล้ายครีม มีปริมาณไขมันและน้ำตาลต่ำ ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัส และการรับรู้รสชาติของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะสามารถช่วยลดการเกิดปัญหาเหล่านี้ได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียในกลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรีย และศึกษาสมบัติต่างๆ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย และเนื่องจากสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์มีความหลากหลายและแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบสมบัติเบื้องต้น เพื่อจะสามารถเลือกพอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้เบื้องต้นในอาหารได้อย่างเหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และศึกษาลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการ

1.3.1. เก็บตัวอย่างและคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากธรรมชาติ

1.3.2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

1.3.3. ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.3.4. ศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

1.3.5. คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่เหมาะสม

1.3.6. ประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

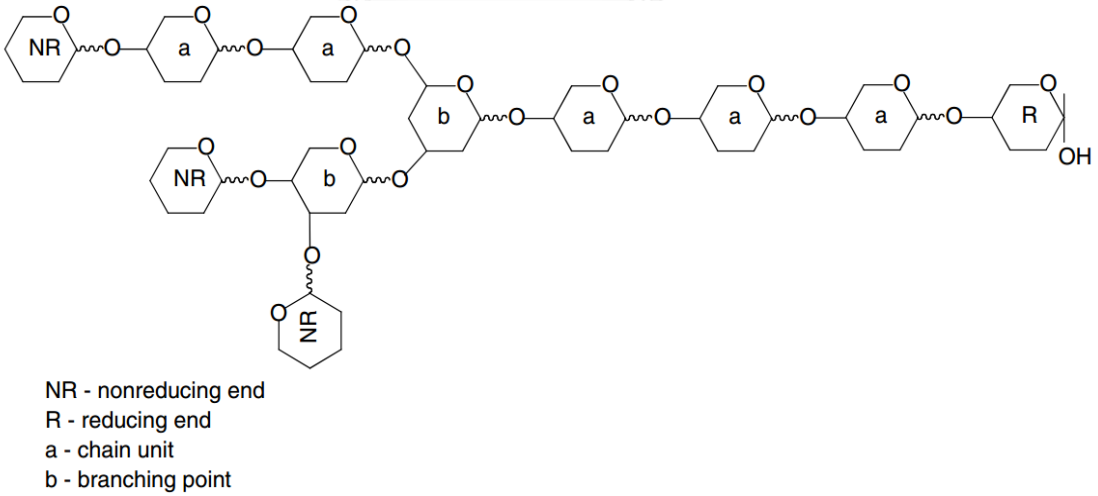
ได้แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และทราบลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ตได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากหน่วยย่อย (monomer) ที่เป็นมอนอแซ็กคาไรด์และอนุพันธ์ของมอนอแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก จากการที่ประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อยจำนวนมากทำให้มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง โครงสร้างของพอลิเมอร์ มีทั้งที่เป็นสายตรง (linear) และที่แตกแขนง (branch) แสดงดังรูปที่ 2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทตามชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลชนิดเดียวกัน และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลต่างชนิดกัน (Izydorczyk และคณะ, 2005) ตัวอย่างมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ เช่น กลูโคส (glucose) กาแลกโทส (galactose) แรมโนส (rhamnose) แมนโนส (mannose) N-แอเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) N-แอเซทิลกาแลกโตซามีน (N-acetylgalactosamine) และกรดกลูคิวโรนิก (glucoronic acid) เป็นต้น (Venugopal, 2011)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างโดยทั่วไปของพอลิแซ็กคาไรด์
ที่มา: ปรับปรุงจาก Izydorczyk และคณะ (2005)

พอลิแซ็กคาไรด์ ถือเป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถผลิตได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถจำแนกได้ตามแหล่งที่มา แสดงดังตารางที่ 2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่มีหน้าที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง เช่น เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชและสาหร่ายสีเขียว ไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา และยีสต์ หรือทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน เช่น แป้ง และไกลโคลเจน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานในพืชและสัตว์ ตามลำดับ (Herdman (1993); Izydorczyk และคณะ (2005); Whitfield (1988))

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	พอลิแซ็กคาไรด์
สาหร่าย	วุ้น (agar) อัลจิเนต (alginate) คาราจีแนน (carragenan)
พืช	แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose)
จุลินทรีย์	แซนแทน (xanthan) เดกซ์แทรน (dextran) เจลแลน(gellan) ลีแวน (levan) เคอร์ดแลน (curdlan) พูลลูแลน (pullulan) เอลซิแนน (elsinan)
สัตว์	ไคติน(chitin) ไคโตซาน (chitosan) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) อิมัลแซน (emulsan)

ที่มา : Herdman (1993); Izydorczyk และคณะ (2005)

นอกจากมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ยังแล้ว สามารถจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ตามชนิดประจุบนโมเลกุลได้เป็น 3 ชนิด (Izydorczyk และคณะ (2005); Margaritis และ Pace (1985)) ได้แก่

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharides) หรือบางครั้งเรียกว่า acidic polysaccharides เนื่องจากมีกรดน้ำตาล (sugar acid) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของมอนอแซ็กคาไรด์ในโมเลกุล เช่น แซนแทน และเพกติน

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharides) ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์เท่านั้น ได้แก่ ลีแวน พูลลูแลน เดกซ์แทรน และแซลลูโลส

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic polysaccharides) ได้แก่ พวกที่มีหมู่ NH_3 หรือมีหมู่ของกรดอะมิโนบางตัวต่ออยู่ เช่น ไคโตซาน

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharides)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ข้อดีของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์คือ ทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่าการผลิตในพืชและสาหร่าย โดยไม่ต้องขึ้นกับภาวะดินฟ้าอากาศ การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล มีขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและการทำให้บริสุทธิ์ที่ง่าย และสามารถควบคุมคุณภาพได้ (Khan และคณะ, 2007) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจและเป็นทางเลือกหรือเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทดแทนที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ แซนแทน กลูแคน พูลลูแลน และ เจลแลน เป็นต้น โดยสามารถแบ่งพอลิแซ็กคาไรด์ตามหน้าที่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้เป็น 3 ประเภท (สุขใจ ชูจันทร์, 2557) คือ

1. Intracellular polysaccharide เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำให้เกิดกลไกสะสมคาร์บอนหรือพลังงานให้แก่เซลล์จุลินทรีย์

2. Structural polysaccharide เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เช่น ไลพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

3. Extracellular polysaccharide (Exopolysaccharide; EPS) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์หรือสังเคราะห์ออกนอกเซลล์

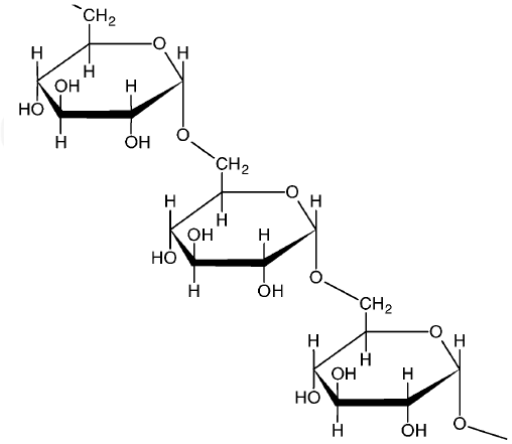
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค โดยจุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกันมากมายขึ้นอยู่กับมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งตามชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบได้ 2 ประเภท ได้แก่

1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.1 กลูแคน

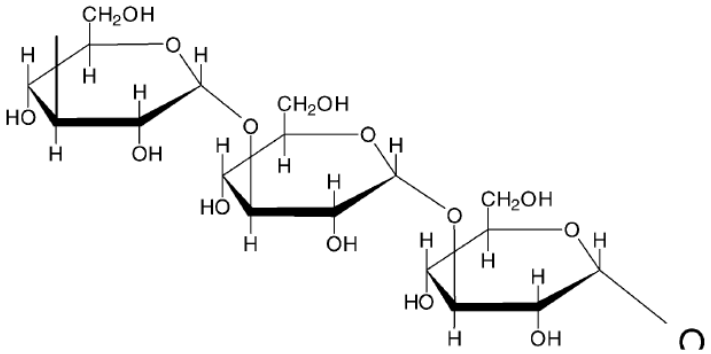
กลูแคนประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งสามารถเชื่อมด้วยพันธะหลายแบบได้แก่ **α**-1,6 **α**-1,2 **α**-1,3 และ **α**-1,4 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น เดกซ์แทรน มิวแทน อัลเทอแนน พูลลูแลน และเคอร์ดแลน พอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* (Monsan และคณะ, 2001)

1.1.1 เดกซ์แทรน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **α**-1,6 เป็นสายหลัก (รูปที่ 2.2) และมีกิ่งก้านหลายชนิด คือเชื่อมด้วยพันธะแบบ **α**-1,2 **α**-1,3 และ **α**-1,4



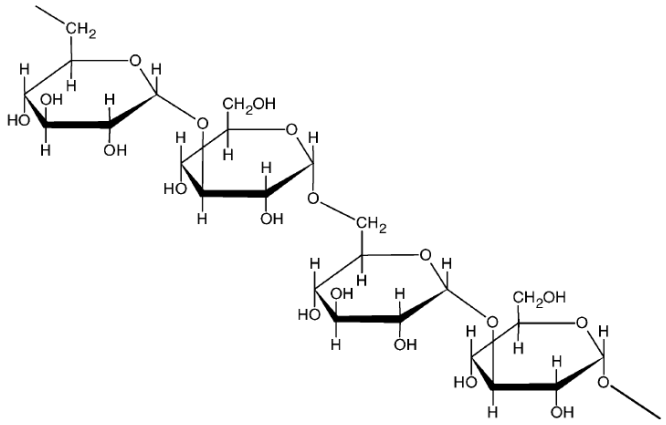
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเดกซ์แทรน (Monsan และคณะ, 2001)

1.1.2 มิวแทน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* NRRL B-523, B-1149 และ *Streptococcus* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **α**-1,6 และ **α**-1,3 (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของมิวแทน (Monsan และคณะ, 2001)

1.1.3 อัลเทอแนน ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **α**-1,6 และ **α**-1,3 สามารถผลิตได้จาก *L. mesenteroides* NRRL B-1355, NRRL B-1501 และ NRRL B-1498 (รูปที่ 2.4)

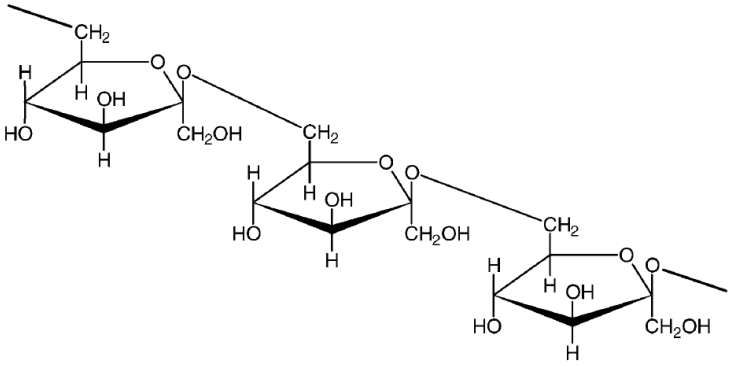


รูปที่ 2.4 โครงสร้างของอัลเทอแนน (Monsan และคณะ, 2001)

1.2 ฟรุกแทน

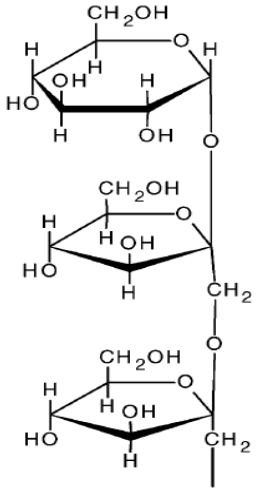
ฟรุกแทน ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **β**-2,6 และ **β**-2,1 ตัวอย่างเช่น ลีแวน อินนูลิน พอลิแซ็กคาไรด์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Zymomonas*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus*

1.2.1 ลีแวน ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมกันเป็นสายยาวเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **β**-2,6 (รูปที่ 2.5) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis* และ *Streptococcus salivarius* เป็นต้น (Monsan และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของลีแวน (Monsan และคณะ, 2001)

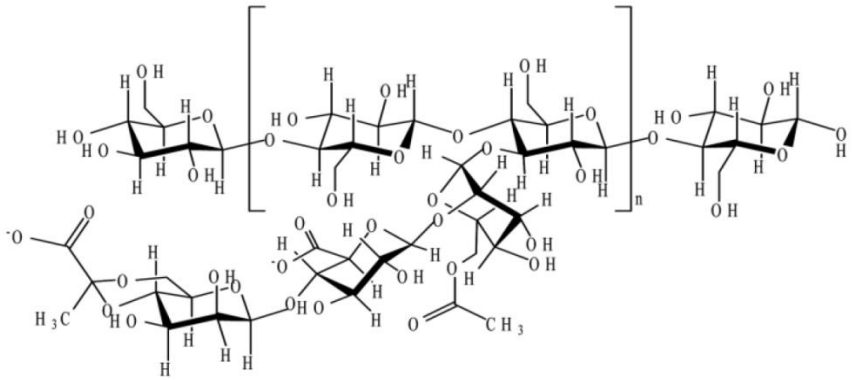
1.2.2 อินนูลิน ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมกันเป็นสายยาวเชื่อมด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด **β**-2,1 (รูปที่ 2.6) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่น่าสนใจเนื่องจากจัดเป็นพรีไบโอติก ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย *S. mutans* และ *L. reuteri* LB 121



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของอินนูลินชนิดฟรุกแทน (Monsan และคณะ, 2001)

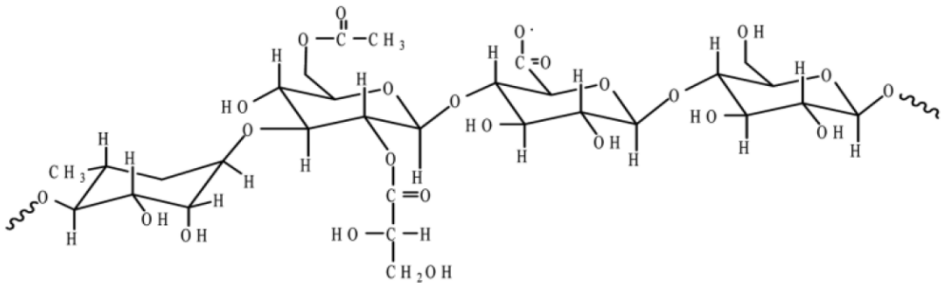
2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น เจลแลน และแซนแทน (Laws และ Marshall, 2001)

2.1 แซนแทน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Xanthomonas campestris* ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ **β**-1,4 ซึ่งเป็นสายหลัก และมีไตรแซ็กคาไรด์ (trisaccharide) ประกอบด้วย กรดกลูโคโรนิกที่อยู่ระหว่างแมนโนส 2 หน่วย (**β**-D-แมนโนส-(1,4)-**β**-D-กรดกลูโคโรนิก-(1,2)-**α**-D-แมนโนส) (Morris, 2006) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของแซนแทน (Khan และคณะ, 2007)

2.2 เจลแลน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Sphingmonas elodea* ประกอบด้วยเททระแซ็กคาไรด์ ซ้ำกันเป็นสายตรงยาว มีหมู่แทนที่ L-กลีเซอริล บนตำแหน่ง C ที่ 2 ของ 1,3-กลูโคส และหมู่แทนที่กลุ่มแอเซทิล อยู่บนตำแหน่ง C ที่ 6 ของ 1,3-กลูโคส เช่นกัน (Izydorczyk และคณะ, 2005) (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของเจลแลน (Khan และคณะ, 2007)

มอนอแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
เดกซ์แทรน	กลูโคส	*Leuconostoc mesenteroid*
อัลจิเนต	กลูคิวโรนิกแอซิด แมนนูโรนิกแอซิด	*Pseudomonas aeruginosa* และ *Azotobater vinelandii*
แซนแทน	กลูโคส แมนโนส กลูคิวโรนิกแอซิด	*Xanthomonas* sp.
เคอร์ดแลน	กลูโคส	*Agrobacterium radiobacter* และ *Rhizobium meliloti*
เซลลูโลส	กลูโคส	*Acetobacter* spp.
ซัคซิโนไกลแคน	กลูโคส กาแลกโตส	*Alaligenes faecalis* var. myxogenes
ไฮยาลูโรแนน	กลูคิวโรนิกแอซิด แอเซทิลกลูโคซามีน	*Pseudomonas aeruginosa*
ลีแวน	ฟรุกโทส	สกุล *Bacillus*, *Rahnella*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* และ *Zymomonas*

ที่มา : Freitas และคณะ (2011); Nwodo และคณะ (2012)

2.3 แลกติกแอซิดแบคทีเรีย และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่เคลื่อนที่ จัดเป็นแบคทีเรียที่เจริญยาก (fastidious bacteria) สามารถหมักน้ำตาลได้กรดแลกติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้ทั้งรูปแบบ D- หรือ L- แลกติก (Axelsson, 2004) สามารถแบ่งกลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรียตามการหมักน้ำตาลได้เป็น 2 ประเภท คือ กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) ที่จะผลิตกรดแลกติกแอซิดเป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้น และกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) ที่ผลิตกรดแลกติก เอทานอล อะซีเตท และคาร์บอนไดอกไซด์ (Khalid, 2011) โดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล (Axelsson, 1998) ได้แก่

1. *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือเป็นคู่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส จัดเป็นกลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ ประกอบด้วย 39 สายพันธุ์ มีบางสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก เช่น *S. thermophilus*, *S. cremoris* และ *S. lactis* และบางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ได้ เช่น *S. pneumonia* และ *S. pyogenes* เป็นต้น มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 34-46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

2. *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ *V. fluviais* ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม N แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

3. *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* และ *L. piscium* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

4. *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส สามารถเจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และที่ค่าความเป็นกรดเบส 9.6 บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) และสายพันธุ์ทำให้เกิด

โรค ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ คือ *E. faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum* และ *E. cecorum* มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

5. *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ผลิตกรดแลกติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) และบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์

6. *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน Pediococcus สายพันธุ์เดิม คือ *P. halophilus* สามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม บางสายพันธุ์มีความสำคัญในการหมักซอสถั่วเหลือง

7. *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ *A. viridans* และ *A. urinae* สายพันธุ์เดิมคือ *P. homari* และ *P. urine-equi* ตามลำดับ นำมาจัดจำแนกใหม่ เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีสภาวะเป็นเบสสูง และสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณเบส G+C ระหว่าง 39.6-39.7 โมลเปอร์เซ็นต์

8. *Leuconostoc* สัณฐานของเซลล์ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และไดแอซิติล จากการหมักกลูโคส จัดเป็นกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ประกอบด้วย 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. argentimum* และ *L. fallax* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์

9. *Oenococcus* ประกอบด้วยสายพันธุ์เดียวคือ *O. oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *L. oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรดและเอธานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอด้วยการศึกษาดีเอ็นเอไฮบริไดซ์เซชัน และลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน

10. *Weissella* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งและกลมลักษณะคล้ายกับ *Leuconostoc* (Leuconostoc-like bacteria) ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ คือ *W. paramesenteroides* (*L. paramesenteroides*), *W. confuses* (*Lactobacillus confuses*), *W. halotolerans* (*L. halotolerans*), *W. kandleri* (*L. kandleri*), *W. minor* (*L. minor*), *W. viridescens* (*L. viridescens*) และสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica*

