

การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของประชากรจุลินทรีย์และรูปแบบของเมตาบอไลต์ในซีเฟอ์ที่มีศักยภาพ
เป็นโพรไบโอติกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF MICROBIAL COMMUNITY AND METABOLITE PROFILE OF
POTENTIAL PROBIOTIC KEFIR USING MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของประชากรจุลินทรีย์และ รูปแบบของเมตาบอไลต์ในคีเฟอร์ที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอ ติกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา
โดย	น.ส.อัญชิสา กุลทวีสุข
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ศานต์ เศรษฐชัยมงคล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวินี ดีแท้)

อัญชิสา กุลทวีสุข : การวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของประชากรจุลินทรีย์และรูปแบบของเมตาบอไลต์
 ในคีเฟอร์ที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา. (CHARACTERIZATION OF
 MICROBIAL COMMUNITY AND METABOLITE PROFILE OF POTENTIAL PROBIOTIC KEFIR
 USING MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร.ศานต์ เศรษฐชัย
 มงคล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.ชื่นจิต ประภคิตชัยวัฒนา

คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่ได้จากกระบวนการหมักโดยกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อ
 ผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาในโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์
 และโปรตีนที่เรียกว่า เม็ดคีเฟอร์ ในประเทศไทยพบการผลิตคีเฟอร์ภายในครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมขนาดเล็กโดยได้รับความ
 นิยมในกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังขาดข้อมูลสนับสนุนในเชิงวิชาการ พบเพียงแต่
 คำกล่าวอ้างถึงประโยชน์ในเชิงสุขภาพด้านต่างๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเม็ดคีเฟอร์ทางการค้าจาก
 แหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อ
 ความสามารถในการสร้างกรด ค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหย
 ง่ายและชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์โดยเทคนิค SPME-GC/MS และ ¹H-NMR ตามลำดับ แล้วคัดเลือกเม็ดคีเฟอร์ที่มี
 ประชากรจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นโดยพิจารณาจากความสามารถในการทนต่อสภาวะ
 ความเป็นกรด (pH=3.00) และเกลือ น้ำดี (0.30%) เพื่อนำมาวิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบ
 โดยเทคนิคการวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วย 16s rDNA/RNA gene sequence analysis ผลการศึกษาสามารถพบกลี
 เชื้อคีเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการหมักสูง เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความ
 ความเป็นกรดและความหนืดเหมาะสม และมีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ผลจากการวิเคราะห์ทางเม
 ตาโบลิมิกส์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายได้รวม 39 สาร และสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากได้
 รวม 52 สารในคีเฟอร์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสำคัญต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ผล
 การวิเคราะห์ระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA/RNA พบว่าประชากรแบคทีเรียกลุ่มหลัก
 ได้แก่ *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus kefir* และ *Bacillus subtilis* และ
 ประชากรยีสต์กลุ่มหลัก ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania unispora*
 และ *Kazachstania* spp. ซึ่งมีรายงานเบื้องต้นถึงสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็น
 ถึงข้อมูลอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในเชิงสุขภาพของกลีเชื้อคีเฟอร์และผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ใน
 ประเทศไทย ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ (functional food) ในระดับอุตสาหกรรม
 ได้

สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5972129423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: CHEMOMETRICS/ KEFIR/ FOOD AUTHENTICATION/ METABOLITE PROFILE/
METABOLOMICS

Aunchisa Kuntaveesuk : CHARACTERIZATION OF MICROBIAL COMMUNITY AND METABOLITE PROFILE OF POTENTIAL PROBIOTIC KEFIR USING MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES.
Advisor: Sam Settachaimongkon, Ph.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Cheunjit Prakitchaiwattana, Ph.D.

Kefir is a fermented milk product obtained from the activity of mixed starter cultures consisting of various lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria and yeast species. This complex microbial consortium performs mutual growth within a protein-polysaccharide granular matrix called kefir grains. It is well documented that kefir is a good source of probiotics. Recently, the popularity of kefir consumption has increased in Thailand, especially for the consumers who primarily concern health and well-being lifestyle. However, scientific studies regarding microbial composition, probiotic potentials and fermentation profile of Thai kefir products are rather limited. Therefore, this study was aimed to investigate the (i) fermentation profiles (microbial growth, acidification and rheological property), (ii) primary potential probiotic properties (acidic condition (pH 3.0) and bile salt (0.3% w/v) tolerance of starter cultures), (iii) metabolite formation (volatile and non-volatile metabolite profile determined by headspace SPME-GC/MS and $^1\text{H-NMR}$, respectively) and microbial consortium composition (16s rDNA/RNA gene sequence analysis) of milk kefir fermented using various grains available in Thai marketplace. Results demonstrated a prototype of kefir grains with high technological and potential probiotic properties. A complementary metabolomics approach using SPME-GC/MS and $^1\text{H-NMR}$ resulted in the identification of 39 aroma volatile and 52 non-volatile metabolites, respectively. These compounds have been acknowledged for contribution in the organoleptic quality of product. The gene sequence analysis demonstrated that *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus kefir* and *Bacillus subtilis* were the most abundant bacteria while *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania unispora* and *Kazachstania* spp. were the most abundant yeasts in the selected grains and kefir product. This information provides new insights regarding the molecular profiling and potential probiotic property of Thai kefir product.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2018

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดีโดยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาและอุปสรรคให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ (ประธานคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์) อาจารย์ ดร. สาริศา สุริยรักษ์ (กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวินี ดีแท้ (กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์จากภายนอกมหาวิทยาลัย) ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณธรา จันทร์ทะธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ขอขอบพระคุณ คุณวรรณวิมล เมฆบุญส่ง ลาก เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวก ให้ข้อมูลและคำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเคีฟเฟอร์ด้วย NMR spectroscopy และขอขอบพระคุณ “ทุนส่งเสริมศักยภาพอาจารย์ใหม่” “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” และ “ทุนส่งเสริมและสนับสนุนหน่วยปฏิบัติการวิจัย กระบวนการผลิต เพื่อออกแบบสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสนับสนุนทุนส่วนหนึ่งสำหรับช่วยในการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ช่วยสนับสนุนอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้องและเพื่อนนิสิตภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ และญาติ สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนมาโดยตลอด ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

อัญชิสรา กุลทวิสุข

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ต
สารบัญรูปภาพ.....	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมติฐานงานวิจัย	3
1.3 วัตถุประสงค์	4
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	6
2.1 นมเปรี้ยว (fermented milk).....	6
2.1.1 ความหมายและข้อมูลทั่วไปของนมเปรี้ยว.....	6
2.1.2 ประเภทของนมเปรี้ยว	6
2.2 นมเปรี้ยวคีเฟอร์ (kefir).....	8
2.2.1 ความหมายและประวัติความเป็นมาของคีเฟอร์.....	8
2.2.2 เม็ดคีเฟอร์ (kefir grains).....	8
2.2.3 กระบวนการหมักคีเฟอร์.....	10
2.2.4 ลักษณะทั่วไปและองค์ประกอบของคีเฟอร์.....	11
2.2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของคีเฟอร์.....	12

2.2.4.2 องค์ประกอบทางจุลชีววิทยาของคีเฟอร์.....	13
2.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics)	18
2.3.1 ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติก.....	18
2.3.2 สมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น.....	20
2.3.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติกในคีเฟอร์.....	21
2.4 กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์.....	22
2.4.1 การย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำนม.....	22
2.4.1.1 เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism).....	22
2.4.1.2 เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism)	23
2.4.1.3 เมตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism).....	24
2.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบเมตาบอไลต์ที่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	25
2.5 การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์	29
2.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	29
2.5.2 เทคนิคอณูชีววิทยา.....	29
2.5.2.1 Polymerase chain reaction (PCR)	30
2.5.2.2 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	32
2.6 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences).....	36
2.7 เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics)	37
2.7.1 เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์.....	38
2.7.1.1 เทคนิคเฮดสเปซโซลิตเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน แก๊สโครมาโทกราฟี- แมสสเปกโตรเมตรี (Headspace solid phase microextraction- gas chromatography-mass spectrometry: headspace SPME-GC/MS)	38
2.7.1.1.1 เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อย (solid phase microextraction).....	38

2.7.1.1.2	หลักการเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	39
2.7.1.1.3	หลักการเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์	39
2.7.1.2	นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance : NMR)	43
2.7.1.2.1	หลักการ nuclear magnetic resonance.....	43
2.7.1.2.2	หน่วยของค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shift: δ)	45
2.7.1.2.3	สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ NMR (reference standard).....	45
2.7.1.2.4	องค์ประกอบหลักของ NMR	46
2.7.1.2.4.1	แม่เหล็กที่ให้ความเข้มสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0)..	46
2.7.1.2.4.2	เครื่อง sweep generator.....	46
2.7.1.2.4.3	แหล่งกำเนิดความถี่วิทยุ (radio frequency transmitter).....	46
2.7.1.2.4.4	เครื่องรับความถี่วิทยุ (radio frequency receiver)	46
2.8	การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics).....	50
2.8.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	51
2.8.2	การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis).....	51
2.9	ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย.....	52
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	53
3.1	วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี	53
3.1.1	วัตถุดิบ	53
3.1.2	อุปกรณ์	53
3.1.3	สารเคมี.....	56
3.1.4	ไพรมอร์.....	57
3.2	ขั้นตอนวิธีการดำเนินงานวิจัย	57

3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย	57
3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (Validation of sample preparation and analytical methods)	61
3.2.2.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย	61
3.2.2.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า.....	61
3.2.2.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า.....	62
3.2.2.4 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า.....	62
3.2.2.5 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)	63
3.2.3 การคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย	63
3.2.3.1 การเพิ่มจำนวนและการเก็บรักษาเม็ตคีเฟอร์	63
3.2.3.2 การ pre-enrichment เม็ตคีเฟอร์ และกระบวนการหมักคีเฟอร์	64
3.2.4 ศึกษาความสามารถในการสร้างกรดตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์ และรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ	64
3.2.4.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์..	64
3.2.4.2 การตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์.....	65
3.2.4.3 ศึกษารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กรดแลคติกและยีสต์ในคีเฟอร์	65
3.2.5 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (headspace SPME-GC/MS).....	65
3.2.6 การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)	66

3.2.6.1 การเตรียมตัวอย่างซีเฟอร์ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$	66
3.2.6.2 การเตรียมตัวอย่างซีเฟอร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$	68
3.2.7 การประมวลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีเฟอร์ โดยใช้เทคนิคการ วิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์	70
3.2.8 การทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของประชากรจุลินทรีย์ใน เมื่อดีซีเฟอร์.....	71
3.2.8.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด.....	71
3.2.8.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี.....	71
3.2.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	72
3.2.9.1 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis). 72	
3.2.9.2 การวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis)....	72
3.2.10 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็ง.....	74
3.2.11 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)	74
3.2.11.1 การสกัดอาร์เอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain reaction, PCR)	74
3.2.11.2 การแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้ เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	76
3.2.11.3 การแยกแถบ DNA เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	76
3.2.12 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	76
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	78
4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและซีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย	78
4.1.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในโยเกิร์ตและซีเฟอร์ ทางการค้า.....	78

4.1.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า	80
4.1.3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า	81
4.1.4 การประมวลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ทางการค้าโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์	83
4.1.4.1 การประมวลผล spectra ของ ¹ H-NMR และการระบุชนิดของสารเมตา บอไลต์spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR.....	83
4.1.4.2 การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และคีเฟอร์ทางการค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR โดยเทคนิค heat- map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA)	90
4.1.4.3 การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และ คีเฟอร์ทางการค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR โดยการวิเคราะห์ องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA).....	93
4.1.4.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดดีทกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดดีทกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Bifidobacterium lactis) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (ตราสินค้า เดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดดีทกวน) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตรา สินค้า B และ C) และคีเฟอร์ (คีเฟอร์ตราสินค้า D, E และ F) ที่ได้รับการ วิเคราะห์ด้วย ¹ H-NMR.....	95
4.2 การคัดเลือกเมื่อดคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย	96
4.2.1 ศึกษาแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ ความสามารถในการสร้างกรด และ ตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์.....	100
4.2.1.1 การศึกษาแบบการเจริญของจุลินทรีย์กรดแลคติกและยีสต์ในคีเฟอร์	100
4.2.1.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในคี เฟอร์ที่ได้จากการหมัก	104
4.2.1.3 การตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์.....	109

4.2.2 การประมวลผลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากหมักด้วยเม็ด คีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์ 111

4.2.2.1 การระบุชนิดของเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS 111

4.2.2.2 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) 114

4.2.2.3 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) 117

4.2.2.4 การระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR 122

4.2.2.5 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR โดยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) 128

4.2.2.6 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) 131

4.2.2.7 การวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิถีเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis

และ การคำนวณวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis	135
4.2.3 การทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของประชากรจุลินทรีย์ใน	
मेंดีคีเฟอร์.....	139
4.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ	
.....	139
4.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือน้ำตาล.....	142
4.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา.....	146
4.3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหาร	
เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง	146
4.3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Reverse	
Transcriptase-polymerase chain reaction denaturing gradient gel	
electrophoresis (Rev-T-PCR-DGGE)	161
4.3.3 ศึกษาลักษณะการรวมตัวของประชากรจุลินทรีย์ในमेंดีคีเฟอร์โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์	
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM).....	163
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	166
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	166
5.2 ข้อเสนอแนะ	168
ภาคผนวก.....	170
ภาคผนวก ก.....	171
ภาคผนวก ข.....	172
ภาคผนวก ค.....	174
ภาคผนวก ง	178
ภาคผนวก จ.....	179
ภาคผนวก ฉ.....	180
ภาคผนวก ช.....	181

ภาคผนวก ซ.....	183
บรรณานุกรม.....	191
ประวัติผู้เขียน.....	206



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	องค์ประกอบของคีเฟอร์ตามมาตรฐาน Codex.....	13
ตารางที่ 2.2	ประชากรจุลินทรีย์ในคีเฟอร์และเม็คคีเฟอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics analysis)	15
ตารางที่ 2.3	รายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 339) และนอกเหนือจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข.....	18
ตารางที่ 2.4	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและลักษณะกลิ่นรสที่พบในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว	26
ตารางที่ 2.5	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว.....	28
ตารางที่ 2.6	ตัวอย่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่พบในเม็คคีเฟอร์และคีเฟอร์ โดยอาศัยเทคนิค PCR-DGGE	34
ตารางที่ 2.7	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS ในนม ผลิตภัณฑ์จากนมและคีเฟอร์	41
ตารางที่ 2.8	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹ H-NMR ในนม ผลิตภัณฑ์จากนมและคีเฟอร์.....	48
ตารางที่ 3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	57
ตารางที่ 4.1	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และรา องค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC (2012), 989.05, AOAC (2012), 991.20, Compendium of methods for food analysis (2003) และอ้างอิงจากข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์ ค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างโยเกิร์ต และคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย ...	82
ตารางที่ 4.2	ค่า chemical shift (ppm) ที่ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบในตัวอย่างโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 49 สารเมตาบอไลต์.....	85
ตารางที่ 4.3	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (log ₁₀ CFU/g) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา.....	102
ตารางที่ 4.4	จำนวนยีสต์และรา (log ₁₀ CFU/g) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา.....	103

ตารางที่ 4.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา.....	107
ตารางที่ 4.6 ผลต่างปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น (ร้อยละโดยมวล) เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา.....	108
ตารางที่ 4.7 ค่า retention time (RT) ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ นี้ทั้งหมด 39 สารเมตาบอไลต์.....	112
ตารางที่ 4.8 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้ในกระบวนการหมักทั้งหมด 52 สารเมตาบอไลต์.....	124
ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรแคริโอต (prokaryote) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในกระบวนการหมักคีเฟอร์.....	147
ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนจุลินทรีย์ในกลุ่มยูแคริโอต (eukaryote) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในกระบวนการหมักคีเฟอร์.....	153
ตารางที่ ก.1 แสดงข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย คือผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (<i>Bifidobacterium lactis</i>) เป็นส่วนประกอบ ของตราสินค้า A โยเกิร์ตชนิดคงตัวแบบออร์แกนิกของตราสินค้า B และคีเฟอร์ทางการค้า ตราสินค้า E.....	171
ตารางที่ ข.1 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า.....	183
ตารางที่ ข.2 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้น.....	187

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ (kefir grains) ที่ใช้นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้	9
ภาพที่ 2.2 กระบวนการหมักคีเฟอร์ (1) เม็ดคีเฟอร์ (2) ใส่เม็ดคีเฟอร์ลงในน้ำนม บรรจุในขณะปิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่กำหนด (3) กรองแยกเม็ดคีเฟอร์ออกจากคีเฟอร์ (4) แช่เย็นคี เฟอร์ก่อนการบริโภคร หรือ (5) บริโภคคีเฟอร์ได้ทันที.....	11
ภาพที่ 2.3 ลักษณะของคีเฟอร์	12
ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงวิถีเบื้องต้นของจุลินทรีย์ในการสังเคราะห์สารเมตาบอลต์ทั้งชนิดระเหยง่าย และระเหยยากที่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมเปรี้ยว	25
ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการดำเนินไปของ Polymerase chain reaction	31
ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	33
ภาพที่ 2.7 แผนภาพ "omics" แสดงภาพรวมของวิธีการที่ครบวงจรในระดับได้แก่ genomics, transcriptomics, proteomics และ metabolomics ในการศึกษาคีเฟอร์และเม็ดคีเฟอร์.....	37
ภาพที่ 2.8 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคีเฟอร์ด้วยเทคนิคเฮดสเปซโซลิตเฟสไมโคร เอกซ์แทรกชันแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี ในงานวิจัยนี้	40
ภาพที่ 2.9 การจัดวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสระหว่างที่ไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (no field) และมีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (with field).....	44
ภาพที่ 2.10 องค์ประกอบหลักของ NMR	47
ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานในงานวิจัยนี้.....	60
ภาพที่ 3.2 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ในงานวิจัยนี้	69
ภาพที่ 4.1 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอลต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ (ข) ภาพขยายในช่วง aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพ ขยายในช่วง sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง aromatic region (6.00- 10.00 ppm) ลำดับสารที่ 1-49 ดังตารางที่ 4.2	84

ภาพที่ 4.2 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร..... 89

ภาพที่ 4.3 แผนภาพเวนน์ (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ และทั้งสองตัวอย่าง..... 90

ภาพที่ 4.4 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่าง โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D, E และ F 92

ภาพที่ 4.5 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากโยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติก ตราสินค้า A) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D, E และ F..... 94

ภาพที่ 4.6 NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D, E และ F ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR..... 96

ภาพที่ 4.7 ลักษณะและที่มาของเม็ดคีเฟอร์ที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์ในงานวิจัยนี้..... 98

ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS ลำดับสารที่ 1-39 แสดงดังตารางที่ 4.7 111

ภาพที่ 4.9 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS จากตัวอย่างและคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D E และ F) และ นมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์..... 116

ภาพที่ 4.10 (ก) PCA 2D score plot (ข) PCA 3D score plot (ค) PC loading และ (ง) PCA Biplot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการ วิเคราะห์ ด้วย headspace SPME-

GC/MS จากตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ด คีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 จากตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D E และ F)..... 120

ภาพที่ 4.11 VIP score ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS จากตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 (1) คีเฟอร์ 2 (2) คีเฟอร์ 3 (3) คีเฟอร์ 4 (4) และคีเฟอร์ 5 (5) จากตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D (6) E (7) และ F (8))..... 121

ภาพที่ 4.12 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR ของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ คีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมัก (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.00-10.00 ppm)..... 123

ภาพที่ 4.13 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร..... 128

ภาพที่ 4.14 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างและคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D E และ F) และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์... 130

ภาพที่ 4.15 (ก) PCA 2D score plot (ข) PCA 3D score plot (ค) PC loading (ง) และ PCA biplot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการประกอบด้วย คีเฟอร์ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้าประกอบด้วย คีเฟอร์ตราสินค้า D E และ F..... 133

ภาพที่ 4.16 VIP score ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย คีเฟอร์ 1 (1) คีเฟอร์ 2 (2) คีเฟอร์ 3 (3) คีเฟอร์ 4 (4) และคีเฟอร์ 5 (5) และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า ประกอบด้วยคีเฟอร์ตราสินค้า D (6) E (7) และ F (8)..... 134

ภาพที่ 4.17 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า..... 136

ภาพที่ 4.18 KEGG’s pathway analysis..... 138

ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบจำนวน ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ ข) ยีสต์และรา ก่อนและหลัง บ่มในสภาวะที่มีความเป็นกรดใกล้เคียงกับสภาวะในกระเพาะอาหาร (pH = 3.00 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง)..... 141

ภาพที่ 4.20 การเปรียบเทียบจำนวน ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ ข) ยีสต์และรา ก่อน และหลัง ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีใกล้เคียงกับสภาวะในลำไส้เล็ก (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้เติม 0.3% (w/v) เกลือน้ำดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง)..... 143

ภาพที่ 4.21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงองค์ประกอบของจุลินทรีย์ (ก) บริเวณพื้นผิว (กำลังขยาย 5,000x) (ข) บริเวณรอยต่อภายนอกและภายใน (กำลังขยาย 7,500x) (ค) บริเวณภายในของเม็ดคีเฟอร์ 5 (กำลังขยาย 1,000 เท่า) ของเม็ดคีเฟอร์ 5 164

ภาพที่ ง.1 รูปแบบการเจริญของ (ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ (ข) ยีสต์และรา ในระหว่าง กระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการ..... 178

ภาพที่ จ.1 รูปแบบ (ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ต่าง (ข) ปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น (ร้อยละโดยมวลของกรดแลคติก) ในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยเม็ดคีเฟอร์จากคีเฟอร์ 1 คีเฟอร์ 2 คีเฟอร์ 3 คีเฟอร์ 4 และคีเฟอร์ 5 ห้องปฏิบัติการ 179

ภาพที่ ฉ.1 ค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ชั่วโมงการหมักที่ 24 โดยหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ 1 เม็ดคีเฟอร์ 2 เม็ดคีเฟอร์ 3 เม็ดคีเฟอร์ 4 และเม็ดคีเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการ..... 180

ภาพที่ ข.1 รูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายก่อน (ก) และหลัง (ข) การจัดการข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบมาตรฐาน (normalize)..... 181

ภาพที่ ข.2 รูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้ จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีใช้เป็น วัตถุประสงค์ตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ก่อน (ก) และหลัง (ข) การจัดการข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบ มาตรฐาน (normalize)..... 182

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353) พ.ศ. 2556 เคเฟอร์ หรือ คีเฟอร์ (kefir) หมายถึง นมเปรี้ยว (fermented milk) ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ *Lactobacillus kefir* หรือ *Lactococcus* และ *Acetobacter* และ *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Saccharomyces exiguous* (อาจใส่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักชนิดอื่นเพิ่มเติมจากที่กำหนดได้) ลักษณะทั่วไปเป็นของเหลวข้น สีขาวนวล มีความเป็นกรดและกลิ่นเปรี้ยวจากกระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation) และกรดอะซิติก (acetic acid fermentation) ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย มีกลิ่นแอลกอฮอล์และความซ่าเล็กน้อยจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของยีสต์ (alcoholic fermentation) กล้าเชื้อคีเฟอร์ประกอบด้วยประชากรจุลินทรีย์เชื้อผสม (mixed culture) ของแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติก ซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (symbiosis) ในโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนสีขาวคล้ายดอกกะหล่ำ มีความเหนียวและยืดหยุ่น เรียกว่า เม็ดคีเฟอร์ (kefir grains)

ประชากรจุลินทรีย์ในเม็ดคีเฟอร์ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มักพบ ได้แก่ *Lactobacillus kefir* แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc*, *Lactococcus* ยีสต์ที่มักพบกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus* ยีสต์กลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ได้แก่ *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces exiguus* แบคทีเรียกรดอะซิติกที่อาจพบ ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* โดยจุลินทรีย์ที่พบมักมีความหลากหลายของชนิดและสัดส่วน อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไม่สามารถคัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (non-culturable) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology technique) ในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ โดยไม่ต้องอาศัยการแยกเชื้อจากตัวอย่าง (culture independent method) เช่น ใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ร่วมกับเทคนิคการแยกความแตกต่างของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วย Denaturing

Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อระบุชนิดของ จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเม็ตคิเฟอร์ จากรายงานการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ที่คัดแยกได้จากคิเฟอร์มีบทบาทในการส่งเสริมประโยชน์ในเชิงสุขภาพต่อผู้บริโภค โดยเป็นจุลินทรีย์ ในกลุ่มโพรไบโอติก

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้ เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจำเป็นต้องทดสอบคุณสมบัติ เบื้องต้นต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ (acid and bile resistance) การ เกาะติดกับผนังลำไส้ (intestinal adherence) การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (antagonism against pathogens) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันและประโยชน์เชิงสุขภาพ (immune modulation and health effects) และความปลอดภัย ซึ่งมีรายงานพบว่าจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากคิเฟอร์มี คุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก โดยมีประโยชน์ในด้านการส่งเสริมสุขภาพ ได้แก่ สมบัติในการต้านการเกิด กิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรค ด้านการเกิดการอักเสบ กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และช่วย ในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เป็นต้น อย่างไรก็ตามกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ดังกล่าวในระหว่างกระบวนการหมัก ได้แก่ การย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนม การ สังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite) และระเหยยาก (non-volatile metabolite) ส่งผลให้สมบัติทางเคมีกายภาพและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคิเฟอร์ที่ได้มีความ แตกต่างกัน

เมตาโบโลมิกส์ หรืองานวิจัยบางส่วนใช้คำว่า การวิเคราะห์ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ (metabolite profiling) เป็นศาสตร์หนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ ที่เน้นการศึกษาสาร ชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) ที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิตหรือเป็น องค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ผลที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลการวิเคราะห์สารเมตา บอไลต์โดยรวม เรียกว่า “เมตาโบโลม” (metabolome) เปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (molecular fingerprint) ของตัวอย่าง ในการศึกษาจะอาศัยเครื่องมือขั้นสูงในการวิเคราะห์ เช่น นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy) และ แมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry: MS) ซึ่งนิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการ แยกสาร เช่น แก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (gas chromatography/mass spectrometry: GC/MS) หรือ ลิกวิดโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (liquid chromatography/mass spectrometry: LC/MS) หรือ ลิกวิดโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (liquid chromatography/mass spectrometry: LC/MS) หรือ ลิกวิดโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (liquid chromatography/mass spectrometry: LC/MS)

chromatography/mass spectrometry: LC/MS) (ปศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2559) พบรายงานการใช้เทคนิค GC/MS ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในคีเฟอร์ ได้แก่ สารประกอบในกลุ่ม alcohols, aldehydes, ketones, sulfur compounds และ esters และพบรายงานการใช้เทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ได้แก่ สารประกอบในกลุ่ม amino acids, carbohydrates, organic acids, lipid derivatives, carbonyl compounds, sulfur compound และ nucleoside อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการใช้เทคนิคทางเมตาโบลอมิกส์ทั้งสองร่วมกันเพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนสารเมตาบอไลต์โดยรวม (ทั้งชนิดระเหยง่ายและระเหยยาก) ในคีเฟอร์

ในประเทศไทย คีเฟอร์ หรือเรียกโดยทั่วไปว่า บัวหิมะ พบการผลิตภายในครัวเรือน โดยในปัจจุบันเกิดกระแสความนิยมและความต้องการบริโภคในเชิงสุขภาพเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังขาดข้อมูลสนับสนุนในเชิงวิชาการ พบเพียงแต่คำกล่าวอ้างถึงคุณประโยชน์ต่างๆ ของคีเฟอร์ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักคีเฟอร์ โดยพิจารณาจากการสร้างกรด ค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ และอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ วิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในคีเฟอร์ โดยเทคนิคทางเมตาโบลอมิกส์ คัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ที่มีประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น และวิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพันธุกรรม ด้วยด้วยเทคนิค 16s rDNA/RNA gene sequence analysis และ Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

1.2 สมมติฐานงานวิจัย

1. สามารถคัดเลือกกล้าเชื้อคีเฟอร์ (เม็ตคีเฟอร์) ทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม และจุลินทรีย์กล้าเชื้อมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยมีความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ได้
2. สามารถหาข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography/mass spectrometry: GC/MS)

และชนิดระเหยยากในซีเฟอร์ ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$) ได้

3. สามารถระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในซีเฟอร์ โดยอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค 16s rDNA/RNA gene sequence analysis และ polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ได้

1.3 วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเม็ดซีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยพิจารณาจากความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ การสร้างกรด และค่าความหนืดของซีเฟอร์
2. คัดเลือกเม็ดซีเฟอร์ที่มีประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยจุลินทรีย์มีความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี
3. วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในซีเฟอร์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์
4. วิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในซีเฟอร์ โดยอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค 16s rDNA/RNA gene sequence analysis และ polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. ทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และซีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร
2. วิเคราะห์ชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อจุลินทรีย์กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและซีเฟอร์ทางการค้า

3. คัดเลือกเมล็ดซีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยพิจารณาจากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าความหนืดของซีเฟอร์ และความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ
4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากของซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อจากต่างแหล่งที่มา โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS และ¹H-NMR ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร
5. วิเคราะห์และระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในซีเฟอร์ โดยเทคนิค 16s rDNA/RNA gene sequence analysis และ polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)



บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 นมเปรี้ยว (fermented milk)

2.1.1 ความหมายและข้อมูลทั่วไปของนมเปรี้ยว

นมเปรี้ยว ตามคำนิยามมาตรฐาน Codex หมายถึง ผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ ซึ่งนมที่ใช้อาจมาจากผลิตภัณฑ์นมที่มีหรือไม่มี การปรับเปลี่ยนส่วนประกอบ กระบวนการหมักส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลดลง โดยอาจทำให้เกิดหรือไม่เกิดการ ตกตะกอนของโปรตีนนม กล้าเชื้อควรมีชีวิต (viable) มีการดำเนินกิจกรรม (active) และมีปริมาณ คงเหลือ (abundant) ในผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานจนกระทั่งถึงวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์ ยกเว้นกรณี ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหลังกระบวนการหมัก ซึ่งอาจไม่พบการมีชีวิตของกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ ได้ (Codex, 243-2003)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353) พ.ศ. 2556 นมเปรี้ยว หมายถึง ผลิตภัณฑ์ นมที่ได้จากน้ำนมจากสัตว์ที่นำมาบริโภคนได้ หรือส่วนประกอบของน้ำนมที่ผ่านการทำลายจุลินทรีย์ที่ ทำให้เกิดโรคแล้วหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรืออันตราย ทำให้ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น และ อาจปรุงแต่งกลิ่น รส สี หรือเติมวัตถุเจือปนอาหาร สารอาหาร หรือส่วนประกอบอื่นที่มีไขมันด้วยก็ได้

กระบวนการหมักนมเปรี้ยวจัดเป็นกระบวนการถนอมอาหารรูปแบบหนึ่ง ซึ่งอาศัยกิจกรรม ทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนม ป้องกันการเสื่อมเสีย (spoilage) และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนมให้เพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันนมเปรี้ยวเป็นที่นิยมและ แพร่หลายไปทั่วโลก ความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และคุณสมบัติต่อสุขภาพ ขึ้นอยู่กับชนิดและกิจกรรมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ (starter culture) (Makwana และ Hati, 2019) ซึ่ง หมายถึง จุลินทรีย์ที่เริ่มต้นและดำเนินกิจกรรมในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มี คุณสมบัติตามที่ต้องการ (Hati et al., 2013, Makwana and Hati, 2019)

2.1.2 ประเภทของนมเปรี้ยว

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353) พ.ศ. 2556 นมเปรี้ยวแบ่งตามชนิดของ จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักได้เป็น 5 ประเภท (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) คือ

- 1) โยเกิร์ต (yoghurt) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย สเตรปโทค็อกคัส เทอร์โมฟิลัส (*Streptococcus thermophilus*) และแล็กโทบาซิลลัส เดลบริคคิโอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) หรือแล็กโทบาซิลลัส ซับสปีชีส์ อื่น
- 2) นมเปรี้ยวแอซิโดฟิลัส (acidophilus milk) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*)
- 3) นมเปรี้ยวเคเฟอร์ (kefir) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลยีสต์ ได้แก่ แล็กโทบาซิลลัส เคฟีไร (*Lactobacillus kefir*) หรือแล็กโทค็อกคัส (*Lactococcus*) และแอซิโทแบคเตอร์ (*Acetobacter*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*) และแซ็กคาโรไมซีส ยูนิสปอรัส (*Saccharomyces unisporus*) หรือแซ็กคาโรไมซีส เซรีวิซิอี (*Saccharomyces cerevisiae*) หรือแซ็กคาโรไมซีส แอซิกูอัส (*Saccharomyces exiguus*)
- 4) นมเปรี้ยวคูมึส (kumys) หมายถึง นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลยีสต์ ได้แก่ แล็กโทบาซิลลัส เดลบริคคิโอ ซับสปีชีส์ บัลแกริคัส (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) และไคลเวอโรไมซีส มาร์เซียนัส (*Kluyveromyces marxianus*)
- 5) นมเปรี้ยวที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์ชนิดที่แตกต่างหรือนอกเหนือจากที่ กำหนดไว้ในข้อ 1) ถึง 4) เช่น แล็กโทบาซิลลัส คาเซอี ซับสปีชีส์ ชิโรต้า (*Lactobacillus casei* subsp. *shirota*) บิฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) นมเปรี้ยวตามข้อ 1 2 3 และ 4 อาจใส่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักชนิดอื่นเพิ่มเติมจากกำหนดได้

2.2 นมเปรี้ยวคีเฟอร์ (kefir)

2.2.1 ความหมายและประวัติความเป็นมาของคีเฟอร์

คีเฟอร์มีแหล่งกำเนิดมาจากบริเวณตอนเหนือของเทือกเขาคอเคซัส (Caucasus) ในสมัย 200 ปี ก่อนคริสตกาล (Rosa et al., 2017) มาจากคำในภาษาตุรกี “keyif” แปลว่า รู้สึกดี สู่ถึงสุขภาพของผู้บริโภคเมื่อรับประทาน ในประเทศแถบยุโรปมีชื่อเรียก คีเฟอร์ แตกต่างกันไป เช่น képhir, kiaphur, kefir และ kippe (Kesenkaş et al., 2017) ปัจจุบันความนิยมในคีเฟอร์มีเพิ่มขึ้นทั่วโลก ทั้งในด้านความนิยมในการบริโภคและผลการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ เนื่องจากประโยชน์ในเชิงสุขภาพ และคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว (Koutinas, 2017)

เคเฟอร์ หรือ คีเฟอร์ (kefir) ตามคำนิยามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353) หมายถึง นมเปรี้ยว (fermented milk) ที่ได้จากการหมักของจุลินทรีย์กล้าเชื้อประกอบด้วย แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก ได้แก่ *Lactobacillus kefir* หรือ *Lactococcus* และ *Acetobacter* และ *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Saccharomyces exiguous* (อาจใส่จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักชนิดอื่นเพิ่มเติมจากที่กำหนดได้) อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (symbiotic) ในโครงสร้างของชั้นพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน เรียกว่า เม็ดคีเฟอร์ (Kefir grains) (Codex, 243-2003) (กระทรวงสาธารณสุข, 2556)

ในประเทศไทย คีเฟอร์ หรือเรียกโดยทั่วไปว่า บัวหิมะธิเบต (ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม, 2555) ปัจจุบันเกิดกระแสความนิยมและความต้องการบริโภคในเชิงสุขภาพเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิตส่วนใหญ่ยังพบเพียงแต่การผลิตในระดับในครัวเรือน อาศัยเม็ดคีเฟอร์เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก (Luang-In and Deeseenthum, 2016)

2.2.2 เม็ดคีเฟอร์ (kefir grains)

เม็ดคีเฟอร์ เป็นกลุ่มก้อนของจุลินทรีย์กล้าเชื้อผสม (mixed starter culture) จับตัวเป็นกลุ่มก้อนสีขาว ถึงขาวเหลือง รูปร่างและขนาดไม่แน่นอน คล้ายดอกกะหล่ำ มีความเหนียวและยืดหยุ่น ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น แบคทีเรียในสกุล

Lactobacillus, *Lactococcus* และ *Leuconostoc* ยีสต์ เช่น *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces exiguus* และแบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น แบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (symbiotic) โดยมีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ *Lactobacillus kefiranofaciens* สร้างขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เรียกว่า คีเฟอร์แรน (kefiran) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose) และน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) (อัตราส่วน 1:1) ร่วมกับโปรตีนเคซีนและไขมันนม ช่วยในการยึดติดรวมกันเป็นโครงสร้างของเม็ดคีเฟอร์ (ภาพที่ 2.1) (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และอัญชิสรา กุลทวีสุข, 2561, Machado de Oliveira Leite et al., 2013, Garofalo et al., 2015, Plessas et al., 2016) จากรายงานการศึกษาพบว่าบริเวณภายนอก (exterior) เม็ดคีเฟอร์จะมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่อาศัยมากกว่าบริเวณภายใน (interior) เม็ดคีเฟอร์ (Schwan et al., 2015) โดยโครงสร้างจุลินทรีย์บริเวณผิวของเม็ดคีเฟอร์มักประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิดแท่ง (rod shaped) อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น บริเวณรอยต่อบริเวณผิวและด้านในเม็ดคีเฟอร์ ประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิดแท่ง และยีสต์ และบริเวณด้านในมักประกอบด้วยยีสต์อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น (Sivieri et al., 2017)

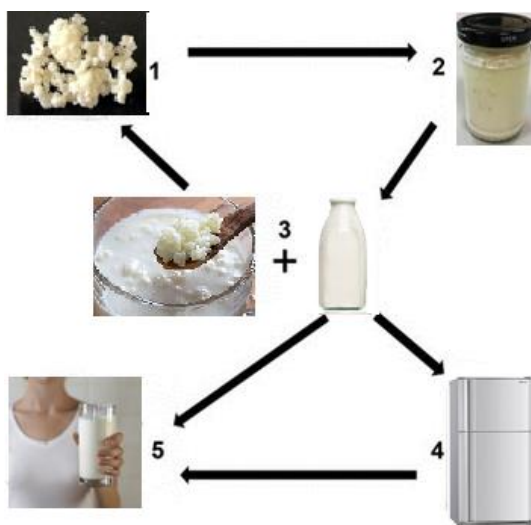
เม็ดคีเฟอร์ที่พบได้ในประเทศไทย มีทั้งประเภทที่ถูกเพิ่มจำนวนและนำเข้าจากต่างประเทศ และประเภทที่นำเข้ามาเพื่อเพิ่มจำนวนในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทยเพื่อจัดจำหน่าย



ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ (kefir grains) ที่ใช้นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้

2.2.3 กระบวนการหมักคีเฟอร์

คีเฟอร์เริ่มมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกช่วงปลายของศตวรรษที่ 19 ในสหภาพโซเวียต ปัจจุบันการผลิตและการบริโภคคีเฟอร์เป็นที่นิยมอย่างมากในกลุ่มประเทศยุโรป ตะวันออก เยอรมนี และนอร์เวย์ อีกทั้งมีแนวโน้มการขยายตัวของตลาดอย่างต่อเนื่องไปยังประเทศในทวีปแอฟริกา ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และประเทศในภูมิภาคตะวันออกกลาง โดยกระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยวิธีดั้งเดิม ทำได้โดยการใส่เมล็ดคีเฟอร์ (ร้อยละ 2-10) (Kabak and Dobson, 2011) ลงในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อเบื้องต้น เช่น นมวัว (นิยม) นมแพะ นมม้า และนมอูฐ บ่มในภาชนะปิดที่อุณหภูมิประมาณ 8 ถึง 40 องศาเซลเซียส นาน 10 ถึง 40 ชั่วโมง นิยมบ่มที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมักกรองเพื่อแยกเมล็ดคีเฟอร์ออกซึ่งเมล็ดคีเฟอร์ดังกล่าวสามารถนำกลับมาใช้หมักซ้ำได้ใหม่ และคีเฟอร์ที่ได้สามารถบริโภคได้ทันที เม็ดคีเฟอร์หลังจากการหมักจะมีขนาดใหญ่ขึ้น (โดยประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์) (Nielsen et al., 2014, Rosa et al., 2017) (ภาพที่ 2.2) การผลิตในระดับอุตสาหกรรมสมัยใหม่นิยมใช้กระบวนการหมักแบบรัสเซีย (Russian method) หรือแบบยุโรป (European method) และมีการนำกล้าเชื้อผสมพร้อมใช้ (direct-vat-inoculation: DVI culture) ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์และเก็บรักษาในรูปแบบกล้าเชื้อแช่เยือกแข็ง (frozen culture) หรือทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried culture) มาใช้แทนเมล็ดคีเฟอร์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของกล้าเชื้อ ปริมาณสัดส่วนกล้าเชื้อที่ใช้ต่อน้ำนม ชนิดของน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบและกระบวนการให้ความร้อน ตลอดจนระยะเวลาและสภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของคีเฟอร์ที่ได้มีความแตกต่างกัน (सानต์ เศรษฐชัยมงคล และอัญชิสา กุลทวีสุข, 2561)



ภาพที่ 2.2 กระบวนการหมักชีเฟอร์ (1) เม็ดชีเฟอร์ (2) ใส่เม็ดชีเฟอร์ลงในน้ำนม บรรจุในขณะปิด
 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตามระยะเวลาที่กำหนด (3) กรองแยกเม็ดชีเฟอร์ออกจากชีเฟอร์ (4)
 แช่เย็นชีเฟอร์ก่อนการบริโภค หรือ (5) บริโภคชีเฟอร์ได้ทันที
 ที่มา: ดัดแปลงจาก Rosa et al., 2017