11. *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) มีปริมาณของเบส G+C ภายในสกุลสูงถึง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา สามารถหมักน้ำตาลได้ทั้งแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟและฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ มีหลายสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในอาหารหมักบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ และทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร (Stiles และ Holzapfel, 1997)

12. *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือเป็นท่อนเรียว (slender rod) จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ ผลิตกรดแลกติก ชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตท และเอทานอล จากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สายพันธุ์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. fundium* และ *C. alterfunditum* มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 31.6-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในปัจจุบันเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียบางสปีชีส์จัดเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) และ Qualified Presumption of Safety (QPS) ซึ่งมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น แป้งหมัก ไส้กรอก ชีส โยเกิร์ต คีเฟอร์ ผลิตภัณฑ์นมหมักต่างๆ และอาหารพื้นเมืองบางชนิด เป็นต้น (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งได้เป็นสองชนิด คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ชนิดเดียว ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโทส เช่น α-กลูแคน และ β-กลูแคน ส่วนเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส แรมโนส N-แอเซทิลกลูโคซามีน

N-แอเซทิลกาแลกโตซามีน และกรดกลูคิวโรนิก เป็นต้น (De Vuyst และ Degeest (1999); Duboc และ Mollet (2001)) ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และ 2.4

ตารางที่ 2.3 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

EPS	สายพันธุ์	ลักษณะการเชื่อมของพันธะ
α-D-กลูแคน		
เดกซ์แทรน	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*	**α**-1,6-D-gL
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*	
มิวแทน	*Streptococcus mutans*	**α**-1,3-D-gL
	Streptococcus sobrinus	
อัลเทอแนน	*Leuconostoc mesenteroides*	**α**-1,3-D-gL/
		α-1,6-D-gL
ริวเทอแรน	*Lactobacillus. reuteri*	**α**-1,4--D-gL
β-D-กลูแคน	*Pediococcus* spp.	**β**-1,3-D-gL
	Streptococcus spp.	
β-D-ฟรุกแทน		**β**-2,6-D-fru
ลีแวน	*Streptococcus salivarius*	**β**-2,1-D-fru
อินนูลิน	*Streptococcus mutans*	**α**-D-gal/
พอลิกาแลกแทน	*Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* H414	**β**-D-gal

ที่มา : Ruas-Madiedo และคณะ (2002)

หมายเหตุ: glc = กลูโคส (glucose) fru = ฟรุกโทส (fructose) และ gal = กาแลกโทส(galactose)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.4 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

สายพันธุ์	มอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบ
Lactobacillus	
L. delbrueckii subsp. *bulgaris*	กาแลกโตส, กลูโคส, แรมโนส
L. helveticus	กลูโคส, กาแลกโตส, แรมโนส, เอ็นแอเซทิลกลูโคซามีน
L. helveticus var *jugurti*	กลูโคส, กาแลกโตส
L. rhamnosus	กลูโคส, กาแลกโตส
L. paracasei subsp. *paracasei*	กลูโคส, กาแลกโตส, แรมโนส
Streptococcus	
S. macedonius Sc136	กาแลกโตส, กลูโคส, เอ็นแอเซทิลกลูโคซามีน
S. thermophiles SFi 20	กาแลกโตส, กลูโคส, เอ็นแอเซทิลกลูโคซามีน
Lactococcus	
L. lactis subsp. *cremoris*	กลูโคส, กาแลกโตส, แรมโนส, เอ็นแอเซทิลกลูโคซามีน
L. lactis subsp. *cremoris*	กลูโคส, แรมโนส, กาแลกโตส

ที่มา : Cerning (1995)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Ruas-Madiedo และคณะ (2009) และ Badel และคณะ (2011) รายงานว่า ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus reuteri* LB121 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ถึง 10 กรัมต่อลิตร ส่วนเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียอยู่ในช่วง 25 ถึง 600 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีรายงานว่า *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 2-2.7 กรัมต่อลิตร

ตัวอย่างปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสกุล *Lactobacillus* แสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งถึงแม้แลกติกแอซิดแบคทีเรียจะผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณต่ำ แต่เป็นที่ยอมรับและถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมนมหมัก

ตารางที่ 2.5 เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากสายพันธุ์ *Lactobacillus*

Lactobacillus spp.	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
L. acidophilus	18.7 ± 2.8
L. brevis	11.8 ± 1.2
L. casei	9.0 ± 0.8
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	4.1 ± 3.1
L. fermentum	14.7 ± 1.4
L. gasseri	7.1 ± 2.6
L. helveticus	9.0 ± 0.8
L. johnsonii	5.4 ± 0.7
L. paracasei	7.0 ± 3.2
L. plantarum	8.1 ± 1.0
L. reuteri	10.8 ± 2.6
L. rhamnosus	5.3 ± 2.8
L. salivarius	29.2 ± 6.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปริมาณผลผลิตของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ 1) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารอาหารอื่นๆ 2) สภาวะในการเจริญ เช่น ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น 3) ระยะเวลาในการหมักหรือบ่ม นอกจากนี้พบว่าวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย (Mende และคณะ, 2013)

2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมอาหาร

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณลักษณะต่างๆ ให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เป็นสารให้ความข้นหนืด (viscosifying) สารให้ความคงตัว (stabilizing) สารก่อเจล (gelling) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifying) เป็นต้น (Jolly และคณะ, 2002) พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร ที่พบมากที่สุด คือ แซนแทนกัม และ เจลแลน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (Farnworth และคณะ, 2006) และยังมีเคอร์ดแลน และ พูลลูแลน ที่ประยุกต์ใช้ในอาหารเช่นกัน โดยพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารด้วยลักษณะที่แตกต่างกัน หรือพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดอย่างเช่น แซนแทนกัม มีสมบัติที่หลากหลาย จึงนำไปใช้ประยุกต์ได้หลายรูปแบบ แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ประยุกต์ใช้ในอาหาร

EPS	ลักษณะสมบัติ						
	ก่อเจล	เพิ่มความหนืด	การกระจาย	ก่ออิมัลชัน	จับเกาะ	อุ้มน้ำ	ก่อฟิล์ม
แซนแทน	/[(1)]	/	/	/	/	/	
เจลแลน	/		/				/
เคอร์ดแลน	/					/	/
พูลลูแลน					/		/

หมายเหตุ: / ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

[(1)] ไม่สามารถก่อเจลได้เอง ต้องร่วมกับสารอื่น

ที่มา : Funami (2009)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ชีส ครีมหมัก (Duboc และ Mollet, 2001) เนื่องจากผู้บริโภคต้องการผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เนียน นุ่ม ลักษณะคล้ายครีม มีปริมาณไขมันต่ำ ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ การใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียก็จะสามารถช่วยลดการเกิดปัญหาเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Guzel-Seydim และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยหัวเชื้อโยเกิร์ต พบว่าช่วย

ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตชนิดแข็งตัว เมื่อบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิต่ำ (35 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่ใช้หัวเชื้อที่ไม่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Purwandari และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Streptococcus thermophilus* ในโยเกิร์ตชนิดแข็งตัว พบว่าในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อความหนืดและการไหล และการแยกชั้นของน้ำเวย์ของโยเกิร์ต นอกจากนี้ยังมีการศึกษา พอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม เช่น Broadbent และคณะ (2001) ใช้หัวเชื้อที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในชีสไขมันต่ำ และการศึกษาลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* และ *Lactobacillus* และนำมาประยุกต์ใช้ในเชดดาร์ชีส (Lynch และคณะ, 2014) แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม แสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นม

สกุล	สายพันธุ์	ผลิตภัณฑ์นม
Lactococcus	*L. lactis* subsp. *cremoris*	นมหมัก และชีส
Lactobacillus	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *Lb. acidophilus* *Lb. kefiranofaciens*	โยเกิร์ต และนมหมัก นมหมัก คีเฟอร์
Leuconostoc	*L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*	คีเฟอร์
Streptococcus	*S. macedonicus* *S. thermophilus*	ชีสโยเกิร์ต และ มอซซาเรลล่าชีส
Bifidobacterium	*B. animalis* subsp. *lactis* *B. longum*	นมหมัก นมหมัก
Propionibacterium	*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*	สวิสชีส

ที่มา: Ruas-Madiedo และคณะ (2009)

2.5 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.5.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid chromatography หรือ HPLC)

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หรือ HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพ วิเคราะห์ (qualitative analysis) โดยเปรียบเทียบ Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน เพื่อทราบว่าเป็นสารชนิดใด และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยวัดความสูงของพีกกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว หรือ วัดพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบชีวภาพ พอลิเมอร์ และไอออนขนาดเล็ก เป็นต้น เทคนิค HPLC ถูกนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา อาหาร ปิโตรเคมี และสิ่งแวดล้อม (Skoog และคณะ, 2007)

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หรือ HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกสารประกอบที่อยู่ในตัวอย่าง ส่วนใหญ่จะใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก หรือ มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง HPL จะประกอบด้วยสองเฟส ได้แก่ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ความดันสูง เพื่อดันสารละลายให้เคลื่อนที่ผ่านตามคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป การแยกสารประกอบอาศัยหลักการความแตกต่างการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความสามารถในการดูดซับของสารประกอบกับเฟสอยู่กับที่ สารประกอบที่มีการดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า จึงถูกแยกออกมาทีหลัง ส่วนสารประกอบที่มีการดูดซับกับเฟสอยู่กับที่ได้ต่ำ ก็จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้รวดเร็ว จึงแยกออกมาได้เร็ว สารที่แยกออกมาจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัววัดสัญญาน สัญญาณที่ตรวจวัดได้จะถูกบันทึกและแสดงออกมาเป็นพีก เรียกว่า โครมาโทแกรม (Lindsay, 1991)

2.6 สมบัติการไหล (Rheological properties)

ความหนืด (viscosity) คือ ความสามารถในการต้านการไหลของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ส่วนของไหล หมายถึง สสารที่สามารถไหลได้ เช่น ของเหลว และก๊าซ ของไหลที่มีความหนืดสูง จะมีการต้านทานต่อการไหลสูง ขณะที่ของไหลที่มีความหนืดต่ำ ก็จะมีการต้านทานต่อการไหลต่ำ การวัดความหนืด จะเป็นการวัดแรงต้านทานการไหลภายในของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ในแนวขนานกับพื้นผิว เรียกว่า แรงเฉือน (shear force) เมื่อพิจารณาก้อนของไหลสี่เหลี่ยมที่ประกอบด้วยแผ่นโมเลกุลหลายแผ่นขนานกันอยู่ โดยแผ่นล่างสุดถูกยึดไว้อยู่ เมื่อแผ่นบนได้รับแรงกระทำคงที่ แผ่นด้านล่างถัดไปจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางจากแผ่นล่างสุดที่ไม่เคลื่อนที่ ความแตกต่างของความเร็ว (dv) ระหว่างของไหลสองแผ่นกับระยะทางที่

เปลี่ยนไป (dx) คืออัตราเฉือน (shear rate) ส่วนค่าแรงต่อหน่วยพื้นที่ที่ทำให้เกิดการไหลเรียกว่าแรงเค้นเฉือน (shear stress) (Grassi และคณะ, 2006)

2.6.1 ลักษณะทางการไหลของของเหลว

การประเมินลักษณะทางการไหลของของเหลวสามารถทำได้ 2 ทาง คือ ให้แรงเฉือนแก่ของไหลด้วยอัตราที่คงที่หรือด้วยอัตราที่แปรไปและวัดความเค้นเฉือนที่เกิดขึ้น หรือให้ความเค้นเฉือนแก่ของไหลและวัดอัตราเฉือนที่แปรเปลี่ยนไป การประเมินลักษณะทางการไหลนี้สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือวัดที่เรียกว่าเครื่อง rheometer หรือหากต้องการทราบเพียงความหนืดก็สามารถใช้เครื่องวัดความหนืด (viscometer) ได้ (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554)

ประเภทของของเหลวแบ่งตามลักษณะการไหลได้เป็น 2 ประเภท (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554) ได้แก่

1. ของไหลนิวโตเนียน (Newtonian fluid) คือของเหลวที่มีความหนืดไม่ขึ้นกับอัตราเฉือนหรือความเร็วในการกวน จะขึ้นกับอุณหภูมิและองค์ประกอบของของเหลว ตัวอย่างเช่น น้ำ น้ำเชื่อม น้ำมัน น้ำผลไม้ นม กาแฟ แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Tracton, 2006)

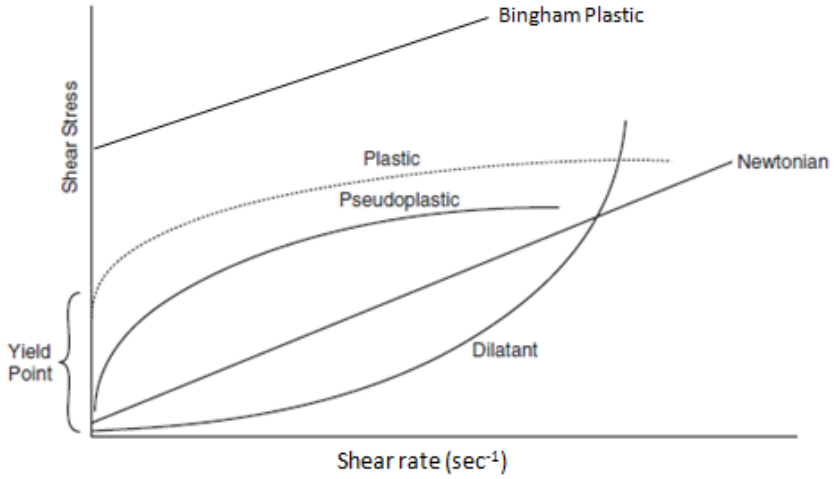
2. ของไหลนอนนิวโตเนียน (Non Newtonian fluid) คือของเหลวที่มีความหนืดขึ้นอยู่กับอัตราเฉือนหรือ ความเร็วในการกวน ณ อุณหภูมิหนึ่งๆค่าความหนืดไม่คงที่ ของไหลนอนนิวโตเนียนที่มีความหนืดไม่แปรตามเวลาในการให้แรงเฉือน (Farid, 2010) ได้แก่

2.1 Pseudoplastic fluid มีความหนืดลดลง เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น หรือความเร็วการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งไหลง่ายขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า “shear thinning” ตัวอย่างเช่น สารละลายพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ สารละลายพอลิเมอร์สังเคราะห์ น้ำผลไม้เข้มข้น น้ำผึ้ง และเนย เป็นต้น

2.2 Dilatant fluid มีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้นในระหว่างการให้แรงเฉือนหรือ ความเร็วในการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งมีความหนืดมากขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า “shear thickening” ตัวอย่างเช่น น้ำแป้ง และ น้ำดินข้น เป็นต้น

2.3 Bingham plastic fluid ของไหลที่แสดงการไหลแบบพลาสติก ของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอเพื่อเอาชนะค่าความเค้น ณ จุดคราก (yield stress) ถึงจะเริ่มไหลได้ และความหนืดของของเหลวไม่ขึ้นกับอัตราเฉือน ตัวอย่างเช่น ซอสมะเขือเทศ สี ดินเหนียว มายองเนส เป็นต้น (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554)

ลักษณะการไหลของของเหลว แสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะการไหลของของเหลว
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Tracton (2006)

2.7 โยเกิร์ต (yogurt)

โยเกิร์ต คือผลิตภัณฑ์นมที่เกิดจากการเติมจุลินทรีย์ลงไปในน้ำนมเพื่อให้เกิดกระบวนการหมักทำให้มีรสเปรี้ยวนมตกตะกอนเป็นลิ่มมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวเรียกว่า เคิร์ด (curd) และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางอาหารและเป็นประโยชน์ (Tamine และ Robinson, 1999)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.1 ชนิดของโยเกิร์ต สามารถแบ่งตามกรรมวิธีการผลิตได้ดังนี้

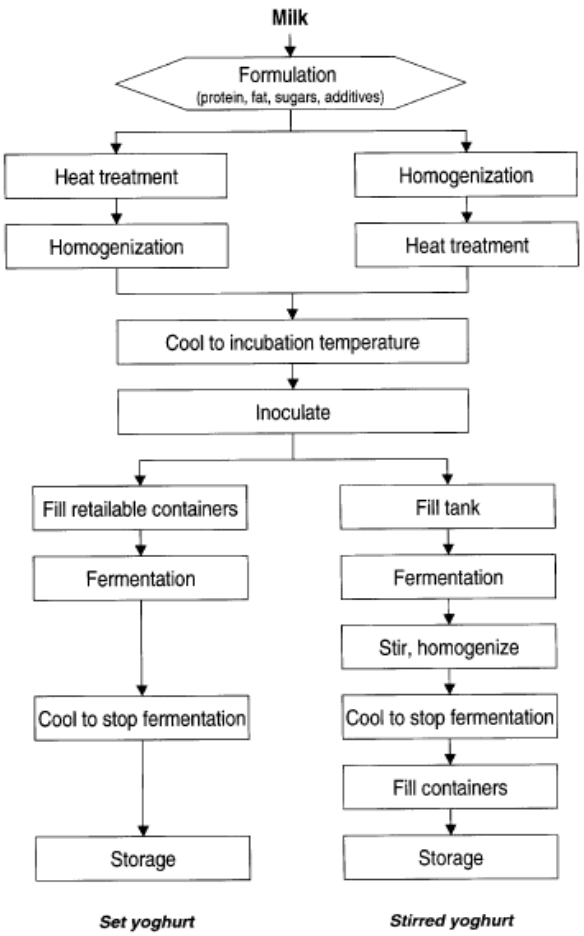
1. โยเกิร์ตชนิดคงรูป (set yogurt) เป็นโยเกิร์ตที่มีการบ่มในภาชนะบรรจุ โดยนำน้ำนมที่ผสมกับหัวเชื้อ (starter culture) บรรจุในภาชนะ แล้วนำไปบ่ม (Tamine และ Robinson, 1999) (รูปที่ 2.10)

2. โยเกิร์ตชนิดคน (stirred type yogurt) เป็นโยเกิร์ตที่ผลิตโดยนำน้ำนมผสมกับหัวเชื้อในถังหมัก บ่มแล้วนำไปคนให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุลงในถ้วย (Tamine และ Robinson, 1999) (รูปที่ 2.10)

3. โยเกิร์ตพร้อมดื่ม (drinking yogurt) เป็นโยเกิร์ตที่คล้ายกับโยเกิร์ตชนิดคนแต่มีความหนืดต่ำกว่า มีลักษณะเป็นน้ำหรือของเหลวดื่มได้ โดยจะมีการเติมสี กลิ่นรส น้ำผลไม้ แล้วจึงบรรจุในถ้วย (Tamine และ Robinson, 1999)

4. โยเกิร์ตแช่เยือกแข็ง (frozen yogurt) เป็นโยเกิร์ตไอศกรีมที่ผลิตโดยนำน้ำนมผสมกับหัวเชื้อในถังหมัก แล้วนำไปปั่นเป็นไอศกรีม บรรจุในภาชนะแล้วแช่เยือกแข็ง (คัดนางค์ ทองสุก, 2542)

5. โยเกิร์ตชนิดเข้มข้น (concentrated yogurt) ผลิตโดยนำน้ำนมผสมกับหัวเชื้อในถังหมัก แล้วนำไปเข้าเครื่องแยกเวย์จากนั้นจึงนำไปบรรจุ (คัดนางค์ ทองสุก, 2542)



รูปที่ 2.10 กระบวนการผลิตโยเกิร์ตชนิดคงรูป (set yogurt) และชนิดคน (stirred type yogurt)
ที่มา : Duboc และ Mollet (2001)

2.5.2 คุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

คุณภาพของโยเกิร์ตมีความสำคัญโดยตรงต่อความชอบของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ ลักษณะปรากฏคุณค่าทางโภชนการ รวมถึงกลิ่น รส ทางประสาทสัมผัส มีผลต่อการตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค โดยคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแบ่งออกได้ดังนี้ (Tamine และ Robinson, 1999)

2.5.2.1 คุณภาพทางเคมี

ส่วนประกอบหลักของโยเกิร์ต คือ น้ำนมหรือผลิตภัณฑ์นม ดังนั้นองค์ประกอบหลักทางเคมีของโยเกิร์ตซึ่งได้แก่ โปรตีนเคซีน โปรตีนเวย์ ไขมันนม วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ มีในปริมาณใกล้เคียงกับที่มีในน้ำนมโดยบางองค์ประกอบอาจมีมากกว่าหรืออาจมีปริมาณลดลงภายหลังจากกระบวนการหมัก การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของโยเกิร์ต ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในระหว่างการหมักนม

องค์ประกอบที่ลดลง	องค์ประกอบที่เพิ่มขึ้น
แลกโตส	กรดแลกติก
โปรตีน	กาแลกโตส
ไขมัน	กลูโคส
วิตามินบางชนิด	พอลิแซ็กคาไรด์
	กรดอะมิโนอิสระ; สารให้กลิ่น
	วิตามินบางชนิด; สารอินทรีย์บางชนิด
	สารยับยั้งแบคทีเรีย

ที่มา: Panesar (2011)

2.5.2.2 คุณภาพทางกายภาพ

ลักษณะปรากฏ (appearance) และลักษณะทางกายภาพ (physical properties) เป็นดัชนีบอกคุณภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยโยเกิร์ตที่มีคุณภาพดีควรมีเนื้อเจลที่ค่อนข้างข้นหนืดและเนียนเรียบ โครงสร้างเจลไม่หดตัวและไม่เกิดการแยกชั้น (whey syneresis) ระหว่างของเหลวกับเนื้อโยเกิร์ต สำหรับโยเกิร์ตชนิดคงรูปมักจะมีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์คือ เนื้อเจลโยเกิร์ตนิ่มมีความแน่นเนื้อต่ำและเกิดการแยกชั้นของน้ำหางนมหรือน้ำเวย์ ซึ่งปริมาณน้ำเวย์ที่ผิวหน้าโยเกิร์ตชนิดคงรูปนี้ถูกใช้ในการจัดระดับให้เป็นโยเกิร์ตคุณภาพต่ำได้ (Walstra และคณะ, 1999)

2.5.2.3 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต หมายรวมถึง ลักษณะปรากฏ ความข้นหนืด (viscosity) ความแข็งแรงของโครงสร้างเจล (gel firmness) และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปโยเกิร์ตที่มีคุณภาพดี โปรตีนนมที่ตกตะกอนเกิดเป็นโครงสร้างคล้ายเจลต้องมีลักษณะเป็นลิ่มค่อนข้างนุ่ม (soft curd) คือ มีเนื้อสัมผัสกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยทั่วไปมีสีขาวถึงขาวนวล มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว รสชาติ ค่อนข้างเปรี้ยว เนื่องจากมีกรดค่อนข้างสูง ไม่มีรสฝาด รสขม หรือรสชาติแปลกปลอมใดๆ (Tamine และ Robinson, 1999) ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพเหล่านี้ได้แก่ วัตถุดิบในการผลิต กระบวนการเตรียมการผลิต สายพันธุ์ของแบคทีเรียกล้าเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักรวมถึงการจัดการและจัดเก็บผลิตภัณฑ์ภายหลังกระบวนการหมัก นอกจากนี้สารให้ความหวาน (sweetener) และสารเพิ่มความคงตัว (stabilizer) ที่เป็นส่วนผสมสำหรับการผลิตโยเกิร์ตมีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยเช่นกัน (อัยรา พันอนุ, 2549)

2.5.3 ประโยชน์ของโยเกิร์ต

1. โยเกิร์ตย่อยง่าย เหมาะสำหรับผู้บริโภคที่ขาดเอนไซม์ย่อยน้ำตาลแลกโตสและโปรตีนนมเคซีน ซึ่งเป็นตัวหลักที่ทำให้เกิดการแพ้นมหรือท้องเสีย แบคทีเรียในโยเกิร์ตจะเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสเป็นกรดแลกติกที่ย่อยง่าย และยังมีเอนไซม์ช่วยย่อยโปรตีนนมเคซีนซึ่งเป็นโปรตีนที่ย่อยยาก ทำให้ร่างกายดูดซึมได้ง่ายขึ้น ลดปัญหาการแพ้น้ำตาลแลกโตสและโปรตีนเคซีนในนม (นฤศันส์ วาสิกดิลก, 2540)

2. ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและช่วยยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เป็นมิตรในลำไส้ เช่น *Salmonella typhidie*, *E. coli* และ *Corynebacteria diphtheria* เป็นต้น ทำให้เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถทำอันตรายต่อร่างกายได้ การรับประทานโยเกิร์ตอย่างสม่ำเสมอช่วยให้มีกลุ่มแบคทีเรียที่ดีอาศัยอยู่ภายในลำไส้ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541)

3. เป็นแหล่งวิตามิน โดยเฉพาะวิตามิน บี1 (ไรโบฟลาวิน) แบคทีเรียในโยเกิร์ตยังช่วยสังเคราะห์วิตามินบีและวิตามินเค ในลำไส้ (นฤศันส์ วาสิกดิลก, 2540)

4. โยเกิร์ตมีจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกมีผลต่อระบบการย่อยอาหาร ลำไส้ รวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยบรรเทาอาการท้องผูกช่วยรักษาโรคท้องเสีย ท้องเดิน และแผลในกระเพาะ

5. โยเกิร์ตยังอุดมไปด้วยแคลเซียม ที่ช่วยบำรุงกระดูกและฟัน และป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน กรดแลกติกในโยเกิร์ตช่วยทำให้การย่อยแคลเซียมในนมดีขึ้นและทำให้ร่างกายดูดซึมแคลเซียมง่ายขึ้น (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541)

6. เป็นแหล่งโปรตีนชั้นดี ในโยเกิร์ตจะมีโปรตีนมากกว่าในนม 20% และยังเป็นโปรตีนที่ย่อยง่าย ร่างกายสามารถดูดซึมไปได้

7. จุลินทรีย์โปรไบโอติกยังถูกนำมาใช้ในระบบภูมิคุ้มกัน ความสามารถในการลดระดับ คอเลสเตอรอล ช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ แลกโตบาซิลัสช่วยควบคุมปริมาณโคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้ (นฤศันส์ วาสิกดิลก, 2540)

8. ช่วยป้องกันมะเร็ง แลกโตบาซิลัสสามารถจับกับสารก่อมะเร็ง สามารถจับกับโลหะหนัก และกรดน้ำดีซึ่งมีพิษ แลกโตบาซิลัสช่วยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียในลำไส้ที่สร้างสารไนเตรทได้ (สารในเตรทเป็นสารก่อมะเร็งตัวหนึ่ง) และแลกโตบาซิลัสยังช่วยเปลี่ยนสารฟลาโวนอยด์จากพืชให้เป็นสารต้านมะเร็งได้ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541)

การศึกษาเพื่อปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยเฉพาะทางกายภาพมีความสำคัญและได้รับความสนใจมาโดยตลอด นอกจากการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาของการให้ความร้อนแก่ส่วนผสมสำหรับผลิตโยเกิร์ต เพื่อให้ได้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต (Tamine และ Robinson, 1999) แล้วการเติมสารเพิ่มความหนืดและสารเพิ่มความคงตัว เช่น เจลาติน แพคติน ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพของโยเกิร์ตทางกายกายภาพ Guggisberg และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลและระดับของอินนูลินที่เติมในการผลิตโยเกิร์ตที่มีผลต่อคุณภาพในด้านเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตไขมันต่ำ Puvanenthiran และคณะ (2002) ทำการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเคซีนและโปรตีนเวย์ที่ใช้ปรับปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในการผลิตโยเกิร์ตชนิดคงตัวให้มีคุณภาพดี นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ปรับปรุงคุณภาพและเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตโดยใช้แบคทีเรียที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักโยเกิร์ต เช่น Prasanna และคณะ (2013) ใช้ *Bifidobacterium* ที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นหัวเชื้อร่วมในการผลิตโยเกิร์ตไขมันต่ำ และ Guzel-Seydim และคณะ (2005) ใช้หัวเชื้อโยเกิร์ตสายพันธุ์ที่เป็น ropy ในการผลิตโยเกิร์ตไขมั่นต่ำ นอกจากนี้แบคทีเรียกล้าเชื้อที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อคุณภาพด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Arm flask ของบริษัท PYREX
2. กระดาษกรอง Whatman ของบริษัท General Electric (GE)
3. กระดาษวัดความเป็นกรด-เบส ของบริษัท Merck, Germany
4. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
5. กระบอกเซนตริฟิวส์ ของบริษัท NALGENE, USA
6. กระบอกตวง ของบริษัท PYREX
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ของบริษัท EXELO
9. ขวดรูปชมพู่ ของบริษัท PYREX
10. คิวเวตต์ ของบริษัท PYREX
11. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
12. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
13. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge ของบริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น Mikro20 ของบริษัท Hettich zErifugen, Germany
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
17. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท SciEific Industries Inc., USA
18. เครื่องระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan

Chulalongkorn University

19. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
20. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
21. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว ของบริษัท PYREX
22. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ของบริษัท Hycon
23. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, ของบริษัท International SciEific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss SciEific Associate L.P., Thailand
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -20 °ซ
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 °ซ บริษัท Forma SciEific, USA
26. ตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของบริษัท Sanyo, Japan
27. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบความร้อนแห้ง รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
29. โถดูดความชื้น
30. บีกเกอร์ ของบริษัท PYREX
31. ปิเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท HBG, Germany
32. ปิเปตทิป ขนาด 1-200 ไมโครลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen SciEific, USA
33. พาราฟิล์ม ของบริษัท American national can
34. ไมโครปิเปต รุ่น P20, P100, P200, P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France
35. หลอดทดลอง ของบริษัท PYREX
36. หลอดทดลองฝาเกลียว ของบริษัท PYREX
37. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 ของบริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 1,1-ไดฟีนิล-2-พิคริลไฮดราซิล (DPPH) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
2. Lactobacilli MRS broth สำเร็จรูป บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
3. n-บิวทานอล บริษัท Merck, Germany
4. เกลือ ตราปรุงทิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด ประเทศไทย
5. เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (Cetylpyridiniumchloride)
6. เมทานอล บริษัท Merck, Germany
7. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
8. แซนแทนกัม บริษัท Sigma Chemical Co., USA
9. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, German
10. แมงกานีสซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
11. แมนโนส บริษัท Sigma Chemical Co., USA และบริษัท Fluka, Switzerland
12. แรมโนส บริษัท Difco, USA
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany
14. โซเดียมอะซิเตต บริษัท Merck, Germany
15. โบรโมครีซอล เพอร์เพิล บริษัท Fluka, USA
16. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA
17. โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
18. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
19. ไซโลส บริษัท Difco, USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
20. ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต บริษัท Carlo Erba, Italy
21. ไรโบส บริษัท Sigma Chemical Co., USA และ บริษัท Fluka, Switzerland
22. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany
23. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บริษัท Merck, Germany
24. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany
25. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
26. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

27. กรดฟอสฟอริก บริษัท Mallinckrodt chemicals, USA
28. กลีเซอรอล บริษัท Merck, Germany
29. กลูโคส บริษัท Merck, Germany
30. กัวกัม บริษัท Success chemical, Thailand
31. กาแลกโทส บริษัท Difco, USA
32. คูแมสซีบลู จี 250 บริษัท Sigma Chemical Co., USA
33. ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล ประเทศไทย
34. ทวีน 80 บริษัท Merck, Germany
35. น้ำมันถั่วเหลือง บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด
36. น้ำมันทานตะวัน บริษัท ธนากรณ์ผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำจัด
37. น้ำมันมะกอก บริษัท Sabroso, Spain
38. ฟรุกโตส (Fructose) บริษัท Fluka, Switzerland
39. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany
40. สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand
41. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Biospringer, France
42. อะซีโตน บริษัท Merck, Germany
43. อะราบิโนส บริษัท Fluka, Switzerland
44. อาหารฟีนอลเรดบรอทเบสสำเร็จรูป (Phenol Red Broth Base) บริษัท Difco, USA
45. อาหารลิตมัสมิลล์สำเร็จรูป (Litmus milk) บริษัท Difco, USA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่าง

คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดอง น้ำผลไม้ และน้ำนมดิบ ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม ราชบุรี สระบุรี นครราชสีมา และนครศรีธรรมราช คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผสมตัวอย่างแต่ละชนิดให้เข้ากัน แล้วนำตัวอย่างมาเจือจางโดยใช้ 0.1% เปปโตนวอเตอร์ แล้วนำมาเกลี่ยลงบนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลกโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS Agar) ผสม bromocresol purple (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่รอบโคโลนีเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงว่า มีการสร้างกรด และทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาสายพันธุ์แลกติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาและการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

3.3.2.1 ศึกษาสัณฐานวิทยา (morphological characteristics)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากข้อ 3.3.1 มาย้อมแกรม เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรม ผลที่ได้ถ้าเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะมีลักษณะรูปร่างกลมหรือแท่ง และติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต

3.3.2.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase test)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากข้อ 3.3.1 บนลงแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อ ผลที่ได้ถ้าเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะไม่เกิดฟองก๊าซขึ้น ซึ่งรายงานว่าผลทดสอบเป็นลบ (Paulo และคณะ, 2012)

3.3.3 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

ขีดเชื้อแบคทีเรียที่พิสูจน์เบื้องต้นว่าเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากข้อ 3.3.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบบเอียง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบเอียงใหม่ทุก 1 สัปดาห์

3.3.3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เขี่ยเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่พิสูจน์เบื้องต้นว่าเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากข้อ 3.3.2 ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.4. การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตโยเกิร์ต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต โดยนำโคโลนีแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญในนม โดยถ่ายเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่บรรจุลิตมัสมิลค์ (litmus milk) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าลิตมัสมิลค์มีการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงอ่อนเป็นสีชมพูขาวและแข็งตัว (clot) ภายใน 24 ชั่วโมง แสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก

3.3.5 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

3.3.5.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.4 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนี และย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น (physiological characteristics and biochemical test) โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.4 ขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารต่างๆ และทดสอบทางชีวเคมีโดยวิธีอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) ดังนี้

3.3.5.2.1 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียบนลงแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อ ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าผลทดสอบเป็นลบ ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก

3.3.5.2.2 ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดอาหารฟีนอลเรดบรอทเบส (Phenol Red Broth Base) ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส และแลกโตส ที่บรรจุหลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นเหลืองแสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก คือแบคทีเรียนั้นสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นได้ และถ้าพบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่า เป็นแบคทีเรียในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ แต่ถ้าไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่า เป็นแบคทีเรียในกลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (Axelsson, 2004)

3.3.5.2.3 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโบรโมครีซอล เพอร์เพิล บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยถ้ามีการเจริญของเชื้อจะดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.3.5.2.4 ทดสอบการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-เบสต่างๆ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH เป็น 4.4 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าจากการดูความขุ่นของอาหารทดสอบ ถ้าอาหารทดสอบมีความขุ่น แสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก

3.3.5.2.5 ทดสอบความทนเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโบรโมครีซอล เพอร์เพิล ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก

3.3.5.2.6 ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ (motility test)

นำเชื้อแบคทีเรียใส่ลงใน motility test medium โดยปักเชื้อตรงๆ (stab) ประมาณ 2/3 ของส่วนลูป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยปักเชื้อ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

3.3.5.2.7 ทดสอบการย่อยอาร์จินีน (arginine test)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารทดสอบที่เติมอาร์จินีน แล้วปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยดูผลทุกวัน ตรวจสอบการย่อยอาร์จินีนโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบ ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงว่าผลทดสอบเป็นลบ ถ้าอาหารเป็นสีม่วงแสดงว่าผลทดสอบเป็นบวก แบคทีเรียสามารถย่อยอาร์จินีนได้ ซึ่งการทดสอบการย่อยอาร์จินีนเพื่อใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในจีนัส *Enterococcus* และ *Leuconostoc*

3.3.6 การผลิตและการสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.5 มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้นซูโครส 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อข้างต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.6.2 การสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.6.1 มาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีดัดแปลงของ Kumar และคณะ (2004) โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และโปรตีน จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วย 95% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนไปละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วย 95% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นนำไปใส่เดซิเคเตอร์เพื่อให้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ รายงานผลเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.7. การศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.7.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จากข้อ 3.3.6 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 % (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)

3.3.7.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น เติมสารละลายคูแมสซีบลูจี 250 (Coomassie blue G250) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง)

3.3.7.2 การทดสอบความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากข้อ 3.3.6 มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัมสังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

3.3.7.3 การตรวจวัดความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากข้อ 3.3.6 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำเหมือนข้างต้นโดยจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นวัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) คือ ระยะทางของเหลวในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่เคลื่อนที่ได้ ต่อระยะทางของน้ำกลั่นที่เคลื่อนที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ถ้าเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงถึงความสามารถในการอุ้มน้ำสูง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Tako และคณะ, 1982)

3.3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA โดยนำสายพันธุ์บริสุทธิ์มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA ที่บริษัทวอรด์เมดิกโดยใช้ primer คือ 16F27 (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) และ 16R1522 (5’-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3’) เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแล้ว นำมาปรับแนวลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor version 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.3.9 การศึกษาลักษณะสมบัติเพิ่มเติมทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.9.1 การทดสอบหาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่เลือก มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยชั่งพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดฝาเกลียว แล้วใส่กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับความเป็นกรดเบสให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ 1 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย Evaporative Light Scattering detectors ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ (retention time)

3.3.9.3 การวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่คัดเลือก มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 M เติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ถ้าพบตะกอนในสารละลายแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์มีประจุลบ (acidic polysaccharide) ถ้าไม่พบตะกอนแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) (Ueda และคณะ, 1981)

3.3.9.2 การทดสอบความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่คัดเลือก มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืชแต่ละชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ตามลำดับ ในอัตราส่วน 4:6 นำไปผสมด้วยเครื่องผสมสารที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ หลังจาก 24 ชั่วโมง (Emulsion index (E_{24})) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของอิมัลชันต่อระดับความสูงทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (Ashtaputre และ Shah, 1995)

3.3.9.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

นำพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่คัดเลือก มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลกับน้ำกลั่นเป็น blank และใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม และวิตามินซี (Zhang และคณะ, 2013) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตรเพื่อหาค่า DPPH radical scavenging activity (%) ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{(A - B)}{C}\right] \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

C = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

3.3.10 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต

คัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ในโยเกิร์ตได้ โดยนำแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยนอร์มัลซาไลน์ จากนั้นถ่ายเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ลงในน้ำนมสเตอริไลซ์ (UHT milk) ที่มีน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบค่าความเป็นกรดเบส ลักษณะการเกิดเคิร์ด กลิ่น สีที่เกิดขึ้น และวัดความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-VOR (Prasanna และคณะ, 2012) เปรียบเทียบกับหัวเชื้อโยเกิร์ตชุดควบคุม (*Streptococcus thermophilus* TISTR 894 (ST) และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (LB))