2.2.4 ลักษณะทั่วไปและองค์ประกอบของชีเฟอร์

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์จะมีเนื้อสัมผัสเป็นของเหลวข้น สีขาวนวล มีความเป็นกรดและกลิ่นเปรี้ยวจากกระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation) และกรดอะซิติก (acetic acid fermentation) ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย มีกลิ่นแอลกอฮอล์และความซ่าเล็กน้อยจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของยีสต์ (alcoholic fermentation) (ภาพที่ 2.3) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงระหว่าง 4.2-4.6 (Baschali et al., 2017, ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ อัญชิสา กุลทวีสุข, 2561) อย่างไรก็ตามคุณภาพทางประสาทสัมผัส ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความหนืดของชีเฟอร์ในแต่ละพื้นที่จะมีความแตกต่างกัน โดยเป็นผลมาจากชนิดและคุณภาพของน้ำนมที่ใช้ในกระบวนการหมัก กระบวนการให้ความร้อน สภาวะในกระบวนการหมัก ปริมาณสัดส่วนเกลือใช้ในการกระบวนการหมัก ชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์เกลือในเม็ดชีเฟอร์ (McAuliffe et al., 2019)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะของคีเฟอร์

ที่มา: www.culturesforhealth.com

2.2.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของคีเฟอร์

คีเฟอร์ มีส่วนประกอบสำคัญโดยประมาณได้แก่ น้ำ (ร้อยละ 89.0) ไขมัน (ร้อยละ 0.2-3.5 ขึ้นกับน้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบ) โปรตีน (ร้อยละ 3.0) น้ำตาล (ร้อยละ 6.0) และเถ้า (ร้อยละ 0.7) (Baschali et al., 2017) ซึ่งประกอบไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุ มีความเข้มข้นกรดแลคติก (lactic acid) ที่ได้จากการหมักในช่วง ร้อยละ 0.8-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในช่วง ร้อยละ 0.5-2.0 และ 0.08-0.2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite) อาทิ acetoin, acetaldehyde, diacetyl, acetic acid, propionic acid และ butyric acid เป็นต้น อีกทั้งคีเฟอร์ยังประกอบไปด้วยวิตามิน เช่น วิตามิน B₁, B₂, B₅, A และ K รวมทั้งแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca) และ ฟอสฟอรัส (P) (Dertli and Çon, 2017, Rosa et al., 2017) องค์ประกอบของคีเฟอร์ตามมาตรฐาน Codex แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของคีเฟอร์ตามมาตรฐาน Codex

ที่มา: Codex, 243-2003

องค์ประกอบ	คีเฟอร์
โปรตีนนม (ร้อยละโดยมวล)	ไม่ต่ำกว่า ร้อยละ 2.7
ไขมันนม (ร้อยละโดยมวล)	ต่ำกว่า ร้อยละ 10
ความเป็นกรดจากการไทเทรต (%กรดแลคติก) (ร้อยละโดยมวล)	ไม่ต่ำกว่า ร้อยละ 0.6
ปริมาณจุลินทรีย์รวม (ที่กำหนดไว้) ในกล้าเชื้อ (ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อกรัม)	ไม่ต่ำกว่า 10^7
ยีสต์ (ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อกรัม)	ไม่ต่ำกว่า 10^4

2.2.4.2 องค์ประกอบทางจุลชีววิทยาของคีเฟอร์

คีเฟอร์ประกอบด้วยจุลินทรีย์เชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก (Prado et al., 2015) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม homofermentative โดยแบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลคติก (lactic acid) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (ร้อยละ 85) จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต เช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ กลุ่ม heterofermentative โดยแบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลคติก (ร้อยละ 50) รวมถึงสารประกอบอื่นๆ อาทิ คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide: CO₂) เอทานอล (ethanol) และกรดอะซิติก (acetic acid) จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต เช่น *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* พบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในคีเฟอร์ (Machado de Oliveira Leite et al., 2013, Sivieri et al., 2017)

2. ยีสต์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส เช่น *Kluyveromyces marxianus* ssp., *Kluyveromyces lactis* และ *Torula kefir* และกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, และ *Pichia fermentans* (Bourrie et al., 2016, Dertli and Çon, 2017, Akal et al., 2018)
3. แบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น แบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* (*Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter orientalis* และ *Acetobacter pasteurianus*) (Korsak et al., 2015, Walsh et al., 2016)

จากรายงานการศึกษาพบว่าคีเฟอร์และเม็คคีเฟอร์ ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งจะมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ประชากรจุลินทรีย์ที่เหมือนและแตกต่างกัน (Gao and Zhang, 2019) เช่น *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* และ *Streptococcus thermophilus* สามารถพบได้ทั้งในคีเฟอร์และเม็คคีเฟอร์โดยมีอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งจะพบได้มากกว่าในคีเฟอร์ และแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* ที่พบได้มากกว่าในเม็คคีเฟอร์ (ตารางที่ 2.2) Leite และคณะ (2012) พบว่าความแตกต่างของแหล่งที่มาเม็คคีเฟอร์ไม่ส่งผลถึงความแตกต่างของลักษณะประชากรจุลินทรีย์กลุ่มหลักในเม็คคีเฟอร์ หากมีการดูแลด้านสุขอนามัยและมีสถานะที่ใช้ในกระบวนการหมักที่เหมือนกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาและสถานะที่ใช้ในกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์กลุ่มย่อย ส่งผลให้คีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์จากต่างแหล่งที่มา มีลักษณะเฉพาะทางประสาทสัมผัสที่แตกต่างกันและมีความเฉพาะตัวในแต่ละพื้นที่ เช่น *Acetobacter pasteurianus* เป็นแบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* สามารถพบได้ในคีเฟอร์ มีความสัมพันธ์กับการสร้างกรดอะซิติก ซึ่งให้กลิ่นรสน้ำส้มสายชู (vinegary flavour) ผลิตภรณ์ (Leite et al., 2012a, Walsh et al., 2016)

ตารางที่ 2.2 ประชากรจุลินทรีย์ในคีเฟอร์และเม็ตคีเฟอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ (Metagenomics analysis)

ที่มา: ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ อัญชิสภา กุลทวีสุข, 2560

Analytical technique	Type of sample	Microbiota	Reference
Pyrosequencing analysis	kefir grains (interior)	Families: <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	Dobson et al. (2011)
	kefir grains (exterior)	Families: <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	
	kefir milk:	Families: <i>Alcaligenaceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	
	kefir grains	Families (Genera): <i>Acetobacteraceae</i> (<i>Acetobacter</i>), <i>Bifidobacteriaceae</i> (<i>Bifidobacterium</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i>), <i>Leuconostocaceae</i> (<i>Leuconostoc</i>), <i>Pseudomonadaceae</i> (<i>Pseudomonas</i>), <i>Solirubrobacteraceae</i> (<i>Solirubrobacter</i>), <i>Streptococcaceae</i> (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>)	Leite et al. (2012b)
	kefir grains	Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i>	Marsh et al. (2013)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Analytical technique	Type of sample	Microbiota	Reference
Pyrosequencing analysis (ต่อ)	kefir grains (ต่อ)	<i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Propionibacteriaceae</i> , <i>Rikenellaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	Marsh et al., 2013 (ต่อ)
	kefir milk	Fungi Families: <i>Bondarzewiaceae</i> , <i>Davidiellaceae</i> , <i>Debaryomycetaceae</i> , <i>Dermataceae</i> , <i>Dothioraceae</i> , <i>Ganodermataceae</i> , <i>Herpotrichiellaceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Pezizaceae</i> , <i>Phaffomycetaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Teratosphaeriaceae</i> , <i>Tremellomycetes</i> , <i>Tricholomataceae</i> , <i>Valsaceae</i> Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Propionibacterineae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> Fungi Families: <i>Bondarzewiaceae</i> , <i>Davidiellaceae</i> , <i>Debaryomycetaceae</i> , <i>Dermataceae</i> , <i>Herpotrichiellaceae</i> , <i>Ganodermataceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Pezizaceae</i> , <i>Phaffomycetaceae</i> , <i>Pichiaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Teratosphaeriaceae</i> , <i>Tremellomycetes</i> , <i>Tricholomataceae</i> , <i>Valsaceae</i> , <i>Wallemyomycetes</i>	(Marsh et al., 2013)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Analytical technique	Type of sample	Microbiota	Reference
Pyrosequencing analysis (ต่อ)	kefir grains	Whole genome sequencing Families (Genera): <i>Enterococcaceae</i> (<i>Tetragenococcus</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>), <i>Leuconostocaceae</i> (<i>Oenococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>), <i>Streptococcaceae</i> (<i>Lactococcus</i>) 16S rRNA gene Families (Genera): <i>Enterococcaceae</i> (<i>Tetragenococcus</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>)	Nalbantoglu et al. (2014)
	kefir grains	Bacteria Genera: <i>Acetobacter</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Streptococcus</i> Fungi Genera: <i>Dekkera</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Saccharomyces</i>	Garofalo et al. (2015a)
Illumina sequencing analysis	kefir grains	Genera: <i>Acetobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Pseudomona</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i>	Gao et al. (2013)
	kefir grains	Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Moraxellaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> Fungi Families: <i>Dipodascaceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Mucoraceae</i> , <i>Pichiaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Trichosporonaceae</i>	Dertli and Çon (2017)

จากตารางที่ 2.2 พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์และเม็คคีเฟอร์จัดเป็น จุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติก (probiotics)

2.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics)

2.3.1 ความหมายของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ตามคำนิยามมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (WHO/FAO) และตามประกาศกระทรวง สาธารณสุข (ฉบับที่ 339) พ.ศ. 2554 จุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (กระทรวง สาธารณสุข, 2554, WHO/FAO, 2006) ทั้งนี้ไม่รวมถึง

- 1) จุลินทรีย์ ที่ใช้เป็นสารชีวบำบัด (biotherapeutic agents)
- 2) จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ที่ไม่ใช้ในอาหาร
- 3) จุลินทรีย์ที่ได้จากการดัดแปลงพันธุกรรม (Genetically Modified Microorganism, GMM)
- 4) จุลินทรีย์ บักเตรีย แบคทีเรีย หรือยีสต์ ตามที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข

รายชื่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกตามและนอกเหนือจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 339) พ.ศ. 2554 แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 รายชื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารตามประกาศ กระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 339) และนอกเหนือจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ที่มา: แนนท่ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 339) พ.ศ. 2554 และแนบท้าย ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกใน อาหารที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแล้ว

จุลินทรีย์	
1. บาซิลลัส โคแอกกูแลน	<i>Bacillus coagulans</i>
2. บีฟิโดแบคทีเรียม อะโดเลสเซนทีส	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	
3. บีฟิโดแบคทีเรียม อะนิมอลิส	<i>Bifidobacterium animalis</i>
4. บีฟิโดแบคทีเรียม บิฟิดัม	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
5. บีฟิโดแบคทีเรียม เบรเว	<i>Bifidobacterium breve</i>
6. บีฟิโดแบคทีเรียม อินฟานทิส	<i>Bifidobacterium infantis</i>
7. บีฟิโดแบคทีเรียม แล็กทิส	<i>Bifidobacterium lactis</i>
8. บีฟิโดแบคทีเรียม ลองกัม	<i>Bifidobacterium longum</i>
9. บีฟิโดแบคทีเรียม ซูโดลองกัม	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
10. เอ็นเทอโรค็อกคัส ดูแรน	<i>Enterococcus durans</i>
11. เอ็นเทอโรค็อกคัส เฟเซียม	<i>Enterococcus faecium</i>
12. แล็กโทบาซิลลัส แอซิโดฟิลัส	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
13. แล็กโทบาซิลลัส คริส	<i>Lactobacillus crispatus</i>
14. แล็กโทบาซิลลัส แกัสเซอร์	<i>Lactobacillus gasseri</i>
15. แล็กโทบาซิลลัส จอห์นโซนิ	<i>Lactobacillus johnsoni</i>
16. แล็กโทบาซิลลัส พาราคาเซอี	<i>Lactobacillus paracasei</i>
17. แล็กโทบาซิลลัส เรูเทรี	<i>Lactobacillus reuteri</i>
18. แล็กโทบาซิลลัส รามโนซัส	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
19. แล็กโทบาซิลลัส ซาลิวาเรียส	<i>Lactobacillus salivarius</i>
20. แล็กโทบาซิลลัส ซีอี	<i>Lactobacillus zeae</i>
21. โพรพิโอนิแบคทีเรียม อะราไบโนซัม	<i>Propionibacterium arabinosum</i>
20. แล็กโทบาซิลลัส ซีอี	<i>Lactobacillus zeae</i>
21. โพรพิโอนิแบคทีเรียม อะราไบโนซัม	<i>Propionibacterium arabinosum</i>
22. สแตปฟีโลคอคคัส ไซนุรี	<i>Staphylococcus sciuri</i>
23. แซ็กคาโรไมซีส เซรีวีซีอี สับสปีชีส์ บัวลาดีอี	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp.
24. แล็กโทบาซิลลัส แพนทาลัม สายพันธุ์ 299V	<i>Lactobacillus plantarum</i> sp. 299V

2.3.2 สมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น

สมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น (WHO/FAO, 2006) ประกอบด้วย

- 1) ความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ (acid and bile resistance)

เป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จำเป็นและเป็นคุณสมบัติแรกที่ยอมรับในการนำมาศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน (host) และทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร (pH ต่ำสุดในกระเพาะอาหาร คือ 1.5 ใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของโฮสต์) และต้องสามารถทนต่อเกลือแร่ในลำไส้เล็ก โดยจุลินทรีย์ยังสามารถดำเนินกิจกรรมได้
- 2) ความสามารถในการเกาะติดกับผนังลำไส้ (intestinal adherence)

เป็นความสามารถที่ช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถอยู่รอดและเจริญเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของผนังลำไส้ได้ และเกิดการแข่งขันกับเชื้อก่อโรค (pathogens) ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถเกาะติดกับผนังลำไส้ได้ลดลง เกิดการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ระหว่างจุลินทรีย์โพรไบโอติกและเชื้อก่อโรค
- 3) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (antagonism against pathogens)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถสังเคราะห์สารประกอบซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรครวมถึงต่อต้านการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ อาทิ กรดแลคติก แลนไทโอนีน (lanthionine) และริวเทอริน (reuterin)
- 4) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Bile Salt Hydrolase (BSH)

BSH เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนในการสลายพันธะของเกลือแร่ที่จับตัวกับกรดอะมิโน (conjugated bile salt) ได้เกลือแร่อิสระซึ่งจะถูกดูดซึมกลับไปยังตับในปริมาณน้อย เป็นสาเหตุให้คอเรสเตอรอลในตับลดลงเนื่องจากถูกนำไปใช้ในการสร้างน้ำดี ใหม่ และทำให้ปริมาณคอเรสเตอรอลที่จะส่งไปยังเลือดลดลงด้วยเช่นกัน
- 5) ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและประโยชน์เชิงสุขภาพ (immune modulation and health effects)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีความสามารถในการกระตุ้นและรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น กระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokines เช่น IL-10 ซึ่งเป็น cytokines ที่สำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน และจุลินทรีย์โพรไบโอติกยังช่วยรักษาสมดุลในระบบลำไส้ ลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรค และอาการท้องเสีย โดยจะสังเคราะห์สารเพื่อเข้าไปจับกับสารน้ำที่โรตาไวรัส (Rotavirus) อันเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการอาเจียนและท้องเสีย ปล่อยออกมา ช่วยในการลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรค ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งจากจุลินทรีย์ในลำไส้ ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด และช่วยลดความดันโลหิตโดยออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE inhibitor) ส่งผลให้ความดันโลหิตลดลง จากรายงานการศึกษา พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในเม็คดีเฟออร์บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (bacteriocin) ในอาหารได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.* และ *Staphylococcus spp.*

6) ความปลอดภัย (safety to the targeted host)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องมีความปลอดภัยต่อการบริโภค มีการทดสอบนอกกาย (in vitro) หรือในสัตว์ (in vivo) และการศึกษาในมนุษย์ เพื่อประเมินความปลอดภัย และปฏิกิริยาของร่างกายต่อจุลินทรีย์โพรไบโอติก

(สุภัจฉรา นพจินดา, 2557, Oelschlaeger, 2010, Zago et al., 2011, Maccaferri et al., 2012, Adriana et al., 2016, Kim et al., 2016, Koh et al., 2018)

2.3.3 จุลินทรีย์โพรไบโอติกในคีเฟอร์

จากประโยชน์ในเชิงสุขภาพ ทำให้คีเฟอร์ถูกจัดให้เป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) ซึ่งให้ประโยชน์หรือคุณสมบัติอื่นๆ ในด้านการส่งเสริมสุขภาพนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการขั้นพื้นฐาน และเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Rosa et al., 2017, Erdogan et al., 2019) จากรายงานการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus delbrueckii, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* และยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Kluyveromyce lactis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในคีเฟอร์และเม็ตคีเฟอร์ มีสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Akal et al., 2018) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังพบการศึกษาและการพยายามแยกจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ ๆ จากคีเฟอร์และเม็ตคีเฟอร์อย่างต่อเนื่อง (Tang et al., 2018, Gut et al., 2019, Yerlikaya, 2019)

ในระหว่างกระบวนการหมักเกิดกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ ได้แก่ การย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนม การสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite) และระเหยยาก (non-volatile metabolite) โดยกิจกรรมดังกล่าวสามารถส่งผลให้สมบัติทางเคมีกายภาพและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักมีความแตกต่างกัน (Leite et al., 2012a)

2.4 กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activities) ในวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ของแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก โดยองค์ประกอบหลักในน้ำนม (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) จะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและชนิดระเหยยากในผลิตภัณฑ์ กระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นจะส่งผลถึงคุณภาพทางประสาทสัมผัส และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยสารเมตาบอไลต์บางชนิดสามารถทำให้อาหารมีความเป็นกรด และมีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่อาจทำให้เกิดการเสื่อมเสีย จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ (Smid and Kleerebezem, 2014)

2.4.1 การย่อยสลายสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำนม

2.4.1.1 เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism)

เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตหรือเมตาบอลิซึมของน้ำตาล (sugar metabolism) ในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ จุลินทรีย์จะอาศัยวิถีที่เรียกว่า ไกลโคไลซิส (glycolytic pathway)

ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่พบมากในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะได้พลังงานในรูป ATP ในระหว่างกระบวนการ วิถีไกลโคไลซิสแบ่งได้เป็น 2 ประเภทแตกต่างกัน คือ วิถีไกลโคไลซิสที่เกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม homofermentative เช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus* sp. และ *Pediococcus* sp. เรียกว่า Embden-Mayerhof pathway (EMP) คาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลจะเข้าสู่วิถีดังกล่าวได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกด้วย lactate dehydrogenase (LDH) อย่างไรก็ตามหากจุลินทรีย์ในกลุ่ม homofermentative อยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น แหล่งคาร์บอนมีอยู่อย่างจำกัด หรือมีคาร์บอนมากเกินไปกว่าความสามารถในการนำไปใช้ของจุลินทรีย์ วิถีเมตาบอลิซึมที่ใช้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแบบ mixed-acid metabolism ได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายมากกว่า เช่น ฟอर्मेट (formate) อะซีเตท (acetate) เอทานอล และ/หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ วิถีไกลโคไลซิสที่เกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม heterofermentative เช่น *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus thermophilus* เรียกว่า phosphoketolase pathway (PKP) คาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลจะเข้าสู่วิถีดังกล่าว จะได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่า homofermentative pathway อาทิ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติก ในระหว่างวิถีไกลโคไลซิสจะเกิดสารมัธยันตร์ (intermediate) คือ ไพรูเวท ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมตาบอลิซึมชนิดต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ต่อไป (ภาพที่ 2.4) คือเฟออร์ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่ม homofermentative และ heterofermentative จึงเกิดสามารถเกิดวิถีเมตาบอลิซึมได้ทั้ง 3 แบบ (Smid and Kleerebezem, 2014, Burgé et al., 2015, Kowalczyk et al., 2015)

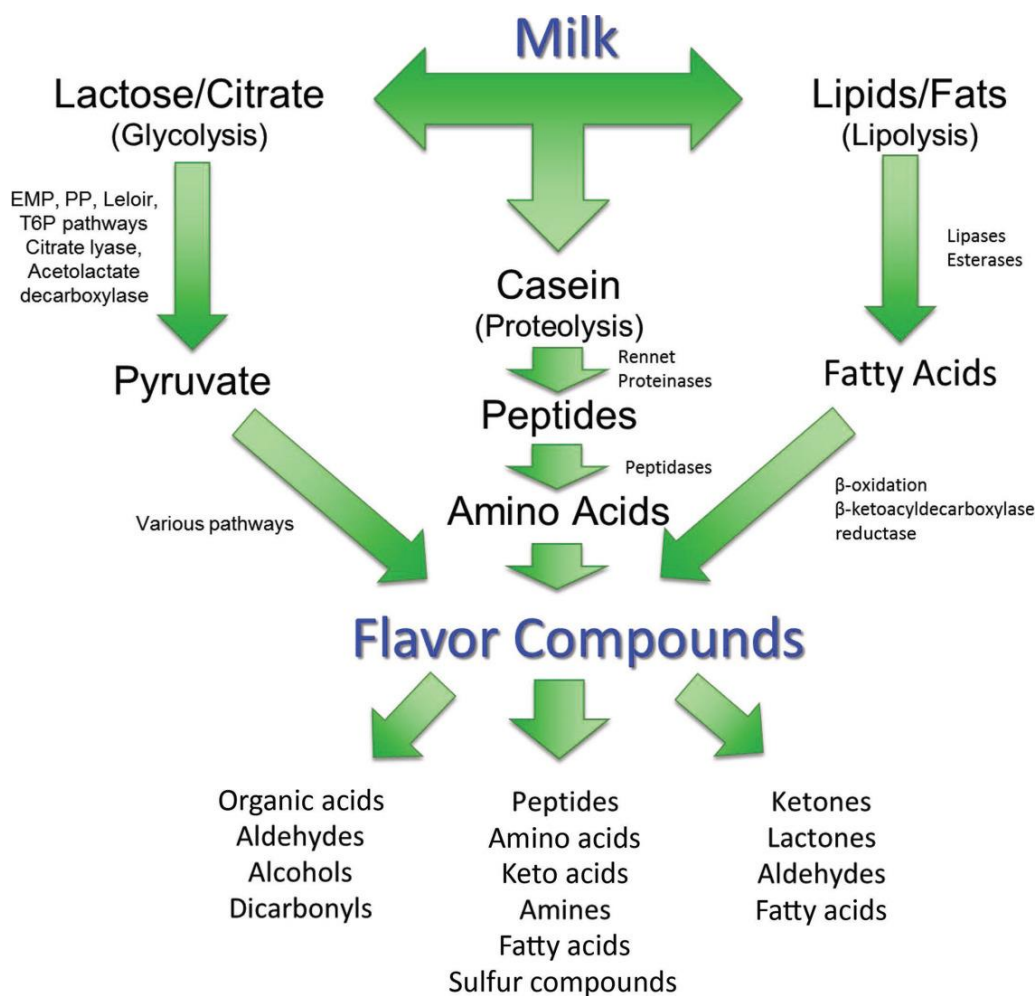
2.4.1.2 เมตาบอลิซึมของโปรตีน (protein metabolism)

เมตาบอลิซึมของโปรตีนเกิดจากความต้องการกรดอะมิโน (amino acid) เพื่อใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งขั้นตอนในการย่อยสลายโปรตีนได้เป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ protein degradation, peptide transport, peptide degradation และ amino acid catabolism โดยในขั้นตอนแรกจุลินทรีย์จะสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic

enzyme, Prt) คือ cell envelope proteinase (CEP) ที่บริเวณผนังเซลล์เพื่อย่อยสลายโปรตีนเคซีน (casein) ในน้ำนม ให้กลายเป็นเปปไทด์ (peptides) ในขั้นตอนที่สองเปปไทด์จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ จากนั้นเปปไทด์จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปติเดส (peptidase) เพื่อเปลี่ยนให้กลายเป็นกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) และในขั้นตอนสุดท้ายกรดอะมิโนอิสระจะถูกย่อยสลายและเกิดการถ่ายโอนหมู่อะมิโน (transamination) ไปยัง α -keto acids เพื่อให้ได้กรดอะมิโน และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compounds) ชนิดต่าง ๆ รวมถึงสารเมตาบอไลต์ ซึ่งส่งผลต่อกลิ่นรสและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) สารประกอบซัลเฟอร์ (sulfur compounds) เช่น methanethiol, dimethyl disulfide และ H_2S ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่มักพบในกลุ่มอาหารหมัก (ภาพที่ 2.4) (Smid and Kleerebezem, 2014, Kowalczyk et al., 2015, Stefanovic et al., 2017)

2.4.1.3 เมตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism)

เมตาบอลิซึมของไขมันในระหว่างกระบวนการหมัก จะอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipases) หรือเอนไซม์เอสเทอร์เรส (esterases) ในการย่อยสลายไขมันนม ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเรียกว่า ลิพอลิซิส (lipolysis) โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอริน (glycerin) หรือ กลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acids, FAs) ทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated FAs) และชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated FAs) ซึ่งจะถูกนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ต่อไป กรดไขมันอิสระประเภทอิ่มตัวจะถูกนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ เช่น methylketones, secondary alcohols, esters, และ lactones กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะถูกออกซิไดซ์ (oxidized) ด้วยอนุมูลอิสระและไดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเป็นผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2.4) (Baltasar et al., 2010, Chen et al., 2017, Yerlikaya, 2019)



ภาพที่ 2.4 แผนภาพแสดงวิถีเบื้องต้นของจุลินทรีย์ในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและระเหยยากที่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมเปรี้ยว
 ที่มา: McAuliffe et al, 2019

2.4.2 การสังเคราะห์สารประกอบเมตาบอไลต์ที่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

เมตาบอไลต์ (metbolites) หมายถึง สารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) (Chong et al., 2019) เป็นองค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่งหรือถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการของสิ่งมีชีวิต เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน เพปไทด์สายสั้น น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ เมตาบอไลต์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากองค์ประกอบหลักของน้ำนม (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

เมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolites) และเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก (non-volatile metabolites)

สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย เป็นสารประกอบโมเลกุลต่ำที่สามารถระเหยได้ที่สภาวะปกติ (ambient condition) (Rowan, 2011) มีความสำคัญโดยตรงต่อการยอมรับในผลิตภัณฑ์กลุ่มอาหารหมัก นมเปรี้ยว รวมถึงคีเฟอร์ของผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ (Aghlara et al., 2009) แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและลักษณะกลิ่นรสที่พบในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว
ที่มา: Walsh et al. (2016) และ Dertli and Çon (2017)

สารเมตาบอไลต์	ลักษณะกลิ่นรสเฉพาะ	กระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์
<u>Acids</u>		
iso-valeric acid	Sweaty, cheesy	Lipid metabolism
Acetic acid	Vinegar, peppers, green, fruity, floral, sour	Carbohydrate metabolism
Nonanoic acid	Fatty, soapy, waxy, green, goat	Lipid metabolism
<u>Alcohols</u>		
Ethanol	Dry, dust	Carbohydrate metabolism
2-Heptanol	Green, Floral, Fruity	Carbohydrate metabolism
2-Butanol	Fruity	Carbohydrate metabolism
3-Methyl-1-butanol	Fresh cheese, alcoholic, fruity,	Aminoacid metabolism
Benzeneethanol	Fresh, wine	Carbohydrate metabolism
<u>Aldehydes</u>		
3-Methylbutanal	Cheesy, dark chocolate, cocoa	Aminoacid metabolism
Acetaldehyde	Fruity, alcoholic, wine	Carbohydrate metabolism
Octanal	Green, fatty, soapy, fruity	Lipid metabolism
Nonanal	Green, citrus, fatty, flora	Lipid metabolism

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

สารเมตาบอไลต์	ลักษณะกลิ่นรสเฉพาะ	กระบวนการเมตาบอไลซึมที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์
<u>Carboxylic acids</u>		
Benzoic acid	Fruity, alcoholic	Lipid metabolism
Carbamic acid	Sour	Aminoacid metabolism
Acetic acid	Vinegar, green, fruity, sour	Carbohydrate metabolism
Propanoic acid	Sour	Lipid metabolism
Butanoic acid	Acrid acidic, cheesy, bad	Carbohydrate metabolism
Hexanoic acid	Sweaty, cheesy, sharp, acidic	Lipid metabolism
Octanoic acid	Cheesy, rancid, pungent	Lipid metabolism
Decanoic acid	Soapy, waxy, stale, buttery	Lipid metabolism
Dodecanoic acid	Soapy, waxy, fatty	Lipid metabolism
<u>Ester</u>		
1, 2 - Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	Plastic	Carbohydrate metabolism
2-hydroxy-isocaproic acid	Pleasant fresh planty	Aminoacid metabolism
2 - hydroxy-isocaproic acid methyl ester	Pleasant fresh planty	Aminoacid metabolism
Acetic acid ethyl ester	Solvent, pineapple, fruity, apples	Carbohydrate metabolism
<u>Ketones</u>		
2-Heptanone	Blue cheese, spicy, Roquefort	Lipid metabolism
2-Butanone	Buttery, sour milk, etheric	Carbohydrate metabolism
2-Nonanone	Malty, fruity, hot milk	Lipid metabolism
	Fruity, sweet	Lipid metabolism
<u>Sulfur compounds</u>		
Dimethyl sulfone	Sulfurous, hot milk, burned	Aminoacid metabolism

สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก เป็นสารประกอบโมเลกุลสูงที่สามารถระเหยได้ยากที่สภาวะปกติ แต่สามารถระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ส่งผลกระทบต่อรสชาติและแสดงออกถึงอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ (Yu et al., 2014) รวมทั้งยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ระเหยง่ายของจุลินทรีย์ได้ (Lee et al., 2019) แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว

ที่มา: Settachaimongkon et al. (2014) และ Kuntaveesuk et al. (2018)

ผลิตภัณฑ์	สารเมตาบอไลต์	ที่มา
Kefir	Aminobutyrate, Alanine, Betaine, Creatine, Creatinine, Isoleucine, Leucine, Methionine, N-Acetylserotonin, N-Acetyltyrosine, Phenylalanine, Proline, Tyrosine, Valine, Sarcosine, Amino acid residues, Ethanol, Galactose, Glucose, Lactose, N-Acetylglucosamine, Sucrose, Sugar residues, Acetate, Benzoate, Butyrate, Hydroxyisobutyrate, Citrate, Formate	Kuntaveesuk et al., 2018
Yoghurt	Valerate derivatives, Valerate, Butyrate, Isoleucine, Leucine, Valine, Isobutyrate, Lactate, Alanine, Acetate, N-Acetyl amino acids, N-Acetyl glucosamine, Acetone, Acetoacetate, Proline, Pyruvate, Succinate, Oxoglutarate, Citrate, Creatine, Creatinine, Dimethyl sulfone, Acetylcarnitine, Choline derivatives, Betaine, Glucose, Lactose, Galactose, Ascorbate, Choline, Phosphocholine, Glycerophosphocholine, Dihydroxyacetone, Sugar residues, Uridine, Orotate, Fumarate, Amino acid residues, Tyrosine, Phenylalanine, Benzoate, Hippurate, Formate	Settachaimongkon et al., 2014

แม้ว่าสารเมตาบอไลต์จะเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่ก็มีมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษา เพราะมีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบทางชีวเคมีและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์นม โดยความหลากหลายของเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกิจกรรมจากโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่เชื้อที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์สารเมตาบอไลต์ที่ได้ก็จะเปลี่ยนแปลงตาม (Vieira et al., 2015)

2.5 การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์

2.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรและคัดแยกจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นหนึ่งในวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัด เนื่องจากต้องอาศัยระยะเวลาในการวิเคราะห์ผลและจุลินทรีย์ในธรรมชาติบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (< 1 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้) ทำให้จุลินทรีย์ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเพียงส่วนหนึ่งของประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมด ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์โดยไม่ต้องอาศัยการแยกเชื้อจากตัวอย่าง (culture independent method) เป็นการอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology technique) ในการวิเคราะห์ (Miguel et al., 2010, Pham and Kim, 2012)

2.5.2 เทคนิคอณูชีววิทยา

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรและชนิดของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยอาศัยการวิเคราะห์จากชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (Deoxyribonucleic Acid, DNA และ ribonucleic acid, RNA) อาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และนิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกความแตกต่างของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมด้วย Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ในการศึกษาและระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มหลักในสิ่งแวดล้อม (มีปริมาณจุลินทรีย์มากกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด) อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการนำเอาเทคโนโลยี high-throughput sequencing มาใช้ในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวจะสามารถวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดในสิ่งแวดล้อม รวมถึงจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ (Masco et al., 2005, Gao and Zhang, 2019) อย่างไรก็ตามเทคโนโลยี high-throughput sequencing ยังมีข้อจำกัดในด้านราคา

ยังสูง ในที่นี้จึงจะขอกล่าวถึงรายละเอียดของเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งจะนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในงานวิจัยนี้

2.5.2.1 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR เป็นกระบวนการในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาดเท่ากันทั้งหมด เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว ง่าย ว่องไว ราคาไม่แพง และมีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสของบริเวณ DNA หรือ RNA ช่วงใดช่วงหนึ่งที่ต้องการศึกษา นิยมประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ศึกษาลักษณะจีโนไทป์ (genotype) ตรวจสอบการกลายพันธุ์ และในการวิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) (Najafov and Hoxhaj, 2017) โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย

- 1) DNA ต้นแบบ (DNA template) ที่ต้องการศึกษา
- 2) ไพร์เมอร์ (primer) คือ นิวคลีโอไทด์เริ่มต้นสายสั้นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยรู้ลำดับเบสที่แน่นอน มีลักษณะเป็นเบสคู่สมกับบริเวณลำดับเบสที่ต้องการศึกษา
- 3) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เป็นหน่วยย่อยของลำดับเบสเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ ประกอบด้วย ATP, CTP, GTP และ TTP เรียกรวมว่า dNTPs
- 4) DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับไพร์เมอร์ นิยมใช้ Taq polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ตามบริเวณบ่อน้ำพุร้อน คือ *Thermus aquaticus* ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวมีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้ถึง 95 องศาเซลเซียส
- 5) บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ช่วยในการควบคุมความเป็นกรด – ด่าง ในระหว่างการดำเนินไปของปฏิกิริยา และให้ไอออน (ion) ที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ (DeLong and Zhou, 2015)

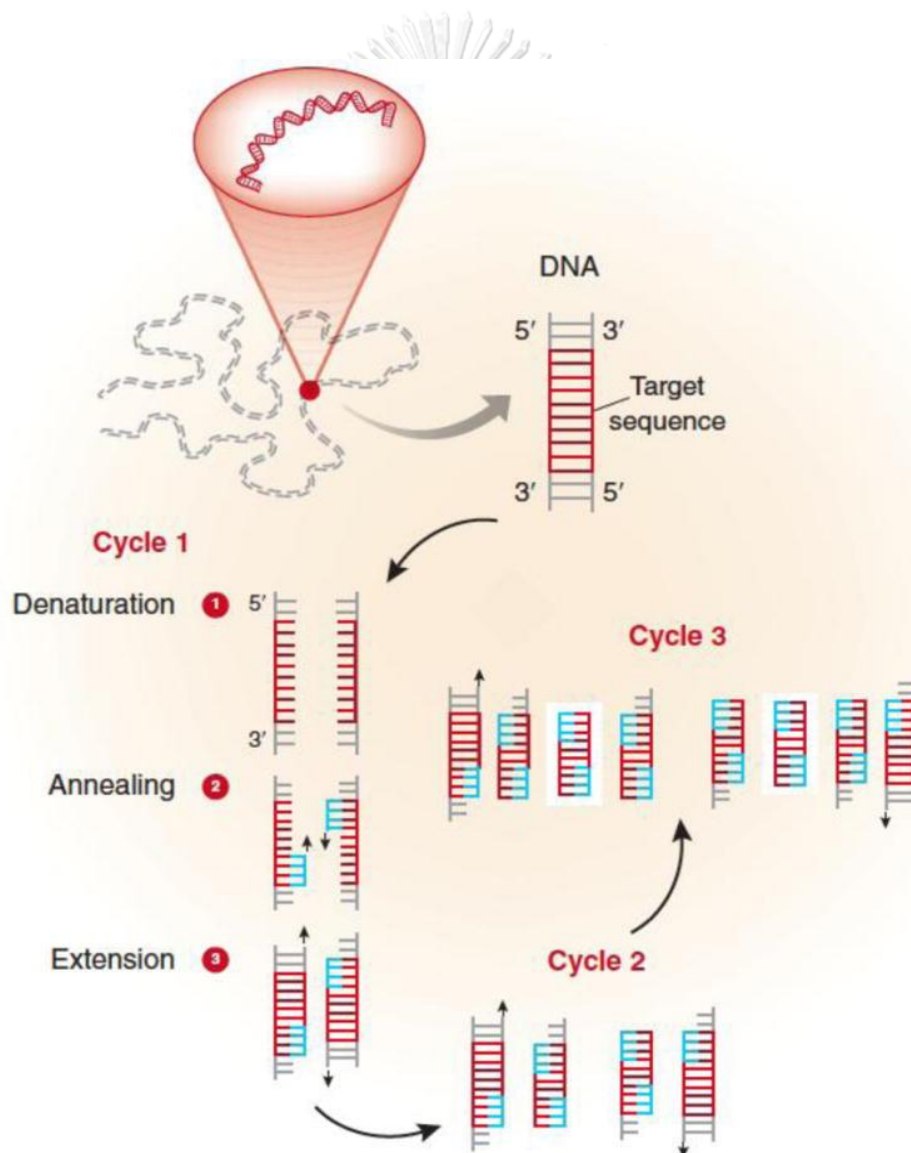
หลักการของเทคนิค PCR แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน (Garibyan and Avashia, 2013) คือ

- 1) Denaturation ขั้นตอนเพิ่มอุณหภูมิ เพื่อแยกคู่สาย DNA ให้กลายเป็นสายเดี่ยวเพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบ (โดยประมาณ 95 องศาเซลเซียส)

2) Annealing หรือ hybridization ขั้นตอนลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ (โดยประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส)

3) Extension เพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกครั้งเพื่อให้นิวคลีโอไทด์เชื่อมต่อเข้ากับไพรเมอร์ และเกิดการสังเคราะห์สาย DNA สายใหม่โดยอาศัยการทำงานของ DNA polymerase (โดยประมาณ 72 องศาเซลเซียส)

ปฏิกิริยาดำเนินไปครบ 3 ขั้นตอนเรียกว่า 1 รอบ (cycle) ปริมาณ DNA จะเพิ่มขึ้นจากปริมาณตั้งต้นหนึ่งเท่าตัว แสดงดังภาพที่ 2.5



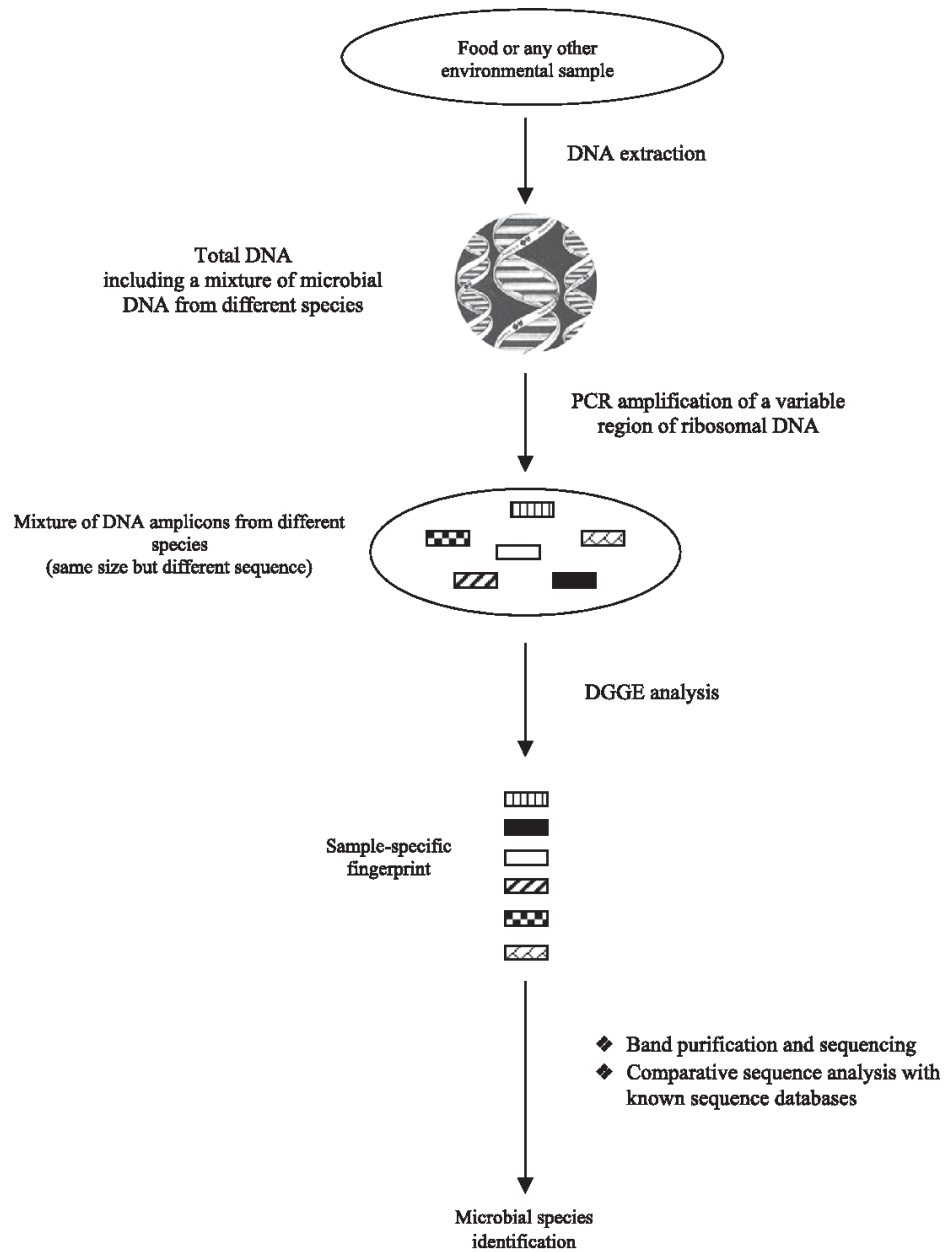
ภาพที่ 2.5 ขั้นตอนการดำเนินไปของ Polymerase chain reaction