3.3.11 การประยุกต์ใช้ในโยเกิร์ต

3.3.10.1 การเตรียมโยเกิร์ต

นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกและหัวเชื้อโยเกิร์ตที่ประกอบด้วย *Streptococcus thermophilus* TISTR 894 (ST) และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (LB) มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1 (10^8 cfu/ml) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยนอร์มัลซาไลน์ จากนั้นถ่ายแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละชนิดร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ต 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 1:1 ลงในน้ำนมสเตอริไลซ์ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 4% โดยปริมาตร โดยแบ่งโยเกิร์ตออกเป็น 7 ชุด ได้แก่ 1) ST + LB เป็นชุดควบคุม 2) ST + L42 3) ST + L50 4) LB + L42 5) LB + L50 6) ST + LB + L42 7) ST + LB + L50 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.3 จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ติดตามผลเป็นเวลา 1 และ 7 วัน

3.3.10.2 การติดตามปริมาณแบคทีเรีย, pH และปริมาณกรดแลกติก

ติดตามการเปลี่ยนแปลง pH ของโยเกิร์ตโดยใช้เครื่องวัด pH

ตรวจสอบปริมาณกรดแลกติก โดยวิธี Titratable acidity (Purwandari และคณะ, 2007)

นำโยเกิร์ต 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วย 0.1 M NaOH โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ จนถึงจุดยุติ จะได้สีชมพูอ่อน แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก ดังสมการนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก (\% Lactic acid)} = \frac{\text{0.1 N NaOH (มิลลิลิตร)} \times 0.09}{\text{ตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

ติดตามปริมาณแบคทีเรีย

นำโยเกิร์ตมา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย 0.1% นอร์มัลซาไลน์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมความเจือจางให้เหมาะสม และเกลี่ยสารละลายเจือจางที่ได้ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น cfu mL^{-1} (Prasanna และคณะ, 2013)

3.3.10.3 การตรวจสอบการแยกน้ำ (% syneresis) ของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ต 10 กรัม นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาตรส่วนใสที่ได้ นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการแยกน้ำเวย์ออก (% syneresis) คือ น้ำหนักของน้ำเวย์ที่แยกออกมาต่อน้ำหนักของตัวอย่างโยเกิร์ต (Tan และ Korel, 2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3.10.4 การวัดความหนืดของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ตมาวัดสมบัติการไหลและความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-VOR โดยประมวลผลด้วยโปรแกรม Bohlin software CVOR15 ที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.1 - 100 วินาที$^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Prasanna และคณะ, 2012)

3.3.10.5 การวัดค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ตที่เก็บไว้ 4 องศาเซลเซียส มาวัดค่าความแน่นเนื้อทันที โดยใช้เครื่อง Texture analyzer รุ่น TA-XT2i (icon) (อัยรา พันอนุ, 2549)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่าง

จากการคัดแยกแลกติกซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดองทั้งหมด 7 ตัวอย่าง น้ำผลไม้ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง น้ำนมโคดิบ 4 ตัวอย่าง น้ำนมแพะดิบ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากกรุงเทพฯ นครปฐม ราชบุรี สระบุรี นครราชสีมา และนครศรีธรรมราช ด้วยการคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple หลังจากนั้นนำโคโลนีที่สามารถผลิตกรด มาย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสเพื่อแสดงคุณสมบัติเบื้องต้นของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่า ได้แลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 53 ไอโซเลต ซึ่งได้รับการกำหนดรหัสเป็น L01-L53 ทั้งนี้คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองจำนวนทั้งหมด 12 ไอโซเลต จากน้ำผลไม้จำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลต จากนมดิบจำนวนทั้งหมด 27 ไอโซเลต และไม่พบแลกติกซิดแบคทีเรียในตัวอย่างสะตอดอง ผักเสี้ยนดอง และนมแพะ ผลการคัดแยกแลกติกแอซิดจากตัวอย่างต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลตของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมด

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา (จังหวัด)	จำนวนไอโซเลต แลกติกแอซิด แบคทีเรีย	รหัสเชื้อ
1	ผักกาดดอง	กรุงเทพฯ	2	L01-L02
2	หน่อไม้ดอง	กรุงเทพฯ	2	L03-L04
3	ไส้กรอกอีสาน	กรุงเทพฯ	2	L05-L06
4	สะตอดอง	นครศรีธรรมราช	ไม่พบ	-
5	ผักเสี้ยนดอง	นครศรีธรรมราช	ไม่พบ	-
6	แหนมเห็ด	นครราชสีมา	3	L07-L09
7	แหนมหมู	กรุงเทพฯ	3	L10-L12
8	น้ำสับปะรด	กรุงเทพฯ	1	L13
9	น้ำตาลสด	กรุงเทพฯ	2	L14-L15
10	น้ำอ้อย	กรุงเทพฯ	4	L16-L19

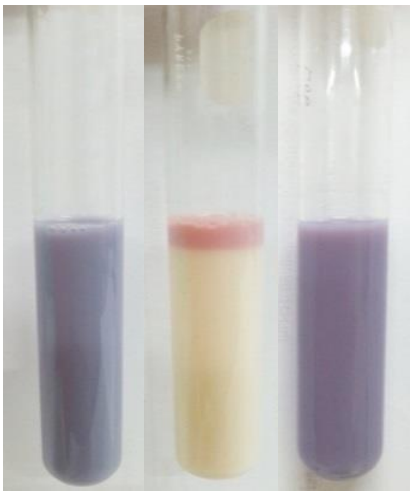
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลตของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมด (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา (จังหวัด)	จำนวนไอโซเลต แลกติกแอซิด แบคทีเรีย	รหัสเชื้อ
11	น้ำมะพร้าว	กรุงเทพฯ	3	L20-L22
12	น้ำเก๊กฮวย	กรุงเทพฯ	2	L23-L24
13	น้ำมะม่วง	กรุงเทพฯ	2	L25-L26
14	นมโค	กรุงเทพฯ	5	L27-L31
15	นมแพะ	กรุงเทพฯ	3	L32-L34
16	นมโค	สระบุรี	4	L35-L38
17	นมโค	นครปฐม	6	L39-L44
18	นมแพะ	นครปฐม	1	L45
19	นมโค	ราชบุรี	8	L46-L53
20	นมแพะ	ราชบุรี	ไม่พบ	-

4.2 การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต

นำแบคทีเรียที่ให้ผลการติดสีแกรมเป็นสีม่วง และให้ผลทดสอบเอนไซม์แคทาเลสเป็นลบ มาทดสอบหาความสามารถในการเจริญและการก่อเคิร์ดในอาหารทดสอบ litmus milk ตามวิธีในข้อ 3.3.4 เพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตโยเกิร์ต โดยหากแลกติกแอซิดแบคทีเรียให้ผลบวกกับการทดสอบ litmus milk (รูปที่ 4.1) จะสามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตได้ นั่นคือเชื้อที่ให้ลักษณะ ได้แก่ ย้อมแกรมติดสีม่วง เอนไซม์แคทาเลสเป็นลบ และก่อเคิร์ดในอาหารทดสอบ litmus milk จะได้รับการคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป แสดงไว้ในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบ litmus milk (ก) ชุดควบคุม (ข) ผลบวกของไอโซเลต L27 คือ เกิดการแข็งตัว (clot) (ค) ผลลบของไอโซเลต L01 คือ อาหารทดสอบ litmus milk ไม่เปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 4.2 การติดสีแกรม การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส และผลการทดสอบ litmus milk ของไอโซเลต L1-L53

ไอโซเลต	การย้อมแกรม		การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส[1]	litmus milk[2]
	การติดสี	รูปร่าง		
L01	ม่วง	แท่ง	-	-(+)
L02	ม่วง	กลม	-	-(+)
L03	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L04	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L05	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L06	ม่วง	กลม	-	-
L07	ม่วง	กลม	-	-(+)
L08	ม่วง	แท่ง	-	-(+)
L09	ม่วง	แท่ง	-	-(+)
L10	ม่วง	แท่ง	-	-(+)
L11	ม่วง	กลม	-	-(+)

ตารางที่ 4.2 การติดสีแกรม การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส และการทดสอบ litmus milk ของไอโซเลต L1-L53 (ต่อ)

ไอโซเลต	การย้อมแกรม		การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส[1]	litmus milk[2]
	การติดสี	รูปร่าง		
L12	ม่วง	กลม	-	-
L13	ม่วง	แท่ง	-	-(+)
L14	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L15	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L16	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L17	ม่วง	กลม	-	-
L18	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L19	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L20	ม่วง	กลม	-	-
L21	ม่วง	แท่งสั้น	-	-(+)
L22	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L23	ม่วง	แท่ง	-	-
L24	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L25	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L26	ม่วง	กลม	-	-
L27	ม่วง	กลม	-	+
L28	ม่วง	กลม	-	-
L29	ม่วง	กลม	-	+
L30	ม่วง	กลม	-	+
L31	ม่วง	แท่ง	-	-
L32	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L33	ม่วง	แท่ง	-	-
L34	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L35	ม่วง	แท่ง	-	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.2 การย้อมแกรม การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส และการทดสอบ litmus milk ของไอโซเลต L1-L53 (ต่อ)

ไอโซเลต	การย้อมแกรม		การทดสอบเอนไซม์แคทาเลส[1]	litmus milk[2]
	การติดสี	รูปร่าง		
L36	ม่วง	แท่ง	-	-
L37	ม่วง	กลม	-	+
L38	ม่วง	แท่ง	-	-
L39	ม่วง	แท่ง	-	+
L40	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L41	ม่วง	กลม	-	+
L42	ม่วง	แท่ง	-	+
L43	ม่วง	กลม	-	+
L44	ม่วง	แท่ง	-	+
L45	ม่วง	กลม	-	+
L46	ม่วง	กลม	-	+
L47	ม่วง	แท่ง	-	+
L48	ม่วง	แท่ง	-	-
L49	ม่วง	กลม	-	+
L50	ม่วง	แท่ง	-	+
L51	ม่วง	กลม	-	-
L52	ม่วง	แท่งสั้น	-	-
L53	ม่วง	แท่ง	-	+

หมายเหตุ 1 ในคอลัมน์ของการทดสอบเอนไซม์แคทาเลส

ผล - คือ ไม่เกิดฟองก๊าซหลังจากหยดสารละลาย H_2O_2 เข้มข้นร้อยละ 3

2 ในคอลัมน์การทดสอบใน Litmus milk

ผล + คือ litmus milk มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นสีชมพูอ่อนและแข็งตัว (clot) ภายใน 24 ชั่วโมง

-(+) คือ เปลี่ยนสีเมื่อเทียบกับ control ภายใน 24 ชั่วโมง

- คือ litmus milk ไม่มีการแข็งตัวและเปลี่ยนสี ภายใน 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง พบว่าจากจำนวนแลกติกซิดแบคทีเรียทั้งหมด 53 ไอโซเลต มี 15 ไอโซเลต ที่มีการติดสีย้อมแกรมเป็นสีม่วง มีรูปร่างเป็นกลมและเป็นแท่ง ผลทดสอบเอนไซม์แคทาเลสเป็นลบและให้ผลบวกกับการทดสอบ litmus milk คือ อาหารทดสอบ litmus milk เปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงอ่อนเป็นสีชมพูอ่อนและแข็งตัว (clot) ภายใน 24 ชั่วโมง จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ทั้ง 15 ไอโซเลตเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต ไอโซเลตเหล่านี้ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L41, L42, L43, L44, L45, L46, L47, L49, L50 และ L53

4.3 การจัดจำแนกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก

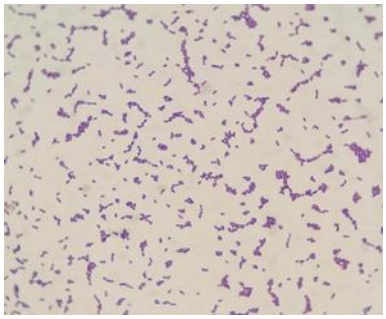
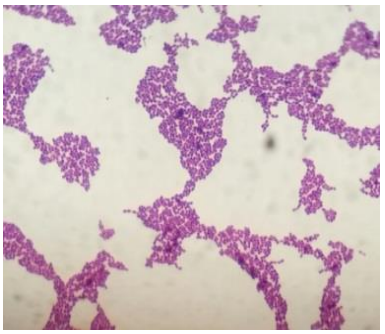
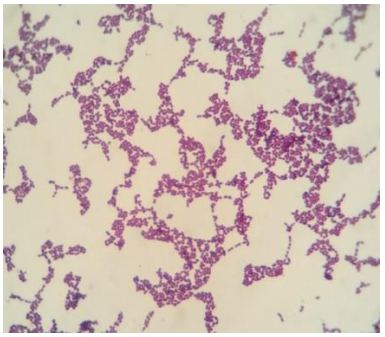
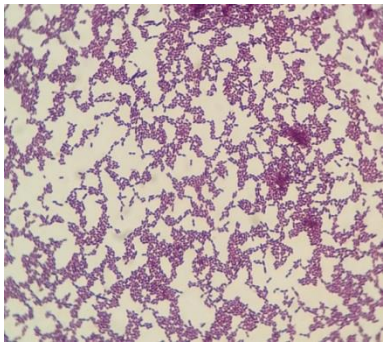
นำแบคทีเรียที่ให้ผลบวกกับการทดสอบกับ Litmus milk ทั้ง 15 ไอโซเลต มาทำการการศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีเพิ่มเติมได้ผลดังต่อไปนี้

4.3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกมาศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยาตามวิธีในข้อ 3.3.5.1 สังเกตลักษณะโคโลนี และย้อมสีเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

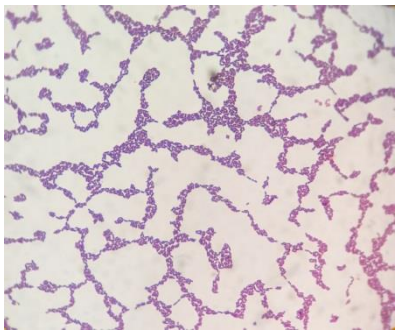
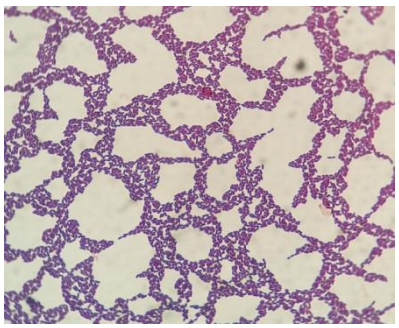
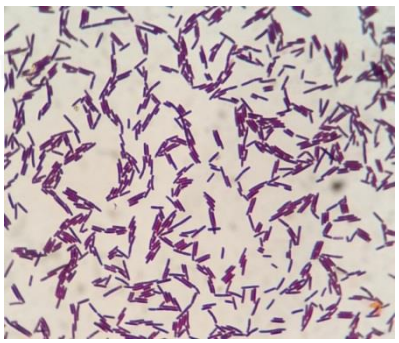
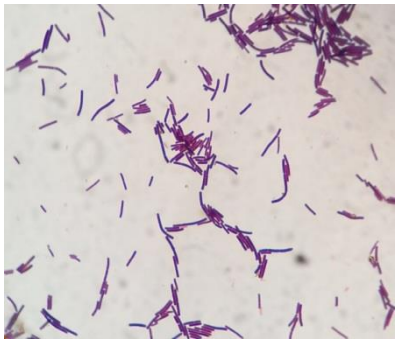
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	การย้อมแกรม		
		รูปร่าง/การจัดเรียงตัว	การติดสี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
L27	กลม สีขาว ขนาดใหญ่ โปร่งแสง มีเมือกเยิ้ม	กลม มักอยู่เป็นเส้นสาย	ม่วง	
L29	กลม สีขาว โปร่งแสง มันวาว	กลม มักอยู่เป็นคู่และเป็นเส้นสาย	ม่วง	
L30	กลม สีขาว มีเมือกเยิ้ม	กลม มักอยู่เป็นเส้นสาย	ม่วง	
L37	กลม สีขาว โปร่งแสง มันวาว	กลม มักอยู่เป็นคู่และเป็นเส้นสาย	ม่วง	

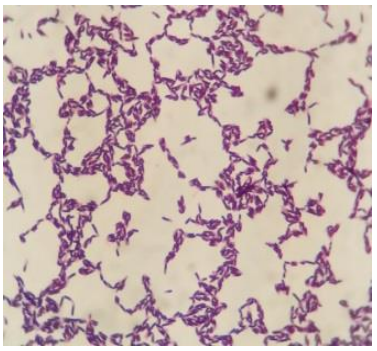
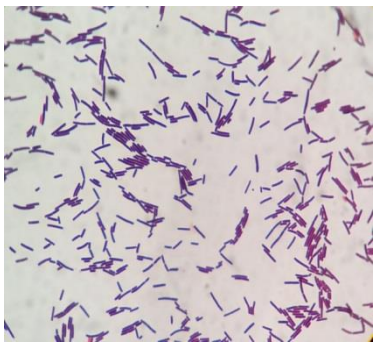
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	การย้อมแกรม		
		รูปร่าง/การจัดเรียงตัว	การติดสี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
L39	สีขาว ทึบแสง แบน ขอบหยัก ผิวมันวาว	แท่งสั้น มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง	
L42	กลม สีขาว ทึบแสง ตรงกลางนูน ขอบไม่เรียบ ผิวมันวาว	แท่งสั้น มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง	
L44	กลม สีขาว ทึบแสง ตรงกลางนูน ขอบไม่เรียบ ผิวมันวาว	แท่งยาว มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง	
L47	กลม สีขาว ทึบแสง ขนาดเล็ก ตรงกลางนูน ขอบเรียบ ผิวมัน	แท่งยาว มักอยู่เป็นเป็นสาย	ม่วง	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อMRS	การย้อมแกรม		
		รูปร่าง/การจัดเรียงตัว	การติดสี	รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
L50	กลม สีขาว ทึบแสง ตรงกลางนูน ขอบเรียบ ผิวมัน	แท่ง มักอยู่เป็นแท่งคู่ เป็นสาย	ม่วง	
L53	กลม สีขาว ทึบแสง ขนาดใหญ่ ตรงกลางนูน ขอบไม่เรียบ ผิวมัน	แท่งยาว มักอยู่เป็นแท่งคู่	ม่วง	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3.2 การทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติม ตามวิธีในข้อ 3.3.5.2 โดยนำแบคทีเรียมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารต่างๆ และภาวะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

เมื่อพิจารณาเทียบเคียงจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี ตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology กับลักษณะมาตรฐานของแบคทีเรีย ผลการทดลอง พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้เป็น 3 สกุล คือ *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* โดยสกุล *Streptococcus* ได้แก่ ไอโซเลต L27, L29, L30 และ L37 สกุล *Lactobacillus* ได้แก่ ไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 และสกุล *Enterococcus* ได้แก่ ไอโซเลต L41, L43, L45, L46 และ L49

เนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้ในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ แลกติกแอซิดแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Lactococcus* (Wouters และคณะ, 2002) ดังนั้นในการคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต จึงคัดเลือกเฉพาะสกุล *Streptococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งหมดรวม 10 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ซึ่งได้นำไปศึกษาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก

ไอโซเลต	การติดสี	รูปร่าง	Catalase test	litmus milk	Fermentation		อุณหภูมิ (°C)		ค่าความเป็นกรดเบส		ความทนเกลือ (%)		การเคลื่อนที่	Arginine test	แบคทีเรียในสกุล
					กลูโคส	แลกโตส	10 °C	45 °C	4.4	9.6	6.5%	18%			
L27	ม่วง	กลม	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	*Streptococcus*
L29	ม่วง	กลม	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	*Streptococcus*
L30	ม่วง	กลม	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	*Streptococcus*
L37	ม่วง	กลม	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	*Streptococcus*
L39	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
L41	ม่วง	กลม	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	*Enterococcus*
L42	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
L43	ม่วง	กลม	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	*Enterococcus*
L44	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
L45	ม่วง	กลม	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	*Enterococcus*

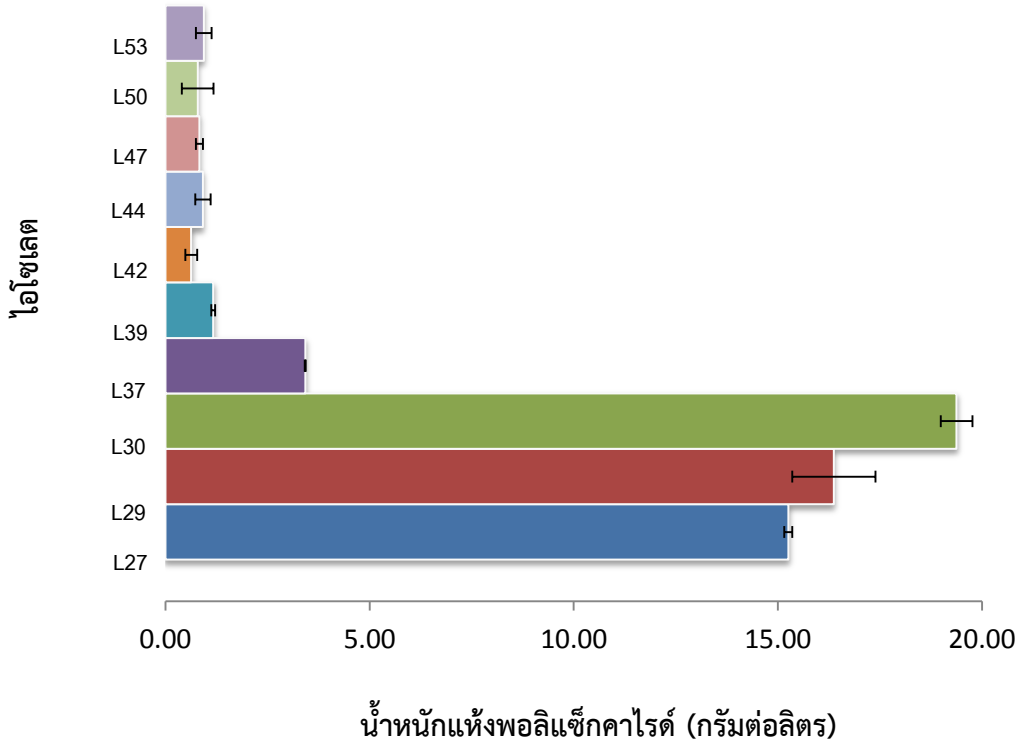
ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก (ต่อ)

ไอโซเลต	การติดสี	รูปร่าง	Catalase test	litmus milk	Fermentation		อุณหภูมิ (°C)		ค่าความเป็นกรดเบส		ความทนเกลือ (%)		การเคลื่อนที่	Arginine test	แบคทีเรียในสกุล
					กลูโคส	แลกโตส	10 °C	45 °C	4.4	9.6	6.5%	18%			
L46	ม่วง	กลม	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	*Enterococcus*
L47	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
L49	ม่วง	กลม	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	*Enterococcus*
L50	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*
L53	ม่วง	แท่ง	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	*Lactobacillus*

4.4 ประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ตรวจสอบประสิทธิภาพในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ของซูโครส น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar จากนั้นนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีในข้อ 3.3.6.2 ชั่งน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์เป็นกรัมต่อลิตร

จากการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า ไอโซเลต L30 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดคือ 19.38 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลต L29, L27 และ L37 ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 16.37, 15.26 และ 3.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยในช่วง 0.63-1.17 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

4.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

4.5.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L27, L29, L30 และ L37 มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูงคืออยู่ในช่วง 86-95% (w/w) ส่วนไอโซเลต L42, L44, L47, L50 และ L53 มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 56-65 แสดงไว้ในตารางที่ 4.5

4.5.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding ตามวิธีของ Bradford (1976) พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลตทั้งหมด มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 2.47-5.03% (w/w) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนต่ำ แสดงไว้ในตารางที่ 4.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (% w/w)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (% w/w)
L27	94.53 ± 0.40	4.75 ± 0.86
L29	86.78 ± 0.43	2.47 ± 2.18
L30	94.24 ± 3.23	2.61 ± 0.83
L37	93.16 ± 1.18	3.23 ± 2.86
L39	64.63 ± 0.20	3.32 ± 1.01
L42	64.01 ± 0.46	2.60 ± 1.00
L44	58.91 ± 0.30	3.46 ± 1.01
L47	58.48 ± 1.08	4.03 ± 3.03
L50	61.10 ± 1.35	5.03 ± 7.07
L53	56.43± 0.20	3.17 ± 1.01

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Chulalongkorn University

4.5.2 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบการละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบความสามารถในการละลายกับสารมาตรฐานแซนแทนกัม ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือก ในน้ำกลั่นและสารละลายต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง

ไอโซเลต	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิห้อง	
	น้ำกลั่น	เมทานอล,อะซีโตน,ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล
L27	++	-
L29	++	-
L30	++	-
L37	++	-
L39	++	-
L42	++	-
L44	++	-
L47	++	-
L50	++	-
L53	++	-
แซนแทนกัม	+++	-

หมายเหตุ : ความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)

- \- ไม่ละลาย เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด
- \+ ละลายได้ต่ำ (ละลายได้เล็กน้อย ยังมีตะกอนอยู่มาก)
- ++ ละลายได้ปานกลาง (ละลายได้บางส่วน ยังมีตะกอนอยู่)
- +++ ละลายได้ดี (ละลายได้หมด)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มีความสามารถในการละลายน้ำได้ปานกลาง และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 10 ไอโซเลตไม่สามารถละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ในขณะที่แซนแทนกัมละลายน้ำได้ดี และไม่ละลายใน เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล เช่นกัน

4.5.3 ความสามารถในการอุ้มน้ำ

นำพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจุ่มในน้ำกลั่นอีกหนึ่งชุด จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) หากเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูง ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 4.7

จากผลการทดสอบพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก ไอโซเลต L27 มีเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงที่สุด เมื่อเทียบกับคาราจีแนน พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเทียบกับกัวกัม และแซนแทนกัม พบว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำกว่า กัวกัม และแซนแทนกัม ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าอย่างชัดเจน ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มีเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์สูง แสดงว่า มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ และต่ำกว่าคาราจีแนน กัวกัม และแซนแทนกัม อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (%)*
L27	27.58 ± 0.43^{b}
L29	45.15 ± 1.29^{c}
L30	60.51 ± 5.91^{d}
L37	62.16 ± 2.15^{d}
L39	86.42 ± 0.87^{e}
L42	87.35 ± 1.34^{e}
L44	88.27 ± 0.00^{e}
L47	85.80 ± 0.87^{e}
L50	87.04 ± 0.00^{e}
L53	91.67 ± 1.31^{e}
คาราจีแนน	32.41 ± 0.44^{b}
กัวกัม	5.86 ± 0.44^{a}
แซนแทนกัม	8.64 ± 0.87^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ตามวิธีข้อ 3.3.8 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 และเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูลใน Genblank ด้วยโปรแกรม Blast N พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของทั้ง 10 ไอโซเลต มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

จากการผลการวิเคราะห์พบว่า ไอโซเลต L27, L29 และ L30 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus lutetiensis* ไอโซเลต L37 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* ไอโซเลต L39 และ L47 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus rhamnosus* ไอโซเลต L42, L44 และ L53 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus helveticus* ส่วนไอโซเลต L50 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus casei* ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางลักษณะสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลต	ไอโซเลตแบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)
L27	*Streptococcus lutetiensis*	NR_121743.1	100
L29	*Streptococcus lutetiensis*	NR_121743.1	99
L30	*Streptococcus lutetiensis*	NR_121743.1	99
L37	*Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18 ไอโซเลต CJ18	NR_102799.1	99
L39	*Lactobacillus rhamnosus* LOCK908	CP005485.1	100
L42	*Lactobacillus helveticus*	HM641232.1	100

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล Genbank (ต่อ)

ไอโซเลต	ไอโซเลตแบคทีเรีย	Accession No.	Sequencing identity (%)
L44	*Lactobacillus helveticus* ไอโซเลต 3-6	KJ702502.1	100
L47	*Lactobacillus rhamnosus* ไอโซเลต RT-B 1	KJ802482.1	100
L50	*Lactobacillus casei*	KP696456.1	100
L53	*Lactobacillus helveticus* R0052	CP003799.1	99

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต L27 L29 และ L37 มีความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงในขณะที่ไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มีความสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ปริมาณต่ำ ในแง่ของลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ปานกลาง ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ ยกเว้นพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L27 ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เนื่องจากทั้ง 10 ไอโซเลตมีสมบัติใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า L27, L29, L30 และ L37 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* group D ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค (Poyart และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงไม่นำไอโซเลต L27, L29, L30 และ L37 ไปศึกษาต่อ และนำแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ได้แก่ L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มาศึกษาลักษณะสมบัติอื่น ๆ ต่อไป

4.7 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก

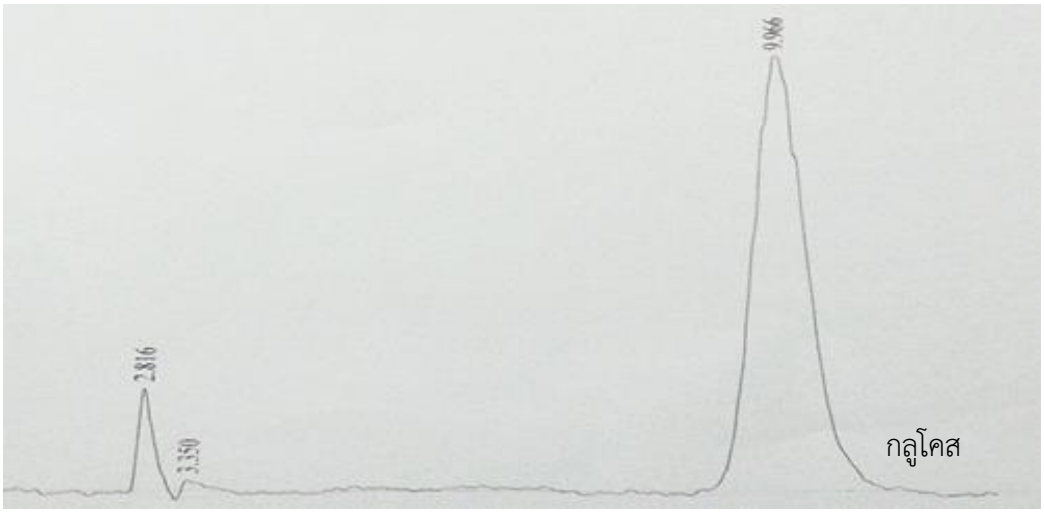
4.7.1 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ได้แก่ L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7 กรองส่วนน้ำใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ภาวะตามข้อ 3.3.9.1 โดยนำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์

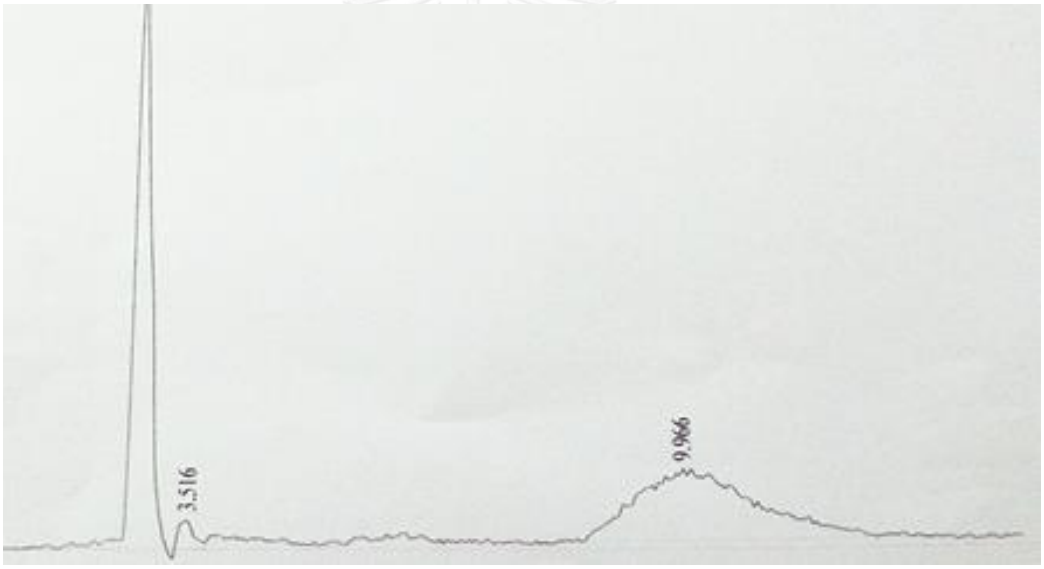
ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L39 โดยเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (รูปที่ 4.3) ซึ่งส่วนประกอบชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.9

จากผลการวิเคราะห์พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L39, L42, และ L44 เป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเรียกว่า กลูแคน (Monsan และคณะ, 2001) จากการรายงานก่อนหน้าพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคส ชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Leuconostoc*, *Lactobaciilus* และ *Weisella* (Korakli และ Vogel, 2006) ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L47, L50 และ L53 พบว่า มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



(ก)



(ข)

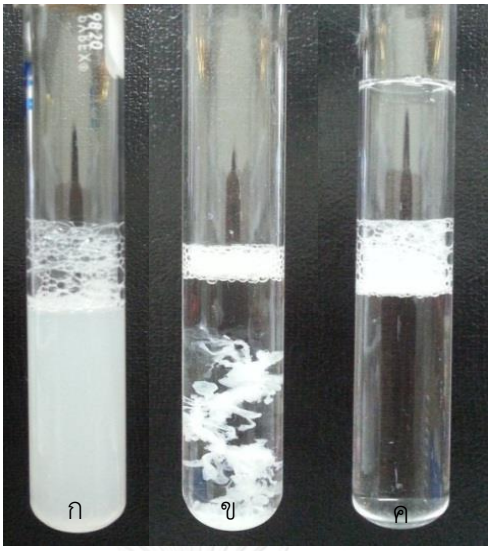
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และ (ข) ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเล L39 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 4.9 ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 หลังจากย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลาย 80% โดยปริมาตร อะซิโตไนไทรล์เป็นตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ไอโซเลต	ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว
L39	กลูโคส
L42	กลูโคส
L44	กลูโคส
L47	อื่นๆ
L50	อื่นๆ
L53	อื่นๆ

4.7.2 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

จากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต ได้แก่ L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มาวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ลงไป พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์แบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ไม่มีตะกอนของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เกิดขึ้น (รูปที่ 4.4ก) ดังนั้น พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ขณะที่แซนแทนกัมเกิดเป็นตะกอนสีขาวแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) แสดงดังในรูปที่ 4.4ข



รูปที่ 4.4 ตัวอย่างผลวิเคราะห์ชนิดประจุของ ก) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L39 ข) แซนแทนกัม (ชุดควบคุมที่มีประจุลบ) และ ค) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมที่มีประจุบวก)

4.7.3 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 4:6 ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.9.2 แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% Emulsifying activity; E_{24}) ผลทดลองแสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำมันมะกอก น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 4:6

ไอโซเลต[ns]	Emulsifying activity (%) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร		
	น้ำมันมะกอก[ns]	น้ำมันทานตะวัน[ns]	น้ำมันถั่วเหลือง[ns]
L39	53.57 ± 1.01	55.80 ± 0.12	54.74 ± 0.47
L42	55.71 ± 0.00	55.48 ± 0.57	55.48 ± 0.57
L44	55.39 ± 0.45	57.05 ± 1.65	53.24 ± 0.54
L47	55.71 ± 0.00	56.12 ± 0.57	52.55 ± 1.52
L50	55.80 ± 1.02	56.20 ± 0.45	55.80 ± 0.00
L53	55.18 ± 1.89	55.18 ± 1.89	54.41 ± 2.08
แซนแทนกัม	56.83 ± 0.44	55.00 ± 1.01	55.80 ± 0.12

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากตารางที่ 4.10 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมีค่า Emulsifying activity (E_{24}) ใกล้เคียงกันทั้งในน้ำมันมะกอก น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันถั่วเหลือง และยังมีค่าใกล้เคียงกับแซนแทนกัม จึงได้วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าค่า Emulsifying activity มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมีความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเทียบเท่ากับแซนแทนกัม

4.7.4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

นำพอลิแซกคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % โดยมวลต่อปริมาตร มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตามวิธีข้อที่ 3.3.9.4 เปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก ได้ผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่า % scavenging activity ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

พอลิแซ็กคาไรด์	% scavenging activity		
	ความเข้มข้น* 0.1% (w/v)	ความเข้มข้น* 0.3% (w/v)	ความเข้มข้น* 0.5% (w/v)
L39	7.86[a]	17.03[a]	31.15[a]
L42	9.51[a]	28.96[b]	42.47[b]
L44	8.41[a]	25.82[ab]	38.08[ab]
L47	8.96[a]	24.89[ab]	35.55[ab]
L50	10.05[a]	29.29[b]	37.91[ab]
L53	12.64[a]	29.29[b]	41.76[b]
กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี)	93.24[b]	93.24[c]	93.02[c]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากผลการทดลอง ตารางที่ 4.11 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มี % scavenging activity ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) สูงสุด โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L42 และ L53 ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) มี % scavenging activity สูงสุดคือเท่ากับ 42.47% และ 41.76% ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต L39, L44, L47 และ L50 มี % scavenging activity ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อยู่ในช่วง 31.15-38.08% แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 6 ไอโซเลต มีสมบัติที่คล้ายกันคือ มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาอื่นๆ มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใกล้เคียงกับแซนแทนกัม มีประจุเป็นกลาง และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มาศึกษาความเหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตโยเกิร์ตต่อไป

4.8 การคัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ในโยเกิร์ต

คัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต โดยนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มาเติมลงในน้ำนมสเตอริไลซ์ (UHT) ที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบลักษณะการเกิดเคิร์ด ค่าความเป็นกรดเบส กลิ่นสีที่ปรากฏ และความหนืดที่เกิดขึ้นของนมหมัก ตามวิธีในข้อ 3.3.9 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.12 ค่าความเป็นกรดเบส ค่าความหนืดปรากฏ (apparent viscosity) กลิ่นและสีของนมหมักที่เกิดจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่าความเป็นกรดเบส	apparent viscosity ที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} (mPa s)	K ($Pa{\cdot}s^{n}$)	n	ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น
L39	3.79 ± 0.00	129 ± 0.00^{bc}	2.89	0.21	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ น้ำมีกลิ่นกรดชัดเจน ฉุน ไม่มีกลิ่นของนมสด มีกลิ่นโยเกิร์ตเล็กน้อย สีขาวปกติ
L42	3.91 ± 0.01	131 ± 0.01^{bc}	3.41	0.17	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรดชัดเจน ไม่ฉุน มีกลิ่นของนมสดน้อย มีกลิ่นโยเกิร์ต สีขาวปกติ
L44	4.17 ± 0.01	116 ± 0.01^{ab}	2.61	0.2	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรดน้อย ไม่ฉุน มีกลิ่นนมสด สีขาวปกติ
L47	4.26 ± 0.02	125 ± 0.01^{abc}	2.92	0.19	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรดน้อย มีกลิ่นนมสดชัดเจน สีขาวปกติ
L50	4.12 ± 0.07	135 ± 0.01^{c}	3.44	0.17	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรด มีกลิ่นนมสด มีกลิ่นโยเกิร์ต สีขาวปกติ
L53	4.14 ± 0.01	114 ± 0.00^{ab}	2.52	0.21	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรด มีกลิ่นนมสด มีกลิ่นโยเกิร์ต สีขาวปกติ
ST	4.5 ±0.01	118.95 ± 0.01^{a}	2.52	0.22	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรดน้อย มีกลิ่นนมสด มีกลิ่นโยเกิร์ต สีขาวปกติ
LB	4.31 ± 0.01	110.83 ± 0.00^{abc}	1.64	0.31	ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ มีกลิ่นกรด มีกลิ่นนมสด มีกลิ่นโยเกิร์ต สีขาวปกติ