ที่มา: Garibyan and Avashia, 2013

2.5.2.2 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

เป็นรูปแบบของ electrophoresis ที่สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA สายคู่ที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันได้ นิยมใช้ร่วมกับเทคนิค PCR โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยบริเวณที่เรียกว่า GC clamp มาแยกความแตกต่างโดยอาศัยระดับความเข้มข้นของเจลและความแตกต่างของแบบแผนการแยกคู่สาย DNA (denaturation profile) โดยบางส่วนของสายคู่ DNA จะถูกทำให้แยกออกจากกันกลายเป็น DNA สายเดี่ยวด้วยสาร denaturant ได้แก่ urea และ formamide ที่มีความเข้มข้นไล่จากต่ำไปสูง คู่สาย DNA จะถูกทำให้แยกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลให้ DNA เคลื่อนที่ไปหยุดที่ตำแหน่ง melting domains ที่แตกต่างกันบนแผ่นอะครีลาไมด์เจล GC clamp บนสาย DNA จะประกอบด้วยเบส G และ C ซึ่งจะช่วยไม่ให้ DNA สายคู่แยกออกจากกันโดยสมบูรณ์ ทำให้เมื่อนำเจลไปย้อมจะเห็นแบนของ DNA ได้อย่างชัดเจน เจลของ DGGE ที่ผ่านการย้อมจะสามารถเห็นรอยพิมพ์ของประชากรจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และเมื่อตัดแถบของ DNA ในบริเวณที่ต้องการไปวิเคราะห์ลำดับเบส จะสามารถทราบชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ได้ โดยเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาและแยกกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้โดยตรงแสดงดังภาพที่ 2.6 (Ercolini, 2004)

จากรายงานการศึกษาพบว่ามีการใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการศึกษาของกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ รวมถึงเมัตคีเฟอร์และผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ Leite และคณะ (2012) ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการศึกษาโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์พบว่า *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์กลุ่มหลักในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ Kesmen และ Kacmaz (2011) พบว่า *Lactococcus lactis* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มหลักในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ และพบจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Leuconostoc mesenteroides* โดยจุลินทรีย์บางชนิดที่พบในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติก (probiotics) แสดงดังตารางที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ที่มา: Ercolini, 2004

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ที่พบในเมดดิเตอร์และคีเฟอร์ โดยอาศัยเทคนิค PCR-DGGE

แหล่งที่มา	โครงสร้างจุลินทรีย์	ที่มา
Water kefir grain	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus nagelii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laureys and De Vuyst (2017)
Water kefir grain	<i>Lactobacillus nagelii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Bifidobacterium aquikefiri</i> , <i>Gluconobacter roseus/oxydans</i> , <i>Gluconobacter cerinus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygotorulasporea florentina</i>	Laureys et al. (2017)
Milk kefir grains	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Acetobacter fabarum</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Acetobacter orientalis</i>	Garofalo et al. (2015b)
Brazilian kefir grains	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> and ssp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus kefirifaciens</i> , <i>Lactobacillus kefiri</i> , <i>Lactobacillus parakefir</i>	Leite et al. (2013)
Sugary Brazilian kefir	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluveromyces lactis</i> , <i>Kazachstania aerobia</i>	Magalhaes et al. (2010)

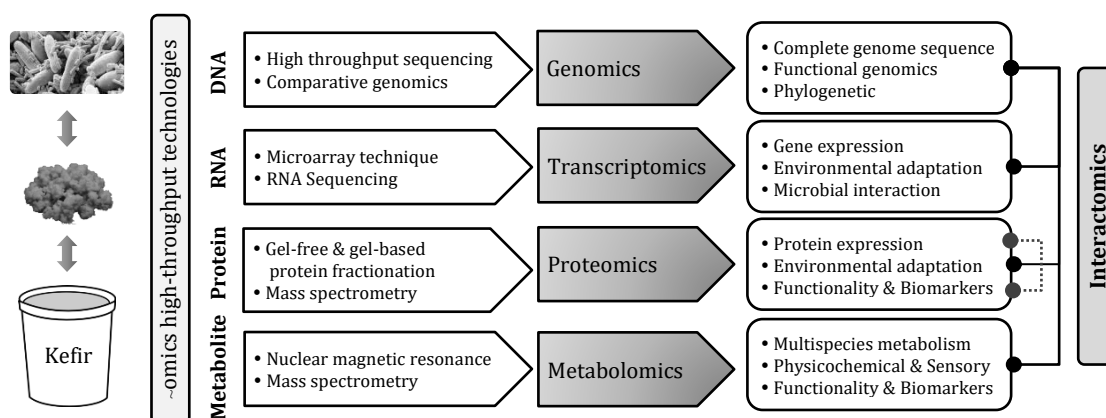
ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

แหล่งที่มา	โครงสร้างจุลินทรีย์	ที่มา
Tibetan kefir	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus</i>	Zhou et al. (2009)
grains	<i>kefiranoformans</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Kazachstania</i>	
	<i>unispora</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kazachstania exigua</i>	

จากข้อมูลที่กำลังกล่าวมาข้างต้นทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าคีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมเปรี้ยวที่มีความน่าสนใจและมีความหลากหลายในตัวเองทั้งในด้านประโยชน์เชิงสุขภาพ โครงสร้างของประชากรจุลินทรีย์ และสารเมตาบอไลต์ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาประยุกต์เข้ากับการวิเคราะห์โดยอาศัยเครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง เพื่อนำมาซึ่งข้อมูลที่มีความสมบูรณ์ทั้งในด้านประชากรจุลินทรีย์และข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ (Hu et al., 2014, Walsh et al., 2016)

2.6 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences)

ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิไล (2560) อธิบายความหมายเบื้องต้นของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ไว้ดังนี้ คำว่า “โอมิกส์” (~omics) มีรากศัพท์มาจากคำในภาษาละติน “~omne” ซึ่งหมายถึง ลักษณะโดยรวมหรือองค์ประกอบทั้งหมด ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นคำต่อท้ายในภาษาอังกฤษ (suffix) ของเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบโดยรวมของสารชีวโมเลกุล (biomolecule) ตั้งแต่ระดับข้อมูลสารพันธุกรรม (genomics) การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (transcriptomics) การสังเคราะห์โปรตีน (proteomics) รวมถึงการวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ (metabolomics) ทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพผลการศึกษาที่ได้จะอยู่ในรูปข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ได้แก่ ข้อมูลรหัสพันธุกรรมทั้งหมด (genome) ข้อมูลการแสดงออกหรือการถอดรหัสของยีนเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอทั้งหมด (transcriptome) ข้อมูลการสังเคราะห์โปรตีน (proteome) และสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด (metabolome) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่ง ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง ภาพที่ 2.7 (Mozzi et al., 2013) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกเชิงหน้าที่และอันตรกิริยาระหว่างสารชีวโมเลกุลเหล่านั้นรวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลดังกล่าวต่อลักษณะปรากฏ (phenotype) หรือคุณลักษณะเฉพาะ (characteristics) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพนั้นๆ ภายใต้สภาวะที่สนใจในภาพรวม (holistic approach) (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิไล, 2561)



ภาพที่ 2.7 แผนภาพ "omics" แสดงภาพรวมของวิธีการที่ครบวงจรในระดับได้แก่ genomics, transcriptomics, proteomics และ metabolomics ในการศึกษาคีเฟอร์และเม็ตคีเฟอร์

ที่มา: ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และอัญชิสา กุลทวีสุข (2561)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในด้านการเกษตรและอาหาร โดยผลที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลสารเมตาโบลิต์โดยรวม เรียกว่า “เมตาโบลอม” ซึ่งเปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (molecular fingerprint) ของตัวอย่างนั้น ๆ (Wishart, 2008) โดยจะได้ข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ ช่วยให้เกิดความเข้าใจถึงข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ของผลิตภัณฑ์อาหาร และกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป และการเก็บรักษา ซึ่งเกี่ยวข้องกับสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic property) ของผลิตภัณฑ์ (Capozzi and Trimigno, 2015)

2.7 เทคโนโลยีเมตาโบลอมิกส์ (metabolomics)

เมตาโบลอมิกส์ หรือ การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (metabolite analysis) เป็นหนึ่งในวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ ซึ่งใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี สามารถวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ หรือสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน เพปไทด์สายสั้น น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ ที่เป็นองค์ประกอบ

ของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่งหรือถูกสังเคราะห์โดยกระบวนการของสิ่งมีชีวิต (Chong et al., 2019) ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะแวดล้อม สิ่งมีชีวิตและสารเมตาบอไลต์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ (Walsh et al., 2016) โดยเทคนิคการวิเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์ ได้แก่ mass spectrometry (MS) นิยมใช้ร่วมกับเทคนิคการแยกสาร เช่น gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) หรือ liquid chromatography/ mass spectrometry (LC/MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลือวิสัย, 2561)

2.7.1 เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการศึกษาทางเมตาโบลอมิกส์

2.7.1.1 เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry: headspace SPME-GC/MS)

เป็นเทคนิคที่รวมการวิเคราะห์ gas chromatography และ mass spectrometry ไว้ด้วยกัน โดย gas chromatography จะทำหน้าที่ในการแยกสารชนิดต่าง ๆ และ mass spectrometry จะทำหน้าที่ในการวิเคราะห์ระบุชนิดของสาร เมื่อนำเอาเทคนิค Headspace solid phase microextraction หรือ SPME ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สารในกลุ่มที่สามารถระเหยได้และมีปริมาณน้อยเข้าด้วยกัน ทำให้เทคนิค headspace SPME-GC/MS เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ซึ่งส่งผลต่อกลิ่นรสของอาหาร ผลไม้ ผลิตภัณฑ์นมและเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 2.7) ข้อดีคือเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว รวดเร็วและความแม่นยำสูง มี libraries ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และระบุชนิดของสารที่วิเคราะห์ได้ ไม่ต้องอาศัยสารมาตรฐานร่วมในการวิเคราะห์ (Jelen et al., 2012)

2.7.1.1.1 เทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อย (solid phase microextraction)

เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีโดยไม่ต้องอาศัยตัวทำละลายในการสกัด สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยได้ เป็นเทคนิคที่ได้ความนิยมและถูกนำมาใช้แพร่หลายในห้องปฏิบัติการ เทคนิคดังกล่าวจะอาศัย

การดูดซับสารไปยังไมโครไฟเบอร์ โดยสามารถดูดซับสารละลายตัวอย่างได้โดยตรง (direct immersion) หรือดูดซับสารระเหยซึ่งอยู่บริเวณช่องว่างเหนือสารละลายหรือของแข็ง (headspace) ได้ ซึ่งเทคนิค Headspace solid phase microextraction เป็นเทคนิคที่นิยมใช้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (Musteata, 2012)

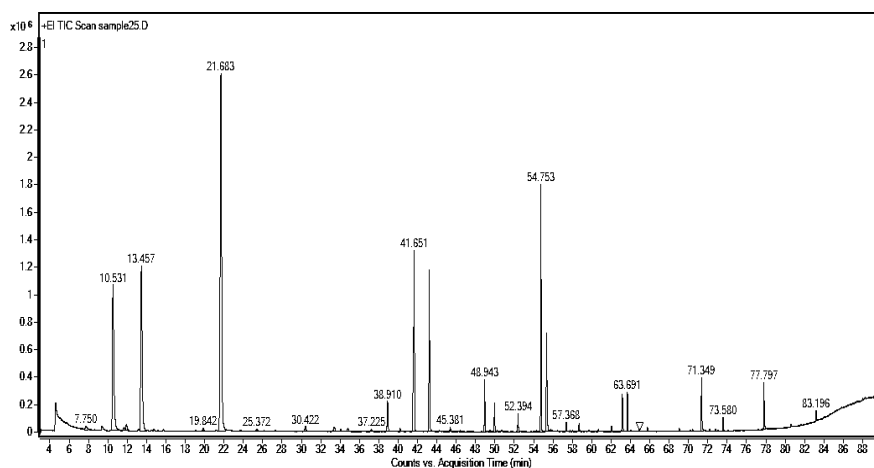
2.7.1.1.2 หลักการเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย และระเหยได้ปานกลาง (semi-volatile metabolites) หลักการของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นการแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่และการกระจายตัวในแต่ละองค์ประกอบของสารบนเฟสคงที่ (stationary phase) อาศัยการพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas โดยเมื่อสารที่เข้าสู่เครื่อง GC สารจะถูกเปลี่ยนสถานะจากของเหลว (liquid) เป็นแก๊ส (gas) และใส่ส่วนแก๊สของสารผสมจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยเฟสเคลื่อนที่ ภายในคอลัมน์จะเกิดการแยกของสารผสม (separation) โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์และสารผสม สารที่เคลื่อนที่และกระจายตัวจะถูกตรวจวัดด้วยตัววัดสัญญาณ (detector) และแสดงผลออกมาในรูปแบบของ โครมาโทแกรม (chromatogram) ภาพที่ 2.8 (French, 2017)

2.7.1.1.3 หลักการเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์เมื่อใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีจะกลายเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์หาสารประกอบประเภทต่างๆ โดยเมื่อสารเคลื่อนที่จากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์สารจะได้รับพลังงาน จากแหล่งกำเนิดไอออน คือ Electron Impact (EI) (นิยามที่ 70 อิเล็กตรอนโวลต์) ทำให้โมเลกุลไอออนของสารตัวอย่างเกิดการสั่นสะเทือนและแตกตัว (fragmentation) เป็นประจุ ลักษณะการแตกตัวเป็นประจุของสารแต่ละชนิดจะแสดงผลในรูปแบบของ mass spectrum ในหน่วย มวลต่อประจุ หรือ mass-to-charge ratio (m/z) สาร

แต่ละชนิดจะมีลักษณะการแตกตัวที่เฉพาะ ดังนั้นสามารถระบุชนิดและโครงสร้างของสารได้จากค่าการแตกตัวเป็นประจุที่แตกต่างกัน (French, 2017)



ภาพที่ 2.8 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคีเฟอร์ด้วยเทคนิคเฮดสเปซโซลิตเฟสไมโครเอกซ์แทรกชันแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS ในนม ผลิตภัณฑ์จากนมและคีเฟอร์

แหล่งที่มา	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์	ที่มา
Milk kefir	Ethanol (CAS) Ethyl alcohol, 1-Butanol, 3-methyl- (impure), 1-Pentanol (CAS) Amylol, Amyl methyl carbinol, 2-Hepten-1-ol, (E)-(CAS), 2-Undecanol, Heptanal, Dodecane, Amyl methyl carbinol, Propanoic acid, Nonanoic acid (CAS), Carbon dioxide (CAS)	Temiz and Dagyildiz (2017)
Water kefir	2-Phenylethyl acetate, Ethyl lactate, Ethyl butanoate, Ethyl 2-methyl-butanoate, Ethyl heptanoate, Ethyl nonanoate, Ethyl 9-decenoate, Ethyl benzenepropanoate, Methyl octanoate, Isoamyl octanoate, Diethyl succinate, Hexanoate, Octanoate, Nonanoate, Decanoate, Hexanal, Benzaldehyde, 1-Octanol, Benzyl alcohol, 2-Phenylethanol	Laureys and De Vuyst (2017)
Milk kefir	Acetic acid, Hexanoic acid, Octanoic acid, 2-Methyl-1-butanol, 2-Ethyl-1-hexanol, Ethanol, 2-Methyl-butanol, Octanal, Nonanal, Ethyl acetate, Ethyl butanoate, 2,3-Butanedione, Acetone, 2-Butanone, Dimethyl sulfone, Carbon disulfide	Walsh et al. (2016)
Yoghurt	1-Butanol, Ethanol, 2-Ethyl-hexanol, 1-Octanol, 1-Pentanol, Acetaldehyde, Acetoin, Acetone, Benzaldehyde, Diacetyl, 2-Heptanone, 2-Udecanal, Dimethyl disulfide, Dimethyl sulfone, Acetic acid, Butyric acid, Nonanoic acid, Pentanoic acid, Propionic acid	Settachaimongkon et al. (2016)

ตารางที่ 2.7 (ต่อ)

แหล่งที่มา	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์	ที่มา
Pasteurized organic milk	Pentanal, Dimethyl sulfide, 1-Pentanol, 2-Heptanone, Dimethyl sulfone, α -Pinene, Hexanoic acid, 2-Nonanone, Nonanal, Octanoic acid, Nonanoic acid, Decanoic acid, 2-Methylpropanoic acid	Tunick et al. (2013)
Pasteurized conventional milk	2-Methylbutanal, Methyl propionate, 1-Pentanol, Hexanal, 2-Heptanone, Nonanal, Octanoic acid, Decanoic acid, 2-Methylpropanoic acid	
Queso Fresco cheese	Heptanone, 2-Heptanol, 1-Heptanol, Octanoic acid, Ethyl octanoate, Furanone, Nonanoic acid, 2-Undecanone	
Whey protein concentrated	3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal, 3,3-Dimethyl-2-butanone, Dimethylsulfide, 1-Pentanol, 3-Hexanone, 2-Hexanone, Hexanal, 3-Ethyl-2-pentanone, 3-Heptanone, 2-Heptanone, 1-Heptanal, 2-Heptanal, Heptanol, 2-Pentylfuran, Nonanal, Octanoic acid, Decanoic acid	

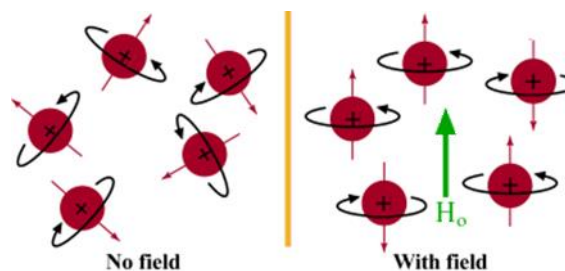
2.7.1.2 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (nuclear magnetic resonance : NMR)

NMR เป็นเทคนิคด้านเมตาโบโลมิกส์ ที่ได้รับความนิยมใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว และระบุสารประกอบอินทรีย์ (Hu et al., 2008) ปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้ในวิเคราะห์อัตลักษณ์ ความคมคุณภาพ และพัฒนาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหาร (ตารางที่ 2.8) เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้รวดเร็ว ไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง ไม่ทำลายตัวอย่างขณะวิเคราะห์ มีความจำเพาะสูง มีประโยชน์แม้จะมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับบางวิธีการทางสเปกโทรสโกปี (Beckonert et al., 2007) สำหรับการนำมาวิเคราะห์ทางชีวเคมี nuclide ที่นิยมใช้ศึกษามากที่สุด คือ ไฮโดรเจนหรือโปรตอน (^1H) (McPhee et al., 2015)

NMR ย่อมาจาก nuclear magnetic resonance โดยที่ nuclear คือ นิวเคลียส (รวมโปรตอนและนิวตรอนที่อยู่ในนิวเคลียส) magnetic คือ สนามแม่เหล็กภายนอก (external magnetic field) และ resonance คือ ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance effect)

2.7.1.2.1 หลักการ nuclear magnetic resonance

เทคนิค NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก (ธีรยุทธ์ วิไลวัลย์ และคณะ, 2552) ทางฟิสิกส์อนุภาคที่มีประจุจะหมุนควง (precession) รอบตัวเองและทำให้เกิดสนามแม่เหล็ก ดังนั้นอะตอมซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนมีประจุลบเคลื่อนที่อยู่รอบๆ นิวเคลียส ส่วนภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโปรตอนมีประจุบวกกับนิวตรอนที่เป็นกลาง (เย็นหทัย นันทนา, 2549) ขณะที่อะตอมอยู่อย่างอิสระไม่มีแรงจากสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) มากกระทำสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสจะวางตัวอย่างอิสระ แต่เมื่อมีสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) เข้าไป การจัดวางตัวของนิวเคลียสจะเปลี่ยนทิศทางไปเป็นแบบมีระเบียบ แสดงดังภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 การจัดวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสระหว่างที่ไม่มีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (no field) และมีสนามแม่เหล็กภายนอก B_0 (with field)

ที่มา: Ellis et al. (2012)

นิวเคลียสมีสมบัติอย่างหนึ่ง เรียกว่า เลขควอนตัมสปิน หรือ เลขสปิน (spin number หรือ I) โดยการวางตัวของสนามแม่เหล็กนิวเคลียส ในสนามแม่เหล็กภายนอกจะมีทิศทางเฉพาะได้ $2I+1$ ทิศทาง (เย็นหทัย แนนหนา, 2549) โดยเลขสปินของโปรตอน (H^1) คือ $\frac{1}{2}$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อ } I = \frac{1}{2} \text{ จำนวนทิศทางการวางตัวของสนามแม่เหล็กของนิวเคลียส} &= 2I+1 \\ &= (2 \times \frac{1}{2}) + 1 \\ &= 2 \text{ ทิศทาง} \end{aligned}$$

ดังนั้นเมื่อนำสารไปในสนามแม่เหล็ก (external magnetic field) นิวเคลียสที่เคยหมุนตัวแบบสุ่ม จะหมุนและเรียงตัวใหม่แบบสองทิศทาง ได้แก่ นิวเคลียสที่มีสปิน $+\frac{1}{2}$ จะวางตัวในแนวขนานในทิศทางเดียวกับแม่เหล็ก ซึ่งเป็นสถานะที่มีพลังงานต่ำ และในส่วนของนิวเคลียสที่มีสปิน $-\frac{1}{2}$ จะวางตัวในแนวขนานกับแม่เหล็ก โดยมีทิศทางตรงกันข้าม และอยู่ในสถานะที่มีพลังงานสูงกว่า (Atkins, 1998)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่มีนิวเคลียสไปวางในสนามแม่เหล็กพร้อมกับให้พลังงานในช่วงความถี่คลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะทำให้นิวเคลียสเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ นิวเคลียสที่มีพลังงานต่ำจะถูกกระตุ้นให้ดูดกลืนพลังงานและเปลี่ยนขึ้นไปอยู่ในระดับที่พลังงานสูงกว่าในทางเดียวกัน นิวเคลียสที่มีระดับพลังงานสูงจะเปลี่ยนแปลง โดยการคายพลังงาน

ออกมา และลงไปอยู่ในระดับที่พลังงานต่ำกว่า ซึ่งเรียกรูปการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า “เรโซแนนซ์ (resonance)” (Bovey, 1988)

2.7.1.2.2 หน่วยของค่าการเลื่อนทางเคมี (chemical shift: δ)

เมื่อความถี่วิทยุตรงกับความถี่เชิงมุมทำให้เกิดเรโซแนนซ์ซึ่งแปรผันโดยตรงกับขนาดของแม่เหล็ก ดังนั้นหากมีการเพิ่มสนามแม่เหล็กจะทำให้ความถี่ของการเกิดเรโซแนนซ์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้การบอกหน่วย chemical shift เป็นหน่วย Hz เปลี่ยนแปลงตามขนาดของแม่เหล็ก สเปกตรัมที่มีความถี่แตกต่างกันจะมีค่า chemical shifts ในหน่วย เฮิรตซ์ (Hz) ที่แตกต่างกัน เช่น chemical shift ของโปรตอนในหมู่เมทิล ของ $C_6H_5CH_3$ ที่วัดด้วยเครื่อง 60 เมกะเฮิรตซ์ มีค่าเป็น 138 เฮิรตซ์ แต่ถ้าวัดด้วยเครื่อง 300 เมกะเฮิรตซ์ มีค่าเป็น 690 เฮิรตซ์ ดังนั้นในการวัด spectra ต้องบอกความเข้มของสนามแม่เหล็กที่ใช้ด้วยทุกครั้งเพื่อลดปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นจึงเปลี่ยนไปใช้หน่วย chemical shift แทน (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549)

ปัจจุบันมีการแสดงหน่วย chemical shift เป็น ppm เพื่อเป็นการปรับหน่วยการวัดให้เท่ากัน โดยอาศัยสารมาตรฐานอ้างอิงในการคำนวณ มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{chemical shift } (\delta) = \frac{\text{ระยะห่างของสารที่พิจารณาจากสารอ้างอิง (Hz)}}{\text{ความถี่ของ NMR spectrometer (MHz)}} \text{ มีหน่วยเป็น ppm}$$

ส่งผลให้เมื่อวัด spectra ด้วยเครื่อง NMR ที่มีความถี่ต่างกัน แต่มีตำแหน่งสัญญาณของโปรตอนชนิดเดียวกัน จะปรากฏที่ค่า chemical shifts เดิมเสมอ (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549) chemical shifts ที่มีค่ามาก แสดงว่ามีความถี่ที่เกิดจากการดูดกลืนคลื่นวิทยุมีค่าสูง chemical shift ที่มีค่าน้อย แสดงว่ามีความถี่ที่เกิดจากการดูดกลืนคลื่นวิทยุมีค่าต่ำ (แมน อมรสิทธิ์และคณะ, 2552; ธีรยุทธ วิไลวัลย์และคณะ, 2552)

2.7.1.2.3 สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ NMR (reference standard)

โดยทั่วไปการบอกค่า chemical shift มักเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยสารมาตรฐานที่นิยมใช้ ได้แก่ tetramethyl silane (TMS), 4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (DSS) และ sodium 3-(trimethylsilyl)-[2,2,3,3-d₄]-1-propionate (TSP)

เนื่องจากโครงสร้างของสารดังกล่าวมีหมู่เมทิล (CH_3) ที่สามารถทำให้เกิดเรโซแนนซ์ได้ที่เดียวกัน และการเกิดห่างจาก peak ของโปรตอนส่วนใหญ่ อีกทั้งสารดังกล่าวเป็นสารเฉื่อย ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอื่นและสามารถกำจัดออกได้ง่าย โดยมักใช้ TSP กับตัวอย่างที่สามารถละลายใน deuterium oxide (D_2O) ได้ (นิยมใช้ D_2O ในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์แบบมีขี้) (Emwas, 2015)

2.7.1.2.4 องค์ประกอบหลักของ NMR (เย็นหทัย แนนหนา, 2549) ภาพที่ 2.11

2.7.1.2.4.1 แม่เหล็กที่ให้ความเข้มสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0)

ต้องเป็นแม่เหล็กที่สามารถให้ความเข้มสนามแม่เหล็กแรงและสม่ำเสมอ เนื่องจากเครื่อง NMR จะสามารถแยกสัญญาณได้ดีหรือไม่ดีจะขึ้นอยู่กับความแรงและคุณภาพของสนามแม่เหล็ก แม่เหล็กที่ใช้มีหลายแบบ คือ แม่เหล็กถาวร แม่เหล็กไฟฟ้า และแม่เหล็กที่ทำจากขดลวดตัวนำยิ่งยวด โดยแม่เหล็กถาวรจะให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กน้อยและไวต่ออุณหภูมิ แม่เหล็กไฟฟ้าจะให้ความเข้มข้นของสนามแม่เหล็กสูงกว่าและไม่ไวต่ออุณหภูมิ แม่เหล็กถาวร และแม่เหล็กที่ทำจากขดลวดตัวนำยิ่งยวดจะให้ความเข้มข้นของสนามแม่เหล็กสูงที่สุด แต่จะมีราคาแพง

2.7.1.2.4.2 เครื่อง sweep generator

เป็นขดลวดคู่ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอกให้เปลี่ยนไปในช่วงระยะแคบๆ

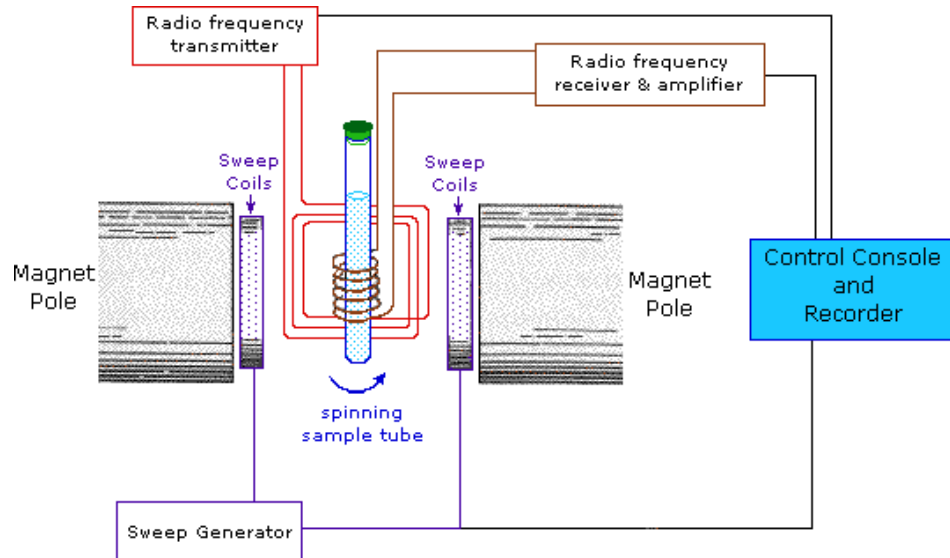
2.7.1.2.4.3 แหล่งกำเนิดความถี่วิทยุ (radio frequency transmitter)

เป็นขดลวดที่อยู่ในแนวตั้งฉากกับเครื่อง sweep generator ใช้ในการผลิตสนามแม่เหล็ก B_1 ที่มีความถี่คงที่

2.7.1.2.4.4 เครื่องรับความถี่วิทยุ (radio frequency receiver)

เป็นขดลวดที่ล้อมรอบสารตัวอย่าง ทำหน้าที่ในการรับสัญญาณการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงคลื่นวิทยุจากสารตัวอย่าง

2.7.1.2.4.5 เครื่องบันทึกสัญญาณ



ภาพที่ 2.10 องค์ประกอบหลักของ NMR

ที่มา: Reusch, 2013

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ¹H-NMR ในนม ผลิตภัณฑ์จากนมและคีเฟอร์

แหล่งที่มา	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์	ที่มา
Commercial cow's milk	2-oxoglutarate, 3-hydroxybutyrate, acetone, L-acetylcarnitine, betaine, citrate, creatine, formate, L-fucose, D-galactose, D-glucose, lactose, L-leucine, pyruvate, succinate, alanine, arginine, asparagine, aspartate, glutamine, proline, serine	Foroutan et al. (2019)
Commercial kefir	Aminobutyrate, Alanine, Betaine, Creatine, Creatinine, Isoleucine, Leucine, Methionine, Acetylserotonin, N-Acetyltyrosine, Phenylalanine, Proline, Tyrosine, Valine, Sarcosine, Amino acid residues, Ethanol, Galactose, Glucose, Lactose, N-Acetylglucosamine, Sucrose, Sugar residues, Acetate, Benzoate, Butyrate, Hydroxyisobutyrate, Citrate, Formate	Kuntaveesuk et al., 2018
Commercial cow's milk	Ethanol, Alanine, Betaine, Creatine, Creatinine, Glycine, Isoleucine, Leucine, N-acetylamino acid, N-acetylglucosamine, Proline, Threonine, Valine, Amino acid residue, Galactose, Glucose, Lactose, Sucrose, Acetate, Acetoacetate, Ascobate, Butyrate, Citrate Formate, Hippurate, Choline, Glycerophosphocholine, Maleate, Propylene glycol	Luangwilai et al. (2017)

ตารางที่ 2.8 (ต่อ)

แหล่งที่มา	ตัวอย่างสารเมตาบอไลต์	ที่มา
Yoghurt	Alanine, Creatine and Creatinine, Isoleucine, Leucine, Proline, Valine, Galactose, Lactose, Sugar residues, Acetate, Acetoacetate, Benzoate, Butyrate, Citrate, Fumarate, Lactate, Pyruvate, Succinate, Acetyl carnitine, Phosphocholine, Acetone, Dimethyl sulfone, Uridine	Settachaimongkon et al. (2016)
Raw milk	Acetate, Acetone, Adenine, Alanine, β -hydroxybutyrate, Betaine, Butyrate, Carnitine, Choline, Citrate, Creatinine, Ethanolamine, Formate, Fucose, Galactose α , Phosphocholine, Trimethylamine-N-oxide	Klein et al. (2010)

หลักจากได้ข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และเทคนิค NMR จะนำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) เพื่อวิเคราะห์รูปแบบความสัมพันธ์และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) (Ebbels et al., 2011) เพื่อจะทำให้สามารถเข้าใจกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพภายใต้การเปลี่ยนแปลงในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง

อย่างไรก็ตามแม้การวิเคราะห์โดยอาศัยเครื่อง Gas chromatography/mass spectrometry จะเป็นเทคนิคที่รวดเร็วและนิยมใช้ในการศึกษาสารเมตาบอไลต์ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่างๆ แต่เทคนิคดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้เฉพาะกลุ่มสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย และระเหยได้ปานกลาง ซึ่งทำให้ข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ที่ได้ยังขาดความสมบูรณ์ ดังนั้นการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง nuclear magnetic resonance ซึ่งมีความสามารถในการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากเข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย จะส่งผลทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่ครบถ้วนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และสามารถใช้ในการบ่งบอกถึงอัตลักษณ์ (authentication) ของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้น ๆ ได้

2.8 การประมวลผลด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics)

เคโมเมตริกซ์ หรือเคโมอินโฟเมติกส์ (chemoinformatics) คือ สาขาวิชาทางเคมีที่ประยุกต์ใช้หลักการคณิตศาสตร์ สถิติและความรู้ด้านตรรกศาสตร์เพื่อออกแบบหรือเลือกกระบวนการทดลองที่มีความเหมาะสม และเพื่อเตรียมองค์ความรู้ทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กันมากที่สุดในการวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี (HÉBerger, 2008) โดยจะใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหารูปแบบและเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลเมตาโบโลมระหว่างตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov et al., 2014; ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิสัย, 2560) เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) หรือการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) (Ebbels et al., 2011)

2.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อลดมิติของตัวแปร ด้วยการรวมตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเข้าเป็นตัวแปรใหม่ โดยตัวแปรอาจมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน หรือทิศทางตรงกันข้าม และยังคงความแปรปรวนรวมของตัวแปรเดิม เรียกตัวแปรใหม่ว่า องค์ประกอบหลัก (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2551; Brotzman et al., 2015) อย่างไรก็ตาม หากปัจจัยที่ได้ยากต่อการตีความ การหมุนปัจจัยเป็นวิธีการที่จะทำให้ปัจจัยมีชัดเจนมากขึ้น การหมุนปัจจัยร่วมให้ตั้งฉากกัน (orthogonal rotation) เป็นวิธีที่นิยมในการลดมิติของข้อมูล อาศัยการพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบ (loading หรือ factor loading) ซึ่งเป็นค่าชี้ถึงระดับหรือปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว (Kim and Mueller, 1978; ยุทธ ไกรวรรณ, 2551) การวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกและง่าย เพราะจะพิจารณาเฉพาะค่า loading ของตัวแปรที่มีค่าสูงเท่านั้น เพื่อให้ตัวแปรสัมพันธ์กับองค์ประกอบในลักษณะที่ชัดเจนขึ้น จากนั้นจึงคัดเลือกตัวแปรที่มีค่า loading ตั้งแต่ 0.3 ขึ้นไป (ยุทธ ไกรวรรณ, 2551) ทำให้ได้องค์ประกอบที่มีจำนวนน้อย แต่ยังคงอธิบายความแปรปรวนของตัวแปรสังเกตได้มากที่สุด (สุภมาส อังศุโชติ และคณะ, 2551)

2.8.2 การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

การวิเคราะห์กลุ่ม เป็นเทคนิคการแบ่งกลุ่มหน่วยข้อมูล ออกเป็นกลุ่มย่อยอย่างน้อย 2 กลุ่ม โดยมีหลักเกณฑ์ในการแบ่ง คือ ให้นำหน่วยที่อยู่กลุ่มเดียวกันมีลักษณะที่สนใจเหมือนกันหรือคล้ายกัน แต่หน่วยที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่สนใจต่างกัน (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) การวิเคราะห์กลุ่มสามารถแบ่งประเภทหรือเทคนิคได้ โดยพิจารณาจากขั้นตอนในการรวมกลุ่ม วิธีการหรือหลักเกณฑ์ในการรวมกลุ่ม ประเภทที่นิยมใช้มาก 2 ประเภท คือ 1) การวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน (hierarchical cluster analysis) และ 2) การวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็นขั้นตอน (nonhierarchical cluster analysis หรือ K – Means Cluster Analysis) (Karadžić et al., 2017; กัลยา วานิชย์บัญชา, 2552) การวิเคราะห์นิยมแสดงผลการรวมกลุ่มในแต่ละขั้นตอนด้วยเดนโดรแกรม (dendrogram) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกต่อการจัดแบ่งกลุ่ม

2.9 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย

ปัจจุบันข้อมูลสนับสนุนเชิงวิชาการของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในประเทศไทย หรือ บัวมะธิตเบต ยังมีอยู่อย่างจำกัด พบเพียงแต่คำกล่าวอ้างถึงคุณประโยชน์ต่าง ๆ และยังไม่พบงานวิจัยใดที่ศึกษาโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในเม็ดคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ที่พบได้ในประเทศไทย โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเม็ดคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักคีเฟอร์ โดยพิจารณาจากการสร้างกรด ค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ และอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในคีเฟอร์ แปรผลข้อมูลโดยการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์จากฐานข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) ได้แก่ การหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) การวิเคราะห์การจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ทหาความสัมพันธ์ของแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์แต่ละตัวอย่างด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) และหาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG pathway analysis จากนั้นนำผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ที่ได้มาประมวลผลข้อมูล เพื่อคัดเลือกเม็ดคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น จากนั้นวิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพันธุกรรม ด้วยด้วยเทคนิค 16s rDNA/RNA gene sequence analysis และ Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการอ้างอิง รวมทั้งศึกษาวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทางค้าในประเทศไทย

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รายการ	ที่มา
น้ำนมโค ยูเอชที รสจืด ตราไทย-เดนมาร์ค	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เมื่อดคีเฟอร์	ร้านคีเฟอร์บ้านเปรม (3 กล้าเชื้อ) จังหวัดระนอง ประเทศไทย ร้านจิบ บัวหิมะ (ธิเบต) (3 กล้าเชื้อ) จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ร้าน Dolly mine (3 กล้าเชื้อ) จังหวัดสงขลา ประเทศไทย ร้าน Earth and Ocean (3 กล้าเชื้อ) จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย ร้าน Kmt Milk kefir (3 กล้าเชื้อ) จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.1.2 อุปกรณ์

รายการ	ที่มา
ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร	Axygen Scientific, Inc., China
เครื่องชั่งน้ำหนักตนิยม 2 ตำแหน่ง ML1602	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งน้ำหนักตนิยม 4 ตำแหน่ง ML204	Mettler Toledo, Switzerland

รายการ	ที่มา
เครื่องดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette)	Pipetman®, Starter-kit, Gilson Co., Ltd., Middletown, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge	Hermle Labortechnik GmbH, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง ultra-centrifuge Optima™ L-100 XL Ultracentrifuge	Beckman Coulter , Inc., USA
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (AutoclaveSX-700)	TOMMY, USA Bruker, Rheinstetten, Germany
เครื่อง NMR spectrometer ความถี่ 500 Hz	Bruker, Rheinstetten, ermany
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)	Hycon Plastics, China
ชุด GF-1 Total RNA Extraction Kit	Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia
ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia
ตู้แช่เยือกแข็ง Sanyo MDF-236 (-25°C)	Sanyo, Sakata Oizumi-Machi, Japan
ถุงมือป้องกันสารเคมีไนไตรล์ สีฟ้า (nitrile power free)	บริษัท สยามเซมเพอร์เมต จำกัด, สงขลา
บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 30, 100, 150 mL	Schott, Germany
ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5, 10 mL	Schott, Germany
ไมโครทูป (microtube) ขนาด 2 mL แบบใส	Axygen Scientific, Inc., China
หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette tip) PK 113-G-Q ขนาด 1000 µL	Thermo Fisher Scientific Inc., Mexico
หลอดดูดจ่ายสารปริมาณต่ำ (micropipette tip) PK 113-G-Q ขนาด 200 µL	QSP Liquid Handling Products, Thermo Fisher Scientific Inc., Mexico
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 mL conical centrifuge tube)	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA

รายการ	ที่มา
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 mL conical centrifuge tube)	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 mL (conical centrifuge tube)	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, USA
หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 10.4 mL (centrifuge bottles with cap assemblies)	Beckman Coulter , Inc., USA
DGGE with Dcode TM Universal Mutation Detection System	Bio-Rad, USA
Gas chromatography–Mass spectrometry (Agilent 7890A GC-7000 Mass Triple Quad)	Agilent Technologies, United States
Gel documentation, Model InGenious	Syngene, United Kingdom
Incubator, LIB101SM	Labtech, Korea
LP Vortex mixer	Thermo Fisher Scientific, China
Nanosep centrifugal device with Omega membrane MWCO 3 kDa	Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA
Pasture pipette	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Germany
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Inc., USA
Power supply, Model EPS 301, GE Healthcare	Amersham Bioscience, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc, USA

3.1.3 สารเคมี

รายการ	ที่มา
น้ำกลั่น (DDW)	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ ทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ
น้ำ Milli-Q	ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ
สารละลาย DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder	Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia
3-Trimethylsilyl-2, 2, 3, 3- tetra deuteriopropionate (TSP)	Merck, Darmstadt, Germany
Bile salts	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dichloromethane (CH ₂ Cl ₂)	RCI Labscan Co.,Ltd, Bangkok, Thailand
Deuterium oxide (D ₂ O)	Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA
Hydrochloric Acid (HCL)	J.T.Baker Chemical Company, USA
Peptone	Titan Biotech Ltd., India
Potato Dextrose Agar	Himedia, India
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Germany
Lactobacillus MRS Agar (MRS Agar)	Himedia, India
Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth)	Himedia, India
Sodium chloride (NaCl)	Loba chemie Pvt. Ltd., India
Yeast Malt Broth	Himedia, India

3.1.4 ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	เป้าหมาย
338F-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG	Bacteria
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	
NL1-GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G	Yeast
LS2	ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC	

3.2 ขั้นตอนวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเม็ดคิเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักคีเฟอร์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างกรด ค่าความหนืดของคีเฟอร์ และอัตราการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์กล้าเชื้อในเม็ดคิเฟอร์ ในระหว่างกระบวนการหมัก คัดเลือกเม็ดคิเฟอร์ซึ่งมีประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยพิจารณาจากความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่เติมเกลือ น้ำตาล หลังจากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในคีเฟอร์ โดยเทคนิคทางเมตาโบลอมิกส์ และสุดท้ายวิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) โดยงานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ 1. การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิค¹H-NMR โดยศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า 2. การคัดเลือกเม็ดคิเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นและศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ที่ได้ 3. วิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคิ

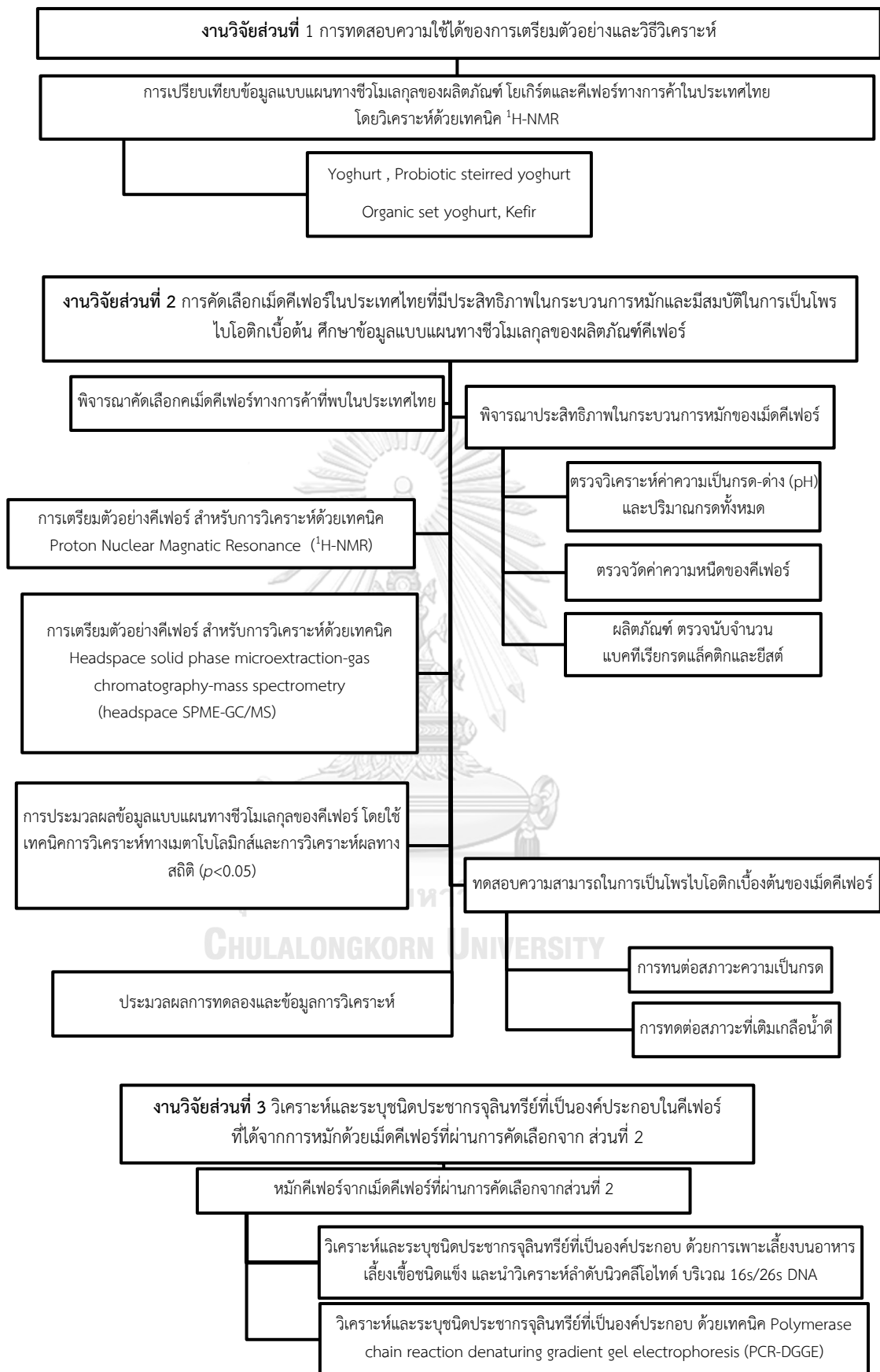
เฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือก ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า ผู้วิจัยจะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต รสธรรมชาติและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (stirred yoghurt) แบบทั่วไป ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นส่วนประกอบ (probiotic stirred yogurt) ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดคงตัว (set yoghurt) แบบออร์แกนิก (organic set yoghurt) และคีเฟอร์ มาศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ที่มีองค์ประกอบของจุลินทรีย์กล้าเชื้อและวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น และศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ ผู้วิจัยจะพิจารณาคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่พบได้ในประเทศไทย เพื่อนำไปหมักคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด ตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ และทดสอบความสามารถการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น จากนั้นนำตัวอย่างคีเฟอร์ส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ คำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra โดย Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) และแปรผลข้อมูลโดยทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ จากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013), Livestock Metabolome Database version 1.0 (Goldansaz et al., 2017), Food Metabolome Database (Scalbert et al., 2014), Milk Composition Database (Foroutan et al., 2019) และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรเช่นเดียวกับการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าดังกล่าวข้างต้น เพื่อหาความสัมพันธ์ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์แต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ที่ได้มาประมวลผลข้อมูล เพื่อคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น รวมทั้งได้ข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยง่ายของคีเฟอร์ในประเทศไทย

ส่วนที่ 3 นำตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกจากส่วนที่ 2 ไปวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 26S rDNA/RNA และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)





ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการดำเนินการในงานวิจัยนี้

3.2.2 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ (Validation of sample preparation and analytical methods)

3.2.2.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหย

ยากด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย 6 ตราสินค้า มาศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีองค์ประกอบของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ (จุลินทรีย์กล้าเชื้อโยเกิร์ต และคีเฟอร์) และวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิต ที่แตกต่างกัน (นมออร์แกนิก และนมทั่วไป) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (stirred yoghurt) จำนวน 1 ตราสินค้า ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (probiotic stirred yoghurt) จำนวน 1 ตราสินค้า (ตราสินค้าเดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (organic set yoghurt) จำนวน 2 ตราสินค้า และคีเฟอร์ทางการค้า จำนวน 3 ตราสินค้า ในประเทศไทย รวมทั้งสิ้น 7 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง (ซ้ำ) โดยผลิตภัณฑ์ที่ใช้มีอายุในช่วง 3-5 วันนับจากวันผลิต รวม 21 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน สำหรับวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด ตัวอย่างละ 25 กรัม สำหรับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ตัวอย่างละ 5 กรัม สำหรับการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมันทั้งหมด (total fat) โปรตีน (protein) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ตัวอย่างละ 250 กรัม และสำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ตัวอย่างละ 50 กรัม

3.2.2.2 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

การค้า

นำตัวอย่างโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าทั้ง 7 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ รวม 21 ตัวอย่าง กวนผสมให้เข้ากันดีจากด้านล่างสู่ด้านบนภาชนะบรรจุ ซึ่งใส่ปีกเกอร์ ตัวอย่างละ 15 กรัม จากนั้นนำไปตรวจวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกผล

การหาปริมาณกรดทั้งหมดในโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าทั้ง 7 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ รวม 21 ตัวอย่าง กวนผสมให้เข้ากันดีจากด้านล่างสู่ด้านบนภาชนะบรรจุ ซึ่งใส่ปีกเกอร์ ตัวอย่างละ 10 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จนได้ค่า pH เท่ากับ 8.30 ± 0.01 บันทึกปริมาตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ และนำไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ในรูปของ ร้อยละของกรดแลคติกต่อไป ตามวิธีมาตรฐาน ISO/IDF (2012)

3.2.2.3 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

ตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมันทั้งหมด (total fat) โปรตีน (protein) และ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โดยใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC (2012), 989.05, AOAC (2012), 991.20 และ Compendium of methods for food analysis (2003) ตามลำดับ ภายใต้คำแนะนำ ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร (คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก 1 ตราสินค้า และตัวอย่างผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทางการค้า 2 ตราสินค้า ตราสินค้าละ 3 ซ้ำ รวม 9 ตัวอย่าง

ค่าองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า (3 ตราสินค้า) และผลิตภัณฑ์ คีเฟอร์ทางการค้า (1 ตราสินค้า) อ้างอิงจากข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวก ก)

3.2.2.4 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Gao et al., 2015 และ Garofalo et al., 2015

โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทั้ง 7 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ รวม 21 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 กรัม ผสมกับสารละลาย peptone salt saline (PSS) ปลอดเชื้อ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ตีผสมให้เข้ากัน เจือจางแบบลำดับ (10-fold serial dilution) จนถึงระดับความเข้มข้น 10^{-10} นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารแข็ง Lactobacillus De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ด้วยเทคนิค pour plate โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในโถบ่มซึ่งภายในบรรจุ anaerobic gas pack เพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน นับจำนวนยีสต์และรา ในอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ด้วยเทคนิค spread plate โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์และ บันทึกผลในหน่วย $\log \text{CFU/g}$

3.2.2.5 การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิด ระเหยยากโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance (^1H - NMR)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ และการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์
ชนิดระเหยยากด้วยเทคนิค ^1H -NMR แสดงดังข้อ 3.2.6-3.2.7

3.2.3 การคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย

จัดหาเม็ตคีเฟอร์ทางการค้า เพื่อดำเนินการคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพใน
กระบวนการหมัก โดยจุลินทรีย์กล้าเชื้อต้องมีความสามารถในการเจริญ มีความสามารถในการสร้าง
กรดระหว่างกระบวนการหมัก สามารถหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่มีความหนืดที่เหมาะสม และ
มีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและเกลือแร่ที่ใช้
ทดสอบได้ จากนั้นศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์จากผู้ผลิตในประเทศไทย ด้วย
เทคนิคทางเมตาโบลอมิกส์

จัดหาเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าจากร้านค้า 5 แห่ง ได้แก่ ร้าน Kmt Milk kefir ร้านจ๊อบ บัวหิมะ
(ฉีเบต) ร้าน Earth and Ocean ร้านคีเฟอร์บ้านเปรม และร้าน Dolly mine ในเขตจังหวัด
กรุงเทพมหานคร จังหวัดจันทบุรี จังหวัดระนอง และจังหวัดสงขลา ประเทศไทย เก็บรักษาในสภาวะ
ที่มีความเย็น (น้ำแข็งแห้ง) ในขณะขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ

3.2.3.1 การเพิ่มจำนวนและการเก็บรักษาเม็ตคีเฟอร์

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Garrote et al., 1997

เพิ่มจำนวนเม็ตคีเฟอร์ โดยนำเม็ตคีเฟอร์ (ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ลงในนม
UHT ชนิดเต็มมันเนย (full fat milk) ที่มีค่าองค์ประกอบเป็นไขมันทั้งหมด ร้อยละ 4 ของน้ำหนัก
คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 4 ของน้ำหนัก และโปรตีน ร้อยละ 3.6 ของน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกเม็ตคีเฟอร์ออก และนำกลับไปใส่นม
UHT ชนิดเต็มมันเนยอีกครั้ง ตามขั้นตอนข้างต้น จนได้เม็ตคีเฟอร์น้ำหนักรวม 40 กรัมโดยประมาณ
ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปดำเนินการทดลองในขั้นตอนถัดไป

โดยเก็บรักษาเม็ดคีเฟอร์ที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในนม UHT ชนิดเต็มมันเนย จนกว่าจะนำมาใช้ในดำเนินการทดลอง

3.2.3.2 การ pre-enrichment เม็ดคีเฟอร์ และกระบวนการหมักคีเฟอร์

การ pre-enrichment เม็ดคีเฟอร์ ทำได้โดยการนำเม็ดคีเฟอร์ที่เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส (ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ลงในนม UHT ชนิดเต็มมันเนย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแยกเม็ดคีเฟอร์ออก และนำไปใส่ในนม UHT ชนิดเต็มมันเนยอีกครั้ง ตามขั้นตอนข้างต้น จากนั้นจึงนำเม็ดคีเฟอร์ที่ได้ ไปใช้ในกระบวนการหมักคีเฟอร์

นำเม็ดคีเฟอร์จาก 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ รวม 15 ตัวอย่าง ที่ผ่านการกระตุ่นในนม UHT ชนิดเต็มมันเนย ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แยกเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาในการหมัก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง โดยกรองแยกเม็ดคีเฟอร์ออก แล้วแบ่งตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้เป็น 5 ส่วน สำหรับวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด ตัวอย่างละ 25 กรัม สำหรับวัดค่าความหนืด ตัวอย่างละ 50 กรัม สำหรับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ตัวอย่างละ 5 กรัม สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย โดยอาศัยเทคนิค headspace SPME-GC/MS ตัวอย่างละ 15 กรัม และสำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก โดยอาศัยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ตัวอย่างละ 50 กรัม

3.2.4 ศึกษาความสามารถในการสร้างกรดตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์ และรูปแบบการ

เจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ

3.2.4.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์

ขั้นตอนการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์ แสดงดังข้อ 3.2.2.2 โดยนำตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ รวม 15 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาในการหมัก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง มาดำเนินการวิเคราะห์

3.2.4.2 การตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Ayar et al., 2016

นำตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ จากทั้ง 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ รวม 15 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง มาวัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืดชนิดหมุน (rotational viscometer) โดยใช้ small adapter เข็มเบอร์ 2 (L2) ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที มีเปอร์เซ็นต์ทอร์ค (torque) อยู่ในช่วง 15 – 100 เปอร์เซ็นต์ อ่านค่าที่วัดได้ในนาที่ที่ 1 และบันทึกผลการทดลองในหน่วย centipoise (cP)

3.2.4.3 ศึกษารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กรดแลคติกและยีสต์ในคีเฟอร์

ขั้นตอนการตรวจนับจำนวนเพื่อศึกษารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กรดแลคติกและยีสต์ในคีเฟอร์ แสดงดังข้อ 3.2.2.4 โดยนำตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ จากทั้ง 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ รวม 15 ตัวอย่าง ที่ระยะเวลาในการหมัก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง มาดำเนินการวิเคราะห์

3.2.5 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (headspace SPME-GC/MS)

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Sansenya et al., 2017

นำตัวอย่าง คีเฟอร์ทางการค้า ทั้ง 3 ตราสินค้า นม UHT ที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์และคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่ง ชนิดละ 3 ซ้ำ รวม 27 ตัวอย่าง ปริมาตร 3 กรัม ใส่ลงในขวด GC vial ขนาด 20 มิลลิลิตร สกัดสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Solid Phase Micro Extraction (SPME) โดยให้ความร้อนเบื้องต้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดซับสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) ด้วยไฟเบอร์ชนิด Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) หน้า 50/30 ไมครอน ควบคุมอุณหภูมิขณะดูดซับที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไฟเบอร์ไปสกัดสารเมตาบอไลต์ โดยการนำเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography

/Mass Spectrometry) (Agilent 7890A GC-7000 Mass Triple Quad) สารเมตาบอไลต์ออกจากไฟเบอร์ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สารเมตาบอไลต์จะถูกแยกด้วยแคปิลารีคอลัมน์ cDB-WAX ขนาด 60 เมตร \times 0.25 มิลลิเมตร \times 0.25 ไมครอน (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) โดยฉีดตัวอย่างแบบ split mode มีค่าอัตราส่วน split ratio 5:1 ที่อุณหภูมิ injector 240 องศาเซลเซียส ค่าโปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นจาก 32 องศาเซลเซียส (คงไว้ 10 นาที) เพิ่มขึ้นในอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนเป็น 40 องศาเซลเซียส (คงไว้ 15 นาที) และเพิ่มขึ้นในอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส และเพิ่มขึ้นในอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 230 องศาเซลเซียส (คงไว้ 5 นาที) อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม (แก๊สตัวพา) มีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิตรต่อนาที แมสสเปกโตรเมตรีเป็นชนิด quadrupole mass detector โดยตั้งค่าที่ electron ionization mode มีค่าอุณหภูมิของส่วนไอออไนเซชัน คือ 230 องศาเซลเซียส มีค่า ionization energy ที่ 70 eV และมีช่วงในการวิเคราะห์ที่ 25 ถึง 400 m/z วิเคราะห์ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา นครราชสีมา

3.2.6 การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Settachaimongkon et al. (2014), Lu et al. (2013) และ มยุรี เหลืองวิสัย และคณะ, 2561 ดังแสดงในภาพที่ 3.2

3.2.6.1 การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ปรับค่า pH เริ่มต้นของคีเฟอร์แต่ละตัวอย่างให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.00 ± 0.01 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

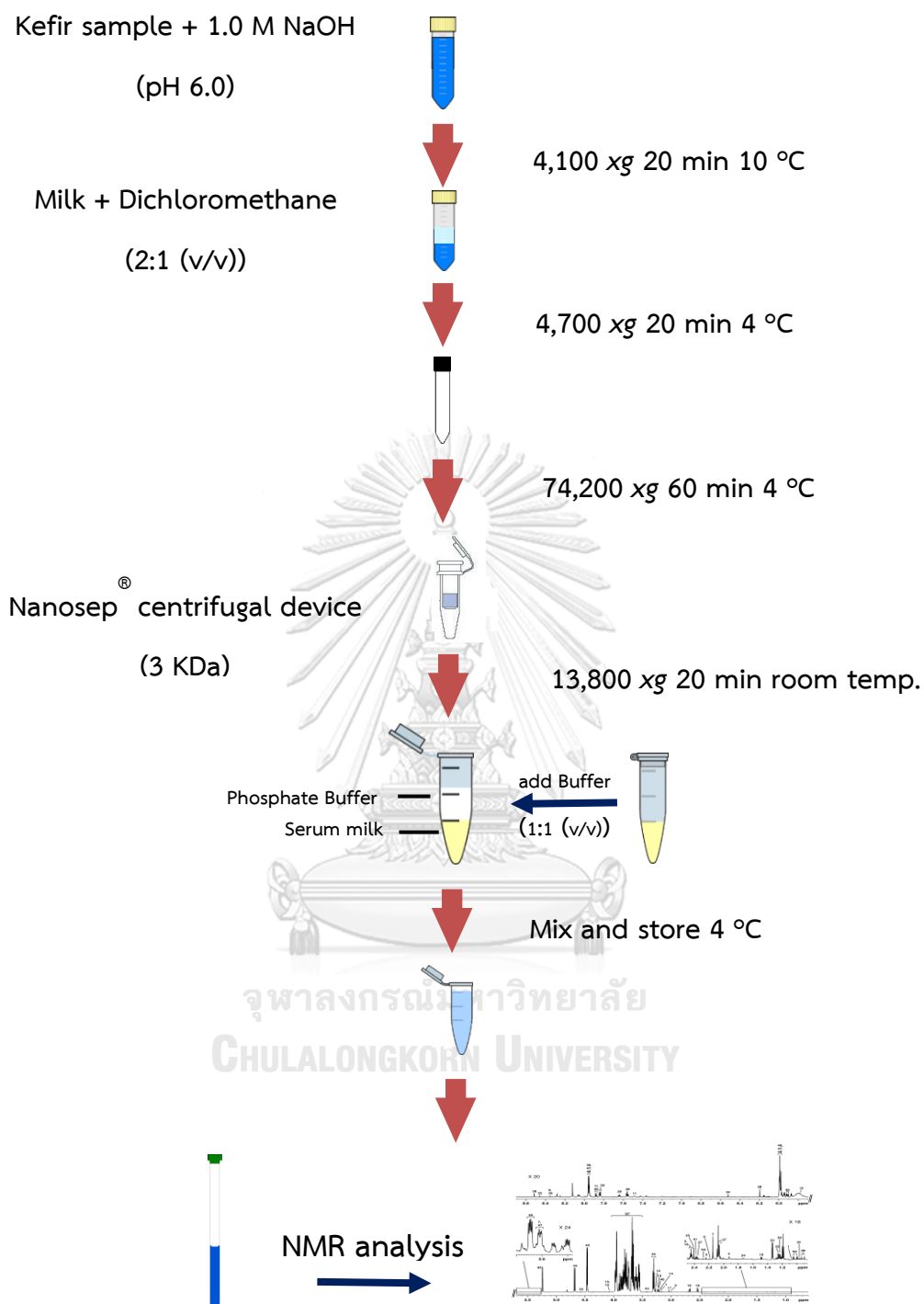
3.2.6.1.1 นำตัวอย่างคีเฟอร์ใส่หลอด centrifuge เพื่อแยกชั้นไขมันนมออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 4,100 $\times g$ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากปั่น เหวี่ยงจะพบการแยกชั้น โดยชั้นไขมันนมอยู่ด้านบน และหางนม (skim milk) อยู่ด้านล่าง จากนั้นถ่ายของเหลวส่วนที่เป็นหางนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่

- 3.2.6.1.2 สกัดไขมันที่เหลือในตัวอย่างหางนมออกด้วย dichloromethane โดยผสมตัวอย่างหางนมกับ dichloromethane ในอัตราส่วน 2:1 (v/v) ในการศึกษานี้จะใช้ตัวอย่างหางนม 20 มิลลิลิตรและ dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ประมาณ 20 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,700 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบซีรัมนม (clear milk serum) อยู่ด้านบน ชั้นไขมันนมที่เหลือและ dichloromethane อยู่ด้านล่างตามลำดับ ถ่ายของเหลวส่วนที่เป็นซีรัมนมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
- 3.2.6.1.3 นำซีรัมนมที่ได้ใส่หลอด centrifuge สำหรับ ultra-centrifuged ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 74,200 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงจะพบ ซีรัม (serum) อยู่ด้านบน และตะกอนโปรตีนนมอยู่ด้านล่าง ถ่ายของเหลวส่วนที่เป็นซีรัมใส่หลอด centrifuge หลอดใหม่
- 3.2.6.1.4 เตรียม Nanosep® centrifugal device (Pall life sciences, Ann Arbor, MI, USA) ที่มีผ่านรูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลดาลตัน ให้พร้อมใช้งาน (ภาคผนวก ข1) จากนั้นนำซีรัมที่ได้ ใส่ใน Nanosep® centrifugal device ตัวอย่างละ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดตะกอนสุดท้าย โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,800 xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายของเหลวที่กรองได้ (filtrate serum) ใส่หลอด microcentrifuge หลอดใหม่
- 3.2.6.1.5 นำตัวอย่างส่วนใสที่กรองได้มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ข 2) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ในการศึกษาจะใช้ตัวอย่าง ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ภายใน 24 ชั่วโมง

3.2.6.2 การเตรียมตัวอย่างคีเฟออร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ย้ายตัวอย่างที่ได้ลงหลอด NMR ขนาด 5 มิลลิเมตร ด้วย micropipette ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และเติม D_2O ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการจับสัญญาณแม่เหล็กไฟฟ้า (Hu et al., 2004) นำตัวอย่างไปวัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Rheinstetten, Germany) ที่ความถี่ 500 เมกะเฮิรต์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วย broadband observe (BBO) probe จากนั้นกด peak ของสารอ้างอิงมาตรฐาน (Internal standard) มีค่า chemical shift เท่ากับ 0.00 ($\delta = 0.00$) peak น้ำ (H_2O) ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.80 ($\delta = 4.80$) เหมาะกับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ ระยะเวลาที่ใช้โดยประมาณ 30 นาทีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง ภายใต้คำแนะนำของเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาพที่ 3.2 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectrometer
ในงานวิจัยนี้

(ดัดแปลงจาก Settachaimongkon et al. (2014), Lu et al. (2013), มยุรี เหลืองวิสัย, (2561))

3.2.7 การประมวลผลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างซีเฟออร์ โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์

3.2.7.1 แปลผลการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจาก headspace SPME-GC/MS ด้วย Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00 software โดยระบุชนิด (identification) สารเมตาบอไลต์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST mass spectral libraries (National Institute of Standards, 2011 version)

3.2.7.2 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วย $^1\text{H-NMR}$ เรียกว่า NMR spectra โดย NMR spectra จะอ้างอิงจากสารอ้างอิงมาตรฐาน (Internal standard) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ คือ 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP) ช่วง chemical shifts (δ) ของโปรตอนในสารประกอบมีค่าระหว่าง 0.00–10.00 ppm โดยจะแบ่งออก (binning) เป็น 0.02 ppm (Anderson et al., 2011) ได้ทั้งหมด 500 bin ซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ได้จาก Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) โดย bin ที่มีช่วงตรงกับน้ำ ($\delta = 4.73 - 4.99$ ppm) จะไม่นำมาวิเคราะห์ (Settachaimongkon et al., 2014a)

3.2.7.3 ทำการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากฐานข้อมูล Chemomx NMR suite 7.5 library (Chemomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013), Livestock Metabolome Database version 1.0 (Goldansaz et al., 2017), Food Metabolome Database (Scalbert et al., 2014), Milk Composition Database (Foroutan et al., 2019) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009, Klein et al., 2010, Settachaimongkon et al., 2014, Lu et al., 2018)

3.2.8 การทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของประชากรจุลินทรีย์ในเม็คคิเฟอร์

3.2.8.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Likotrafiti et al., 2015 และ Xing et al., 2017

ซังตัวอย่างเม็คคิเฟอร์ที่ได้จากการหมักที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากทั้ง 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว MRS (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก) หรือ YM (สำหรับยีสต์) ที่ได้ปรับ pH ให้เท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มภายใต้สภาวะการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) ตีผสมตัวอย่างด้วยเครื่องตีปั่น 200 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำไปเจือจางแบบลำดับ (10-fold serial dilution) นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่มีความสามารถในการทนกรด ดังแสดงในข้อ 3.2.4

3.2.8.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Sanlidere Aloglu et al. (2016) และ Xing et al., 2017

ซังตัวอย่างเม็คคิเฟอร์ที่ได้จากการหมักที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากทั้ง 5 แหล่ง แหล่งละ 3 ซ้ำ ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว MRS (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก) หรือ YM (สำหรับยีสต์) ที่ได้เติม 0.3% (w/v) เกลือ น้ำดี ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ภายใต้สภาวะการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) ตีผสมตัวอย่างด้วยเครื่องตีปั่น 200 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำไปเจือจางแบบลำดับ (10-fold serial dilution) และนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือ น้ำดี ดังแสดงในข้อ 3.2.4

3.2.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3.2.9.1 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis)

บันทึกข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2010 นำข้อมูลที่ได้จากการการ ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด และการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และคีเฟอร์ทางการค้า มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติแบบตัวแปรเดียว ด้วยวิธี Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

3.2.9.2 การวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis)

3.2.9.2.1 นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจากพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ ชนิดระเหยง่าย ด้วย headspace SPME-GC/MS มาวิเคราะห์ข้อมูล โดยแปลงข้อมูลที่ได้ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล พื้นที่ใต้กราฟของสารบางชนิดที่ไม่พบในทุกตัวอย่างจะถูกแทนที่ด้วยค่าที่ได้จากการประมาณค่าด้วยค่ามัธยฐานของสารชนิดนั้นๆ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (log₂-scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.9 (Ralli et al., 2018) และ MetaboAnalyst (Chong et al., 2018) เพื่อวิเคราะห์รูปแบบความสัมพันธ์ข้อมูลแบบแผนสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์

3.2.9.2.2 นำปริมาณสัมพัทธ์ของข้อมูลจาก spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ ชนิดระเหยง่าย ด้วย ¹H-NMR โดยใช้ Bruker TopSpin software (Bruker, Rheinstetten, Germany) มาวิเคราะห์ข้อมูล โดยแปลงข้อมูลที่ได้ให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize) ด้วยค่ามัธยฐาน (median) ของข้อมูล โดยการนำค่า bin ของแต่ละตัวอย่างหารด้วยค่า median ของแต่ละ bin และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าลอการิทึมฐาน 2 (log₂-scaling) จะได้ข้อมูลที่ใช้สำหรับโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV)

version 4.9 เพื่อวิเคราะห์รูปแบบความสัมพันธ์ข้อมูลแบบแผนสารเมตาบอไลต์ ชนิดระเหยยากของคีเฟอร์ ซึ่ง bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ได้ จะนำค่าที่ได้จาก Bruker TopSpin software มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และเลือก bin ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ร่วมกับ bin ที่สามารถระบุชนิดของสารได้ เพื่อนำไปประมวลผลในขั้นตอนถัดไป (Settachaimongkon et al., 2014, มยური เหลืองวิสัย, 2561)

3.2.9.2.3 ประมวลผลข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบหาความแตกต่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัว (Skov et al., 2014) ได้แก่ การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) โดยเทคนิค heat-map visualization อาศัยการเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดย สีแดง หมายถึง มีปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดนั้นมาก และสีเขียว หมายถึง มีปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดนี้น้อย การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA หลักการในการทำ cluster คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ของแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์แต่ละตัวอย่างด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation) และการหารูปแบบความแตกต่างของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Components Analysis, PCA) โดยค่า loading และ ค่า จาก VIP score สามารถใช้ในการชี้ระดับหรือปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละตัว (Kim and Mueller, 1978, ยุทธ ไกรวรรณ, 2551) ให้ตัวแปรสัมพันธ์กับองค์ประกอบในลักษณะที่ชัดเจนขึ้น ทำให้ได้องค์ประกอบจำนวนน้อย ที่สามารถใช้อธิบายความแปรปรวนของตัวแปรสังเกตได้มากที่สุด (สุภมาส อังศุโชติ และคณะ, 2551) และสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดของสารเมตาบอไลต์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) ในตัวอย่างได้

จากนั้นวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG pathway analysis (<https://www.metaboanalyst.ca>)

3.2.10 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ในซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นที่ผ่านการคัดเลือก

ขั้นตอนการหมักซีเฟอร์ด้วยเม็ดซีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือก แสดงดังข้อ 3.2.3.2 เก็บตัวอย่างซีเฟอร์ที่ระยะเวลาในการหมัก 0 6 12 18 24 ชั่วโมง ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงดังข้อ 3.2.2.4 จากนั้นสุ่มโคลนตัวแทน โดยใช้เทคนิค Harrison disc ซึ่งเป็นเทคนิคในการสุ่มเลือกโคลนจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการระบุชนิด (Tu et al., 2010) จากนั้นตรวจสอบจนกระทั่งได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 26S rDNA/RNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.2.11 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ในซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นที่ผ่านการคัดเลือก

วิธีการดำเนินงานขั้นตอนนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Chanprasartsuk et al., 2013

3.2.11.1 การสกัดอาร์เอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction, PCR)

ขั้นตอนการหมักคีเฟอร์ด้วยเมดคีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือก แสดงดังข้อ 3.2.3.2 เก็บตัวอย่างคีเฟอร์ที่ระยะเวลาในการหมัก 0 6 12 18 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (สกัด RNA ทันทีและเปลี่ยนให้เป็น cDNA) ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัด RNA โดยชุดสกัด GF-1 Total RNA Extraction Kit เปลี่ยน RNA ให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ตามวิธีในคู่มือการใช้ เก็บรักษา cDNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปดำเนินการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป (Chanprasartsuk et al., 2013)

เพิ่มจำนวน cDNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA และ 26S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยนำ cDNA ที่ได้มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50 μ l ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุ

เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA และ 26S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยนำ DNA ที่ได้มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50 μ l ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุการทำ PCR โดยใช้ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 338F-GC และ 518R และ NL1-GC และ LS2 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยรีเอเจนต์ ดังนี้

1x taq buffer with KCl, 0.1 mM dNTPs, 1 μ M forward และ reverse primers
2mM MgCl₂, 2 U taq DNA polymerase, DNA template 20 ng และ Water, nuclease-free
โดยมีสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. Initial denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	9	นาที
2. Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1	นาที
3. Annealing	อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	3	วินาที
4. Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1	วินาที
5. Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	5	นาที

ทำข้อ 2) ถึงข้อ 4) ซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ

3.2.11.2 การแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล แปรความเข้มข้นของเจลเป็นร้อยละ 10% (w/v) (acrylamide-bis-acrylamide 37.5:1) โดยใช้เกรเดียนต์ (gradient) ของยูเรียและฟอร์มามาไมด์ที่ความเข้มข้นจากร้อยละ 40–70 (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ผสมสารเคมีสำหรับทำ DGGE และบรรจุในกระจกตามวิธีการบรรจุเจลสำหรับการทำ DGGE (ภาคผนวก ค) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) 5 ไมโครลิตร โดยแยกแถบดีเอ็นเอบนเจล จากนั้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ ใน 1×Tris-acetate/EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) เป็นระยะเวลา 3.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System นำแผ่นเจลแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปล้าง โดยการแช่แผ่นเจลในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏด้วยเครื่อง Gel Documentation และตัดแถบ DNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.2.11.3 การแยกแถบ DNA เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำสารละลายที่ได้จากแถบ DNA จากข้อ 3.2.10.1 ใช้เป็น template PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 338F และ 518R และ NL1 และ LS2 ตรวจสอบคุณภาพ PCR product ส่งไปวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศสิงคโปร์ ตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม blastn blastn ของ 16S ribosomal RNA sequences database ของ the NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)).

3.2.12 วิจัยและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลองที่ได้จากการคัดเลือกเมดิคิเฟอร์มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น รวมถึงผลการวิเคราะห์คิเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดิคิเฟอร์ โดยอาศัยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และ $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy เปรียบเทียบ

ความแตกต่างของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปรและนำไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการหาความสัมพันธ์ของสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและชนิดระเหยยากในตัวอย่าง รวมทั้งวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของคีเฟอร์ จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ในระหว่างกระบวนการหมัก รวมทั้งระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 26S rDNA/RNA และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE และสรุปผลการทดลอง



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหย

ยากด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จะนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย 6 ตราสินค้า มาศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีองค์ประกอบของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ (จุลินทรีย์กล้าเชื้อโยเกิร์ต และคีเฟอร์) และวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน (นมอินทรีย์ และนมทั่วไป) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (stirred yoghurt) จำนวน 1 ตราสินค้า (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (probiotic stirred yoghurt) จำนวน 1 ตราสินค้า (ตราสินค้าเดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดกวน) (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (organic set yoghurt) จำนวน 2 ตราสินค้า (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ทางการค้า (คีเฟอร์ตราสินค้า D, E และ F) จำนวน 3 ตราสินค้า ในประเทศไทย รวมทั้งสิ้น 7 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวอย่าง (ซ้ำ) โดยผลิตภัณฑ์ที่ใช้มีอายุในช่วง 3-5 วันนับจากวันผลิต รวม 21 ตัวอย่าง

4.1.1 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ปกติจะอยู่ในช่วง ประมาณ 3.85-4.50 (Aryana and Olson, 2017) และ 4.20-4.60 (Baschali et al., 2017) ตามลำดับ ผลการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (ตราสินค้าเดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ (คีเฟอร์ตราสินค้า D, E และ F) พบว่าค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีค่า 4.28 ± 0.09 และค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ มีค่า 4.20 ± 0.38 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ปกติ อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่

ได้ ไม่สามารถแสดงถึงปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่แท้จริง เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักโปรตีนในนมจะเกิดการเสียสภาพ (protein denaturation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าประจุ ซึ่งส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อนจากผลของปริมาณกรดที่แท้จริง (Lošdorfer Božič and Podgornik, 2017) ดังนั้นในการตรวจวัดปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์นม จำเป็นต้องอาศัยการตรวจวัดด้วยวิธีการไทเทรตเพิ่มเติม

การตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวสามารถทำได้โดยการไทเทรตตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นนำปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดตามวิธีมาตรฐาน ISO/IDF (2012) จากมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ (คำนวณเป็นร้อยละของกรดแลคติก) ต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละ 0.6 (ร้อยละโดยมวล) (Codex, 243-2003) ผลการตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (ตราสินค้าเดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ (คีเฟอร์ตราสินค้า D, E และ F) พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์มีปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ มากกว่าร้อยละ 0.60 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพ และในแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) จากการวิเคราะห์ยังพบว่าค่าปริมาณกรดทั้งหมดที่ตรวจวัดได้ มีความสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างโยเกิร์ตและคีเฟอร์ โดยตัวอย่างคีเฟอร์ตราสินค้า E มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดและมีปริมาณร้อยละโดยมวลของกรดทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งเมื่อปริมาณร้อยละโดยมวลของกรดมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้จะมีค่าลดลง (Noh et al., 2013) ปริมาณกรดแลคติกที่ได้เป็นผลมาจากความสามารถในการดำเนินกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำตาลแลคโตสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักที่สามารถพบได้ในน้ำนมและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก (Chen et al., 2017, Heine et al., 2017) และจากผลการศึกษาพบว่าในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์มากกว่าในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ซึ่งเป็นผลมาจากความหลากหลายของจุลินทรีย์กล้าเชื้อในคีเฟอร์ ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียทั้งในกลุ่มของ homofermentative และ heterofermentative (Kowalczyk et al., 2015) และยีสต์ โดยหาก

กรดแลคติกมีปริมาณมาก จะส่งผลถึงคุณภาพทางประสาทสัมผัส ทำให้เกิดรสเปรี้ยว ในลักษณะ tart หรือ acrid ในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวได้ (Terpou et al., 2017)

4.1.2 การตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

ในขั้นตอนนี้จะตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมันทั้งหมด (total fat) โปรตีน (protein) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โดยใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC (2012), 989.05, AOAC (2012), 991.20 และ Compendium of methods for food analysis (2003) ตามลำดับ ในตัวอย่างโยเกิร์ตชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B) คีเฟอร์ตราสินค้า D และ E ในส่วนของตัวอย่างโยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า C) และคีเฟอร์ตราสินค้า F จะใช้ค่าองค์ประกอบทางเคมีอ้างอิงจากข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวก ก) วัตถุประสงค์เพื่อใช้ค่าองค์ประกอบทางเคมีเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเปรียบเทียบกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่แตกต่างกัน (กล้าเชื้อในกระบวนการหมักโยเกิร์ตและคีเฟอร์) และคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์

จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มผลิตภัณฑ์คีเฟอร์อย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.1) เป็นผลมาจากความหลากหลายและความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในงานวิจัยนี้ โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 ชนิด (*Streptococcus thermophiles* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) และโยเกิร์ตชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) ประกอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด (*Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Bifidobacterium lactis*) ขณะที่จุลินทรีย์กล้าเชื้อของคีเฟอร์ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติก (Codex, 243-2003) (กระทรวงสาธารณสุข, 2556) ซึ่งชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์จะมีผลต่อความหลากหลายของกิจกรรมทางเมตาบอลิซึม เป็นผลให้คีเฟอร์เกิดกิจกรรมทางเมตาบอลิซึม และมีกระบวนการในการย่อยสลายองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) ที่หลากหลายกว่าในโยเกิร์ต (Bourrie et al., 2016, Walsh et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่า คีเฟอร์ตราสินค้า E มีค่า

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด เมื่อนำไปเทียบกับคีเฟอร์ตัวอย่างอื่น ๆ แสดงถึงการมีเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตที่สูงที่สุด ผลจากการวิเคราะห์ที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้รายงานไปก่อนหน้านี้ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จะต่ำเนื่องจากมีปริมาณกรดแลคติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตสูง

จากการวิเคราะห์พบว่าค่าองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ไขมันทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 2.59-3.77 ของน้ำหนัก โปรตีน มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 3.00-4.50 ของน้ำหนัก และคาร์โบไฮเดรต มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.71-15.45 ของน้ำหนัก เมื่อนำผลการวิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับมาตรฐานนมเปรี้ยว ตามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ซึ่งได้กำหนดให้มีโปรตีน ไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.70 ของน้ำหนัก สำหรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ไขมันทั้งหมด น้อยกว่าร้อยละ 15 และร้อยละ 10 ของน้ำหนัก สำหรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ตามลำดับ พบว่าทุกตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์มีปริมาณโปรตีน และไขมันทั้งหมด เป็นไปตามมาตรฐานคุณภาพ

4.1.3 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า

การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ แบ่งเป็นการตรวจนับแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และรา โดยผลิตภัณฑ์ที่ใช้มีอายุในช่วง 3-5 วันนับจากวันผลิต พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์มีจำนวนอยู่ในช่วง $7.6-10.0 \log_{10}$ CFU/g แต่ตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยีสต์และราในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีจำนวนน้อยกว่า $2.0 \log_{10}$ CFU/g และยีสต์และราในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีจำนวนอยู่ในช่วง $6.4-7.0 \log_{10}$ CFU/g แต่ตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.1) ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับจำนวนจุลินทรีย์ที่กำหนดในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ตามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ซึ่งได้กำหนดให้มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักโดยโยเกิร์ตและคีเฟอร์ ไม่น้อยกว่า $7.0 \log_{10}$ CFU/g มียีสต์ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ ไม่เกินกว่า $4.0 \log_{10}$ CFU/g และมีราในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ไม่เกินกว่า $2 \log_{10}$ CFU/g โดยพบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และรา สอดคล้องตามมาตรฐานคุณภาพ

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และรา องค์ประกอบทางเคมีจากการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC (2012), 989.05, AOAC (2012), 991.20, Compendium of methods for food analysis (2003) และอ้างอิงจากข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และ ปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างโยเกิร์ต และคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย

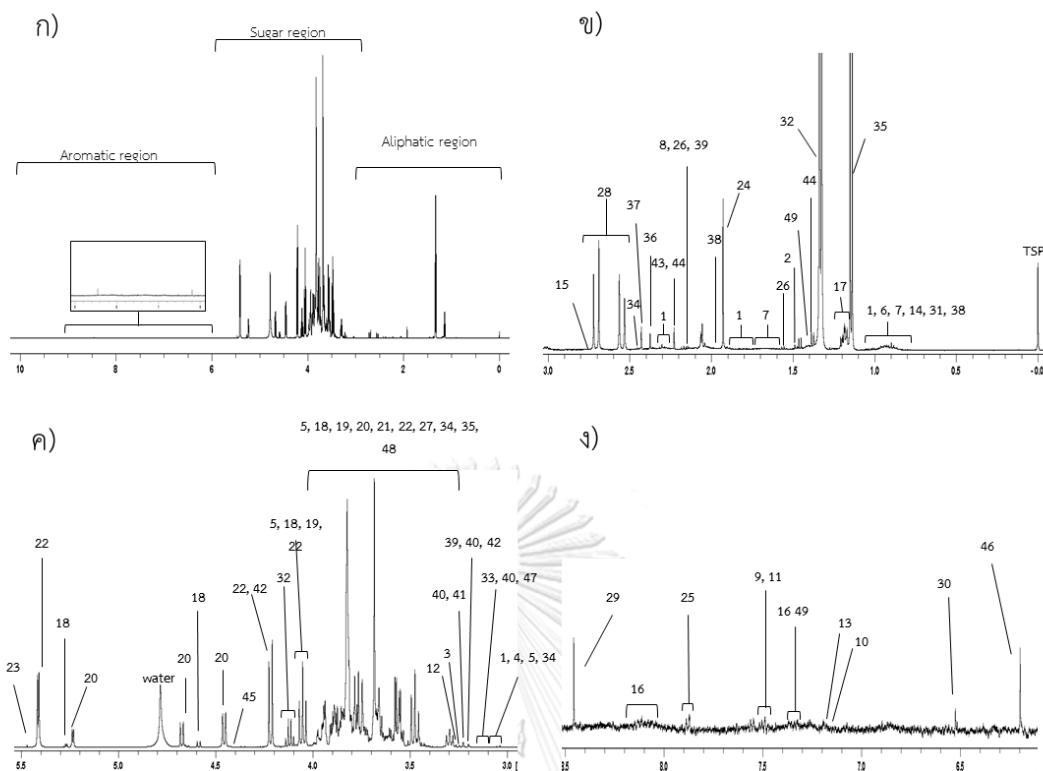
ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โยเกิร์ตและคีเฟอร์	ปริมาณจุลินทรีย์ (log ₁₀ CFU/g) แบคทีเรียกรดแลคติก	องค์ประกอบทางเคมี (%)			ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)	ปริมาณกรด ทั้งหมด (% กรดแลคติก)	
		ยีสต์และรา	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน			ไขมัน
โยเกิร์ต ตราสินค้า A	7.6±0.5 ^a	< 2.0	14.07	3.70	2.59	4.27±0.05 ^{bc}	1.07±0.04 ^c
โยเกิร์ตโพรไบโอติก ตราสินค้า A	9.2±0.1 ^c	< 2.0	15.45	3.64	3.64	4.38±0.09 ^{cd}	0.93±0.05 ^{abc}
โยเกิร์ต ตราสินค้า B	10.0±0.1 ^d	< 2.0	9.66	3.60	3.15	4.16±0.13 ^b	0.93±0.06 ^{ab}
โยเกิร์ต ตราสินค้า C	9.0±0.1 ^c	< 2.0	9.00	3.00	3.00	4.32±0.08 ^{cd}	0.80±0.03 ^a
คีเฟอร์ ตราสินค้า D	8.3±0.2 ^b	6.4±0.1 ^a	4.64	3.64	3.30	4.37±0.03 ^{cd}	1.06±0.09 ^{bc}
คีเฟอร์ ตราสินค้า E	8.3±0.1 ^b	6.4±0.1 ^b	1.71	3.35	3.77	3.76±0.01 ^a	2.52±0.05 ^d
คีเฟอร์ ตราสินค้า F	8.6±0.6 ^{bc}	7.0 ±0.0 ^b	3.30	4.50	3.50	4.46±0.08 ^d	0.97±0.014 ^{bc}

หมายเหตุ : a, b, c และ d ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานขององค์ประกอบทางเคมีที่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.1.4 การประมวลผลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทาง การค้ำโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์

4.1.4.1 การประมวลผล spectra ของ $^1\text{H-NMR}$ และการระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ spectra ของ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

หลังจากการประมวลผล spectra ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm (แสดงดังขั้นตอนที่ 3.2.7) ได้ทั้งหมด 500 bin และจะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013), Livestock Metabolome Database version 1.0 (Goldansaz et al., 2017), Food Metabolome Database (Scalbert et al., 2014), Milk Composition Database (Foroutan et al., 2019) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009, Klein et al., 2010, Settachaimongkon et al., 2014, Lu et al., 2018) สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ได้ ทั้งหมด 171 bin และเมื่อนำสารเมตาบอไลต์ที่ได้มาจัดกลุ่ม จะได้สารทั้งหมด 49 เมตาบอไลต์ โดยเป็นสารในกลุ่มของ กรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ ไขมันและอนุพันธ์ สารประกอบคาร์บอนิล และอื่นๆ สามารถระบุตำแหน่งบนสเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอลิต์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ (ข) ภาพขยายในช่วง aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง aromatic region (6.00-10.00 ppm) ลำดับสารที่ 1-49 ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่า chemical shift (ppm) ที่ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างโยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 49 สารเมตาบอไลต์

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^1H chemical shift, ppm ^a
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	1	Aminobutyrate	3.03 (t)- 3.01 (t), 2.31(t)- 2.29(t), 1.93(m)- 1.87(m), 1.03(t)- 1.01 (t)
	2	Alanine	3.83 (m)- 3.79(m), 1.49 (d)- 1.47 (d)
	3	Betaine**	3.91(s) ,3.27(s)
	4	Creatine**	3.97 (s)- 3.93(s), 3.05 (s)- 3.03(s)
	5	Creatinine	4.07 (s), 3.05 (s)- 3.03 (s)
	6	Isoleucine	0.99 (d), 0.93 (t)
	7	Leucine	3.77 (d)- 3.73 (d), 1.75 (m)- 1.65 (m), 0.99 (t)- 0.95 (t)
	8	Methionine	2.15 (m)
	9	N-Acetylserotonin	7.39 (d), 7.21 (s)
	10	N-Acetyltyrosine	7.15 (m)
	11	Phenylalanine	7.43 (m)- 7.35 (m)
	12	Proline	3.45 (m)- 3.41 (m), 3.37 (m)- 3.31 (m), 2.37(m)- 2.33(m), 2.07(m)- 1.99(m)
	13	Tyrosine	7.19 (d)- 7.15(d), 6.91 (m)- 6.89(d)
	14	Valine	2.27(m)- 2.25 (m), 1.05 (d)- 0.99(d)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
กรดอะมิโนและอนุพันธ์ (ต่อ)	15	Sarcosine**	2.73 (s)
	16	Amino acid residues	8.37 (m) – 8.09 (m), 7.27 (m) – 7.31 (m), 6.85 (d) – 6.87 (s)
แอลกอฮอล์	17	Ethanol	1.21 (t)- 1.17 (t)
คาร์โบไฮเดรตและ อนุพันธ์	18	Galactose	5.29 (d)- 5.27 (d), 4.59 (d), , 4.11 (m)- 4.07 (m), 3.99 (m)- 3.63 (m), 3.53 (m)- 3.47 (m)
	19	Glucose	5.25 (m)- 5.23 (m), 4.65 (d), 3.97 (m)- 3.71 (m), 3.55 (m)- 3.25 (m)
	20	Lactose	4.69 (d)- 4.67 (d), 4.47 (d)- 4.45 (d), 3.99 (m)- 3.93 (m), 3.89 (m)- 3.53 (m), .31 (m)- 3.29 (m)
	21	N-Acetylglucosamine	8.07 (d)- 8.05 (d), 3.53 (m)- 3.49 (m), 2.07 (s)- 2.03 (s)
	22	Sucrose	5.43 (d)- 5.41 (d), 4.23 (d)- 4.21 (d), 4.07 (t)- 4.05 (t), 3.91 (m)- 3.71(m), 3.69 (s), 3.59 (m)- 3.55 (m), 3.49 (t)- 3.45 (t)
	23	Sugar residues	5.45 (m), 5.39(m)-5.37 (m)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
กรดอินทรีย์	24	Acetate	1.93 (s)
	25	Benzoate	7.89 (m)– 7.47 (m)
	26	Butyrate	2.19–2.15, 15.3 (m)– 1.59 (m), 0.91 (t)– 0.87 (t)
	27	Hydroxyisobutyrate	3.57 (m)– 3.53 (m), 1.37 (s)
	28	Citrate	2.73/2.71 (d)– 2.69 (d), 25.7 (d)– 2.53 (d)
	29	Formate	8.45 (s)
	30	Fumarate*	6.53 (s)
	31	Isobutyrate	2.35 (m)– 2.33 (m), 1.05 (d)– 1.03 (d)
	32	Lactate	4.15 (m)– 4.12 (m), 1.35 (d)– 1.33 (d)
	33	Malonate	3.15 (s)
	34	Oxoglutarate	3.03 (t)– 3.01 (t), 2.45 (t)
	35	Propylene glycol	3.91 (m)– 3.87 (m), 3.57 (m)– 5.53 (m), 3.47 (m)– 3.43 (m), 1.15 (d)– 1.13 (d)
	36	Pyruvate	2.37 (s)
	37	Succinate	2.43 (s)
	38	Valerate* and derivatives	3.85 (m), 2.37 (s), 2.07 (m)– 1.99 (m), 1.29 (s)– 1.27 (s), 0.93 (t)– 0.91 (t), 0.89 (t)– 0.83 (t)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

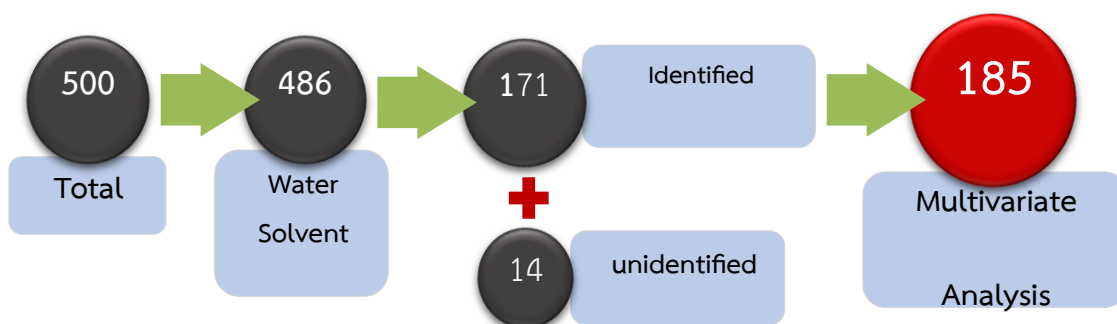
กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
ไขมันและอนุพันธ์	39	Acetylcholine	3.75 (m), 3.21 (s), 2.15 (s)
	40	Choline and derivatives	3.23 (s), 3.19 (s)
	41	Glycerophosphocholine**	4.33 (m)- 4.31 (m), 3.61 (m), 3.23 (s)
	42	Phosphocholine**	3.61 (m), 3.21(s)
สารประกอบคาร์บอนิล	43	Acetone**	2.23 (s)
	44	Acetoin	2.23 (s), 1.39 (d)- 1.37 (d)
	45	Dihydroxyacetone*	4.43 (s)
	46	Maleate	6.19 (s)
อื่นๆ	47	Dimethyl sulfone	3.15 (s)
	48	Glycerol**	3.81 (m)- 3.77 (m), 3.69 (m)- 3.65 (m), 3.59 (m)- 3.55 (m)
	49	Phenylpropionate**	7.39 (m)- 7.33 (m), 1.43 (d)- 1.41 (d)

หมายเหตุ: * พบเฉพาะในตัวอย่างโยเกิร์ตทางการค้า

** พบเฉพาะในตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า

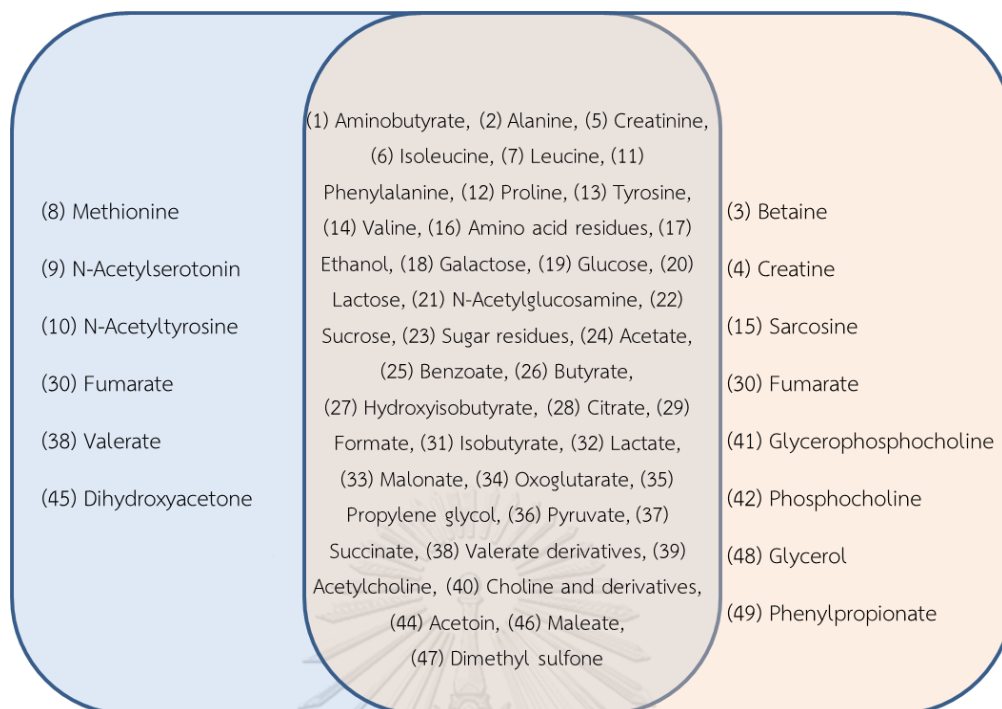
^ad=doublet, m=multiplet, s=singlet, t=triplet

ในส่วนของ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสาร จะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวน โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ได้ทั้งหมด 14 bin ผลการวิเคราะห์จะได้ bin รวมทั้งหมด 187 bin (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

และเมื่อเปรียบเทียบในเชิงคุณภาพระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า (ภาพที่ 4.3) พบว่า มีสารเมตาบอไลต์จำนวน 6 เมตาบอไลต์ที่พบได้เฉพาะในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ได้แก่ methionine, N-acetylserotonin, N-acetyltyrosine, fumarate, valerate และ dihydroxyacetone มีสารเมตาบอไลต์จำนวน 8 เมตาบอไลต์ ที่พบได้เฉพาะในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ ได้แก่ betaine, creatine, sarcosine, fumarate, glycerophosphocholine, phosphocholine, glycerol และ phenylpropionate แสดงให้เห็นว่าสารเมตาบอไลต์ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีมากกว่าในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์กล้าเชื้อมีผลต่อชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้น (Walsh et al., 2016)



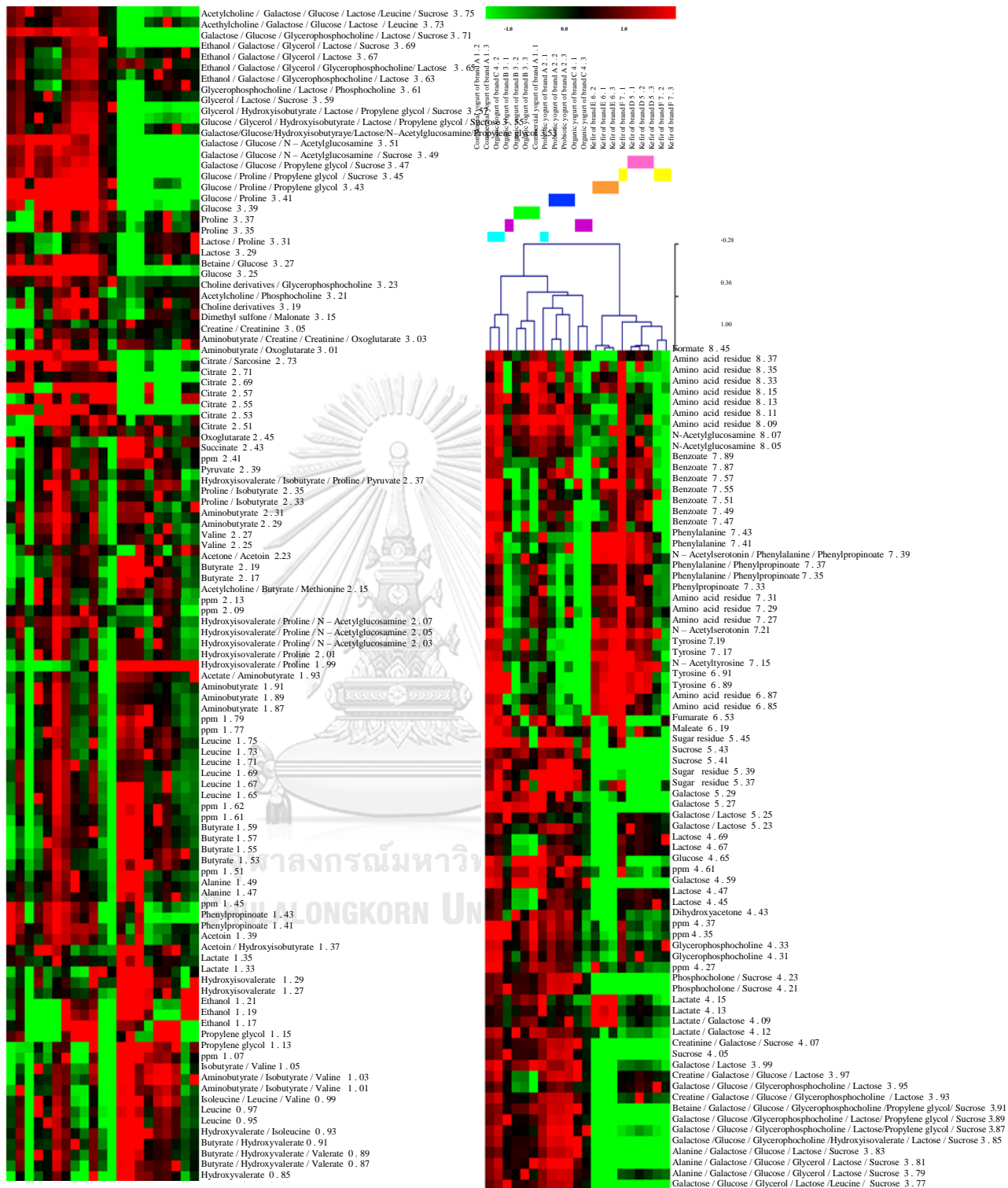
ภาพที่ 4.3 แผนภาพเวนน (Venn Diagram) ของสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (■) ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (■) และทั้งสองตัวอย่าง (■)

4.1.4.2 การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยเทคนิค *heat-map visualization* และ *hierarchical cluster analysis (HCA)*

จากข้อมูลที่ได้จากการประมวลผล spectra ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และการระบุสารเมตาบอไลต์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าได้ทั้งหมด 185 bin จากนั้นเมื่อนำมาประมวลผลดังแสดงในขั้นตอนที่ 3.2.7 เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค *heat-map visualization* และ HCA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.8.1 และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยการจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค *heat-map visualization* โดยจะเปรียบเทียบความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง กำหนดให้ สีแดง หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์มาก และสีเขียว หมายถึง มีสารเมตาบอไลต์น้อย วิเคราะห์ข้อมูลด้วย HCA โดยใช้หลักในการทำ cluster คือ การจัดกลุ่มข้อมูลที่มีลักษณะเหมือนกันเข้าด้วยกัน และหาความสัมพันธ์ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

แพรร์สัน (Pearson's correlation) จากผลการวิเคราะห์ด้วย HCA พบว่า กลุ่มตัวอย่างสามารถถูกจัดจำแนกเป็นกลุ่มผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ได้อย่างชัดเจน ตามความเหมือนกันของความเข้มข้นสัมพัทธ์ของแต่ละสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่าง โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) มีข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสีฟ้า (■) สีน้ำเงิน (■) สีเขียว (■) และสีม่วง (■) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D, E และ F มีข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่เหมือนกันจัดอยู่ในกลุ่มสีชมพู (■) สีส้ม (■) และสีเหลือง (■) แสดงดังภาพที่ 4.4





ภาพที่ 4.4 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่าง โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีคววน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) (■) ชนิดตีคววนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (■) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B (■) และ C (■) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D (■), E (■) และ F (■)

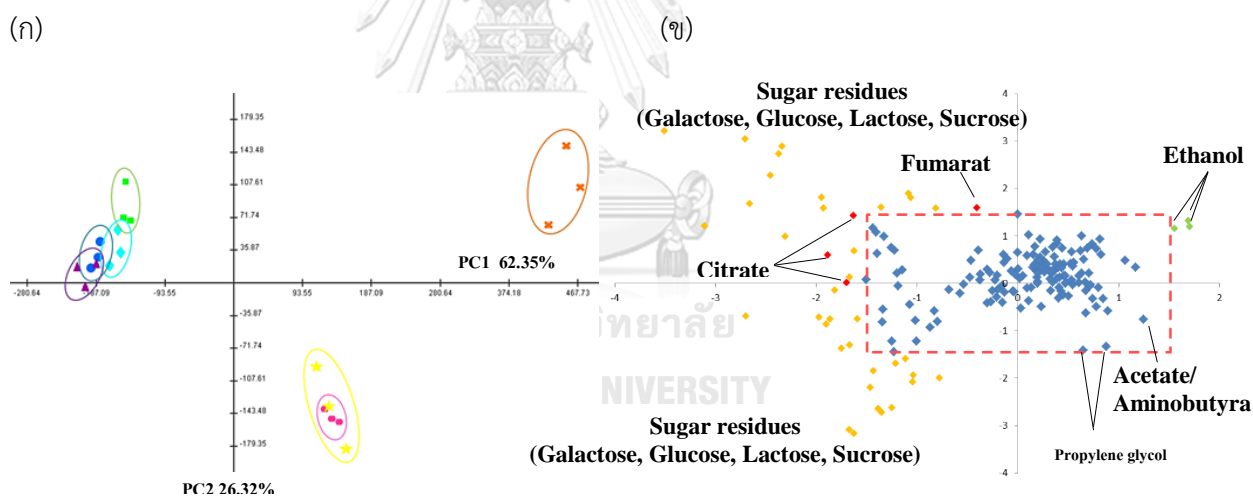
4.1.4.3 การเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและ คีเฟอร์ทาง การค้าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ PCA หรือการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็น เทคนิคที่ใช้ในการลดมิติของตัวแปร และสร้างตัวแปรใหม่ สามารถจำแนกกลุ่มของตัวอย่างได้ เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วย HCA ทำได้โดยพิจารณาจากรูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลบนกราฟ และเมื่อนำองค์ประกอบหลักสร้างเป็นกราฟประกอบด้วยองค์ประกอบหลักที่ 1 (PC1) และ องค์ประกอบหลักที่ 2 (PC2) พบว่า มีค่าความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 88.67 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 62.35 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 26.32 โดยองค์ประกอบหลักจะประกอบไปด้วยข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และคีเฟอร์ทางการค้า ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) (◆) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ต โพรไบโอติกตราสินค้า A) (●) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B (■) และ C (▲)) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D (◆), E (✕) และ F (★)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้ง 7 ผลิตภัณฑ์ สามารถแยกออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ 1) ผลิตภัณฑ์ โยเกิร์ตชนิดตีกวนตราสินค้า A ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็น ส่วนประกอบตราสินค้า A ชนิดคงตัวแบบออร์แกนิกตราสินค้า B และ C 2) ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ตรา สินค้า D และ F และ 3) ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ตราสินค้า E พบว่า ข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลใน ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้ามีความคล้ายคลึงกันและแตกต่างจากผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทางการค้าอย่าง เห็นได้ชัด ในส่วนของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มคีเฟอร์ พบว่าข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์ คีเฟอร์ตราสินค้า E มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ตราสินค้า D และ F อย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.5 ก) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตและปริมาณกรด ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 4.1) และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างตัวแปรด้วย วิธีการ PCA สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 7 กลุ่ม คือ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน (โยเกิร์ต ตราสินค้า A) ชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคี

เฟอร์ ทรานส์ D, E และ F และสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างทั้ง 7 กลุ่ม ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HCA ที่แสดงในภาพ 4.4

ในขั้นตอนการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า ผลจากค่า loading plots พบว่า กลุ่มของน้ำตาลโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลซูโครส (sucrose) และน้ำตาลแลคโตส สาร citrate และ fumarate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เนื่องจากมีปริมาณสัมพันธ์สูงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยผลของน้ำตาลต่อการแยกกลุ่มของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตและปริมาณกรดทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 4.1 นอกจากนี้ยังพบว่าสาร ethanol, acetate/aminobutyrate และ propylene glycol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์คีเฟอร์เนื่องจากมีปริมาณสัมพันธ์สูงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คีเฟอร์



ภาพที่ 4.5 PCA score plot (ก) และ PC loading (ข) ของข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากโยเกิร์ตชนิดตีควน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) (◆) ชนิดตีควนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติก ทรานส์ A) (●) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B (■) และ C (▲)) และคีเฟอร์ ทรานส์ D (◆), E (×) และ F (★)

หมายเหตุ: ภาพ ข ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ไม่ถึง 1.5 และ

● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 1.5 ขึ้นไป

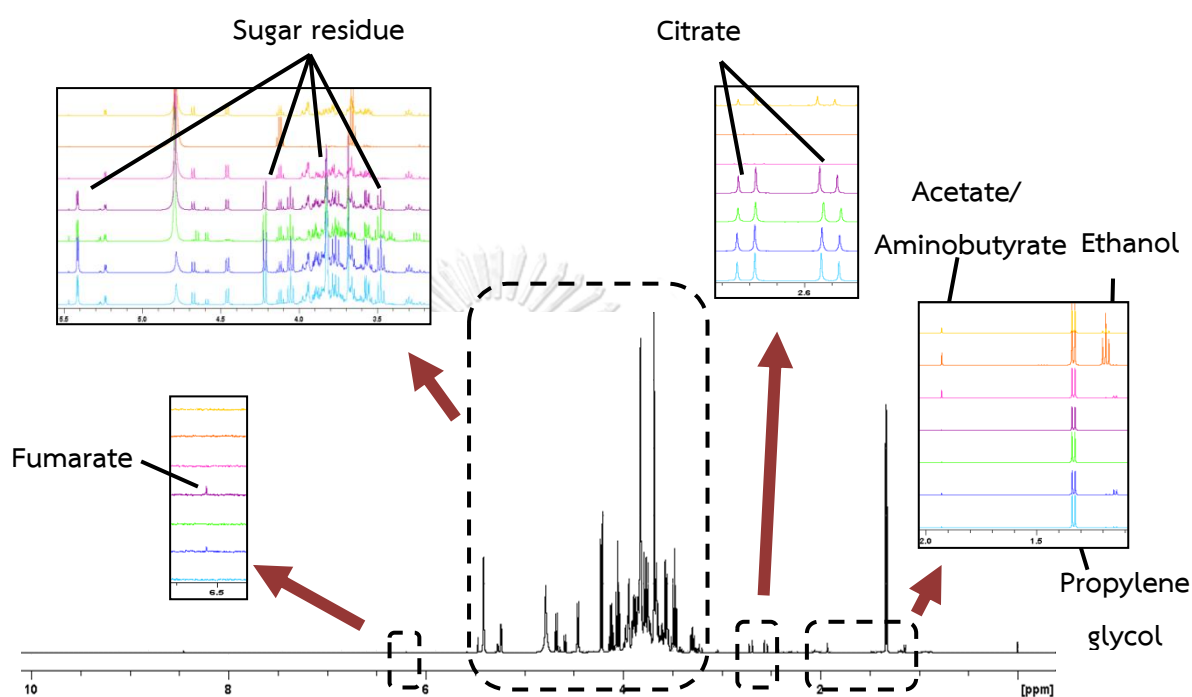
จากผล loading plots ซึ่งพบว่าสาร citrate สามารถให้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและมีปริมาณที่มากกว่าในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (citrate-positive strains) มีความสามารถในการเปลี่ยนสาร citrate ให้กลายเป็นสาร acetoin มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ซึ่งสาร acetoin จัดเป็นสารเมตาบอไลต์สำคัญที่ส่งผลถึงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (buttery flavor note) (Machado de Oliveira Leite et al., 2013, Dertli and Çon, 2017) ในส่วนของสาร ethanol, acetate และ propylene glycol ซึ่งถูกจัดเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า ethanol และ acetate เป็นสารเมตาบอไลต์หลักที่ส่งผลกับคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (Walsh et al., 2016) โดยเป็นผลมาจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของยีสต์ในกระบวนการหมักและสังเคราะห์แอลกอฮอล์ และกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดอะซิติก เช่น *Acetobacter* spp. และแบคทีเรียกรดแลคติกในการสังเคราะห์สาร acetate (Magalhaes et al., 2010, Walsh et al., 2016) และสารกลุ่ม propylene glycol ที่ถูกพบในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ คาดว่าเป็นสารที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร (propylene glycol esters of fatty acids และ propylene glycol alginate) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการแยกชั้น (emulsifier) และทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความหนืดและคงตัว (thickener/stabilizer) ซึ่งตามมาตรฐาน Codex สารดังกล่าวเป็นสารที่ได้รับอนุญาตในการใช้เป็นวัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว (Codex, 243-2003)

4.1.4.4 การเปรียบเทียบ NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดคีเฟอร์ (โยเกิร์ตตราสินค้า

A) ชนิดคีเฟอร์ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (ตราสินค้าเดียวกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดคีเฟอร์) ชนิดคงตัวแบบบอร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B และ C) และคีเฟอร์ (คีเฟอร์ตราสินค้า D, E และ F) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของแต่ละกลุ่มตัวอย่างใน spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าสาร sugar residues, citrate และ fumarate ใน spectra ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดคีเฟอร์ (โยเกิร์ตตราสินค้า A) (■) ชนิดคีเฟอร์ที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (■) และชนิดคงตัวแบบบอร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B (■))

และ C (■)) สูงมากกว่า เมื่อเทียบกับ NMR spectra ของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ ตราสินค้า D (■), E (■) และ F (■) และสาร ethanol, acetate/aminobutyrate และ propylene glycol ใน spectra ของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์สูงมากกว่า เมื่อเทียบกับ NMR spectra ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต



ภาพที่ 4.6 NMR spectra ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีควน (โยเกิร์ตตราสินค้า A) (■) ชนิดตีควนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ (โยเกิร์ตโพรไบโอติกตราสินค้า A) (■) และชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก (โยเกิร์ตตราสินค้า B (■) และ C (■)) และคีเฟอร์ ตราสินค้า D (■), E (■) และ F (■) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

4.2 การคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย

ปัจจุบันข้อมูลสนับสนุนเชิงวิชาการของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในประเทศไทย หรือ บัวมะชิเบต ยังมีอยู่อย่างจำกัด พบเพียงแต่คำกล่าวอ้างถึงคุณประโยชน์ต่าง ๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดหาเม็ตคีเฟอร์ทางการค้าจากร้านค้า 5 แห่ง โดยมีที่มาจากจังหวัดที่แตกต่างกัน ได้แก่ ร้าน Kmt Milk kefir จังหวัดกรุงเทพมหานคร ร้านจิบ บัวมะชิเบต (ชิเบต) จังหวัดกรุงเทพมหานคร ร้าน Earth and Ocean จังหวัดจันทบุรี ร้านคีเฟอร์บ้านเปรม จังหวัดระนอง และร้าน Dolly mine จังหวัดสงขลา ประเทศไทย (ลักษณะปรากฏของเม็ตคีเฟอร์แสดงดังรูปที่ 4.7) เพื่อนำมาหมักคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ โดย

ประสิทธิภาพในกระบวนการหมักของเม็ดคีเฟอร์ สามารถวิเคราะห์ได้จากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมด รวมถึงค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ทั้งคีเฟอร์ยังถูกจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Rosa et al., 2017) ดังนั้นจึงมีการนำเอาเม็ดคีเฟอร์ที่จัดหามาได้ไปทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของประชากรจุลินทรีย์ โดยทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่เติมเกลือ น้ำตาล ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จำเป็นของจุลินทรีย์โพรไบโอติก และเป็นคุณสมบัติที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Xing et al., 2017) หลังจากนั้นนำคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักในห้องปฏิบัติการมาศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล คีเฟอร์ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ระหว่างตัวอย่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) (Skov et al., 2014) ได้แก่ การหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ PCA การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค heat-map visualization และ HCA และหาความสัมพันธ์ของด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation) รวมถึงวิเคราะห์หาวิถีเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG pathway analysis (<https://www.metaboanalyst.ca>) จากนั้นนำผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ที่ได้มาประมวลผลข้อมูล เพื่อคัดเลือกเม็ดคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและมีสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น ตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกไปวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S และ 26S rDNA/RNA และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

ก)



คีเฟอร์ 1

ที่มา ร้าน Earth and Ocean

จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย

ข)



คีเฟอร์ 2

ที่มา ร้าน Dolly mine

จังหวัดสงขลา ประเทศไทย

ค)



คีเฟอร์ 3 มหาวิทยาลัย

ที่มา ร้านคีเฟอร์บ้านเปรม

จังหวัดระนอง ประเทศไทย

ภาพที่ 4.7 ลักษณะและที่มาของเม็ดคีเฟอร์ที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์ในงานวิจัยนี้

ง)



คีเฟอร์ 4

ที่มา ร้าน Kmt Milk kefir

จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

จ)



คีเฟอร์ 5

ที่มา ร้านจิบ บัวหิมะ (อิเบต)

จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

รูปภาพที่ 4.7 (ต่อ) ลักษณะและที่มาของเม็ดคีเฟอร์ที่ใช้ในการหมักคีเฟอร์ในงานวิจัยนี้

4.2.1 ศึกษาารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ ความสามารถในการสร้างกรด และตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์

ขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อจากทั้ง 5 แหล่ง และความสามารถในการสร้างกรด การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดทั้งหมดของคีเฟอร์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งจะส่งผลต่อค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมัก

4.2.1.1 การศึกษาารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กรดแลคติกและยีสต์ในคีเฟอร์

ขั้นตอนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาารูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อจากทั้ง 5 แหล่ง ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยแบ่งเป็นการศึกษาารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และรูปแบบการเจริญของยีสต์และรา ในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ที่ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง มาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่ง ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง (กำหนดให้เป็นระยะสิ้นสุดกระบวนการหมัก) พบว่าในตัวอย่างคีเฟอร์มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 7.6-8.0 \log_{10} CFU/g (ตารางที่ 4.3) โดยแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ซึ่งได้กำหนดให้มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ไม่น้อยกว่า 7.0 \log_{10} CFU/g อีกทั้งผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่ว่า โดยทั่วไปจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มักพบอยู่ในช่วง 4.8-8.9 \log_{10} CFU/g (Anton et al., 2016, Rosa et al., 2017) แม้ว่าในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากร้านคีเฟอร์บ้านเปรม (คีเฟอร์ 3) ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมงจะมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ $8.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/g อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในเม็ดคีเฟอร์จากร้านจ๊อบ บัวหิมะ (จีเบต) (คีเฟอร์ 5) มีความสามารถในการเจริญสูงสุด ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนในระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ได้มาก

ที่สุด ($\Delta T_{24-T_0} = 1.6 \pm 0.2 \log_{10} \text{ CFU/g}$) (ตารางที่ 4.4) โดยรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ แสดงดังภาคผนวก ง1

ผลการตรวจนับจำนวนยีสต์และราของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่ง ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง (กำหนดให้เป็นระยะสิ้นสุดกระบวนการหมัก) พบว่าในตัวอย่างคีเฟอร์มีจำนวนยีสต์ราอยู่ในช่วง $6.4\text{-}7.1 \log_{10} \text{ CFU/g}$ (ตารางที่ 4.4) โดยแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ซึ่งได้กำหนดให้มีจำนวนยีสต์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ไม่น้อยกว่า $4.0 \log_{10} \text{ CFU/g}$ อีกทั้งผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่ว่า โดยทั่วไปจำนวนยีสต์และราในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มักพบอยู่ในช่วง $5.2\text{-}8.6 \log_{10} \text{ CFU/g}$ (ส่วนมากมักพบไม่เกิน $8.0 \log_{10} \text{ CFU/g}$) (Anton et al., 2016, Rosa et al., 2017) พบว่าในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์จากร้านคีเฟอร์บ้านเปรม (คีเฟอร์ 3) และร้านจิบ บัวหิมะ (ธิเบต) (คีเฟอร์ 5) ที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมงมีจำนวนยีสต์และราสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 7.1 ± 0.1 และ $6.9 \pm 0.0 \log_{10} \text{ CFU/g}$ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์และราในทุกตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยรูปแบบการเจริญของ ยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ (ภาคผนวก ง1)

เมื่อนำผลรูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และรา ในคีเฟอร์ 5 มีความสามารถในการเจริญสูงที่สุด ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนในระหว่างชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 ได้มากที่สุด โดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ $1.6 \pm 0.2 \log_{10} \text{ CFU/g}$ และ มีจำนวนยีสต์และรา เพิ่มขึ้น เท่ากับ $1.8 \pm 0.1 \log_{10} \text{ CFU/g}$

ตารางที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (\log_{10} CFU/g) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมเตคิเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา

ตัวอย่างคีเฟอร์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)					จำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (ΔT_{24-T_0})
	0	6	12	18	24	
คีเฟอร์ 1	6.5±0.2 ^a	6.7±0.2 ^a	7.1±0.2 ^{abc}	7.7±0.2 ^a	7.9±0.2 ^{ab}	1.4±0.0 ^{ab}
คีเฟอร์ 2	6.5±0.1 ^a	7.0±0.1 ^a	7.3±0.2 ^{bc}	7.5±0.1 ^a	7.6±0.1 ^a	1.1±0.2 ^a
คีเฟอร์ 3	6.6±0.0 ^a	7.1±0.3 ^a	7.4±0.1 ^c	7.6±0.3 ^a	8.0±0.0 ^b	1.4±0.1 ^{ab}
คีเฟอร์ 4	6.4±0.1 ^a	6.7±0.1 ^a	6.9±0.2 ^{ab}	7.4±0.1 ^a	7.8±0.1 ^{ab}	1.4±0.2 ^{ab}
คีเฟอร์ 5	6.2±0.1 ^a	6.7±0.2 ^a	6.8±0.0 ^a	7.4±0.1 ^a	7.9±0.1 ^{ab}	1.6±0.0 ^b

หมายเหตุ : a, b และ c ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (\log_{10} CFU/g) ที่มีความแตกต่างกัน

อย่างสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.4 จำนวนยีสต์และรา (\log_{10} CFU/g) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดคีเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา

ตัวอย่างคีเฟอร์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)					จำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (ΔT_{24-T_0})
	0	6	12	18	24	
คีเฟอร์ 1	4.8±0.1 ^{ab}	5.4±0.1 ^a	6.1±0.2 ^{ab}	6.5±0.1 ^a	6.4±0.1 ^a	1.6±0.2 ^a
คีเฟอร์ 2	4.7±0.1 ^a	5.4±0.1 ^a	6.0±0.2 ^a	6.5±0.1 ^a	6.6±0.1 ^{ab}	1.9±0.2 ^a
คีเฟอร์ 3	5.1±0.1 ^{bc}	6.0±0.1 ^b	6.4±0.1 ^{bc}	6.8±0.2 ^a	7.1±0.1 ^c	2.0±0.2 ^a
คีเฟอร์ 4	5.1±0.1 ^c	5.9±0.2 ^b	6.4±0.0 ^c	6.7±0.1 ^a	6.8±0.1 ^{bc}	1.7±0.2 ^a
คีเฟอร์ 5	5.2±0.1 ^c	6.2±0.1 ^b	6.6±0.1 ^c	6.8±0.1 ^a	6.9±0.0 ^c	1.8±0.1 ^a

หมายเหตุ : a, b และ c ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนยีสต์และรา (\log_{10} CFU/g) ที่มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.2.1.2 การตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมัก

ตามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ได้มีการกำหนดค่าปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวประเภทต่าง ๆ ไว้เป็นค่ามาตรฐาน ดังนั้นการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวจึงสามารถอ้างอิงถึงคุณภาพมาตรฐานในขั้นพื้นฐานของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวได้ โดยจากคำนิยามของนมเปรี้ยว ตามมาตรฐาน Codex กิจกรรมทางเมตาบอลิซึมที่เหมาะสมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนมมีค่าลดลง โดยอาจเกิดหรือไม่เกิดการตกตะกอนของโปรตีนนม (coagulation) ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง และปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการมีกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในจุลินทรีย์กล้าเชื้อ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะอาศัยวิถีไกลโคไลซิสในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลในน้ำนม โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก และเอทานอล (Kowalczyk et al., 2015)

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.5) พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.43 ± 0.11 โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 4.20-4.60 ซึ่งเป็นช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่มักพบในคีเฟอร์ทั่วไป (Baschali et al., 2017) แม้ว่าคีเฟอร์ 1 และ คีเฟอร์ 3 ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 24 ชั่วโมง จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าที่ 4.36 ± 0.10 และ 4.36 ± 0.03 แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างกระบวนการหมักในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 ของทุกตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รูปแบบการการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ แสดงดังภาพที่ ๑1) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงเป็นผลมาจากปริมาณกรดที่จุลินทรีย์สังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น (Noh et al., 2013) Goršek และ Zajsek (2010) พบว่าที่ระยะเวลาในกระบวนการหมักที่เท่ากัน (24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว (จาก pH 6.65 ไปเป็น pH 3.82) เมื่อเทียบกับคีเฟอร์ที่หมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (จาก pH 6.69 ไปเป็น pH 5.24)

ในส่วนของผลการตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมด (titratable acidity) ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.7) พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดทั้งหมดในทุกตัวอย่างคีเฟอร์มีค่า ร้อยละ 0.85 ± 0.08 เป็นไปตามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) ซึ่งกำหนดให้มีปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์มากกว่า ร้อยละ 0.60 พบว่าคีเฟอร์ 5 ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 24 ชั่วโมง มีปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น (ร้อยละโดยมวลของกรดแลคติก) ในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยเม็ดคีเฟอร์ แสดงถึงภาคผนวก จ1) และจากการวิเคราะห์ผลการตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์ร่วมกับค่าความเป็นกรด-ด่าง (ตารางที่ 4.6) พบว่าคีเฟอร์ 5 ซึ่งเป็นตัวอย่างคีเฟอร์ที่มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุดไม่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด ดังนั้นในการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์นมรวมถึงนมเปรี้ยว ควรวิเคราะห์ควบคู่กับการตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดโดยการไทเทรตตามวิธีมาตรฐาน ISO/IDF (2012) สำหรับผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้จะเกิดความคลาดเคลื่อนจากผลของปริมาณกรดที่แท้จริง แต่เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงค่าประจุของโปรตีนในนมที่เกิดการเสียสภาพ (protein denaturation) (Lošdorfer Božič and Podgornik, 2017) โดยกรดในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งจะอธิบายต่อในหัวข้อถัดไป (ข้อ 4.2.1.3)

และจากผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดทั้งหมดที่ตรวจวัดได้ ร่วมกับผลการศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในตัวอย่างคีเฟอร์ พบว่าผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกัน โดยเมื่อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณกรดทั้งหมดที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้จะเพิ่มขึ้น และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ตรวจวัดได้จะมีค่าลดลง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ยังสามารถส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่อาจทำให้เกิดการเสื่อมเสีย จึงทำให้คีเฟอร์ที่ได้มีความปลอดภัยและช่วยยืดอายุการในเก็บรักษาได้ โดยกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญในคีเฟอร์ ทั้งในกลุ่มของ homofermentative และ heterofermentation (Gao and Zhang, 2019) จะเกิดกระบวนการในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลแลคโตส แบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative จะใช้วิถีไกลโคไลซิสที่เรียกว่า Embden-Mayerhof pathway (EMP) และแบคทีเรียในกลุ่ม

heterofermentation จะใช้วิถีไกลโคไลซิสที่เรียกว่า phosphoketolase pathway (PKP) ในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน ATP เพื่อใช้ในการเจริญ เมื่อจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลในน้ำนมได้มาก จะสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากวิถีทั้ง 2 ประเภท คือกรดแลคติก อย่างไรก็ตามจากความหลากหลายของจุลินทรีย์กล้าเชื้อคีเฟอร์ ทำให้ในคีเฟอร์ยังประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ประเภทอื่น ๆ เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียกรดอะซิติกที่สังเคราะห์ขึ้น (Noh et al., 2013, Kowalczyk et al., 2015, Kesenkaş et al., 2017)



ตารางที่ 4.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในคิเพอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดคิเพอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มา

ตัวอย่างคิเพอร์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				ค่า pH ที่ ลดลง (ΔT_{24-T_0})	
	0	6	12	18		24
คิเพอร์ 1	6.21±0.02 ^{ab}	5.46±0.04 ^a	5.11±0.11 ^a	4.40±0.14 ^a	4.36±0.10 ^a	1.96 ± 0.17 ^a
คิเพอร์ 2	6.42±0.01 ^c	5.59±0.14 ^a	5.30±0.05 ^{ab}	4.85±0.09 ^a	4.62±0.12 ^b	1.81 ± 0.11 ^a
คิเพอร์ 3	6.14±0.13 ^a	5.44±0.16 ^a	5.14±0.05 ^{ab}	4.82±0.13 ^a	4.36±0.03 ^a	1.77 ± 0.10 ^a
คิเพอร์ 4	5.38±0.07 ^{bc}	5.49±0.11 ^a	5.22±0.12 ^{ab}	4.61±0.09 ^a	4.41±0.10 ^{ab}	1.96 ± 0.17 ^a
คิเพอร์ 5	6.4±0.05 ^c	6.52±0.06 ^a	5.37±0.08 ^b	4.72±0.13 ^a	4.41±0.03 ^{ab}	1.99 ± 0.07 ^a

หมายเหตุ : a, b และ c ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.6 ผลต่างปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น (ร้อยละโดยมวล) เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0 ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดิเคเฟอร์ จากทั้ง 5 แหล่งที่มา

ตัวอย่างคีเฟอร์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
	0	6	12	18	24
คีเฟอร์ 1	0.21±0.01*	0.16±0.01	0.26±0.06	0.57±0.07	0.65±0.05 ^{ab}
คีเฟอร์ 2	0.19±0.03*	0.15±0.07	0.25±0.05	0.27±0.08	0.56±0.10 ^a
คีเฟอร์ 3	0.20±0.02*	0.16±0.05	0.27±0.01	0.38±0.06	0.67±0.02 ^{ab}
คีเฟอร์ 4	0.18±0.01*	0.20±0.02	0.31±0.05	0.52±0.03	0.63±0.11 ^{ab}
คีเฟอร์ 5	0.17±0.01*	0.23±0.04	0.28±0.03	0.59±0.04	0.77±0.05 ^b

หมายเหตุ : a, b และ c ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด ที่มีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

* แสดงปริมาณกรดทั้งหมดที่วัดได้จริงในชั่วโมงที่ 0

4.2.1.3 การตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการด้วยเครื่องวัดความหนืดชนิดหมุน (rotational viscometer) โดยค่าความหนืดซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์ อันเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างโปรตีนในน้ำนมสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ เกิดจากโครงสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่จุลินทรีย์กล้าเชื้อสังเคราะห์ขึ้น การเสถียรภาพของโปรตีนในนมเป็นผลมาจากกระบวนการในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของจุลินทรีย์ โดยกรดที่จุลินทรีย์สังเคราะห์เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ค่าความเป็น-ต่างของน้ำนมลดลงจนมีค่าเข้าใกล้ค่าไอโซอิเล็กทริก (pH เท่ากับ 4.6) อนุภาคเคซีนในน้ำนมจะสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) เคลื่อนที่มารวมตัวกันและเกิดการตกตะกอน (coagulation)

ผลการศึกษาพบว่าค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการมีค่าอยู่ในช่วง 247 ± 5.62 และ 182.77 ± 6.30 cP (ภาคผนวก ฉ) โดยเมื่อเปรียบเทียบในทุกตัวอย่างแล้ว พบว่า คีเฟอร์ 1 และ คีเฟอร์ 3 มีค่าความหนืดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า 230 ± 2.60 และ 247 ± 5.62 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่พบว่าคีเฟอร์ 1 และคีเฟอร์ 3 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด และสอดคล้องกับรายงานการศึกษา ก่อนหน้าที่พบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าต่ำลง ค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์นมจะเพิ่มมากขึ้น (McCarthy, 2011) อย่างไรก็ตามค่าความหนืดที่แตกต่างกันของผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นผลได้จากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของน้ำนมที่นำมาใช้ องค์ประกอบหลักในน้ำนม (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) อุณหภูมิในระหว่างการวัดค่าความหนืด อุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมักและการเก็บรักษา (Makwana and Hati, 2019) โดยในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการเปรียบเทียบตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยเลือกใช้นมยูเอชทีในทางการค้าเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมัก ควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการวัดค่าความหนืดที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส หมักคีเฟอร์จากเม็ดคีเฟอร์ที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส และตรวจวัดค่าความหนืดของตัวอย่างทันทีเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 24 ชั่วโมง ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างของค่าความหนืดของคีเฟอร์ในงานวิจัยนี้คือ ความแตกต่างของกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Makwana and Hati, 2019) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ ในกล้าเชื้อคือ

เฟอร์มีความสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในน้ำนมและได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นจะส่งผลให้เกิดการเสียสภาพและจับตัวกันตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนม และทำให้เกิดเจล (gel formation) นอกจากกรดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้ว จุลินทรีย์บางชนิดยังมีความสามารถในการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) ซึ่งส่งผลให้ค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้น (McCarthy, 2011) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Marshall และคณะ (1999) พบว่าโยเกิร์ตที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ EPS จะมีความหนืดมากกว่าโยเกิร์ตที่ได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างแคปซูล และจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่ไม่มีความสามารถในการสร้าง EPS ตามลำดับ (Marshall and Rawson, 1999, Amatayakul et al., 2006) จากการศึกษาความสามารถในการสร้าง EPS ของจุลินทรีย์ที่อยู่ในกล้าเชื้อคือเฟอร์พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการสร้าง EPS เช่น *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Kazachstania unispora* (Wang et al., 2015, Chen et al., 2016, Kotova et al., 2016, Jeong et al., 2017) โดยในปัจจุบันมีรายงานการคัดแยกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ EPS จากคีเฟอร์ที่พบได้ในจังหวัดนครราชสีมา (Luang-In and Deeseenthum, 2016) และในปัจจุบันมีความนิยมใช้ EPS ที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมในระดับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้นเช่น ใช้เป็นสารเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวและความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมเปรี้ยว (da Silva and da Costa, 2019)

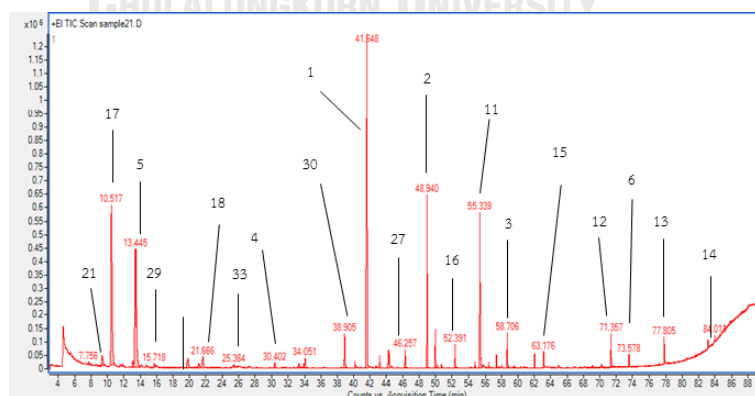
จากผลการเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกระบวนการหมักของเม็คคีเฟอร์ โดยศึกษาจากรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ ความสามารถในการสร้างกรด และตรวจวัดค่าความหนืดของคีเฟอร์ พบว่าเม็คคีเฟอร์ 3 และเม็คคีเฟอร์ 5 มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักคีเฟอร์มากที่สุด โดยมีรูปการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และคีเฟอร์ที่ได้มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วงตามมาตรฐานของ Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) มีความสามารถในการสร้างกรดที่ดี โดยให้ค่าความเป็นกรด-ต่างของ อยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ต่างตามรายงานการศึกษา (4.20-4.60) และมีปริมาณกรดที่ตรวจวัดได้ไม่น้อยกว่า ร้อยละ 0.60 ตามมาตรฐาน Codex และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353), (2556) และให้ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่มีค่าความหนืดต่ำที่สุด คีเฟอร์จัดอยู่ในกลุ่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม

(Altay et al., 2013) ดังนั้นลักษณะของความหนืดคือเฟออร์ที่ต้องการคือเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมีความหนืดต่ำ และมีเนื้อสัมผัสลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว

4.2.2 การประมวลผลข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของตัวอย่างคิเฟออร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ด คิเฟออร์ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์

4.2.2.1 การระบุชนิดของเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างคิเฟออร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS

การวิจัยขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ระบุชนิดและเปรียบเทียบสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างคิเฟออร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคิเฟออร์ในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างคิเฟออร์จำนวน 3 ตราสินค้า (คิเฟออร์ตราสินค้า D, E และ F) โดยเป็นตราสินค้าเดียวกันกับตัวอย่างคิเฟออร์ทางการค้าในข้อ 4.1.1 ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS จากนั้นแปลผล mass spectrum ที่ได้ด้วย Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00 software โดยระบุชนิด (identification) สารเมตาบอไลต์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST mass spectral libraries (National Institute of Standards, 2011 version) เมื่อนำสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้มาจัดกลุ่ม จะได้สารทั้งหมด 39 เมตาบอไลต์ โดยเป็นสารในกลุ่มของ แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ กรดคาร์บอกซิลิก เอสเตอร์ คีโตน สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวนเบนซีน เป็นองค์ประกอบ และอื่นๆ โดยสามารถระบุตำแหน่งของสารต่าง ๆ บนโครมาโทแกรมของตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคิเฟออร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคิเฟออร์ในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS ลำดับสารที่ 1-39 แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่า retention time (RT) ใช้ระบุตำแหน่งสารเมตาบอไลต์ที่พบในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ นี้ทั้งหมด 39 สารเมตาบอไลต์

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	RT time, min ^a	ลักษณะกลิ่นรสเฉพาะ
แอลกอฮอล์	1	Isoamyl alcohol*	41.64	fresh cheese, alcoholic
	2	2-Heptanol*	48.93	green, Floral, Fruity
	3	2-Nonanol	58.71	waxy
	4	Isobutanol	30.47	malty
	5	Ethanol*	13.44	dry
	6	2-Phenylethanol	73.59	unclean, rose, violet-like
	7	2-Ethylhexyl alcohol	57.37	-
	8	trans-2-Methylcyclopentanol	27.27	-
แอลดีไฮด์	9	Isovalerylaldehyde	11.91	cheesy, dark chocolate
	10	Benzaldehyde	58.6	almonds, sugar, burnt
กรดคาร์บอกซิลิก	11	Acetic acid	55.41	vinegar, peppers, green
	12	Hexanoic acid*	71.36	sweaty, cheesy, sharp
	13	Octanoic acid	77.81	cheesy, rancid, pungent
	14	Decanoic acid	83.18	soapy, waxy, fatty
	15	Butanoic acid	63.19	acidic, cheesy, bad
	เอสเทอร์	16	2-Nonanone	52.39
17		Ethyl acetate*	10.53	solvent, pineapple, fruity
18		Ethyl butanoate	21.66	ripe fruit, buttery, green
19		Isoamyl acetate	33.37	fresh cheese, alcoholic
20		Ethyl hexanoate*	43.22	fruity, malty, young
21		Isopropenyl acetate*	7.74	acetic, fruity

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	RT ^a time, min	ลักษณะกลิ่นรสเฉพาะ
เอสเทอร์ (ต่อ)	22	Ethyl decanoate*	63.19	fruity, grape, cognac
	23	Ethyl (S)-2-hydroxypropionate	49.97	-
	24	Methyl salicylate	69.05	wintergreen
	25	Ethyl octanoate	52.3	fruity, apple, green
คีโตน	26	Acetone	7.76	earthy, fruity, wood
	27	Acetoin	46.27	sour milk
	28	Butanone	11.03	buttery, sour
	29	Ethyl acetone	15.70	orange peel, sweet,
	30	Butylacetone	38.91	blue cheese, spicy
	31	2-Octanone	46.45	-
	32	Methyl nonyl ketone	62.06	floral, fruity, green,
	33	Dimethyl disulfide	25.37	sulfurous, hot milk, burned
สารประกอบซัลเฟอร์	34	Toluene	21.17	paint
ไฮโดรคาร์บอนที่มีวงแหวน	35	Hexane	5.07	petroleum-liked
	36	2,2-Dimethylhexane	5.53	-
เบนซินเป็นองค์ประกอบ	37	4-Methylheptane	6.65	-
	38	1-Heptene, 2,4-dimethyl	10.27	-
	39	2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	14.78	-

หมายเหตุ: ^a The retention time (ระยะเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ นับจากเวลาเริ่มต้นในการวิเคราะห์ถึงเวลาที่สามารถตรวจพบสัญญาณได้สูงสุด)

*เมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย 10 อันดับแรกมักพบได้ในคีเฟอร์

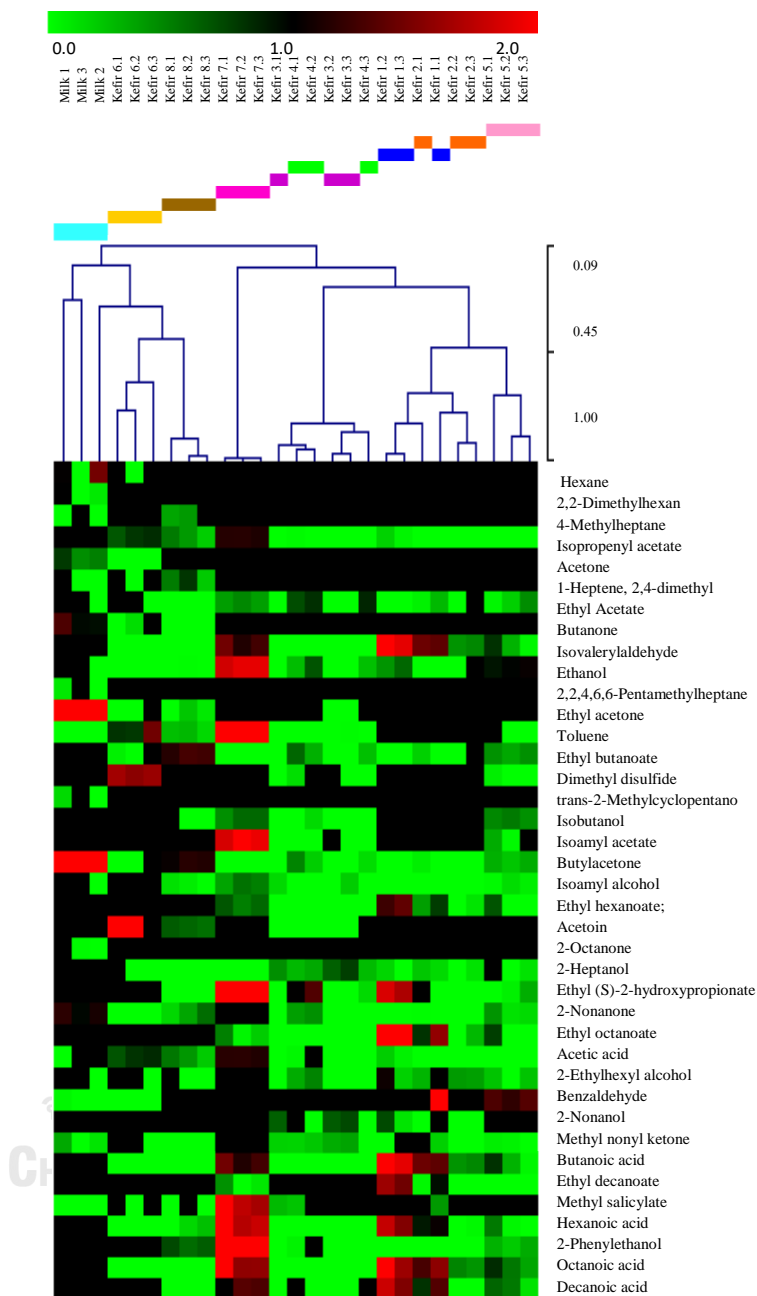
โดยสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบในงานวิจัยนี้ บางชนิดจัดอยู่ในกลุ่มสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย 10 อันดับแรกที่มักพบได้ในคีเฟอร์ โดยมีรายละเอียดการให้ลักษณะกลิ่นรสเฉพาะ (Aghlara et al., 2009, Hu et al., 2014, Dertli and Çon, 2017) แสดงดังตารางที่ 4.7

4.2.2.2 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย *headspace SPME-GC/MS* โดยเทคนิค *heat-map visualization* และ *hierarchical cluster analysis (HCA)*

จากข้อมูลที่ได้จากการประมวลผล ผล mass spectrum ด้วย *headspace SPME-GC/MS* และการระบุสารเมตาบอไลต์ สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ได้ทั้งหมด 39 เมตาบอไลต์ เมื่อนำเอาพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของพีกสารแต่ละพีกมาแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปประมวลผล (normalize) (ภาคผนวก ข1) เพื่อนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค *heat-map visualization* และ HCA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.8.1 จากผลการวิเคราะห์ด้วย *heat-map visualization* แสดงให้เห็นว่าสารเมตาบอไลต์ในคีเฟอร์ทางการค้าและคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการมีปริมาณสารและความหลากหลายมากกว่าในนมยูเอชที และผลการวิเคราะห์กลุ่มด้วย HCA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยออกเป็น 3 กลุ่ม โดยข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ (■) ที่ได้แตกต่างกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์อย่างชัดเจน และจากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ พบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการที่ได้แตกต่างกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้าอย่างชัดเจน โดยตัวอย่าง

คิเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคิเฟอร์ในห้องปฏิบัติการมีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ใกล้กัน สังกะตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีม่วง (■) สีเขียว (■) สีน้ำเงิน (■) สีส้ม (■) และสีชมพู (■) และตัวอย่างคิเฟอร์ทางการค้ามีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายใกล้เคียงกัน จึงจัดอยู่ใกล้กัน สังกะตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีเหลือง (■) สีน้ำตาล(■) และสีชมพูเข้ม (■) แสดงดังภาพ 4.9 ซึ่งจากการวิเคราะห์ HCA ในขั้นตอนนี้ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างคิเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคิเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคิเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคิเฟอร์ได้อย่างชัดเจน





ภาพที่ 4.9 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS จากตัวอย่างและคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 (■) คีเฟอร์ 2 (■) คีเฟอร์ 3 (■) คีเฟอร์ 4 (■) และคีเฟอร์ 5 (■) ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D (■) E (■) และ F (■)) และ นมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ (■)

4.2.2.3 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักซีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย *headspace SPME-GC/MS* โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (*principal component analysis: PCA*)

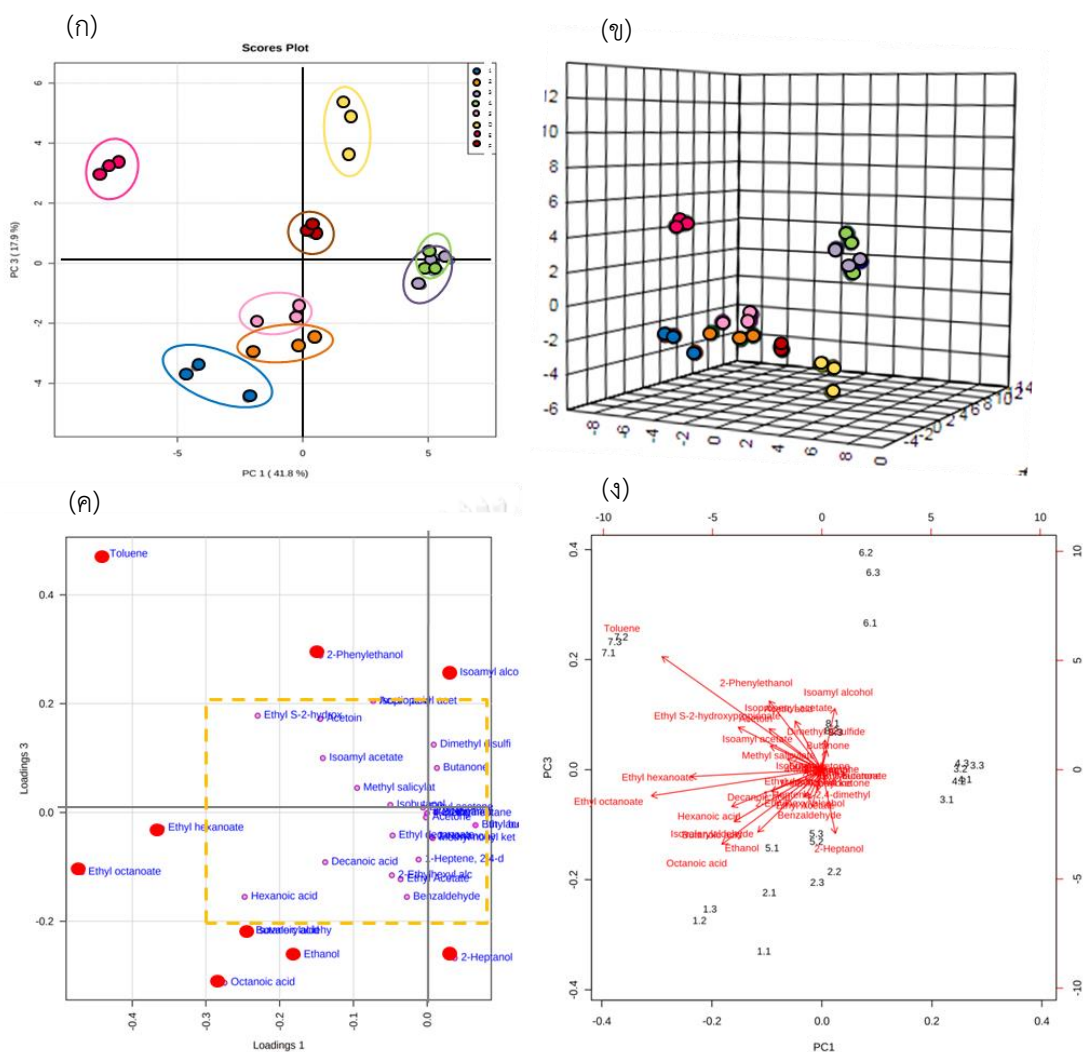
ในขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ซึ่งพบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 59.7 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 41.8 และ PC3 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 17.9 โดยองค์ประกอบหลักนี้ จะประกอบด้วยข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบภายในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้าและซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ออกจากกันได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลจาก HCA ที่แสดงดังภาพที่ 4.9 และพบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการแยกออกจาก ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า (ภาพที่ 4.10ก) โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย อาทิ ความแตกต่างของชนิดน้ำนมที่ใช้ในกระบวนการหมัก สภาวะในกระบวนการหมัก รวมถึงสภาวะในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Gul et al., 2015)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบของซีเฟอร์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots เป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้จากภาพที่ 4.10ก เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าสารเมตาบอไลต์ดังภาพที่ 4.10ค ได้แก่ 2-heptanol, ethyl octanoate, isovalerylaldehyde, ethanol, ethyl hexanoate และ octanoic acid มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และ toluene, 2-Phenylethanol และ isoamyl alcohol มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างซีเฟอร์ที่ทางการค้า และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score (ภาพที่ 4.11) พบว่า สามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ 2-heptanol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมล็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการและใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ toluene, 2-Phenylethanol และ isoamyl alcohol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ซีเฟอร์ทางการค้า โดย 2-heptanol และ ethanol เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มของแอลกอฮอล์ที่มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมหมัก (Dan et al., 2017) 2-heptanol

ให้กลิ่นรส green, floral และ fruity และ ethanol ที่ให้กลิ่นรส dry มีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า โดยสามารถตรวจพบสารข้างต้นได้ในผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทคีเฟอร์และโยเกิร์ต (Chen et al., 2017, Dertli and Çon, 2017) โดยสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในการย่อยสลายสารในกลุ่มแอลดีไฮด์ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล (Kowalczyk et al., 2015) สำหรับ ethyl octanoate เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ให้กลิ่นรส fruity, apple และ green และ ethyl hexanoate เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ให้กลิ่นรส fruity, malty Laureys และ De Vuyst (2014) รายงานว่า ethyl octanoate และ ethyl hexanoate เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายหลักที่พบในคีเฟอร์ (Laureys and De Vuyst, 2014) Hu และคณะ (2014) พบว่าข้อมูลสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มเอสเทอร์ (esters) ได้แก่ ethyl octanoate และ ethyl hexanoate ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทางการค้าและในอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* มีความคล้ายคลึงกัน โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่นที่ไม่มียีสต์เป็นองค์ประกอบในประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อ (Hu et al., 2014) สำหรับ isovalerylaldehyde (3-methylbutanal) เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มแอลดีไฮด์ที่ให้กลิ่นรส cheesy และ dark chocolate (Dertli and Çon, 2017) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย้ายหมู่ของกรดอะมิโน (transaminase-pathway) ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายกรดอะมิโนของจุลินทรีย์โดยอาศัยเอนไซม์ทรานสมีเนส (transaminase) หรืออะมิโนทรานสเฟอเรส (aminotransferase) เป็นสารให้กลิ่นรสสำคัญในผลิตภัณฑ์กลุ่มเนยแข็ง (Gouda, Cheddar, Camembert และ Swiss-type cheese) (Smit et al., 2005) อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ และในคีเฟอร์ (Grønnevik et al., 2011, Pogacic et al., 2016) สำหรับ octanoic acid เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายให้กลิ่นรส cheesy, rancid และ pungent ที่สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมหมัก การตรวจพบสารดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Dan และคณะ (2017) ที่ตรวจพบ octanoic acid ในนมหมักในห้องปฏิบัติการ (Dan et al., 2017) และรายงานการศึกษาของ Dertli และ Con (2017) ที่ตรวจพบ octanoic acid ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (Dertli and Çon, 2017)

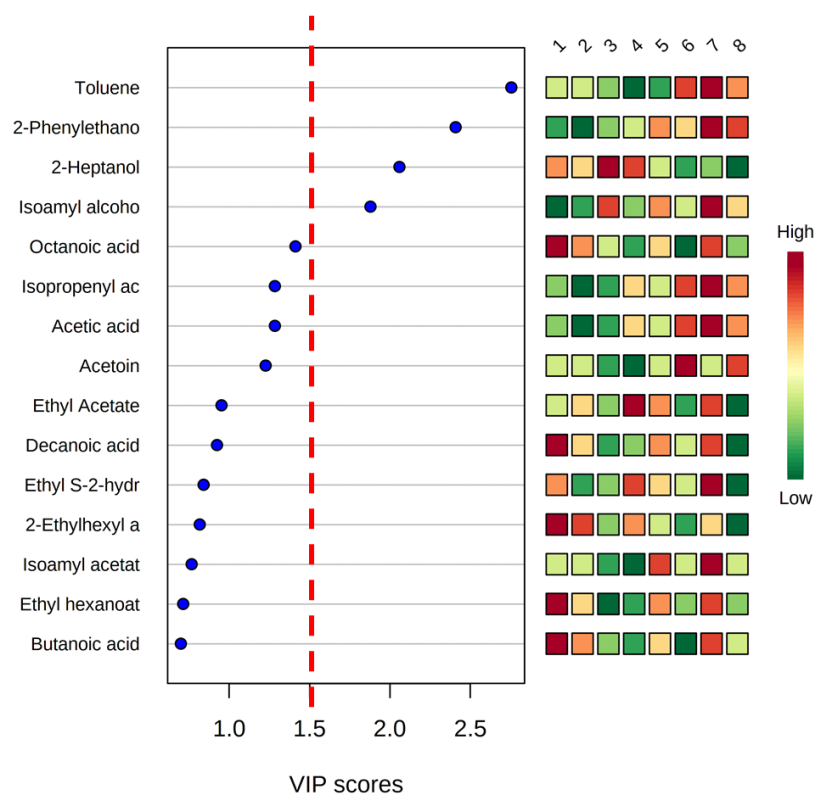
ในส่วนของ toluene เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ให้กลิ่นรส paint การตรวจพบสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการตรวจพบในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ (Chen et al., 2017, Terpou et al., 2017) ในส่วนของ 2-Phenylethanol เป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ให้กลิ่นรส unclean, rose และ violet-like มีรายงานการตรวจพบสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวในไวน์ ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง และคีเฟอร์ โดยเป็นสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในการย่อยสลายน้ำตาล และกรดอะมิโน (phenylalanine) (Smit et al., 2005, Aru et al., 2018) และในส่วนของ isoamyl alcohol เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มแอลกอฮอล์ให้กลิ่นรส fresh cheese และ alcoholic เป็นสารเมตาบอไลต์ที่มักพบในไวน์ ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเนยแข็งและคีเฟอร์ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Irigoyen และคณะ (2012) พบปริมาณ ethanol และ isoamyl alcohol สูงที่สุด เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทอื่น ๆ ในการทดลอง (Irigoyen et al., 2012) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการในการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ โดยอาศัย leucine และ valine เป็นสารตั้งต้น (Furdíková et al., 2017) และเป็นสารให้กลิ่นรสสำคัญที่ได้จากกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของกรดไพรูวิกในแบคทีเรียกรดแลคติก (Kowalczyk et al., 2015)

จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า พบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการมีความใกล้เคียงกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้ามากที่สุด



ภาพที่ 4.10 (ก) PCA 2D score plot (ข) PCA 3D score plot (ค) PC loading และ (ง) PCA Biplot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการ วิเคราะห์ ด้วย headspace SPME-GC/MS จากตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ด คีเฟอร์ใน ห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 (■) คีเฟอร์ 2 (■) คีเฟอร์ 3 (■) คีเฟอร์ 4 (■) และคีเฟอร์ 5 (■) จากตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D (■) E (■) และ F (■))

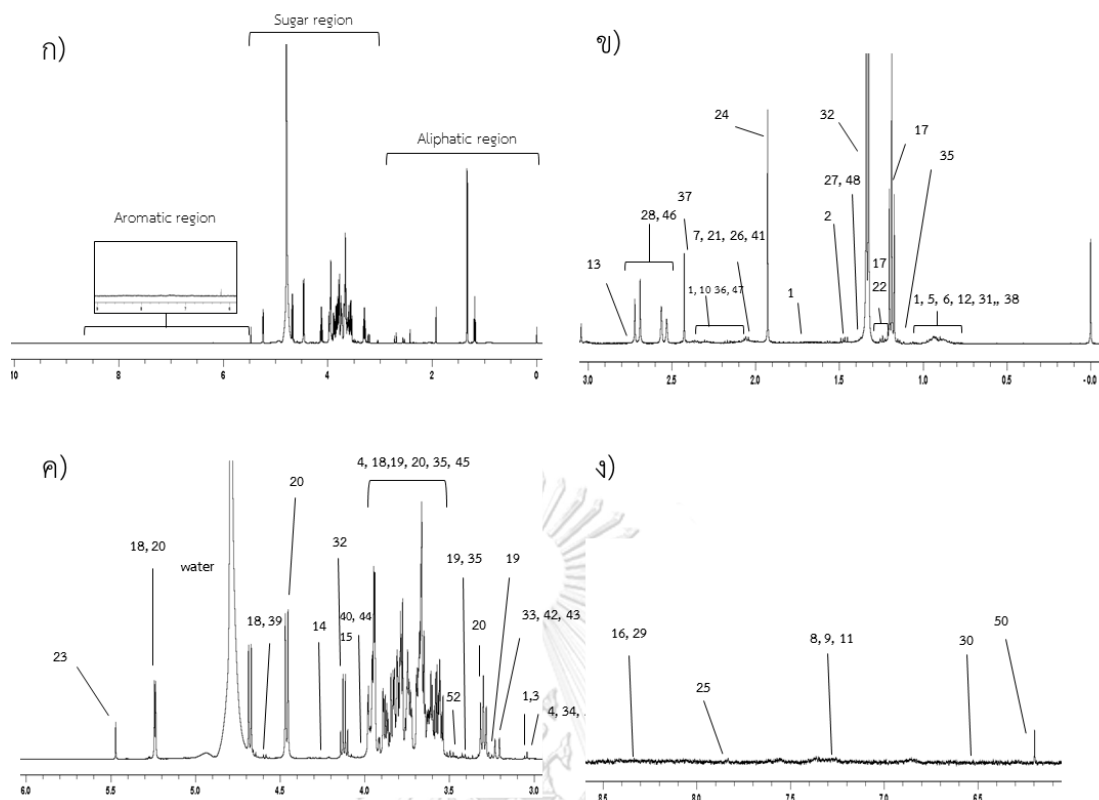
หมายเหตุ: ภาพ ค ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า ตั้งแต่ 0.2 ขึ้นไป



ภาพที่ 4.11 VIP score ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS จากตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ คีเฟอร์ 1 (1) คีเฟอร์ 2 (2) คีเฟอร์ 3 (3) คีเฟอร์ 4 (4) และคีเฟอร์ 5 (5) จากตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D (6) E (7) และ F (8))

4.2.2.4 การระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

หลังจากการประมวลผล spectra ของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ผลิตภัณฑ์ซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ในช่วง chemical shifts (δ) ระหว่าง 0.00–10.00 ppm (แสดงดังขั้นตอนที่ 3.2.7) ได้ทั้งหมด 500 bin และจะนำมาระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Chenomx NMR suite 7.5 library (Chenomx Inc., Alberta, Canada), Human Metabolome Database version 3.0 (Wishart et al., 2013), Livestock Metabolome Database version 1.0 (Goldansaz et al., 2017), Food Metabolome Database (Scalbert et al., 2014), Milk Composition Database (Foroutan et al., 2019) และจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Boudonck et al., 2009, Klein et al., 2010, Settachaimongkon et al., 2014, Lu et al., 2018) สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักซีเฟอร์ ได้ทั้งหมด 201 bin และเมื่อนำสารเมตาบอไลต์ที่ได้มาจัดกลุ่ม จะได้สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากทั้งหมด 52 สาร โดยเป็นสารประกอบในกลุ่มของ กรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ ไขมันและอนุพันธ์ สารประกอบคาร์บอนิล และอื่นๆ โดยสามารถระบุตำแหน่งบนสเปกตรัมดังแสดงในภาพที่ 4.12 และพบว่าสามารถพบ threonine, uridine, fucose, ascobate, isobutyrate, hydroxyisovalerate, และ acetylcholine เพิ่มเติมในซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.8)



ภาพที่ 4.12 (ก) การระบุตำแหน่งข้อมูลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของตัวอย่างเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ คีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมัก (ข) ภาพขยายในช่วง Aliphatic region (0.01-3.00 ppm) (ค) ภาพขยายในช่วง Sugar region (3.00-6.00 ppm) และ (ง) ภาพขยายในช่วง Aromatic region (6.00-10.00 ppm)

ลำดับสารที่ 1-52 ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่พบในตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์
ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้ในกระบวนการหมัก
ทั้งหมด 52 สารเมตาบอไลต์

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	^1H chemical shift, ppm ^a
กรดอะมิโนและอนุพันธ์	1	Aminobutyrate	3.03 (t)- 3.01 (t), 2.31(t)- 2.29(t), 1.93(m)- 1.87(m), 1.03(t)- 1.01 (t)
	2	Alanine	3.83 (m)- 3.79(m), 1.49 (d)- 1.47 (d)
	3	Creatine	3.97 (s)- 3.93(s), 3.05 (s)-3.03(s)
	4	Creatinine	4.07 (s), 3.05 (s)- 3.03 (s)
	5	Isoleucine	0.99 (d), 0.93 (t)
	6	Leucine	3.77 (d)- 3.73 (d), 1.75 (m)- 1.65 (m), 0.99 (t)- 0.95 (t)
	7	Methionine	2.15 (m)
	8	N-Acetylserotonin	7.39 (d), 7.21 (s)
	9	Phenylalanine	7.43 (m)- 7.35 (m)
	10	Proline	3.45 (m)- 3.41 (m), 3.37 (m)- 3.31 (m), 2.37(m)- 2.33(m), 2.07(m)- 1.99(m)
	11	Tyrosine	7.19 (d)- 7.15(d), 6.91 (m)- 6.89(d)
	12	Valine	2.27(m)- 2.25 (m), 1.05 (d)- 0.99(d)
	13	Sarcosine	2.73 (s)
	14	Threonine	4.27(m)- 4.29 (m)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
กรดอะมิโนและอนุพันธ์ (ต่อ)	15	Uridine	4.25 (m)- 4.27 (m)
	16	Amino acid residues	8.37 (m) – 8.09 (m), 7.27 (m) – 7.31 (m), 6.85 (d) – 6.87 (s)
แอลกอฮอล์	17	Ethanol	1.21 (t)- 1.17 (t)
คาร์โบไฮเดรตและ อนุพันธ์	18	Galactose	5.29 (d)- 5.27 (d), 4.59 (d), , 4.11 (m)- 4.07 (m), 3.99 (m)- 3.63 (m), 3.53 (m)- 3.47 (m)
	19	Glucose	5.25 (m)- 5.23 (m), 4.65 (d), 3.97 (m)- 3.71 (m), 3.55 (m)- 3.25 (m)
	20	Lactose	4.69 (d)- 4.67 (d), 4.47 (d)- 4.45 (d), 3.99 (m)- 3.93 (m), 3.89 (m)- 3.53 (m), .31 (m)- 3.29 (m)
	21	N-Acetylglucosamine	8.07 (d)- 8.05 (d), 3.53 (m)- 3.49 (m), 2.07 (s)- 2.03 (s)
	22	Fucose	1.23(m), 5.25(d)
	23	Sugar residues	5.45 (m), 5.39(m)-5.37 (m)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

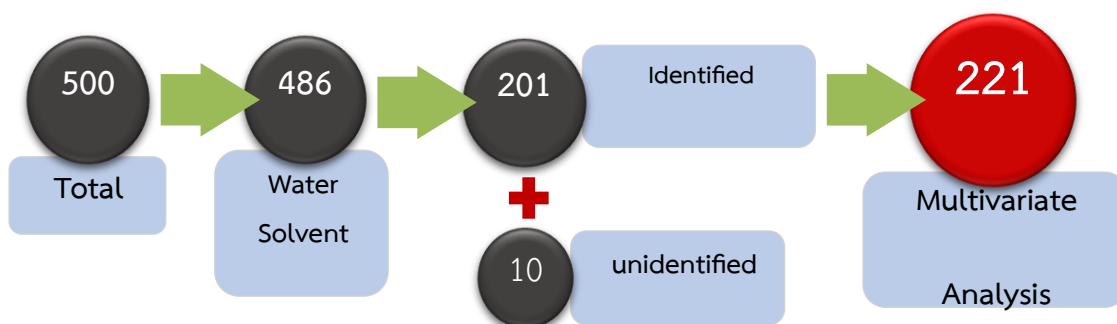
กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
กรดอินทรีย์	24	Acetate	1.93 (s)
	25	Benzoate	7.89 (m)– 7.47 (m)
	26	Butyrate	2.19–2.15, 15.3 (m)– 1.59 (m), 0.91 (t)– 0.87 (t)
	27	Hydroxyisobutyrate	3.57 (m)– 3.53 (m), 1.37 (s)
	28	Citrate	2.73/2.71 (d)– 2.69 (d), 25.7 (d)– 2.53 (d)
	29	Formate	8.45 (s)
	30	Fumarate	6.53 (s)
	31	Isobutyrate	2.35 (m)– 2.33 (m), 1.05 (d)– 1.03 (d)
	32	Lactate	4.15 (m)– 4.12 (m), 1.35 (d)– 1.33 (d)
	33	Malonate	3.15 (s)
	34	Oxoglutarate	3.03 (t)– 3.01 (t), 2.45 (t)
	35	Propylene glycol	3.91 (m)– 3.87 (m), 3.57 (m)– 5.53 (m), 3.47 (m)– 3.43 (m), 1.15 (d)– 1.13 (d)
	36	Pyruvate	2.37 (s)
	37	Succinate	2.43 (s)
	38	Valerate and derivatives	3.85 (m), 2.37 (s), 2.07 (m)– 1.99 (m), 1.29 (s)– 1.27 (s), 0.93 (t)– 0.91 (t), 0.89 (t)– 0.83 (t)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบเคมี	ลำดับ	สารเมตาบอไลต์	¹ H chemical shift, ppm ^a
กรดอินทรีย์ (ต่อ)	39	Ascobate	4.51(d)- 4.53(d)
	40	Hippurate	3.95(d)- 3.97 (d)
	41	Hydroxyisovalerate	0.83(d)-0.85(d), 1.99(m)- 2.07(m), 1.25(d)- 1.27(d)
ไขมันและอนุพันธ์	42	Acetylcholine	3.75 (m), 3.21 (s), 2.15 (s)
	43	Choline and derivatives	3.23 (s), 3.19 (s)
	44	Glycerophosphocholine	4.33 (m)- 4.31 (m), 3.61 (m), 3.23 (s)
	45	Phosphocholine	3.61 (m), 3.21(s)
	46	Acetylcarnithine	2.71(d)- 2.73 (d)
สารประกอบคาร์บอนิล	47	Acetone	2.23 (s)
	48	Acetoin	2.23 (s), 1.39 (d)- 1.37 (d)
	49	Dihydroxyacetone	4.43 (s)
	50	Maleate	6.19 (s)
อื่นๆ	51	Dimethyl sulfone	3.15 (s)
	52	Glycerol	3.81 (m)- 3.77 (m), 3.69 (m)- 3.65 (m), 3.59 (m)- 3.55 (m)