หมายเหตุ K คือดัชนีเนื้อสัมผัสหรือ consistency index

n คือค่าดัชนีลักษณะทางการไหล หรือ flow behavior index

a, b,... ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

จากตารางที่ 4.12 พบว่า ลักษณะนมหมักที่เกิดจากการหมักด้วยแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลตมีลักษณะโดยรวมแล้วไม่แตกต่างกันมากนัก โดยพบว่า ไอโซเลต L39 และ L42 มีค่าความเป็นกรดเบสต่ำที่สุดคือ 3.79 และ 3.91 ตามลำดับ เมื่อวัดค่าความหนืดพบว่า ไอโซเลต L42 และ L50 มีค่าความหนืดปรากฏ ที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} สูงสุดคือเท่ากับ 131 และ 135 mPa s ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตที่เป็นชุดควบคุม (ST และ LB) พบว่ามีค่าไม่น้อยกว่าชุดควบคุม ดังนั้นถ้าใช้ไอโซเลต L42 และ L50 เป็นหัวเชื้อร่วมในการผลิตโยเกิร์ต ก็จะทำให้โยเกิร์ตมีความหนืดเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อพิจารณาค่า n หรือค่าดัชนีลักษณะทางการไหล พบว่า n มีค่าน้อยกว่า 1 ดังนั้น นมหมักที่เกิดขึ้นมีพฤติกรรมการไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic fluid) ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต L42 และ L50 ไปประยุกต์ในโยเกิร์ตร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ตจากสมบัติที่พบว่ามีค่าความหนืดปรากฏสูงสุด และมีลักษณะที่ปรากฏโดยรวมเหมาะสม คือ ไม่มีการแยกของน้ำเวย์บนผิวหน้า มีสีขาวปกติ มีกลิ่นกรดที่ไม่ฉุน มีกลิ่นโยเกิร์ต และไม่มีกลิ่นผิดปกติ

4.9 การประยุกต์ในโยเกิร์ต

นำแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือก 2 ไอโซเลต ได้แก่ L42 และ L50 มาเติมลงในนมสเตอริไลซ์ (UHT) ที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 4% โดยปริมาตร เป็นกล้าเชื้อผสมร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* TISTR 894 (ST) และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 (LB) โดยแบ่งเป็นโยเกิร์ต 7 ชุด ได้แก่ 1) ST + LB เป็นชุดควบคุม 2) ST + L42 3) ST + L50 4) LB + L42 5) LB + L50 6) ST + LB + L42 7) ST + LB + L50 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.3 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน ตามวิธีในข้อ 3.3.10.1 แล้วตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีและทางกายภาพดังนี้

4.9.1 ตรวจสอบค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณแบคทีเรีย

นำโยเกิร์ตแต่ละตัวอย่างที่เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน มาตรวจสอบค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณแบคทีเรีย ตามวิธีในข้อ 3.3.10.2 ได้ผลดังแสดงตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเชื้อ (cfu/ml) ของโยเกิร์ตแต่ละชุดเมื่อเก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน

โยเกิร์ต	เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4°C (วัน)	ความเป็น กรดเบส	ปริมาณ กรดแลกติก	ปริมาณเชื้อ (cfu/ml)
ST + LB	1	4.29 ± 0.01	0.73 ± 0.00	4.95×10^{10}
	7	4.28 ± 0.04	0.80 ± 0.02	7.60×10^{10}
ST + L42	1	4.28 ± 0.01	0.79 ± 0.01	7.75×10^{10}
	7	4.01 ± 0.01	0.95 ± 0.03	4.60×10^{11}
ST + L50	1	4.27 ± 0.06	0.70 ± 0.04	4.16×10^{10}
	7	4.12 ± 0.01	0.95 ± 0.04	1.35×10^{11}
LB + L42	1	4.27 ± 0.01	0.72 ± 0.04	4.00×10^{10}
	7	3.99 ± 0.00	0.92 ± 0.02	6.50×10^{10}
LB + L50	1	4.26 ± 0.02	0.75 ± 0.01	7.50×10^{10}
	7	4.15 ± 0.02	0.76 ± 0.06	1.46×10^{11}
ST + LB + L42	1	4.29 ± 0.01	0.75 ± 0.00	3.40×10^{10}
	7	4.03 ± 0.08	0.94 ± 0.01	4.50×10^{10}
ST + LB + L50	1	4.31 ± 0.01	0.74 ± 0.01	4.30×10^{10}
	7	4.26 ± 0.02	0.81 ± 0.02	1.32×10^{11}

จากตารางที่ 4.13 พบว่าโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดที่เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน มีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วง 4.26-4.31 และมีค่าลดลงอยู่ในช่วง 3.99-4.26 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน ส่วนปริมาณกรดแลกติกของโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุด ในวันที่ 1 มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.70-0.79 โดยปริมาตร และมีค่าสูงขึ้นในวันที่ 7 คือมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.76-0.95 โดยปริมาตร สำหรับปริมาณเชื้อ พบว่า ในวันที่ 7 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ในตัวอย่างโยเกิร์ตทั้งหมด และจะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บโยเกิร์ตไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งยังคงมีปริมาณเชื้อสูงอยู่ ดังนั้นโยเกิร์ตชุดที่มีไอโซเลต L42 และ L50 มีค่าความเป็นกรดเบส ปริมาณกรดแลกติกทั้งหมด และปริมาณเชื้อ ไม่แตกต่างจากโยเกิร์ตชุดควบคุม

4.9.2 ตรวจสอบการแยกน้ำ (% syneresis) ของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ตแต่ละตัวอย่างที่เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1 และ 7 วัน มาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำ ตามวิธีในข้อ 3.3.10.3 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การแยกน้ำของโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน

โยเกิร์ต	% การแยกของน้ำ (% syneresis)	
	1 วัน^{ns}	7 วัน^{ns}
ST + LB	59.95 ± 1.20	58.88 ± 0.14
St + L42	60.00 ± 1.13	60.75 ± 0.60
ST + L50	60.40 ± 1.27	58.86 ± 0.98
LB + L42	61.65 ± 1.20	60.75 ± 0.56
LB + L50	61.15 ± 0.07	61.41 ± 0.70
ST + LB + L42	60.30 ± 0.14	58.43 ± 1.41
ST + LB + L50	60.15 ± 0.64	60.58 ± 0.13

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ในคอลัมน์) ($P > 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากตารางที่ 4.14 พบว่าโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุด มีค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำอยู่ในช่วง 59.95-61.65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโยเกิร์ตที่เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ส่วนโยเกิร์ตที่เก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำอยู่ในช่วง 58.43-61.41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโยเกิร์ตแต่ละชุดมีค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำใกล้เคียงกัน จึงได้วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำของตัวโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 วันและ 7 วัน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.9.3 ความหนืดของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ตแต่ละชุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน มาวัดค่าความหนืด ตามวิธีในข้อ 3.3.10.4 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ความหนืดปรากฏที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} ของโยเกิร์ตแต่ละชุดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน

โยเกิร์ต	ความหนืดปรากฏ ที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} (mPa s)	
	1 วัน^{ns}	7 วัน^{ns}
ST + LB	121.57 ± 0.000	123.25 ± 0.002
ST + L42	131.38 ± 0.003	129.40 ± 0.011
ST + L50	127.29 ± 0.001	138.39 ± 0.001
LB + L42	126.71 ± 0.002	123.65 ± 0.002
LB + L50	117.70 ± 0.012	129.80 ± 0.001
ST + LB + L42	128.55 ± 0.002	137.02 ± 0.005
ST + LB + L50	129.56 ± 0.003	135.39 ± 0.000

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ในคอลัมน์) ($P > 0.05$)

จากตารางที่ 4.15 พบว่าโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุด เมื่อเก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน ค่าความหนืดปรากฏที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่เวลา 1 วัน โยเกิร์ตมีค่าความหนืดอยู่ในช่วง 117.70-137.02 mPa s และมีค่าเพิ่มขึ้นทุกชุด เมื่อเก็บเป็นเวลา 7 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 123.25-138.39 mPa โยเกิร์ตชุดที่มีไอโซเลต L42 และ L50 มีค่าไม่น้อยกว่าโยเกิร์ตชุดควบคุม ST + LB และโยเกิร์ตชุด ST + L50 มีค่าความหนืดสูงสุด

4.9.4 ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ต

นำโยเกิร์ตทั้ง 7 ตัวอย่าง ที่เก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1 และ 7 วัน มาวัดค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ตามวิธีในข้อ 3.3.10.5 ได้ผลแสดงในตารางที่ 4.16

ตา**รางที่ 4.16** ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ตแต่ละชุดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน

โยเกิร์ต	ค่าความแน่นเนื้อ (กรัม)^{ns}	
	1 วัน^{ns}	7 วัน^{ns}
ST + LB	81 ± 0.000	73 ± 0.004
ST + L42	76 ± 0.000	77 ± 0.005
ST + L50	70 ± 0.000	81 ± 0.003
LB + L42	68 ± 0.010	72 ± 0.000
LB + L50	60 ± 0.010	70 ± 0.002
ST + LB + L42	76 ± 0.010	80 ± 0.001
ST + LB + L50	73 ± 0.000	77 ± 0.000

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ในคอลัมน์) ($P > 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากตารางที่ 4.16 พบว่า ค่าแรงกดสำหรับการแทงทะลุผ่านเนื้อเจลโยเกิร์ต หรือค่าความแน่นเนื้อของโยเกิร์ต เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน จึงได้วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA พบว่า ค่าความแน่นเนื้อมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อดูค่าตัวเลขพบว่า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน โยเกิร์ตชุดควบคุม ST + LB มีค่าความแน่นเนื้อสูงสุด มีค่าเท่ากับ 81 กรัม รองลงมาคือ โยเกิร์ตชุด ST + L42 และ ST + LB + L42 มีค่าเท่ากับ 76 กรัม เมื่อเก็บต่อไป เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโยเกิร์ตชุดควบคุม ST + LB มีค่าลดลงคือเท่ากับ 73 กรัม ในขณะที่โยเกิร์ตชุดอื่นมีค่าความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นทุกชุด โดยโยเกิร์ตชุด ST + L50 และ ST + LB + L42 มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 81 และ 80 กรัม ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารนั้นต้องเป็นแบคทีเรียที่จัดเป็น Food-Grade Bacteria คือมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอาหาร แลกติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้รับการรับรองว่าเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) สามารถนำมาใช้ในอาหารได้ (Mogensen และคณะ, 2002) โดยทั่วไปแลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถพบได้ในอาหารหมักชนิดต่างๆ ผลิตภัณฑ์นมหมัก และอาหารพื้นเมืองบางชนิด (Ruas-Madiedo และ de los Reyes-Gavilan, 2005) งานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในธรรมชาติ โดยได้เก็บตัวอย่างผักดองชนิดต่างๆ น้ำผลไม้ และนมดิบ จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple จากนั้นนำไอโซเลตทั้งหมดมาย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Paulo และคณะ, 2012) พบว่า ไอโซเลตที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่งและกลม และให้ผลแคทาเลสเป็นลบ มีจำนวนทั้งหมด 53 ไอโซเลต โดยได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองจำนวนทั้งหมด 12 ไอโซเลต จากน้ำผลไม้จำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลต จากนมดิบจำนวนทั้งหมด 27 ไอโซเลต ซึ่งทั้ง 53 ไอโซเลตได้รับการกำหนดรหัสเป็น L01-L53 มีการรายงานของวรรษมน นิลสันเทียะ (2553) รายงานว่า ไม่พบแลกติกแอสิดแบคทีเรียในตัวอย่างมะม่วงดอง พุทราดอง มะยมดอง และมะกอกดอง ส่วนกระเทียมดอง ผักกาดดอง และหน่อไม้ดอง พบแลกติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 43, 35 และ 56 ไอโซเลต ตามลำดับ และมงคล ถิรบุญยา และคณะ (2556) สามารถคัดแยกแลกติกแอสิดแบคทีเรียจากนำนมดิบหมักจำนวน 31 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปร่างแบบท่อนหรือแบบกลมได้จำนวน 284 ไอโซเลต

ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความนิยม เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีประโยชน์ต่อผู้บริโภค และเนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันต่ำ และลดการใช้สารเติมแต่งในอาหาร ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและการรับรู้รสชาติของผลิตภัณฑ์ (Duboc และ Mollet, 2001) ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์กรดแลกติกที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต เพื่อช่วยลดปัญหาดังกล่าว มีความสำคัญและได้รับความสนใจ (Duboc และ Mollet (2001); Purwandari และคณะ, (2007) ในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกจุลินทรีย์กรดแลกติกสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ต เพื่อช่วยปรับปรุงคุณภาพของโยเกิร์ต จึงได้นำไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้มาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับ

การผลิตโยเกิร์ต โดยใช้อาหารทดสอบ litmus milk โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่ก่อเคิร์ดในอาหารทดสอบ litmus milk จากไอโซเลตทั้งหมดพบว่า มี 15 ไอโซเลตเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต เมื่อนำแลกติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตมาศึกษาสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น พบว่า สามารถจำแนกแบคทีเรียในระดับสกุลได้เป็น 3 สกุล คือ *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Enterococcus* ตามอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan และ Gibbons, 1974) Ludbrook และคณะ (1997) รายงานว่า สามารถคัดแยกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในสกุล *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ซึ่งคัดแยกได้จากอาหารหมักดองต่างๆ เช่น มะกอกดอง และแฮม และยังมีการรายงานของ Franciosi และคณะ (2009) ที่รายงานว่าพบแบคทีเรียในสกุล *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างนมโคดิบ เนื่องจาก Wouters และคณะ (2002) รายงานว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Lactococcus* สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค และไม่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์นม (Stiles และ Holzapfel, 1997) ดังนั้นในการคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต จึงคัดเลือกเฉพาะสกุลที่คาดว่าจะเป็น *Streptococcus* และ *Lactobacillus* เท่านั้น ซึ่งพบว่ามีทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ L27, L29, L30, L37, L39, L42, L44, L47, L50 และ L53

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 4% ซูโครสโดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต L30 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด เท่ากับ 19.38 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือไอโซเลต L29, L27 และ L37 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 16.37, 15.26 และ 3.42 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรียไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดคืออยู่ในช่วง 0.63-1.17 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Mostefaoui และคณะ (2014) ที่รายงานว่า ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างนมดิบ อยู่ในช่วง 0.16-0.74 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการรายงานของ Badel และคณะ (2011) ที่รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.8-2.775 กรัมต่อลิตร ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีการรายงานของวิชุชดา วิไลรัศมี (2555) รายงานว่าเมื่อนำไอโซเลต L07 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส

กลูโคส ฟรุกโทส แลกโตส และมอลโทส พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด Ruas-Madiedo และคณะ (2009) รายงานว่า ปริมาณผลผลิตของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารอาหารอื่นๆ สภาวะในการเจริญ เช่น ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น ระยะเวลาในการหมักหรือบ่ม สายพันธุ์จุลินทรีย์ นอกจากนี้พบว่าวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีผลต่อปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย (Mende และคณะ, 2013)

สมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์มีความสำคัญต่อการเลือกใช้งานของพอลิเมอร์ พอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมแตกต่างกันขึ้นกับสมบัติเฉพาะของพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับงานนั้น ๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกไอโซเลตที่เหมาะสมไปศึกษาต่อ จากการศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L27, L29, L30 และ L37 มีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูง คืออยู่ในช่วง 95-113 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนไอโซเลต L39, L42, L44, L47, L50 และ L53 มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 56-65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 10 ไอโซเลต มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 24.67-50.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณของโปรตีนแสดงถึงความบริสุทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้

จากการทดสอบความสามารถในการละลายที่อุณหภูมิห้อง พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 10 ไอโซเลต ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ละลายน้ำได้ปานกลาง และทั้งหมดไม่ละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล ความสามารถในการละลายน้ำนั้นขึ้นอยู่กับการมีหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ การที่พอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากว่าเมื่อละลายในตัวละลายอินทรีย์ทำให้มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการตกผลึกของพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ (James, 1986) โดยคุณสมบัติการละลายเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในอาหาร

ในการทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลตทั้งหมด พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์สูง หรือมีความสามารถในการอุ้มน้ำที่ต่ำเมื่อเทียบกับแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวกัม ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าอย่างชัดเจน ยกเว้นไอโซเลต L27 ที่มีความสามารถใน

การอุ้มน้ำสูงที่สุดคือเท่ากับ 27.58% และเทียบเท่ากับคาราจีแนน ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของวรรษมน นิลสันเทียะ (2553) รายงานว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ EN07 มีเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำสุดที่ 28% สมบัติความสามารถในการอุ้มน้ำสามารถนำไปประยุกต์ในอาหารได้หลากหลาย เช่น ช่วยลดการแยกของน้ำเวย์ในผลิตภัณฑ์นมหมักและมีความสัมพันธ์กับสมบัติการไหล (Farnworth และคณะ, 2006)