หมายเหตุ: ^ad=doublet, m=multiplet, s=singlet, t=triplet

ในส่วนของ bin ที่ไม่สามารถระบุชนิดของสาร จะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวน โดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ได้ทั้งหมด 10 bin ผลการวิเคราะห์จะได้ bin รวมทั้งหมด 221 bin (ภาพที่ 4.13)



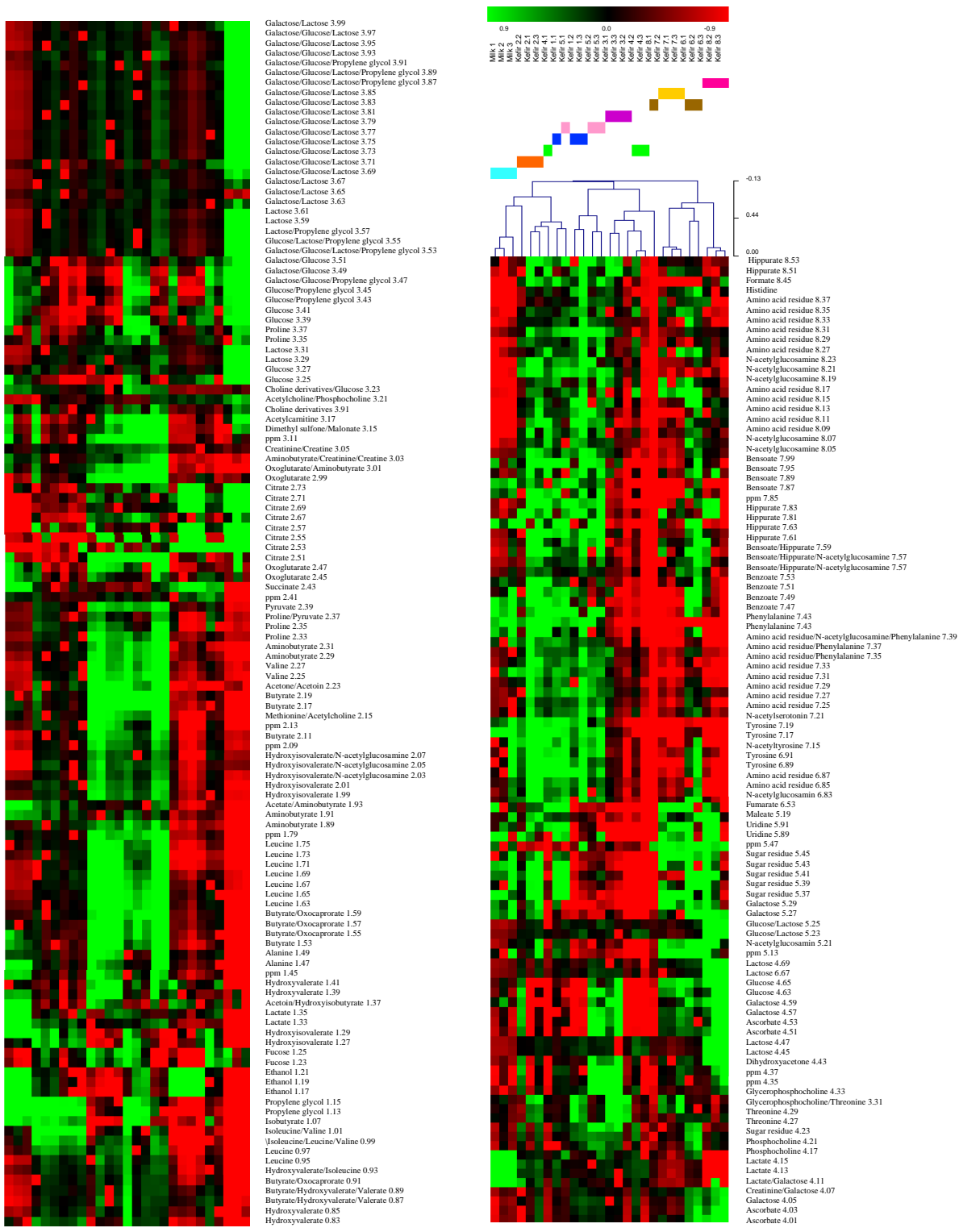
ภาพที่ 4.13 แผนผังแสดงจำนวน bin จากการประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร

4.2.2.5 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยเทคนิค *heat-map visualization* และ *hierarchical cluster analysis (HCA)*

จากข้อมูลที่ได้จากการประมวลผล spectra ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และการระบุสารเมตาบอไลต์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างเป็นตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ และได้ทั้งหมด 221 bin จากนั้นนำปริมาณสัมพันธ์ของข้อมูลจาก spectra ในแต่ละ bin มาแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปประมวลผล (normalize) (ภาคผนวก ข2) เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยเทคนิค *heat-map visualization* และ HCA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) version 4.8. ผลการวิเคราะห์กลุ่มด้วย HCA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยออกเป็น 3 กลุ่มโดยข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ (■) ที่ได้แตกต่างกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์อย่างชัดเจน และจากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ พบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการที่ได้แตกต่างกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของกลุ่ม

ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้าอย่างชัดเจน โดยตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการมีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ใกล้กัน สังเกตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีส้ม (■) สีเขียว (■) สีน้ำเงิน (■) สีชมพู (■) และสีม่วง (■) และตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้ามีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากใกล้เคียงกัน จึงจัดอยู่ใกล้กัน สังเกตได้จากกลุ่มตัวอย่างสีเหลือง (■) สีชมพูเข้ม (■) และ สีน้ำตาล (■) แสดงดังภาพ 4.14 ซึ่งจากการวิเคราะห์ HCA ในขั้นตอนนี้ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักซีเฟอร์ได้อย่างชัดเจน





ภาพที่ 4. 14 แผนภาพความร้อน (heat map) และการวิเคราะห์ HCA ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยจากที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H-NMR จากตัวอย่างและคิเพอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดิคิเพอร์ในห้องปฏิบัติการ คิเพอร์ 1 (■) คิเพอร์ 2 (■) คิเพอร์ 3 (■) คิเพอร์ 4 (■) และคิเพอร์ 5 (■) ตัวอย่างคิเพอร์ทางการค้า (ตราสินค้า D (■) E (■) และ F (■)) และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคิเพอร์ (■)

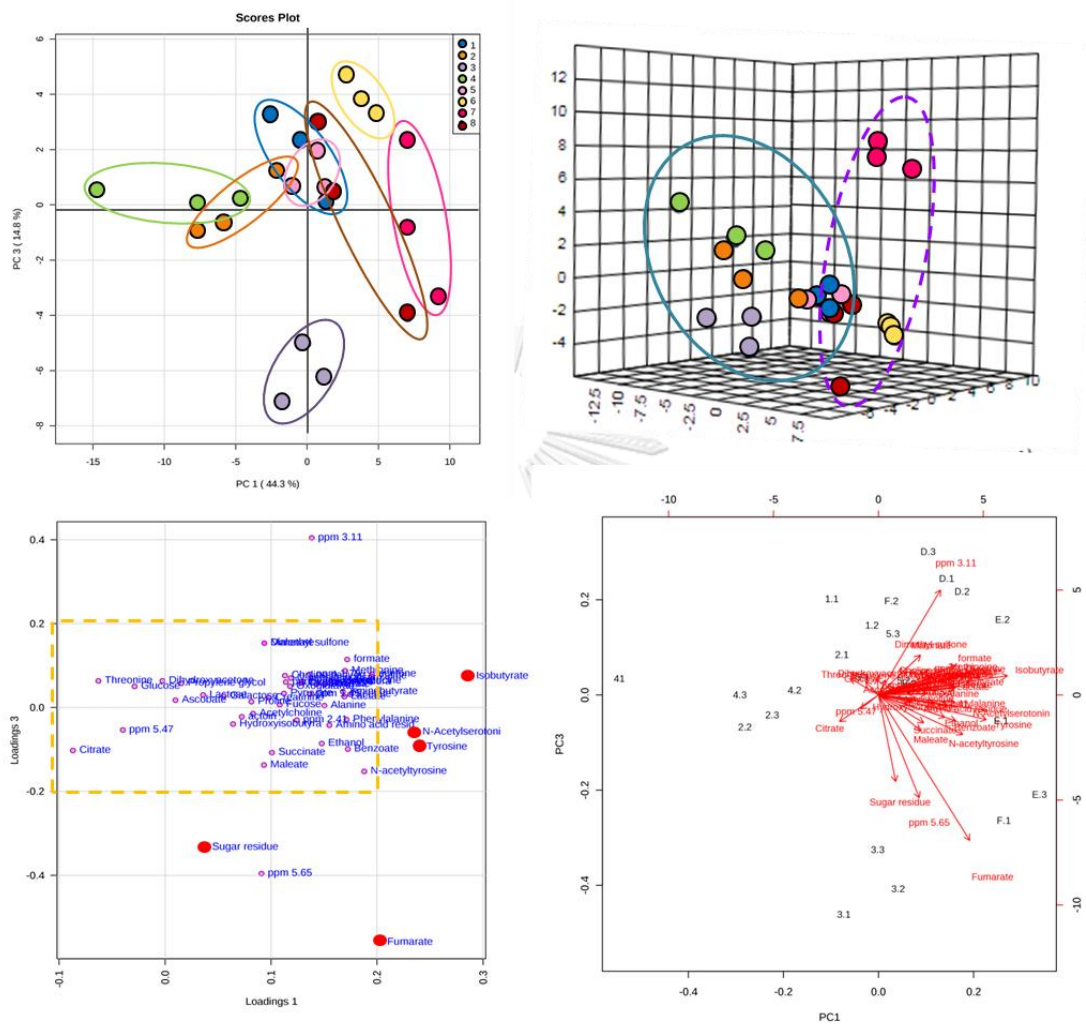
4.2.2.6 การเปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis: PCA)

ขั้นตอนนี้จะนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ PCA หรือ การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักพบว่า มีความแปรปรวนของตัวแปรรวมร้อยละ 59.1 โดย PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ร้อยละ 44.3 และ PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ ร้อยละ 14.8 โดยองค์ประกอบหลักจะประกอบไปด้วยข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ โดยผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลจาก HCA ที่แสดงดังภาพที่ 4.14 และพบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ (สีส้ม (■) สีเขียว (■) สีน้ำเงิน (■) สีชมพู (■) และสีม่วง (■)) แตกต่างจากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้าอย่างชัดเจน (สีเหลือง (■) สีชมพูเข้ม (■) และ สีน้ำตาล (■)) (ภาพที่ 4.15ก) โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย อาทิ ความแตกต่างของชนิดน้ำนมที่ใช้ในกระบวนการหมัก สภาพในกระบวนการหมัก รวมถึงสภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Gul et al., 2015)

จากนั้นนำข้อมูลมาพิจารณาค่าน้ำหนักองค์ประกอบของคีเฟอร์ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างจาก loading plots เป็นการยืนยันผลจาก PCA ที่ได้จากภาพที่ 4.15ก เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่าง จากผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ดังภาพที่ 4.15ค ได้แก่ isobutyrate, tyrosine, N-acetylserotonin, fumarate และ sugar residue มีปริมาณสัมพัทธ์ที่สูงในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และเมื่อพิจารณาค่าจาก VIP score (ภาพที่ 4.16) พบว่า สามารถใช้ปริมาณสัมพัทธ์ของ isobutyrate, tyrosine, N-acetylserotonin และ fumarate ที่มีปริมาณสัมพัทธ์สูงในกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของคีเฟอร์ทั้ง 2 กลุ่มได้ โดยพบว่า isobutyrate เป็นสารเมตาบอไลต์ที่สามารถพบได้ในน้ำนม (Maher and Rochfort, 2014) และพบได้มากในโยเกิร์ตที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12) เป็นส่วนประกอบ (Settachaimongkon et al., 2014b) และ isobutyrate

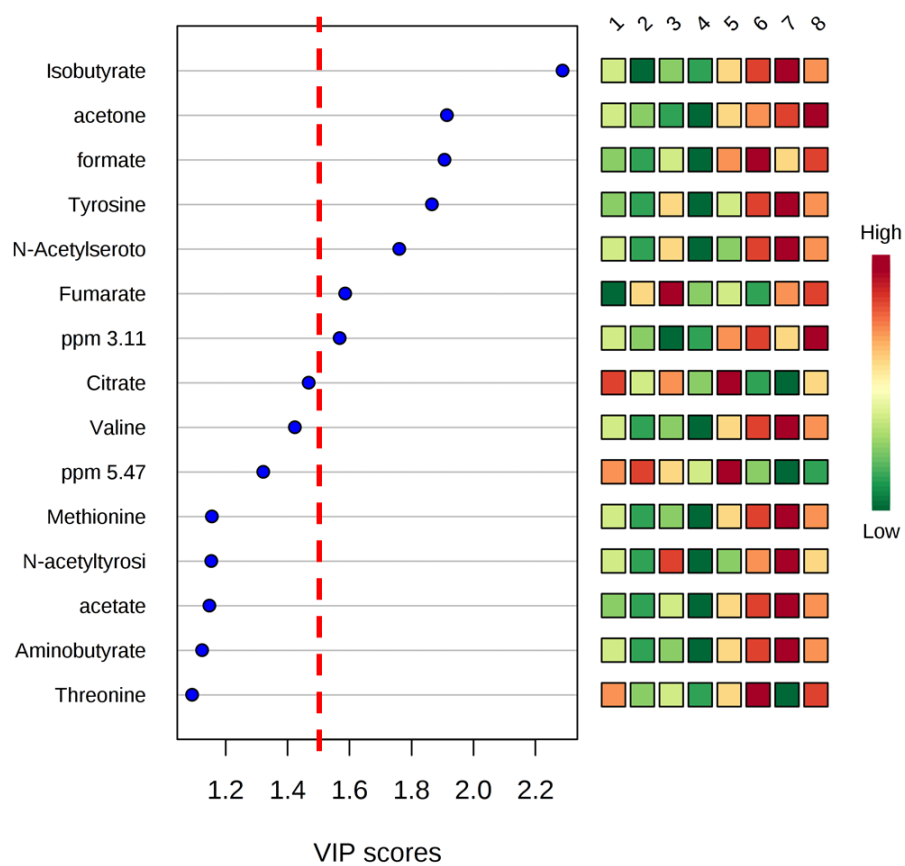
ยังเป็นสารเมตาบอไลต์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนของจุลินทรีย์ มีลักษณะเป็นเป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้าน (Branched-chain amino acids) จุลินทรีย์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรส (aroma compound) ได้ (Wszolek et al., 2007) ในส่วนของ Tyrosine เป็นกรดอะมิโนที่สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมทางการค้า (Foroutan et al., 2019) โดยมีรายงานว่าในน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมเกษตรอินทรีย์จะมีปริมาณ tyrosine สูงกว่าน้ำนมที่ได้จากฟาร์มโคนมที่มีระบบการจัดการฟาร์มแบบทั่วไป (Sivieri et al., 2017) นอกจากนี้แล้ว tyrosine ยังเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ tyramine ในแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่ง tyramine จัดเป็นสารในกลุ่มไบโอเจนิคเอมีนอีกที่พบได้ในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมหมัก (Kowalczyk et al., 2015) และเป็นสารเมตาบอไลต์ที่พบได้ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ โดยจะมีปริมาณมากกว่าในคีเฟอร์ที่หมักจากน้ำนมวัว เมื่อเทียบกับคีเฟอร์ที่หมักจากน้ำนมควาย (Gul et al., 2015) และ fumarate มีรายงานการพบ fumarate ได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น Cheonggukjang ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของประเทศเกาหลี (Mozzi et al., 2013) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ (ยกเว้น *L. harbinensis*) จะมีความสามารถในการเปลี่ยน malate เป็น fumarate (Kowalczyk et al., 2015) ในส่วนของ acetone เป็นสารเมตาบอไลต์สำคัญในกลุ่มของคีโตนที่สามารถให้กลิ่นรสที่ส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสอันเป็นเอกลักษณ์ของคีเฟอร์ (Wouters et al., 2002) จากรายงานการศึกษาของ Terpou และคณะ (2017) พบว่า ปริมาณ acetone ที่สูงขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ส่งผลให้เกิดกลิ่นรสนมต้ม (heated milk flavour) ในผลิตภัณฑ์นมหมักได้ (Terpou et al., 2017) และจากรายงานก่อนหน้า พบว่า acetone ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเนื้องอกบางชนิดในสัตว์ทดลองมากกว่า acetone ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่น (Guzel-Seydim et al., 2011) ในส่วนของ formate เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม heterofermentative (Kowalczyk et al., 2015) จากรายงานการศึกษาก่อนหน้าพบว่า *Streptococcus thermophilus* มีความสามารถในการสังเคราะห์ formate เพื่อใช้เป็นสารเมตาบอไลต์ที่ช่วยกระตุ้นเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ต (Uriot et al., 2017) และในส่วนของ N-acetylserotonin ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของ N-acetyl amino acid ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ

สังเคราะห์เมลานิน (melatonin) (<http://www.hmdb.ca>) จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสามารถพบสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวได้ในกลุ่มอาหารหมัก (Martin-Cabrejas et al., 2017)



ภาพที่ 4.15 (ก) PCA 2D score plot (ข) PCA 3D score plot (ค) PC loading (ง) และ PCA biplot ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย คีเฟอร์ 1 (■) คีเฟอร์ 2 (■) คีเฟอร์ 3 (■) คีเฟอร์ 4 (■) และคีเฟอร์ 5 (■) และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้าประกอบด้วย คีเฟอร์ตราสินค้า D (■) E (■) และ F (■)

หมายเหตุ: ● หมายถึง สารเมตาบอไลต์ที่มีค่า loading ตั้งแต่ 0.2 ขึ้นไป

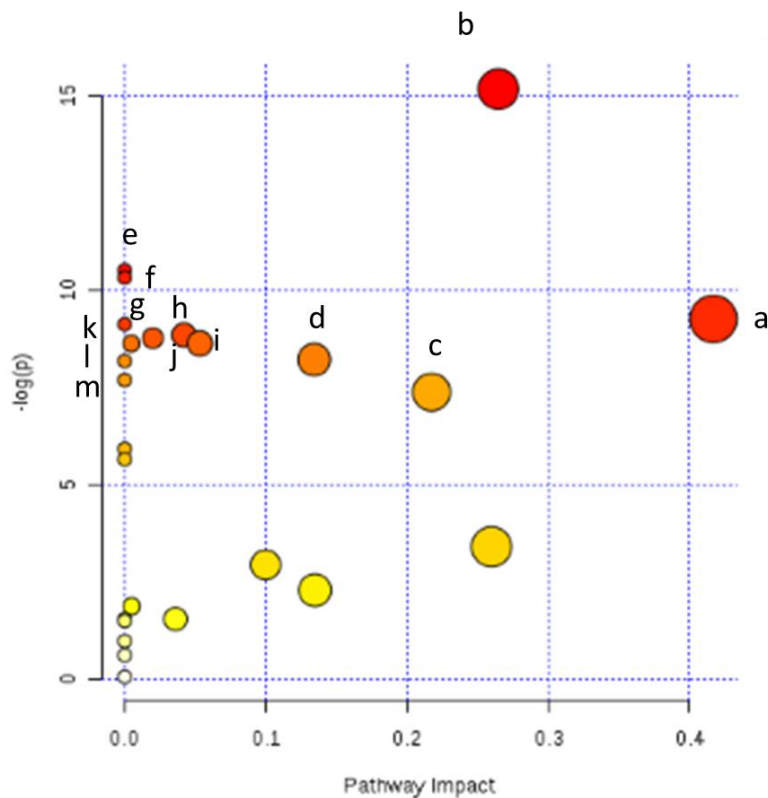


ภาพที่ 4.16 VIP score ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้จากวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ จากตัวอย่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย คีเฟอร์ 1 (1) คีเฟอร์ 2 (2) คีเฟอร์ 3 (3) คีเฟอร์ 4 (4) และคีเฟอร์ 5 (5) และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า ประกอบด้วยคีเฟอร์ตราสินค้า D (6) E (7) และ F (8)

จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า แสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ได้มีความหลากหลายสัมพันธ์กับความหลากหลายของเม็ตซีเฟอร์กล้าเชื้อที่ใช้ ดังนั้นจึงนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า มาวิเคราะห์หาสารที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิธิเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis และวิเคราะห์ตำแหน่งของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในวิธิเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis

4.2.2.7 การวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างจากวิธิเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis และ การคำนวณวิธิเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องด้วย KEGG's pathway analysis

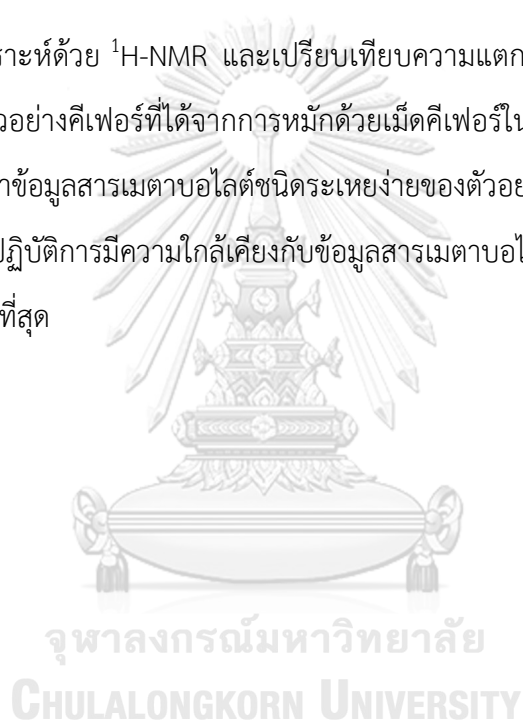
จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันจากวิธิเมตาบอลิซึมของสารเมตาบอไลต์นั้นด้วย pathway analysis แสดงดังภาพที่ 4.18 พบว่า มีวิธิเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างซีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตซีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างซีเฟอร์ทางการค้า ได้แก่ (a) Methane metabolism, (b) Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, (c) Pyruvate metabolism, (d) Cysteine and methionine metabolism, (e) Aminoacyl-tRNA biosynthesis, (f) Valine, leucine and isoleucine degradation, (g) Pantothenate and CoA biosynthesis, (h) Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (i) Sulfur metabolism (j) Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (k), Selenoamino acid metabolism (l) Phenylalanine metabolism ดังภาพที่ 4.17

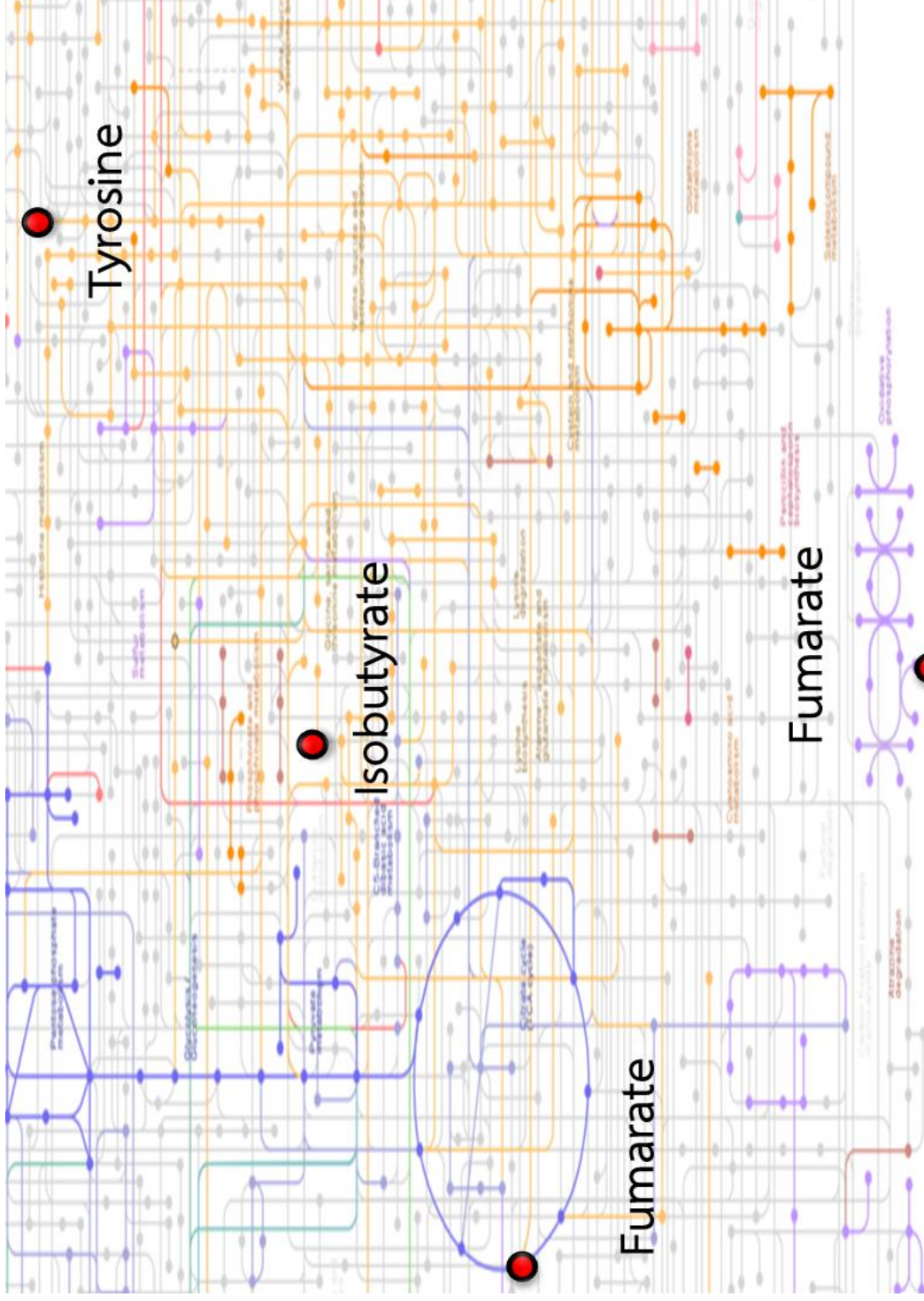


ภาพที่ 4.17 การวิเคราะห์วิถีเมตาบอลิซึม (pathway analysis) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า โดย (a) Methane metabolism, (b) Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, (c) Pyruvate metabolism, (d) Cysteine and methionine metabolism, (e) Aminoacyl-tRNA biosynthesis, (f) Valine, leucine and isoleucine degradation, (g) Pantothenate and CoA biosynthesis, (h) Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (i) Sulfur metabolism (j) Phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis (k), Selenoamino acid metabolism (l) Phenylalanine metabolism

จากการตรวจสอบสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแต่ละกลุ่มตัวอย่างตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคิเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า จากค่าของ VIP score จะนำข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากที่ใช้สามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจากตัวอย่างคีเฟอร์ ได้แก่ isobutyrate, acetone, formate, tyrosine, N-acetylserotonin และ fumarate มาวิเคราะห์ตำแหน่งในวิถีเมตาบอลิซึมจากข้อมูล complete genome sequencing ของตัวแทนยีสต์คือ *Kluyveromyces marxianus* ด้วย KEGG's pathway analysis (<https://www.metaboanalyst.ca>) (ภาพที่ 4.18)

จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคิเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า พบว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคิเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการมีความใกล้เคียงกับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้ามากที่สุด





ภาพที่ 4.18 KEGG's pathway analysis

ที่มา : <https://www.genome.jp/kegg/>

4.2.3 การทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของประชากรจุลินทรีย์ในเม็คคิเฟอร์

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกของจุลินทรีย์กล้าเชื้อในเม็คคิเฟอร์จากทั้ง 5 แหล่งที่มาในประเทศไทย ที่ได้จัดหามาในงานวิจัยนี้ โดยคุณสมบัติเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นคือ ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด และสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี เนื่องจากจุลินทรีย์โพรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านได้ โดยจุลินทรีย์ต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและยังต้องสามารถอยู่รอดและสามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ในสภาวะที่มีน้ำดีในลำไส้เล็ก โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะเคลื่อนที่ไปยังบริเวณเป้าหมายบนผนังของลำไส้เล็ก เพื่อรอดอยู่และเพิ่มจำนวน และช่วยในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และช่วยลดการอักเสบของลำไส้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะเข้าไปแย่งจุลินทรีย์ก่อโรคจับกับตัวรับ Toll-like receptors (TLRs) บนเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก (intestinal epithelial cells (IECs)) โดยกิจกรรมดังกล่าวยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Xing et al., 2017, Maldonado Galdeano et al., 2019)

4.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

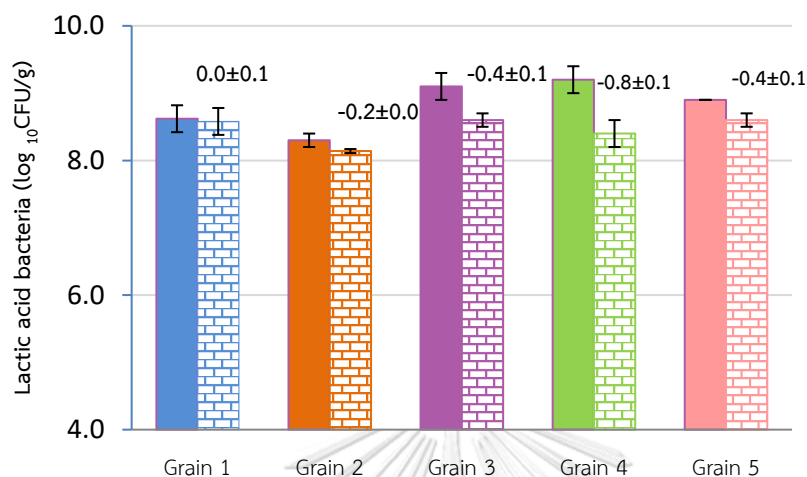
ในการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราที่เป็นองค์ประกอบในเม็คคิเฟอร์ ทำได้โดยการเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในเม็คคิเฟอร์ก่อนและหลังบ่มในสภาวะที่มีความเป็นกรด (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้ปรับ pH ให้เท่ากับ 3.00 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะในกระเพาะอาหารของมนุษย์ โดยกระเพาะอาหารจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยประมาณ 3.00 อาหารใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารโดยประมาณ 3 ชั่วโมง (Xing et al., 2017)

ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างเม็คคิเฟอร์ทั้ง 5 แหล่งที่มา พบว่าในตัวอย่างเม็คคิเฟอร์ 1 และเม็คคิเฟอร์ 3 แบคทีเรียกรดแลคติกในเม็คคิเฟอร์มีความสามารถในการ

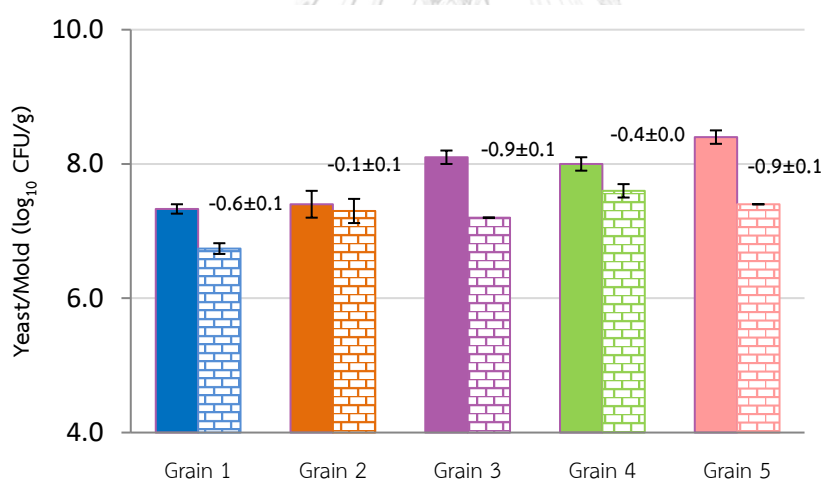
ทนต่อสภาวะความเป็นกรดสูงที่สุด โดยมีการลดลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์อื่น ๆ แสดงดังภาพที่ 4.19 โดยจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงในช่วง 0.0 ± 0.01 และ $0.2 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Leite และคณะ (2015) โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก จากการเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนและหลังหลังการให้บ่มในสภาวะที่มีความเป็นกรดใกล้เคียงกับสภาวะในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกันกับงานวิจัยนี้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกจะต้องทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด (pH เท่ากับ 3.00) ระยะเวลาในการบ่ม 3 ชั่วโมง และมีจำนวนลดลงไม่เกินกว่า $2.00 \log_{10}$ CFU/g (Leite et al., 2015, Likotrafiti et al., 2015) จากรายงานการศึกษาดังกล่าวจะพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ทั้ง 5 แหล่งที่มา มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้นในทุกตัวอย่าง

ผลการตรวจนับจำนวนยีสต์และราจากตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ทั้ง 5 แหล่งที่มา พบว่าในตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ 2 ยีสต์และราในเม็ดคีเฟอร์มีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดสูงที่สุด โดยมีการลดลงของจำนวนยีสต์และราต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์อื่น ๆ แสดงดังภาพที่ 4.19 จำนวนยีสต์และราลดลงในช่วง $0.1 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/g โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sanlidere Aloglu (2016) โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกยีสต์และราที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกจากความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด (pH เท่ากับ 3.00) เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยจำนวนยีสต์และรา ก่อนและหลังนำไปบ่มด้วยสภาวะกรด จะต้องมีจำนวนลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (Diosma et al., 2014, Sanlidere Aloglu et al., 2016)

ก) แบคทีเรียกรดแลคติก



ข) ยีสต์และรา



ภาพที่ 4.19 การเปรียบเทียบจำนวน ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ ข) ยีสต์และรา ก่อน (■) และ หลัง (▤) บ่มในสภาวะที่มีความเป็นกรดใกล้เคียงกับสภาวะในกระเพาะอาหาร (pH = 3.00 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง)
หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ราที่ลดลง (log₁₀ CFU/g)

4.2.3.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี

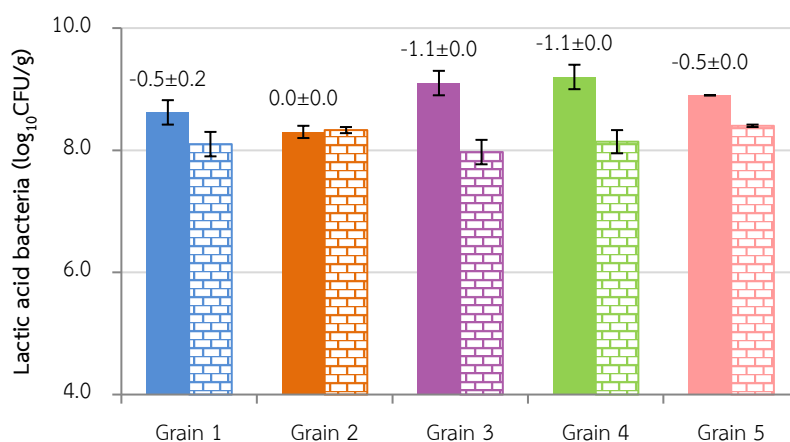
ในการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราที่เป็นองค์ประกอบในเม็ดคีเฟอร์ ทำได้โดยการเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในเม็ดคีเฟอร์ก่อนและหลังบ่มในสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้เติม 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เกลือ น้ำดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะในลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยในลำไส้เล็กมีความเข้มข้นของเกลือ น้ำดีอยู่ในช่วงระหว่าง ร้อยละ 0.03 และ 0.30 อาหารจะใช้เวลาอยู่ในลำไส้เล็กประมาณ 4-16 ชั่วโมง (Sanlidere Aloglu et al., 2016, Xing et al., 2017)

ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ทั้ง 5 แหล่งที่มา พบว่า ในตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ 2 แบคทีเรียกรดแลคติกในเม็ดคีเฟอร์มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดีสูงที่สุด โดยไม่พบการลดลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์อื่น ๆ โดยจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงในช่วง $0.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับแสดงดังภาพที่ 4.20 โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าของ Abushelaibi และคณะ (2017) โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกจากความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี (เข้มข้น ร้อยละ 0.3) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยจำนวนยีสต์และรา ก่อนและหลังนำไปบ่มด้วยสภาวะใกล้เคียงกับลำไส้เล็กในมนุษย์ จะต้องมีจำนวนลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Likotraftiti et al., 2015, Abushelaibi et al., 2017)

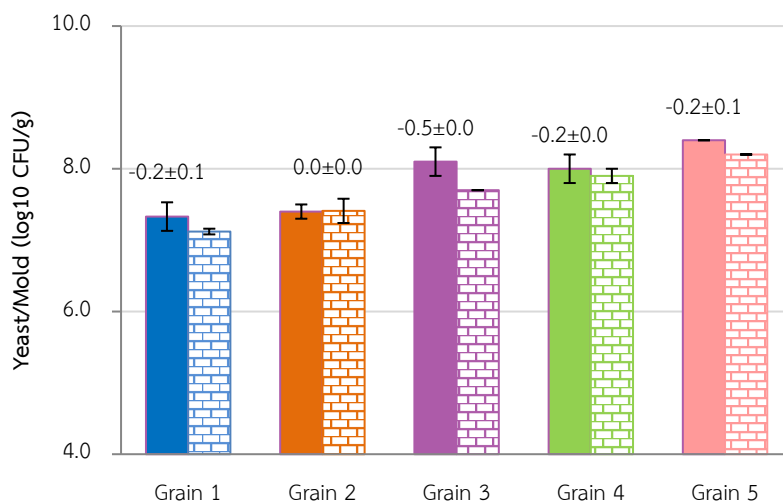
ผลการตรวจนับจำนวนยีสต์และราจากตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ทั้ง 5 แหล่งที่มา พบว่าในตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์ 2 ยีสต์และราในเม็ดคีเฟอร์มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดีสูงที่สุด โดยไม่พบการลดลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเม็ดคีเฟอร์อื่น ๆ โดยจำนวนยีสต์และราลดลงในช่วง $0.0 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/g แสดงดังภาพที่ 4.20 โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าของ Sanlidere Aloglu (2016) โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกยีสต์และราที่มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก จากการ

เปรียบเทียบจำนวนยีสต์และรา ก่อนและหลังการให้บ่มในสถานะที่เติมเกลือใกล้เคียงกับสถานะกับสถานะในลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นสถานะเดียวกันกับงานวิจัยนี้ โดยยีสต์และราที่ผ่านการคัดเลือกจะต้องทนต่อสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3 ระยะเวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมง และมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนและหลังจากการบ่ม ลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Diosma et al., 2014, Sanlidere Aloglu et al., 2016)

ก) แบคทีเรียกรดแลคติก



ข) ยีสต์และรา



ภาพที่ 4.20 การเปรียบเทียบจำนวน ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ ข) ยีสต์และรา ก่อน (■) และ หลัง (▨)

ในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีใกล้เคียงกับสถานะในลำไส้เล็ก (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้เติม 0.3% (w/v) เกลื่อน้ำดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง)

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์และราที่ลดลง (log₁₀ CFU/g)

โดยสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกเม็คทีเฟอร์ที่มีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นในงานวิจัยนี้ ใช้สภาวะและความเป็นกรดใกล้เคียงกับสภาวะของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยในกระเพาะอาหารของมนุษย์จะมีค่าความเป็นกรด-ต่างโดยประมาณ 3.00 อาหารใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารโดยประมาณ 3 ชั่วโมง และในลำไส้เล็กของมนุษย์มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีอยู่ในช่วงระหว่าง ร้อยละ 0.03 และ 0.30 อาหารจะใช้เวลาอยู่ในลำไส้เล็กโดยประมาณ 4-16 ชั่วโมง (Tang et al., 2018) อย่างไรก็ตามสภาวะที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่นิยามทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและทนต่อสภาวะที่มีการเติมเกลือน้ำดีเป็นการทดสอบเบื้องต้น เพื่อใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นจากเม็คทีเฟอร์ ผลิตภัณฑ์ซีเฟอร์ และผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาหารหมักหมักชนิดอื่น ๆ โดย Tang และคณะ (2018) สามารถคัดเลือก *Lactobacillus plantarum* MA2 ได้จากเม็คทีเฟอร์ โดยจุลินทรีย์มีความสามารถในการทนต่อภาวะความเป็นกรดที่ค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 2.50 และภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ร้อยละ 0.30 ได้ (Tang et al., 2018) Diosmo และคณะ (2014) สามารถคัดเลือก *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 และ *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112 โดยจุลินทรีย์มีความสามารถในการทนต่อภาวะความเป็นกรดที่ค่าความเป็นกรด-ต่าง เท่ากับ 2.50 และภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ร้อยละ 1.00 ได้ (Diosma et al., 2014) โดยจุลินทรีย์ทั้งหมดข้างต้นจากรายงานการศึกษาต่างๆ มีคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโพรไบโอติก สอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่า ซีเฟอร์ เป็นแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Erdogan et al., 2019) โดยนอกจากการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดและสภาวะที่มีการเติมเกลือน้ำดีแล้ว จากรายงานการศึกษาพบว่ายังมีคุณสมบัติอื่นๆที่เป็นที่นิยมใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกเช่นเดียวกัน เช่น ความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองของจุลินทรีย์ (autoaggregation) และความสามารถในการเกาะเกาะกลุ่มกับจุลินทรีย์ก่อโรค (coaggregation with pathogens) ซึ่งความสามารถดังกล่าวจะมีผลต่อการช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ของเจ้าบ้าน โดยการเข้าไปแทนที่จุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Menezes et al., 2019) การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีความสามารถในการยึดเกาะและอยู่รอดเพื่อเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของผนังลำไส้ได้ ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถเกาะติดกับผนังลำไส้ได้ลดลง (Xing et al., 2017) และการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Likotrafiti et al., 2015) โดยคุณสมบัติเบื้องต้น