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S ribosomal DNA พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L27, L29 และ L30 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus lutetiensis* และไอโซเลต L37 มีความคล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* Poyart และคณะ (2002) รายงานว่า *S. lutetiensis* (*S. infantarius* subsp. *coli*) และ *S. infantarius* subsp. *infantarius* จัดอยู่ในกลุ่มของ *S. bovis/S. equinus* เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากคน สัตว์ อุจจาระของทารก และผลิตภัณฑ์นม (Mora และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่รายงานว่า *S. infantarius* subsp. *infantarius* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากในผลิตภัณฑ์นมหมักพื้นบ้านของแอฟริกา เช่น suusac และยังไม่มีการรายงานที่แน่ชัดในด้านความปลอดภัยเกี่ยวกับสายพันธุ์นี้ ซึ่งอาจจะมีความเสี่ยงต่อสุขภาพ และจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต (Jans และคณะ, 2013) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของไอโซเลต L39 และ L47 มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus rhamnosus* ไอโซเลต L42, L44 และ L53 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA คล้ายกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus helveticus* และไอโซเลต L50 มีลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA คล้ายกับของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus casei* Klein และคณะ (1998) รายงานว่า *L. rhamnosus* และ *L. casei* เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่มีการใช้ในคนและสัตว์ *L. casei* เป็นโปรไบโอติกที่มีการเติมลงไปในผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต เพราะนอกจากจะมีประโยชน์ต่อร่างกายแล้ว ยังมีการรายงานว่าเป็นสายพันธุ์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ในระหว่างการเก็บรักษามากกว่า *L. acidophilus* และ Bifidobacteria (Ravula และ Shah, 1998) และยังมีการรายงานของ Taverniti และ Guglielmetti (2012)พบว่า *L. helveticus* ก็แสดงลักษณะความเป็นโปรไบโอติกเช่นเดียวกับแบคทีเรียโปรไบโอติกอื่น และสามารถป้องกันจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกเฉพาะไอโซเลต L39 L42 L44 L47 L50 และ L53 ไปศึกษาคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาคุณสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลตที่คัดเลือกโดยวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ไอโซเลต L39, L42, L44 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว จัดเป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ van Geel-Schutten และคณะ (1998) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ส่วนใหญ่จะเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดกลูแคน และยังมีการรายงานของ Korakli และ Vogel (2006) รายงานว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตกลูแคน พบในกลุ่มของ *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Weissella* ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์จากไอโซเลต L47, L50 และ L53 พบน้ำตาลชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากที่ทดสอบ Badel และคณะ (2011) รายงานว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* มีทั้งชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ และมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส แรมโนส แมนโนส เป็นต้น โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น องค์ประกอบน้ำตาล การแทนที่ของสาร และลักษณะโครงสร้างแบบเส้นตรงหรือแตกกิ่ง มีความสำคัญต่อสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ (Kennedy และ White, 1983) เนื่องจากประจุมีความสำคัญต่อการก่อเจลจึงได้ทำการทดสอบประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อทดสอบประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์จากทั้ง 6 ไอโซเลต มีชนิดประจุเป็นกลาง ดังนั้นจึงไม่สามารถจับกับเกลือของโลหะแล้วเกิดเป็นเจลได้ ในขณะที่แซนแทนกัมมีประจุลบและสามารถเกิดเจลได้กับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (วิชชุดา วิไลรัศมี, 2555)

คุณสมบัติอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในการนำพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันพืชได้ และเป็นสมบัติที่ถูกนำไปใช้อย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากการทดสอบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่า มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก และน้ำมันเมล็ดทานตะวันได้ดีเทียบกับแซนแทนกัม มีการรายงานของ Prasanna และคณะ (2012) รายงานว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % emulsifying activity (E_{24}) กับน้ำมันเมล็ดทานตะวันสูงสุด เท่ากับ 78.2% ซึ่งสูงกว่าแซนแทนกัมและกัวกัม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 69.5% และ 65.7% ตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษาการเป็นอิมัลซิไฟเออร์กับน้ำมันพืชนั้น ยังมีความสำคัญในแง่ของการผลิตโยเกิร์ตประเภท vegetable oil yogurt คือโยเกิร์ตที่มีการทดแทนไขมันนมด้วยน้ำมันพืช (Tamine และ Robinson, 1999)

ส่วนการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต L42 ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) มี % DPPH radical scavenging activity สูงสุดคือเท่ากับ 42.47% รองลงมาคือพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L53 คือเท่ากับ 41.76% ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต L39, L44, L47 และ L50 มี % DPPH radical scavenging activity อยู่ในช่วง 31.15 - 38.08% และสูงกว่าวิชุชดา วิไลรัศมี (2555) ที่รายงานไว้ว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก L06 และ L07 มี %DPPH radical scavenging activity ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยเท่ากับ 10.83% และ 11.88% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากรดแอสคอร์บิก นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ Zhang และคณะ (2013) รายงานว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *L. plantarum* C88 มี % DPPH radical scavenging activity เท่ากับ 52.23% ที่ความเข้มข้น 0.4% (w/v) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นสมบัติเสริมอย่างหนึ่ง สามารถนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ เป็นการเสริมคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากทั้ง 6 ไอโซเลต มีสมบัติที่คล้ายกันคือ มีองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลอื่นๆ มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ สามารถละลายน้ำได้ปานกลาง ไม่ละลายในตัวทำละลาย มีความเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใกล้เคียงกับแซนแทนกัม มีประจุเป็นกลาง และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงนำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต มาศึกษาความเหมาะสมเพิ่มเติมในการใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต

การศึกษาความเหมาะสมเพิ่มเติมในการใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต โดยเติมเชื้อลงในน้ำนมยูเอชที ที่มีความเข้นของน้ำตาลเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการรายงานของอุษามาส จริยวรานุกูล (2552) รายงานว่าโยเกิร์ตที่ใช้สารให้ความหวานที่ระดับ 4 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) มีคะแนนทางด้านความชอบโดยรวมมากกว่าที่ระดับอื่น และยังรายงานว่า ซูโครสเป็นสารให้ความหวานที่มีการเติมแต่งในโยเกิร์ตและได้รับการยอมรับมากที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้น้ำตาลความเข้มข้นที่ระดับ 4 เปอร์เซ็นต์ในการผลิตโยเกิร์ต จากการศึกษาพบว่า ไอโซเลต L42 และ L50 มีค่าความหนืดปรากฏ ที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} สูงสุดคือเท่ากับ 131 และ 135 mPa s ตามลำดับ และมีค่าไม่น้อยกว่าชุดควบคุมที่เป็นหัวเชื้อโยเกิร์ต (ST และ LB) และต่อไปจะนำแบคทีเรียไอโซเลต L42 และ L50 ร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ตในการผลิตโยเกิร์ต ซึ่งจะทำให้โยเกิร์ตมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น แม้ว่าจากผลการทดสอบปริมาณการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ พบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต L42 และ L50 ไม่ใช่ไอโซเลตที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด ทั้งนี้ Vasilean และคณะ (2011) รายงานว่า ความหนืดที่เกิดขึ้นไม่ขึ้นกับปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ แต่ขึ้นอยู่กับ

คุณสมบัติของพอแซ็กคาไรด์และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิต และนอกจากนี้นมหมักที่เกิดจากแบคทีเรียไอโซเลต L42 และ L50 มีลักษณะที่ปรากฏโดยรวมไม่แตกต่างจากนมหมักที่เกิดจากหัวเชื้อโยเกิร์ตชุดควบคุม คือ ไม่มีการแยกของน้ำเวย์บนผิวหน้า มีสีขาวปกติ มีกลิ่นกรดที่ไม่ฉุน มีกลิ่นโยเกิร์ต (กลิ่นของอะซิตาลดีไฮด์) และไม่มีกลิ่นผิดปกติ ดังนั้นไอโซเลต L42 และ L50 มีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ต งานวิจัยนี้จึงได้นำไอโซเลต L42 และ L50 มาใช้ร่วมกับหัวเชื้อโยเกิร์ตในการผลิตโยเกิร์ต และศึกษาลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของโยเกิร์ตต่อไป

ในการผลิตโยเกิร์ตทางการค้าจะใช้หัวเชื้อ 2 ชนิดร่วมกัน ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2556 (ภาคผนวก จ)) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทำหน้าที่ในการสร้างกลิ่นรสและลักษณะของเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ต โดย *Streptococcus* ทำให้เกิด diacetyl และสารประกอบที่คล้ายกันซึ่งมีผลต่อกลิ่นรสของครีมเนยในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในช่วงแรก *Streptococcus* จะเจริญจนมีค่าความเป็นกรดประมาณ pH 5.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* จะสร้างกรดฟอร์มิคขึ้นมา โดย *Lactobacillus* จะใช้กรดฟอร์มิคในการสร้าง acetaldehyde เพื่อทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของโยเกิร์ต (Hill และ Kethireddipalli, 2013) ในปัจจุบันนี้โยเกิร์ตได้มีการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพมาโดยตลอด ทำให้เกิดโยเกิร์ตชนิดที่เรียกว่าไบโอโยเกิร์ต (bioyogurt) คือ โยเกิร์ตที่มีการเติมจุลินทรีย์อื่นที่เป็นประโยชน์ร่วมด้วย อย่างเช่น *L. casei*, *Bifidobacteria*, *L. acidophilus* เป็นต้น ซึ่งเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย (Lourens-Hattingh และ Viljoen, 2001) และนอกจากนี้ยังมีการเติมแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของโยเกิร์ต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลต L42 และ L50 และหัวเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตในการผลิตโยเกิร์ต และศึกษาลักษณะทางเคมี และคุณลักษณะทางกายภาพ โดยพบว่า หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดมีค่าความเป็นกรดเบสลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันที่ 1 สอดคล้องกับปริมาณกรดแลกติกทั้งหมด และมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น เมื่อตรวจสอบค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำของโยเกิร์ตทั้ง 7 ชุด พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำไม่แตกต่างกัน โดยโยเกิร์ตชุด ST + LB, ST + L50, LB + L42 และ ST + LB + L42 มีเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำลดลงเล็กน้อยในวันที่ 7 ในขณะที่โยเกิร์ตชุดอื่นมีค่าคงที่ แต่ไม่ปรากฏการแยกของน้ำเวย์ที่ผิวหน้าโยเกิร์ต เมื่อตรวจสอบมีค่าความหนืดปรากฏที่อัตราเฉือน 50 s^{-1} เมื่อเก็บไว้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในวันที่ 7

โยเกิร์ตทั้ง 7 ชุดมีค่าเพิ่มเล็กน้อยอยู่ในช่วง 123.25-138.39 mPa s และมีค่าไม่น้อยกว่าโยเกิร์ตชุดควบคุม โดยโยเกิร์ตตัวอย่าง ST + L50 มีค่ามากที่สุด

ค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของโยเกิร์ต พบว่า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 7 วัน ค่าความแน่นเนื้อของโยเกิร์ตมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยโยเกิร์ตชุดควบคุม ST + LB มีค่าความแน่นเนื้อสูงสุด มีค่าเท่ากับ 81 กรัม และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโยเกิร์ตชุดควบคุม ST + LB มีค่าลดลงคือเท่ากับ 73 กรัม ในขณะที่โยเกิร์ตชุดอื่นมีค่าความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นทุกชุด โดยโยเกิร์ตชุด ST + L50 และ ST + LB + L42 มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 81 และ 80 กรัม ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาคุณสมบัติทั้งหมดของโยเกิร์ตในช่วงระยะเวลา 7 วัน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า โยเกิร์ตชุด ST + LB + L42 และ ST + L50 มีลักษณะทางเคมีและทางกายภาพโดยรวมดีที่สุด ด้วยคุณสมบัติดังนี้คือ โยเกิร์ตทั้ง 2 ชุดมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น มีเปอร์เซ็นต์การแยกน้ำเวย์คงที่ มีค่าความหนืดปรากฏและมีค่าความแน่นเนื้อสูงขึ้น และสูงกว่าชุดควบคุมที่เป็นหัวเชื้อโยเกิร์ต (ST+LB)

นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อปรับปรุงคุณภาพโยเกิร์ตแล้ว ปริมาณของแข็งที่เหมาะสมในการเป็นส่วนผสมเพิ่มในน้ำนมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ น้ำตาลแลกโตส โปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ ในน้ำนมที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต มีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติทางกายภาพและกลิ่นรสของโยเกิร์ต โดยเฉพาะความหนืด ความแน่นเนื้อ และกลิ่นครีมเนย โดยโยเกิร์ตที่มีคุณภาพดีได้จากน้ำนมที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 15-16 โดยน้ำหนัก หลังกระบวนการหมักจะทำให้ได้โยเกิร์ตที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 14-15 โดยน้ำหนัก และ Amatayakul และคณะ (2006) พบว่าการใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักร่วมกับการปรับอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเคซีนและโปรตีนเวย์ในส่วนผสมสำหรับผลิตโยเกิร์ต ทำให้ได้โยเกิร์ตชนิดคงตัวและโยเกิร์ตชนิดคนที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงควรศึกษาอัตราส่วนปริมาณของแข็งในน้ำนมร่วมกับการใช้แลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในการผลิตโยเกิร์ตต่อไป

ทั้งนี้ลักษณะปรากฏ (appearance) และลักษณะทางกายภาพ (physical properties) เป็นดัชนีคุณภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โยเกิร์ตที่มีคุณภาพดีควรมีเนื้อเจลค่อนข้างข้นหนืดและเนียนเรียบ โครงสร้างเจลไม่หดตัว และไม่เกิดการแยกชั้นระหว่างของเหลวกับเนื้อโยเกิร์ต (whey syneresis) สำหรับโยเกิร์ตชนิดคงตัว มีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ที่มักปรากฏ คือ เนื้อเจลโยเกิร์ตนิ่มมีความแน่นเนื้อต่ำ และเกิดการแยกชั้นของน้ำหางนมหรือน้ำเวย์ออกจากโครงสร้างเจลโยเกิร์ตจนทำให้

มีของเหลวที่ผิวหน้าโยเกิร์ต (Walstra และคณะ, 1999) โดยลักษณะทางกายภาพ และลักษณะปรากฏต่างๆ ของโยเกิร์ตมีความสำคัญโดยตรงต่อความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์

ถึงแม้ว่าการใช้แบคทีเรียไอโซเลต L42 และ L50 เป็นหัวเชื้อร่วมในการผลิตโยเกิร์ต จะมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการผลิตโยเกิร์ตโดยใช้หัวเชื้อโยเกิร์ตมากนัก แต่อย่างไรก็ตาม พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากไอโซเลต L42 และ L50 ก็มีสมบัติที่ดีอื่นๆ ในการผลิตโยเกิร์ต นอกจากจะเป็นเชื้อที่มีรายงานว่ามีความเป็นโปรไบโอติกที่เป็นประโยชน์แล้ว พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตยังมีสมบัติความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นการเสริมคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ผู้บริโภคจะได้ประโยชน์จากสมบัติในส่วนนี้ด้วย

นอกจากนี้มีหลายงานวิจัย รายงานการใช้แลกติกแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่น Broadbent และคณะ (2001) ใช้หัวเชื้อที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในชีสไขมันต่ำ และการศึกษาลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Weissella* และ *Lactobacillus* และนำมาประยุกต์ใช้ในเชดดาร์ชีส (Lynch และคณะ, 2014) การนำไปประยุกต์ในผลิตภัณฑ์นมหมักอื่น อย่างเช่น ชีส ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับงานวิจัยนี้ในอนาคตต่อไป และนอกจากผลิตภัณฑ์นมแล้ว การใช้แลกติกแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย อย่างเช่น แหนม ขนมจีน และไส้กรอกอีสาน ก็มีความน่าสนใจเช่นกัน

จากการนำแลกติกแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ต ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) แต่เนื่องด้วยผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นในด้านกลิ่นและสีที่เกิดขึ้น พบว่ากลิ่นและสีที่เกิดขึ้นไม่มีผลเสียต่อผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และเนื่องจากเป็นแลกติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมักอยู่แล้ว จึงไม่น่าจะส่งผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ไอโซเลต L42 และ L50 สามารถนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ตได้และมีความปลอดภัยในการบริโภค

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของแลกติกแอซิดแบคทีเรียไอโซเลต L42 และ L50 เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และทราบระยะเวลาที่มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด
2. ควรศึกษาผลของสารให้ความหวานชนิดอื่นๆ และปริมาณของแข็งที่เหมาะสมต่อคุณภาพของโยเกิร์ต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คัดนางค์ ทองสุก. 2542. การผลิตโยเกิร์ต. อาหาร 29(4): 296-298.

จิรารัตน์ ทัตติยกุล. 2554. วิทยากระแสของอาหารกรุงเทพ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธิดารัตน์ วงศ์รัตน์. 2552. ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นฤศันส์ วาสิกดิลก. 2540. การสารวจพฤติกรรมของผู้บริโภคที่มีต่อโยเกิร์ต. ปัญหาพิเศษปริญญา- โท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มงคล ถิรบุญยานนท์, เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร และวิจิตรา แดงปรก. 2556. ผลของผลิตภัณฑ์นมหมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกกรดแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้.

วรรษมน นิลสันเทียะ. 2553. การคัดเลือกและลักษณะสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิชชุดา วิไลรัศมี. 2555. เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแลกติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในน้ำสลัด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก: อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์.จาร์พา.

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุขใจ ชูจันทร์. 2557. พอลิเมอร์จากจุลินทรีย์กรุงเทพ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัยรา พันอนุ. 2549. การเพิ่มปริมาณ conjugated linoleic acid (CLA) ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตโดยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลกติก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อุษามาส จริยวรานุกูล. 2552. ผลของสารให้ความหวานต่อคุณภาพของโยเกิร์ต. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 29(4): 102-111.Amatayakul, T., A. L. Halmos, F. Sherkat and N. P. Shah. 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. International Dairy Journal 16(1): 40-51.

ภาษาอังกฤษ

Ashtaputre, A. A. and A. K. Shah. 1995. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharicle from *Spingomonas paucimobilis*. World Journal of Microbiology & Biotecbnology 11: 219-222.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology. Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects. New York: Marcel Dekker, Inc.

Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. Microbiological and Functional Aspects. U.S.: CRC Press.1-67

Badel, S., T. Bernardi and P. Michaud. 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. Biotechnology Advances 29(1): 54-66.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Broadbent, J. R., D. J. McMahona, C. J. Obergb and D. L. Welker. 2001. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. International Dairy Journal 11: 433-439.

Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative BacteriologyUnited States of America Waverly press

Cerning, J. 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. Lait 75: 463-472.

Collins, E. A., J. Bares and F. W. Billmeyer. 1973. Experiments in Polymer Science New York: Wiley

De Vuyst, L. and B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 23: 153–177.

Duboc, P. and B. Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal 11: 759–768.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Farid, M. M. 2010. Rheological Properties of FoodNew York CRC Press.31–67

Farnworth, E. R., C. P. Champagne and M. Rose Van Calsteren. 2006. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: food uses, production, chemical structures, and health effects.Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods 2nd. New York CRC Press.353 - 371

Franciosi, E., L. Settanni, A. Cavazza and E. Poznanski. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. International Dairy Journal 19: 3–11.

Freitas, F., V. D. Alves and M. A. Reis. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology 29(8): 388-398.

Funami, T. 2009. Functions of food polysaccharides to control the gelatinization and retrogradation behaviors of starch in an aqueous system in relation to the macromolecular characteristics of food polysaccharides. Food Science and Technology Research 15: 557-568.

Grassi, G., R. Lapasin, M. Grassi and I. Colombo. 2006. Rheology.In Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms A Physical and Mathematical Approach. New York CRC Press

Guggisberg, D., J. Cuthbert-Steven, P. Piccinali, U. Bütikofer and P. Eberhard. 2009. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. International Dairy Journal 19(2): 107-115.

Guzel-Seydim, Z. B., E. Sezgin and A. C. Seydim. 2005. Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. Food Control 16(3): 205-209.

Herdman, R. C. 1993. Biopolymers: making materials nature's wayWashington DC U.S. Government Printing Office

Hill, A. R. and P. Kethireddipalli. 2013. Biochemistry of Foods. Chapter 8 – Dairy Products: Cheese and Yogurt. San Diego: Academic Press is an imprint of Elsevier. 319-362.

Izydorczyk, M., S. W. Cui and Q. Wang. 2005. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications.In Cui, S. W, Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications. New York CRC Press

James, K. C. 1986. Drugs and the pharmaceutical sciences : Solubility and related properties. 28, Marcel Dekker, New York

Jans, C., D. W. M. Kaindi, D. Böck, P. M. K. Njage, S. M. Kouamé-Sina, B. Bonfoh, C. Lacroix and L. Meile. 2013. Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. International Journal of Food Microbiology 167: 186–195.

Jolly, L., S. J. F. Vincent, P. Duboc and J. R. Neeser. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 82: 367–374.

Kambourova, M., R. Mandeva, D. Dimova, A. Poli, B. Nicolaus and G. Tommonaro. 2009. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. Carbohydrate Polymers 77: 338-343.

Kennedy, J. F. and C. A. White. 1983. Bio-active carbohydrates Chichester: Ellis Horwood

Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. International Journal of Biosciences 1: 1-13.

Khan, T., J. K. Park and J. Kwon. 2007. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. Korean Journal of Chemical Engineering 24(5): 816-826.

Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 41: 103–125.

Korakli, M. and R. F. Vogel. 2006. Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. Appl Microbiol Biotechnol 71(6): 790-803.

Kumar, A. S., K. Mody and B. Jha. 2007. Bacterial exopolysaccharides-a perception. Journal of basic microbiology 47(2): 103-117.

Kumar, C. G., H. S. Joo, J. W. Choi, Y. M. Koo and C. S. Chang. 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophillus *Baciilus* sp. I-450. Enzyme and Microbial Technology 34: 673-681.

Laws, A. V. and V. M. Marshall. 2001. The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11: 709–721.

Lindsay, S. 1991. High Performance Liquid Chromatography : Analytical chemistry by open learningSingapore John Wiley and Sons

Lourens-Hattingh, A. and B. C. Viljoen. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal 11(1-2): 1-17.

Ludbrook, K. A., C. M. Russell and R. I. Greig. 1997. Exopolysaccharide production from Lactic acid bacteria isolated from fermented foods. JOURNAL OF FOOD SCIENCE 62(3): 597-601.

Lynch, K. M., P. L. H. McSweeney, E. K. Arendt and T. Uniacke-Lowe. 2014. Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and

their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. International Dairy Journal 34: 125-134.

Margaritis, A. and P. W. Pace. 1985. Microbial Polysaccharide.Comprehensive Biotechnology. New York: New York Pergamon Press

Mende, S., M. Peter, K. Bartels, H. Rohm and D. Jaros. 2013. Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. Food Hydrocolloids 32(1): 178-185.

Mogensen, G., S. Salminen, J. O'Brien and e. al. 2002. Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. International Diabetes Federation Bull 377: 4-10.

Monsan, P., S. Bozonnet, C. Albenne, G. Joucla, R. Willemot and M. Remaud-Simeon. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11: 675–685.

Mora, D., G. Ricci, S. Guglielmetti, D. Daffonchio and M. G. Fortina. 2003. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. Microbiology 149: 807–813.

Morris, V. J. 2006. Bacterial Polysaccharides.Food polysaccharides and their applications. New York: CRC Press.413–454

Mostefaoui, A., A. Hakem, B. Yabrir, S. Boutaiba and A. Badis. 2014. Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. African Journal of Microbiology Research 8: 2208-2214.

Nwodo, U. U., E. Green and A. I. Okoh. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. International Journal of Molecular Sciences 13(11): 14002-14015.

Ogunbanwo, S. T. and B. M. Okanlawon. 2009. Influence of nutrients utilization and cultivation conditions on the production of lactic acid by homolactic fermenters. Biotechnology 8: 107-113.

Panesar, P. S. 2011. Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. Food and Nutrition Sciences 02(01): 47-51.

Paulo, E. M., M. P. Vasconcelos, I. S. Oliveira, H. M. de Jesus Affe, R. Nascimento, I. S. de Melo, M. R. de Abreu Roque and S. A. de Assis. 2012. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. Ciencia e Tecnologia de Alimentos 32: 710-714.

Poyart, C., G. Quesne and P. Trieu-Cuot. 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese dependent superoxide dismutase gene (sodA) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1247–1255.

Prasanna, P. H. P., A. Bell, A. S. Grandison and D. Charalampopoulos. 2012. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. Carbohydrate Polymers 90: 533-540.

Prasanna, P. H. P., A. S. Grandison and D. Charalampopoulos. 2012. Screening human intestinal *Bifidobacterium* strains for growth, acidification, EPS production and viscosity potential in low-fat milk. International Dairy Journal 23: 36-44.

Prasanna, P. H. P., A. S. Grandison and D. Charalampopoulos. 2013. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing *Bifidobacterium* strains. Food Research International 51(1): 15-22.

Prasertsan, P., W. Dermlim, H. Doelle and J. F. Kennedy. 2006. Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers 66: 289-297.

Purwandari, U., N. P. Shah and T. Vasiljevic. 2007. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. International Dairy Journal 17(11): 1344-1352.

Puvanenthiran, A., R. P. V. Williams and M. A. Augustin. 2002. Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. International Dairy Journal 12: 383-391.

Ravula, R. R. and N. P. Shah. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. Biotechnology Techniques 12(11): 819–822.

Ruas-Madiedo, P. and C. G. de los Reyes-Gavilan. 2005. Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Sciences 88: 843–856.

Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholtz and P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. International Dairy Journal 12: 163-171.

Ruas-Madiedo, P., N. Salazar and C. G. de Los Reyes-Gavilan. 2009. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in food and probiotic applications. Microbial Glycobiology 45: 887-902.

Skoog, D. A., H. F. J. and S. R. Crouch. 2007. Principles of Instrumental Analysis, 6th ed.: The United States of America

Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36: 1-29.

Tako, M., S. Nakamura and T. Nagahama. 1982. Studies on the application of polysaccharide produced by coryneform bacteria strain c-8 1. Physical properties of sweet bean jelly containing the polysaccharide as a stabilizing agent. . Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of the Ryukyus.

Tamine, A. Y. and R. K. Robinson. 1999. Yoghurt Science and TechnologyCambridge: Woodhead Publishing Ltd

Tan, G. and F. Korel. 2007. Quality of flavored yogurt containing added coffee and sugar. Journal of Food Quality 30: 342-356.

Taverniti, V. and S. Guglielmetti. 2012. Health-promoting properties of *Lactobacillus helveticus*. Frontiers in Microbiology 3: 1-13.

Tracton, A. 2006. Rheology and Surface ChemistryNew York CRC Press.1-12

Ueda, S., F. Momii, K. Osajima and K. lto. 1981. Extracellular polysaccharide produced by strain No. 626 of *Aeromonas hydrophila*. Agricultural and Biological Chemistry 45: 1977-1981.

van Geel-Schutten, G. H., F. Flesch, B. ten Brink, M. R. Smith and L. Dijkhuizen. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. Apply Microbiol Biotechnol 50: 697-703.

Vasilean, I., R. Segal and A. Vasile. 2011. Obtaining fermented dairy products with the yogurt culture YF-L 812 Food Technology 35(1): 92-99.

Venugopal, V. 2011. Marine Polysaccharides:Food Applications

Walstra, P., T. J. Geurts, A. Noomen, J. Jellema and v. B. M. A. J. S. 1999. Dairy Technology: principle of milk properties and processesNew York

Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. Can J Microbiol 34(4): 415-420.

Wouters, J. T. M., E. H. E. Ayad, J. Hugenholtz and G. Smit. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal 12(2–3): 91-109.

Zhang, L., C. Liu, D. Li, Y. Zhao, X. Zhang, X. Zeng, Z. Yang and S. Li. 2013. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. International Journal of Biological Macromolecules 54: 270-275.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลกโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS Agar) ผสม bromocresol purple ตามวิธีของ (Ogunbanwo และ Okanlawon, 2009)

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	5	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	5	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (bromocresol purple)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.5-6.8

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแลกโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS Agar) สำเร็จรูป

Lactobacilli MRS	55	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรดัดแปลงจากอาหารสูตรแลกโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS) ที่มีซูโครสความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone no.3)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	40	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	5	กรัม
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (di -Ammonium hydrogen citrate)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$)	0.05	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.5-6.8

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

หมายเหตุ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ผงวุ้น 15.0 กรัมต่อลิตร

4. อาหารทดสอบลิตมัสมิลค์ (Litmus Milk) สำเร็จรูป

Litmus Milk	100	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 20 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. อาหารฟีนอลเรดบรอทเบสสำเร็จรูป (Phenol Red Broth Base)

ฟีนอลเรดบรอทเบส	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
น้ำตาลชนิดต่างๆ	10	กรัม

ละลายฟีนอลเรดบรอทเบสด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นใส่หลอดดักก๊าซ แล้วอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test medium)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (Agar)	4.0	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน จากนั้นนำมาใส่หลอดทดลอง แล้วอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
สารเคมี

1. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3% โดยปริมาตร

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30%	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.0	มิลลิลิตร

2. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ฟีนอล	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3. สารละลายคูแมสซีบลู

ชั่งสารละลายคูแมสซี่บลู จี 250 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้เป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

4. สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

7. สารละลาย Cetylpyridinium Chloride (CPC) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

Cetylpyridinium Chloride (CPC)	10	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

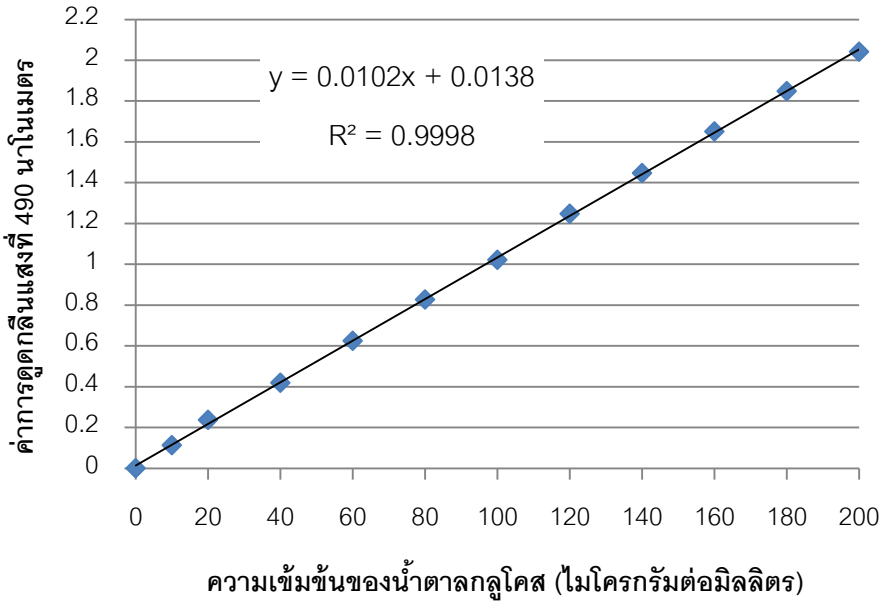
8. สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

DPPH (1,1-ไดฟีนิล-2-พิคริลไฮดราซิล)	39.4	มิลลิกรัม
95% เอทานอล : น้ำกลั่น (1:1)	100	มิลลิลิตร

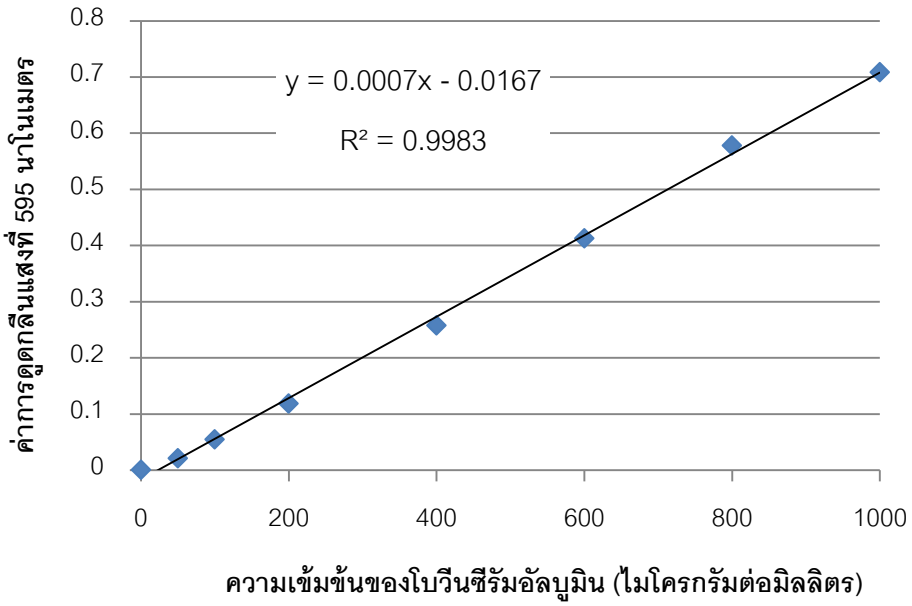
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)



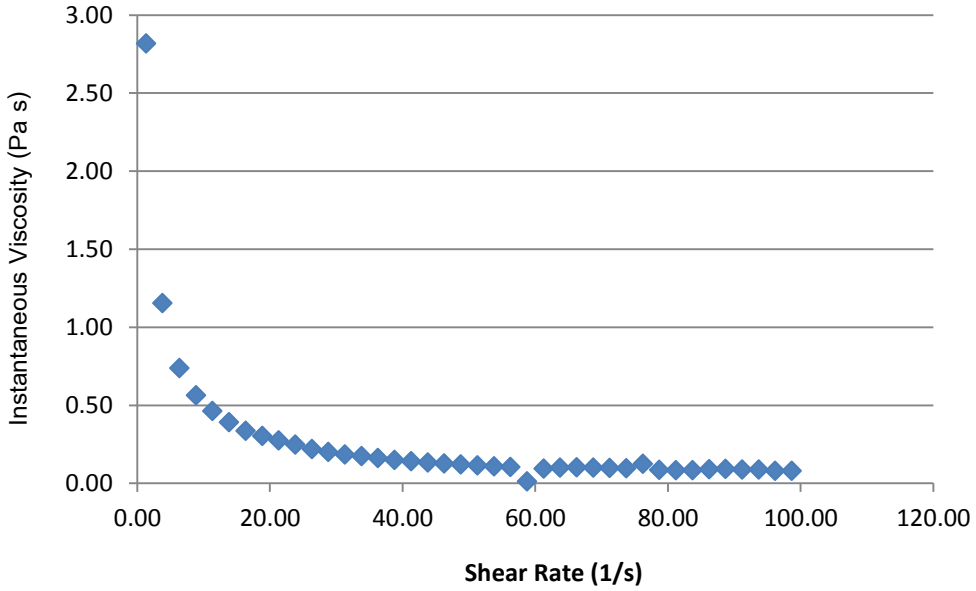
2. กราฟมาตรฐานโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)



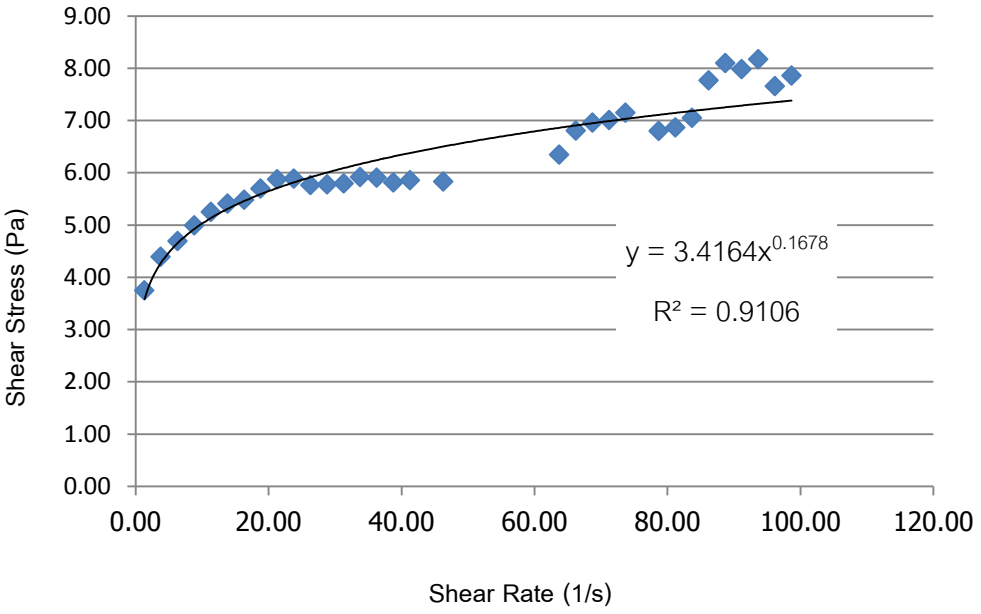
ภาคผนวก ง

ตัวอย่างกราฟความหนืด

1. กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate กับ Instantaneous Viscosity



2. กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง shear rate กับ shear stress ตามสมการยกกำลัง (Power law model)



ภาคผนวก จ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๓๕๓) พ.ศ. ๒๕๕๖

เรื่อง นมเปรี้ยว

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง นมเปรี้ยว อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ วรรคหนึ่ง และมาตรา ๖ (๓) (๔) (๕) (๖) (๗) และ (๑๐) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. ๒๕๒๒ อันเป็นกฎหมายที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา ๒๙ ประกอบกับมาตรา ๓๓ มาตรา ๔๑ มาตรา ๔๓ และมาตรา ๔๕ ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย บัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข ออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ ๒๘๙) พ.ศ. ๒๕๔๘ เรื่อง นมเปรี้ยวลงวันที่ ๑๗ มกราคม พ.ศ. ๒๕๔๘

ข้อ ๒ ให้นมเปรี้ยวเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน

ข้อ ๓ นมเปรี้ยว (Fermented milk) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากน้ำนมจากสัตว์ที่นำมาบริโภคได้ หรือส่วนประกอบของน้ำนมที่ผ่านการทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแล้วหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรืออันตราย ทำให้ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น และอาจปรุงแต่งกลิ่น รส สี หรือเติมวัตถุเจือปนอาหาร สารอาหาร หรือส่วนประกอบอื่นที่มิใช่นมด้วยก็ได้ ทั้งนี้ ให้รวมถึงนมเปรี้ยวที่นำมาผ่านการฆ่าเชื้อ การแช่แข็ง หรือการทำให้แห้งด้วย

ข้อ ๔ นมเปรี้ยวแบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักได้ ดังนี้

(๑) โยเกิร์ต (Yogurt) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย สเตรปโทค็อกคัส เทอร์โมฟิลัส (*Streptococcus thermophilus*) และแลกโทบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) หรือแลกโทบาซิลลัส ซับสปีชีส์ อื่น

(๒) นมเปรี้ยวแอซิโดฟิลัส (Acidophilus Milk) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลกโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*)

(๓) นมเปรี้ยวเคเฟอร์ (Kefir) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ แลกโทบาซิลลัส เคฟิไร (*Lactobacillus kefiri*) หรือแลกโทค็อกคัส (*Lactococcus*) และแอซีโทแบกเตอร์ (*Acetobacter*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*) และแซ็กคาโรไมซีสยูนิสปอรัส (*Saccharomyces unisporus*) หรือแซ็กคาโรไมซีส เซรีวิซิอี (*Saccharomyces cerevisiae*) หรือแซ็กคาโรไมซีส แอซิกูอัส (*Saccharomyces exiguus*)

(๔) นมเปรี้ยวคูมิส (Kumys) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ แลกโทบาซิลลัส เดลบรึคคิไอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อรพิน บุญเกิด เกิดวันอาทิตย์ที่ 23 เมษายน 2532 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2554 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ปัจจุบัน 110/4 ม. 9 ต. ทอนหงส์ อ. พรหมคีรี จ. นครศรีธรรมราช 80320

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ในงาน The 26th Annual meeting of the Thai society for biotechnology and International conference 2014 ระหว่างวันที่ 26-29 พฤศจิกายน 2557 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย ในหัวข้อเรื่อง “Isolation of Exopolysaccharide producing-lactic acid bacteria for fermented milks products” (Poster presentation)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University