ดังกล่าวเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (WHO/FAO) ที่กำหนดให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมี อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่มีการเติมเกลือน้ำดีเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมี เนื่องจากจุลินทรีย์จำเป็นต้องผ่านสภาวะดังกล่าวข้างต้นก่อน เพื่อผ่านไปยังลำไส้เล็กและดำเนินกิจกรรมอื่น ๆ ต่อไป (Xing et al., 2017)

ถึงแม้ว่าเม็ดคีเฟอร์ 2 จะมีประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้นที่สามารถทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3.00 และมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่เติมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ได้มากที่สุด แต่เม็ดคีเฟอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักต่ำ (แสดงดังตารางที่ 4.4-4.7) ดังนั้นเมื่อนำผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และผลการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย และชนิดระเหยยาก) มาวิเคราะห์ร่วมด้วย โดยเม็ดคีเฟอร์ 5 เป็นเม็ดคีเฟอร์ที่หมักแล้วได้คีเฟอร์ที่มีข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลใกล้เคียงกับคีเฟอร์ทางการค้ามากที่สุด

จากผลการทดลองในเบื้องต้นทั้งหมดที่กล่าวมาจึงสามารถสรุปได้ว่าเม็ดคีเฟอร์ 5 มีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษารูปแบบประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมัก เท่ากับ 7.9 ± 0.1 และ $6.9 \pm 0.0 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์และราที่มักพบในคีเฟอร์จากรายงานการศึกษาและตรงตามมาตรฐาน Codex แบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในเม็ดคีเฟอร์มีความสามารถในการเจริญสูงที่สุด โดยเพิ่มจำนวนในระหว่างชั่วโมงการหมักที่ 0 ถึงชั่วโมงการหมักที่ 24 เท่ากับ 1.6 ± 0.0 และ $1.8 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ มีความสามารถในการผลิตกรดในระหว่างกระบวนการหมักสูงที่สุด โดยหมักได้คีเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ต่าง เท่ากับ 4.41 ± 0.03 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ต่างของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ทั่วไปและมีปริมาณทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักสูงที่สุด มีปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง เท่ากับ ร้อยละ 0.77 ± 0.05 และปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ สอดคล้องตามมาตรฐาน Codex โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดในคีเฟอร์มากกว่าร้อยละ 0.60 (แสดงดังข้อที่ 4.2.1) และมีความสามารถในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในกระบวนการหมักคีเฟอร์ได้เทียบเคียงกับคีเฟอร์ทางการค้า (แสดงดังข้อที่ 4.2.2)

และประกอบไปด้วยจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น โดยมีการลดลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในสภาวะที่มีความเป็นกรด เท่ากับ -0.4 ± 0.1 และ $-0.9 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ และการลดลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในสภาวะที่เติมเกลือ น้ำดี เท่ากับ -0.5 ± 0.0 และ $-0.2 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/g (แสดงดังข้อที่ 4.2.3)

4.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

4.3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ 5 (ร้านจ๊ีบ บัวหิมะ (ธิเบต) จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) ที่ระยะเวลาในกระบวนการหมัก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง โดยความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ได้ จะเป็นของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (cultur dependent method) โดยใช้เทคนิค Harrison disc ซึ่งเป็นเทคนิคในการสุ่มเลือกโคโลนีจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการระบุชนิด (Tu et al., 2010) จากนั้นตรวจสอบจนกระทั่งได้แบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA/RNA และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยในงานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ 5 เป็น 2 กลุ่มคือ จุลินทรีย์ในกลุ่มโพรแคริโอต (prokaryote) ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก และจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ ยีสต์ และรา

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA/RNA ของตัวแทนแบคทีเรียในคีเฟอร์ แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนจุลินทรีย์ในกลุ่ม
โพรแคริโอต (prokaryote) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในกระบวนการหมักคีเฟอร์

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
0	1	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	97.44%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749.1	97.44%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868.1	97.44%
2	2	1	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain SS45.40	MH936308	98.03%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> JCM 15040	LC480801	98.01%
		3	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS5253	MK835749	98.01%
6	1	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801.1	99.32%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749.1	99.32%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868.1	99.32%
	2	1	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain SS45.40	MH936308.1	99.34%
		2	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801.1	99.34%
		3	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749.1	99.34%

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
12	1	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	100.00%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	100.00%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	100.00%
	2	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	98.77%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	98.77%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	98.77%
	3	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	98.66%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	98.66%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	98.66%
18	1	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	98.32%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	98.32%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	98.32%
	2	1	<i>Bacillus subtilis</i> strain IFBG MK-2	LC480801	80.99%
		2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain FQ1	MK835749	80.58%
		3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain A24T	MK681868	80.58%

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
18 (ต่อ)	3	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	95.65%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	95.65%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	95.65 %
24	1	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	98.71%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	98.71%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	98.71%
	2	1	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	LC480801	99.32%
		2	<i>Lactobacillus buchneri</i> strain HBUAS52537	MK835749	99.32%
		3	<i>Lactobacillus kefir</i> strain BB6	MK681868	99.32%

ชั่วโมงที่ 0 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 97.44 เปอร์เซ็นต์ ในทุกสายพันธุ์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri* เท่ากับ 98.01-98.03 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 0 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของแบคทีเรียประกอบด้วย แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri*

ในอัตราส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* หรือ *Lactobacillus kefir* ในอัตราส่วน 33.37 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 99.32 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus otakiensis* และ *Lactobacillus buchneri* เท่ากับ 99.34 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 6 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของแบคทีเรียประกอบด้วย แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus otakiensis* หรือ *Lactobacillus buchneri* ในอัตราส่วน 100

ชั่วโมงที่ 12 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 98.77 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 98.66 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 12 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของแบคทีเรียประกอบด้วย แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus otakiensis* หรือ *Lactobacillus buchneri* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 18 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefir* เท่ากับ 98.32 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* และ *Staphylococcus epidermidis* เท่ากับ 80.99 80.58 และ 80.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus*

kefiri เท่ากับ 95.65 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 18 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus otakiensis* หรือ *Lactobacillus buchneri* ในอัตราส่วน 75 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียในสกุล *Bacillus subtilis* ในอัตราส่วน 25 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefiri* เท่ากับ 98.71 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus kefiri* เท่ากับ 99.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 18 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri* หรือ *Lactobacillus kefiri* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มแบคทีเรียหลักที่วิเคราะห์พบในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการพบที่มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งรายงานว่แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มประชากรหลักในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ Nalbantoglu และคณะ (2014) พบว่า *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus buchneri* และ *Lactobacillus helveticus* เป็นสามสายพันธุ์หลักของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ที่พบได้ในเมดคีเฟอร์จากประเทศตุรกี ซึ่งจัดเป็นเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม heterofermentative มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส เป็นคุณสมบัติที่ช่วยในการส่งเสริมประโยชน์ในเชิงสุขภาพของคีเฟอร์ โดยทำให้ผู้ที่มีภาวะการย่อยแลคโตสผิดปกติ (lactose intolerance) สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ได้ และ จากรายงานการศึกษาของ Zeng และคณะ (2010) พบว่า *Lactobacillus buchneri* มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกเบื้องต้น โดยสามารถทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดและเติมเกลือน้ำดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในกลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ (Zeng et al., 2010, Nalbantoglu et al., 2014, Macori and Cotter, 2018) *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถใน

การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาล โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มของ lactate, formate และ ethanol ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้า ที่พบว่าสัดส่วนของน้ำตาลในคีเฟอร์มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับนํ้านมวัตถุดิบ และพบว่าสัดส่วนของสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวมีค่าเพิ่มมากขึ้น(ข้อ 4.2.2) นอกจากนั้นแล้ว *Lactobacillus* ยังมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนํ้านม โดยได้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มของกรดอะมิโนอิสระ และไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine) โดยกรดอะมิโนอิสระที่ได้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำกลับมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นรส โดยสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้าที่พบว่าสัดส่วนของกรดอะมิโนอิสระในคีเฟอร์มีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับนมวัตถุดิบ นอกจากนั้นแล้ว ในงานวิจัยนี้ (ข้อ 4.2.2) ยังพบ tyrosine ซึ่งเป็นหนึ่งในสารกลุ่มไบโอเจนิคเอมีนที่ได้จากการย่อยสลายกรดอะมิโนของแบคทีเรียกรดแลคติก (Kowalczyk et al., 2015) โดยสารดังกล่าวถูกระบุว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการและคีเฟอร์ทางการค้า โดยมีรายงานการตรวจพบ tyrosine ในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (Menestrina et al., 2016) ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเนยแข็ง (Piras et al., 2013) รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทอื่น ๆ เช่น Cheonggukjang และ Meju ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก (Mozzi et al., 2013) ในส่วนของ *Bacillus subtilis* การตรวจพบจุลินทรีย์ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Luang-In และ Deeseenthum (2016) ที่ได้รายงานถึงการพบจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus subtilis* ในคีเฟอร์ไทย โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความสามารถในการสังเคราะห์ ESP ซึ่งจะส่งผลต่อความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้จากการหมัก (Luang-In and Deeseenthum, 2016) จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *Bacillus subtilis* พบว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของ lactate, acetate, acetoin และ ethanol (Cruz Ramos et al., 2000) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากที่ตรวจพบสารดังกล่าว ในงานวิจัยนี้ (ข้อ 4.2.2)

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA/RNA ของตัวแทนยีสต์และราในคีเฟอร์ แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในกระบวนการหมักคีเฟอร์

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
0	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate PA-16	KT875208	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	99.48%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	99.48%
2	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M1	KJ491107	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M58	KJ491106	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M5	KJ491105	100.00%
3	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate PA-16	KJ491107	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M58	KJ491106	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M	KJ491105	100.00%
6	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain C1-36-Y2	MG24584	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M1	KJ491107	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M58	KJ491110	100.00%

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
6 (ต่อ)	2	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain C1-36-Y2	MG245845	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M1	KJ491107	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain M58	KJ491106	100.00%
	3	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain C1-36-	KP195097	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain YBD6	KJ491107	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	100.00%
12	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain YBD6	MK656266	99.44%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	99.44%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	99.44%
	2	1	<i>Kazachstania</i> sp. IMB190R	KC118126	100.00%
		2	<i>Kazachstania servazzii</i> strain UCDFST:01-162	MH595175	100.00%
		3	<i>Kazachstania unispora</i> strain HBUAS61046	MH880179	100.00%

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
12 (ต่อ)	3	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate PA-16	KT875208	100.94%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	99.48%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	99.48%
18	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain S-2-05	KP195097	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%
	2	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	KP195097	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:50-84	MH595091	100.00%

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
18 (ต่อ)	2	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	KP195097	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:50-84	MH595091	100.00%
3	3	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate PA-16	KT875208	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	99.48%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	99.48%
4	4	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	99.49%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	99.49%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:50-84	MH595091	99.49%

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
24	1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:50-84	MH595091	100.00%
	2	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain C1-0-Y4a	MG245844	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain NJAULZ-JM1	MH244202	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain NJAULZ-JM1	KX380575	100.00%
	3	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain S-2-05	KP195097	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ตัวแทน	ลำดับที่	Strain	Accession no.	Sequencing identity (%)
24 (ต่อ)	4	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain YBD6	MK656266	100.00%
		2	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:05-822	MH595156	100.00%
		3	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain UCDFST:49-27	MH595097	100.00%

ชั่วโมงที่ 0 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100-99.48 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 0 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของยีสต์และราประกอบด้วย ยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 6 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 6 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของยีสต์และราประกอบด้วย ยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 12 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 99.44 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kazachstania* sp, *Kazachstania servazzii* และ *Kazachstania unispora* เท่ากับ 100-99.44 เปอร์เซ็นต์ และ ตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100-99.48 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 12 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของยีสต์และราประกอบด้วย ยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ในอัตราส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ *Kazachstania* sp, *Kazachstania servazzii* หรือ *Kazachstania unispora* ในอัตราส่วน 33.37 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 18 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 99.48 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 18 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของยีสต์และราประกอบด้วยยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาในกระบวนการหมักคีเฟอร์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ของตัวแทนที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ตัวแทนที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวแทนที่ 4 มีความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 18 ในระยะเวลาในการหมักคีเฟอร์ มีความหลากหลายของยีสต์และราประกอบด้วยยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์

โดยกลุ่มยีสต์และเราได้จากคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตคีเฟอร์ 5 ในห้องปฏิบัติการพบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ายีสต์ในกลุ่ม *Kluyveromyces* และ *Kazachstania* เป็นยีสต์กลุ่มหลักที่พบในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ (Erdogan et al., 2019) จากรายงานการศึกษาของ Kalamaki และคณะ (2018) พบว่า *Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์กลุ่มหลักที่พบในเม็ตคีเฟอร์และคีเฟอร์ทางการค้าจากประเทศกรีซ (Kalamaki and Angelidis, 2017) มีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 1.50 (Sanlidere Aoglu et al., 2016) สามารถอยู่รอดและเจริญเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของผนังลำไส้ (Diosma et al., 2014) ส่งผลให้ *Kluyveromyces marxianus* จัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกเบื้องต้น โดยสามารถทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร อยู่รอดและเจริญเพิ่มจำนวนบนพื้นผิวของผนังลำไส้เล็ก เพื่อแย่งพื้นที่ในการเกาะติดกับจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Akal et al., 2018) โดย *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งยีสต์เป็นกลุ่มหลักที่พบในงานวิจัยนี้ เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตส โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ β -galactosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโตส และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดอื่น ๆ ต่อไป นอกจากนี้ความสามารถดังกล่าวจะช่วยในการส่งเสริมประโยชน์ในเชิงสุขภาพของคีเฟอร์แล้ว ยังช่วยในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสได้ โดยอาศัยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายของ *Kluyveromyces marxianus* เป็นสารตั้งต้น ซึ่งยีสต์ *Kazachstania* ที่พบเป็นประชากรกลุ่มน้อยในงานวิจัยนี้ถูกจัดเป็นยีสต์ที่ไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (Domingues et al., 2010) อย่างไรก็ตามยีสต์ที่พบในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการสังเคราะห์สารตาบอไลต์ในกลุ่มของ acetate, pyruvate, ethanol และ glycerol ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบสารเมตาบอไลต์กลุ่มดังกล่าวในการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในงานวิจัยนี้ (แสดงดังข้อ 4.2.2) และจากรายงานการศึกษาของ Wittmann และคณะ (2012) พบว่า *Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารให้กลิ่นรสในกลุ่มของ 2-phenylethanol ซึ่งให้กลิ่นรส unclean, rose และ violet-like ซึ่งเป็นกลิ่นรสสำคัญในทางอุตสาหกรรม อีกทั้งสามารถพบได้ในไวน์ ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง และคีเฟอร์ ซึ่งสารเมตาบอไลต์ดังกล่าว เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในการย่อยสลายน้ำตาล

และกรดอะมิโน (phenylalanine) (Wittmann et al., 2002) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้าที่มีการตรวจพบ 2-phenylethanol ในงานวิจัยนี้ (แสดงดังข้อ 4.2.2)

4.3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (Rev-T-PCR-DGGE)

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ 5 (ร้านจ๊ีบ บัวหิมะ (ชิเบต) จังหวัดกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) ที่ระยะเวลาในกระบวนการหมัก 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง โดยความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ได้ จะเป็นของจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่มีชีวิต มีการแสดงออกของยีน (gene) และดำเนินกิจกรรมในช่วงเวลานั้น ๆ เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ได้จากการสกัด RNA โดยตรงจากคีเฟอร์ (สิ่งแวดล้อม) และเปลี่ยนให้เป็น cDNA ปัจจุบันเป็นเทคนิคที่นิยมมากกว่าการสกัด DNA จากตัวอย่าง เนื่องจากการสกัด DNA จะได้มาซึ่ง DNA ของจุลินทรีย์เซลล์ตาย อย่างไรก็ตาม RNA สามารถเสถียรภาพได้ง่ายกว่า DNA (De Filippis et al., 2017) โดยในงานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็คคีเฟอร์ 5 เป็น 2 กลุ่มคือ จุลินทรีย์ในกลุ่มโพรแคริโอต (prokaryote) ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก และจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่ ยีสต์และรา จากการศึกษาพบว่ามีปรากฏแบบ (brand) cDNA ของยีสต์และราเพียง 1 แบบ โดยเริ่มปรากฏที่ชั่วโมงการหมักที่ 0 เป็นแบบบาง ๆ ปรากฏเข้มข้นมากที่สุดในชั่วโมงการหมักที่ 6 จางลงในชั่วโมงการหมักที่ 12 และไม่ปรากฏในชั่วโมงการหมักที่ 18 และ 24 จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบบที่ปรากฏพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับยีสต์และราในสกุล *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถตรวจพบได้ในคีเฟอร์และเม็คคีเฟอร์ (Leite et al., 2013) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ตรวจพบการแสดงออกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชั่วโมงการหมักต่าง ๆ จากผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์ราในตัวอย่างคีเฟอร์ แสดงดังข้อ 4.2.1.1 แม้ว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและ ยีสต์และราที่ตรวจพบจะมีจำนวนมากกว่า $10^1 \log_{10}$ CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณน้อยที่สุดที่เทคนิค PCR-DGGE สามารถวิเคราะห์ได้ (Chahorm and Prakitchaiwattana, 2018) อย่างไรก็ตามยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอต (Shao et al., 2018) ประกอบด้วยจำนวนโครโมโซม (multiple chromosomes) จำนวนมากกว่าแบคทีเรีย (โดยมากพบ single circular chromosome) ดังนั้นจากอัตราส่วนที่

ใกล้เคียงกันของจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม ส่งผลให้มีสารพันธุกรรมของยีสต์มากกว่าสารพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบ จากรายงานการศึกษาที่ก่อนหน้านี้พบว่าจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญ ที่ส่งผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะสามารถตรวจพบได้ (Neilson et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง โดยการที่ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจเป็นผลจากการที่สารพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกถูกสารพันธุกรรมของยีสต์ที่มีจำนวนมากกว่าในระบบบดบังทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับยังบริเวณจำเพาะในขั้นตอน Annealing และเพิ่มจำนวนในขั้นตอน Extension ในระหว่างกระบวนการ PCR ได้ และแม้ว่าจะมีการตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกในซีเฟอร์ อย่างไรก็ตามสถานะที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ RNA ที่แตกต่างกัน ดังนั้นคาดว่าสถานะในกระบวนการหมักในช่วงเวลาที่ศึกษา อาจเป็นช่วงเวลาที่แบคทีเรียกรดแลคติกไม่มีการดำเนินไปของกิจกรรม ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ RNA ในช่วงเวลาดังกล่าวได้ (Klump and Hwa, 2014) อย่างไรก็ตามหลังจากการแสดงออกของ RNA และจะสามารถตรวจพบ RNA ในระบบได้ในระยะเวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง เนื่องจาก RNA จะเกิดการสลายตัว ดังนั้นสาเหตุดังกล่าวจึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัย ซึ่งส่งผลให้ไม่พบการแสดงออกของ RNA ในบางช่วงของระยะเวลาในการหมัก ซึ่งการตรวจพบ RNA ของจุลินทรีย์ใด ๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก สามารถบ่งชี้ได้ว่า จุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการแสดงออก (expression) จนถึงการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (overexpression) ในระบบ (Chhetri et al., 2019)

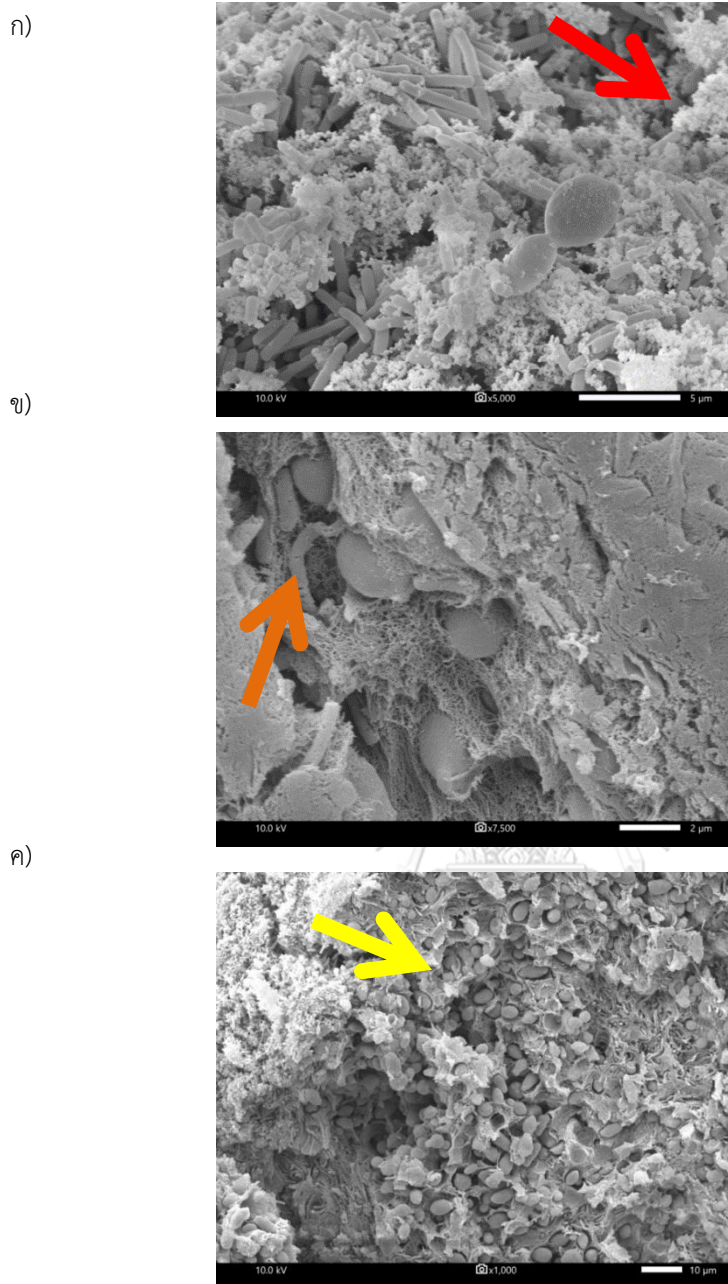
จากผลการทดลองในขั้นตอนดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์กลุ่มหลักที่มีการแสดงออกของกิจกรรมมากที่สุดในการหมักซีเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราในซีเฟอร์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (แสดงดังข้อ 4.3.1) และพบว่ายีสต์ในกลุ่มดังกล่าวมีความสามารถในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารให้กลิ่นรสในกลุ่มของ 2-phenylethanol ซึ่งให้กลิ่นรส unclean, rose และ violet-like ซึ่งเป็นกลิ่นรสสำคัญในทางอุตสาหกรรม พบได้ทั้งในไวน์ ผลิตภัณฑ์เนยแข็ง และซีเฟอร์ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในการย่อยสลายน้ำตาล และกรดอะมิโน (phenylalanine) (Wittmann et al., 2002) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบสารเมตาบอไลต์ในการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในงานวิจัยนี้ (แสดงดังข้อ 4.2.2)

4.3.3 ศึกษาลักษณะการรวมตัวของประชากรจุลินทรีย์ในเม็คคีเฟอร์โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

การศึกษาในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปโครงสร้างของจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวภายนอก บริเวณรอยต่อภายนอกและภายใน และบริเวณภายในเม็คคีเฟอร์ 5 โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

จากการศึกษาพบว่าบริเวณพื้นผิวภายนอกของเม็คคีเฟอร์ (แสดงดังภาพ 4.23ก) ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดแท่งอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น และมีโครงสร้างลักษณะคล้ายฟองน้ำ (Schwan et al., 2015) คาดว่าเป็นโครงสร้างของคีเฟอร์แรน (kefiran) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้น (ลูกศรชี้ ดังภาพที่ 4.21ก) บริเวณรอยต่อภายนอกและภายในเม็คคีเฟอร์ ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดแท่ง และยีสต์ (แสดงดังภาพ 4.21ข) และบริเวณภายในเม็คคีเฟอร์ประกอบด้วยยีสต์อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น (แสดงดังภาพ 4.21ค) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษา ก่อนหน้าของ Sivieri และคณะ (2017) โดยพบลักษณะการรวมกลุ่มของประชากรจุลินทรีย์ในตัวอย่างเม็คคีเฟอร์ในลักษณะเดียวกันนี้ โดยภายนอกของเม็คคีเฟอร์ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดแท่งอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น และบริเวณภายในเม็คคีเฟอร์ประกอบด้วยยีสต์อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น (Garofalo et al., 2015b, Sivieri et al., 2017) โดยผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในเม็คคีเฟอร์ โดยยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในคีเฟอร์ เป็นยีสต์ที่เจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ เช่น *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Kazachstania exigua* ดังนั้นจึงพบได้มากกว่าที่บริเวณภายในของเม็คคีเฟอร์



ภาพที่ 4.21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงองค์ประกอบของ จุลินทรีย์ (ก) บริเวณพื้นผิว (กำลังขยาย 5,000x) (ข) บริเวณรอยต่อภายนอกและภายใน (กำลังขยาย 7,500x) (ค) บริเวณภายในของเมดซีเฟอร์ 5 (กำลังขยาย 1,000 เท่า) ของ เมดซีเฟอร์ 5

ลูกศรสีแดงแสดงโครงสร้างลักษณะคล้ายฟองน้ำบริเวณพื้นผิวภายนอกลูกศรสีส้มแสดง ตำแหน่งของเซลล์แบคทีเรีย และลูกศรสีเหลืองแสดงตำแหน่งเซลล์ยีสต์

จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ สามารถคัดแยกเม็ตซีเฟอร์ที่พบได้ในประเทศไทย ซึ่งมีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก โดยคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตซีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกมีความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากกระบวนการหมัก สอดคล้องและตรงตามมาตรฐานการกำหนดของ Codex และได้ค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม มีเนื้อสัมผัสลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวซึ่งเป็นลักษณะของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และจุลินทรีย์กล้ำเชื้อคีเฟอร์ (แบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และรา) มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยมีความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือแร่ ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กของมนุษย์ ซึ่งมีส่วนช่วยในการส่งเสริมคุณภาพของคีเฟอร์ที่ได้ และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และ $^1\text{H-NMR}$ ร่วมกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร พบว่าคีเฟอร์ที่ได้จากเม็ตซีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกมีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยาก ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสำคัญต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้ได้มาซึ่งข้อมูลของแบบแผนทางชีวโมเลกุล รวมถึงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งบอกถึงอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในประเทศไทย ผลการวิเคราะห์ระดับชนิดจุลินทรีย์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA/RNA พบว่าประชากรแบคทีเรียกลุ่มหลัก ได้แก่ *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus kefir* และ *Bacillus subtilis* และ ประชากรยีสต์กลุ่มหลัก ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania unisporea* และ *Kazachstania* spp. ซึ่งมีรายงานเบื้องต้นถึงสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในเชิงสุขภาพของกล้ำเชื้อคีเฟอร์และผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในประเทศไทย ซึ่งมีความสำคัญในการพัฒนาต่อ ยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ (functional food) ในระดับอุตสาหกรรมได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเม็ดสีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักคีเฟอร์ โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างกรด ค่าความหนืดของคีเฟอร์ และอัตราการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์กล้าเชื้อในเม็ดสีเฟอร์ ในระหว่างกระบวนการหมัก คัดเลือกเม็ดสีเฟอร์ซึ่งมีประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น พิจารณาจากความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือ น้ำดี วิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและระเหยยากในคีเฟอร์ โดยเทคนิคทางเมตาโบลอมิกส์ โดยการวิเคราะห์ด้วย headspace SPME-GC/MS และ $^1\text{H-NMR}$ และวิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ 1. การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ โดยศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า 2. การคัดเลือกเม็ดสีเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น และศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ที่ได้ 3. วิเคราะห์ระบุชนิดประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดสีเฟอร์ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ส่วนที่ 1 การทดสอบความใช้ได้ของการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า จากการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy และประมวลผลโดยการระบุชนิดสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของตัวอย่างแต่ละผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า พบว่า เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้ศึกษาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมได้ทั้งหมด 49 สาร ครอบคลุมสารในกลุ่มของ กรดอะมิโนและอนุพันธ์ แอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ ไขมันและอนุพันธ์ สารประกอบคาร์บอนิล และอื่นๆ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์

ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้า ด้วยเทคนิค PCA และ HCA พบว่าสามารถแยกข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในกลุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตและคีเฟอร์ออกจากกันอย่างชัดเจน พบว่าสามารถใช้ค่าปริมาณสัมพัทธ์ของ sucrose, lactose, citrate และ fumarate เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต และสามารถใช้อัตราส่วนสัมพัทธ์ของ ethanol, acetate/aminobutyrate และ propylene glycol เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อกลุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์คีเฟอร์

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกเม็ตคีเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น และศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของคีเฟอร์ โดยการศึกษาประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก จะพิจารณาจากความสามารถในการสร้างกรด ค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ได้ และอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กล้าเชื้อ พบว่าสามารถพบกล้าเชื้อคีเฟอร์ในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการหมักสูง เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีค่าความเป็นกรดและความหนืดเหมาะสม และมีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ผลจากการวิเคราะห์ทางเมตาโบลอมิกส์สามารถระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายได้รวม 39 สาร โดยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากได้รวม 51 สาร โดยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และ $^1\text{H-NMR}$ ในคีเฟอร์ ซึ่งประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หลายกลุ่มที่มีความสำคัญต่อคุณภาพด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ด้วยเทคนิค PCA และ HCA พบว่าสามารถแยกข้อมูลสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและชนิดระเหยยากระหว่างกลุ่มตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ และคีเฟอร์ทางการค้าได้อย่างชัดเจน และสามารถระบุชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ที่สารที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อแยกความแตกต่างของคีเฟอร์ทั้ง 2 กลุ่มได้

ส่วนที่ 3 การวิเคราะห์ความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตคีเฟอร์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และมีสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นที่ดีที่สุด โดยผลการวิเคราะห์ระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S/26S rDNA/RNA พบว่าประชากรแบคทีเรียกลุ่มหลัก ได้แก่ *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus kefir* และ *Bacillus subtilis* และประชากรยีสต์กลุ่มหลัก ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania*

unispora และ *Kazachstania* spp ซึ่งมีรายงานเบื้องต้นถึงสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และผลการวิเคราะห์ระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ไม่พบการแสดงออกของกิจกรรมแบบที่เรียกรวดแลคติกในชั่วโมงการหมักที่ศึกษา อย่างไรก็ตามพบว่า *Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์กลุ่มหลักที่มีการแสดงออกของกิจกรรมมากที่สุดในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบสารเมตาบอไลต์ในการศึกษาข้อมูลสารเมตาบอไลต์ทั้งชนิดระเหยง่ายและระเหยยาก ในงานวิจัยนี้

ในประเทศไทยพบการผลิตคีเฟอร์ภายในครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมขนาดเล็กโดยได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังขาดข้อมูลสนับสนุนในเชิงวิชาการ พบเพียงแต่คำกล่าวอ้างถึงประโยชน์ในเชิงสุขภาพด้านต่างๆ ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงข้อมูลอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลและจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในเชิงสุขภาพของกล้าเชื้อคีเฟอร์และผลิตภัณฑ์คีเฟอร์ในประเทศไทย ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเชิงหน้าที่ (functional food) ในระดับอุตสาหกรรมได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในปัจจุบันข้อจำกัดด้านข้อมูลอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลและความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและชนิดระเหยยาก ด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS และ $^1\text{H-NMR}$ ในตัวอย่างคีเฟอร์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักซึ่งได้จากจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่มีความหลากหลาย สามารถวิเคราะห์และระบุชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพทางมีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังวิเคราะห์ระบุชนิดจุลินทรีย์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA/RNA เพื่อวิเคราะห์ถึงความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และสารเมตาบอไลต์ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้น ในอนาคตอาจจะมีการพัฒนาข้อมูลโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเมดิคีเฟอร์จากแหล่งที่มาที่หลากหลายมากขึ้นจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย และมีการทดลองกับกลุ่มตัวอย่างชุดที่ใหญ่ขึ้นเพื่อตรวจสอบถึงความสม่ำเสมอและความถูกต้องของผลการทดลอง (validation) และสามารถนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ดังกล่าว ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาหารหมักในประเทศไทย อื่น ๆ เช่น ปลาาร้า

แหนดม หรือแบ่งข้าวหมกมาก เพื่อได้มาซึ่งข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล และใช้ในการระบุอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์อาหารหมักในประเทศไทย และนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการต่อยอดเพื่อพัฒนาในการควบคุมคุณภาพในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาหารหมักของไทยในอนาคต





ภาคผนวก ก

ข้อมูลโภชนาการ (nutrition facts) ของผลิตภัณฑ์และคีเฟอร์ทางการค้า

ตารางที่ ก.1 แสดงข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตและคีเฟอร์ทางการค้าในประเทศไทย คือ ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวน ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตีกวนที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก (*Bifidobacterium lactis*) เป็นส่วนประกอบ ของตราสินค้า A โยเกิร์ตชนิดคงตัวแบบออร์แกนิก ของตราสินค้า B และคีเฟอร์ทางการค้า ตราสินค้า E

ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์	ตราสินค้า A		ตราสินค้า B	ตราสินค้า F
	ผลิตภัณฑ์ โยเกิร์ตชนิดตี กวน	ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตชนิดตี กวนที่มีจุลินทรีย์โพร ไบโอติก (<i>Bifidobacterium lactis</i>) เป็นส่วนประกอบ	โยเกิร์ตชนิดคงตัว แบบออร์แกนิก	คีเฟอร์ทางการค้า
ไขมันทั้งหมด	3.5 ก.	4 ก.	3ก.	3.5 ก.
ไขมันอิ่มตัว	2.5 ก.	2.5 ก.	2 ก.	
โคเลสเตอรอล	15 มก.	15 มก.	10 มก.	
โปรตีน	5 ก.	4 ก.	3 ก.	4.5 ก.
คาร์โบไฮเดรต ทั้งหมด	19 ก.	17 ก.	9 ก.	3.3 ก.
ใยอาหาร	0 ก.	0 ก.	0 ก.	
น้ำตาล	14 ก.	15 ก.	0 ก.	
โซเดียม	70 มก.	70 มก.	40 มก.	

ภาคผนวก ข

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ข1 การเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งานของ microcentrifuge (Nanosep® Centrifugal Device)

นำ microcentrifuge (Nanosep® Centrifugal Device) มีผ่านรูกรองขนาดอนุภาค 3 กิโลเมตร มาเตรียมความพร้อมก่อนการใช้งาน เนื่องจากบริเวณรูกรองอาจจะมี glycerin เคลือบอยู่ โดยจะใส่น้ำ Milli-Q 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,800 $\times g$ จำนวน 5 ครั้ง โดยครั้งที่ 1-4 จะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และครั้งสุดท้ายจะปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิด microcentrifuge ด้วยพาราฟิล์ม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ข2 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

ข2.1 ส่วนประกอบของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

10 mM 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP)	1 มิลลิลิตร
300 mM KH_2PO_4	0.4083 กรัม
D_2O	1 กรัม
0.1 M NaOH	± 5 มิลลิลิตร
น้ำ Milli-Q	

การคำนวณปริมาณของ 10 mM TSP

น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ TSP คือ 172.27 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.172 \times 10}{1000} = 0.00172 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 10 \text{ mM ในปริมาตร } 10 \text{ mL} = 10 \times 0.00172 = 0.0172 \text{ กรัม}$$

การคำนวณปริมาณของ 300 mM KH_2PO_4

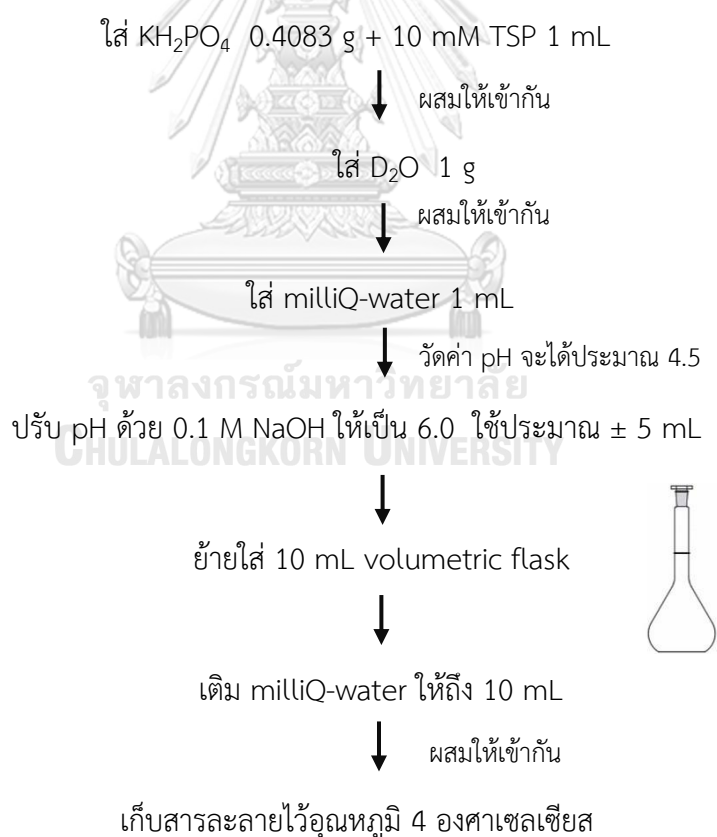
น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ KH_2PO_4 คือ 136.086 กรัมต่อโมล

$$1 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = \frac{0.13608 \times 10}{1000} = 0.0013608 \text{ กรัม}$$

$$\text{จะได้ } 300 \text{ mM in } 10 \text{ mL} = 300 \times 0.0013608 = 0.4083 \text{ กรัม}$$

ข2.2 วิธีเตรียมฟอสเฟตบัพเฟอร์

1. ชั่ง TSP 0.0172 กรัม ผสมกับน้ำ Milli-Q 10 มิลลิลิตร ตามที่คำนวณได้เตรียมไว้ จะได้ 10 mM TSP 10 มิลลิลิตร
2. ชั่ง 300 mM KH_2PO_4 0.4083 กรัม ที่ได้จากการคำนวณ และ D_2O 1 กรัม
3. ใส่ TSP ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร และน้ำ Milli-Q 1 มิลลิลิตร เพื่อช่วยในการละลาย
4. ปรับ pH ด้วย 0.1 M NaOH ให้ได้ pH 6.0
5. ปรับปริมาตรฟอสเฟตบัพเฟอร์ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ด้วยน้ำ Milli-Q ให้ได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้บัพเฟอร์เสถียรและมีประสิทธิภาพในการทำงาน



สรุปการเตรียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

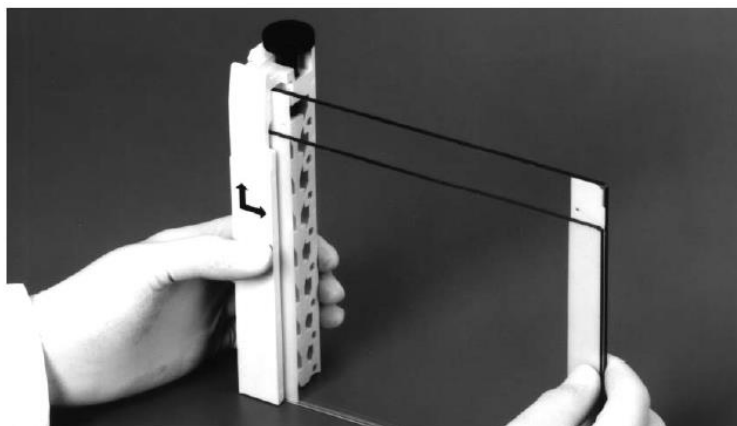
การประกอบเจลพอลิอะครีลาไมด์

DGGE with Dcode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA

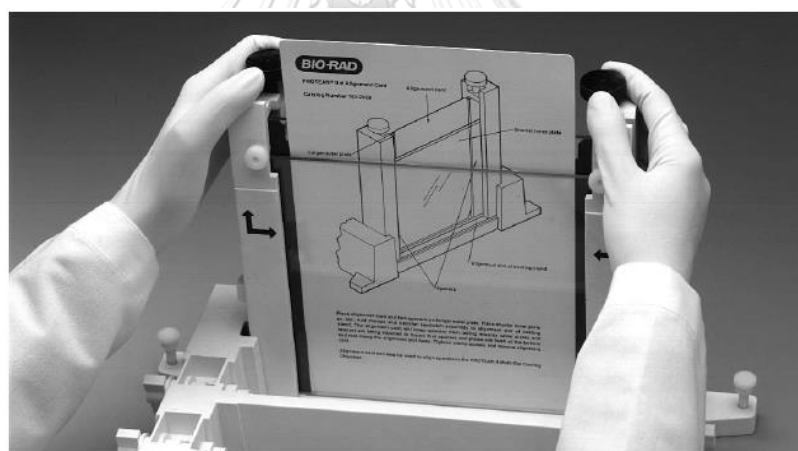
1. ล้างกระจก spacer และ combs ห้ามขัดถูผิวง้างให้แห้ง ประกอบชุดกระจกโดยสวมถุงมือในทุกขั้นตอน



2. ประกอบกระจกโดยวางกระจกแผ่นใหญ่ไว้ด้านล่าง วาง spacer ระหว่างกระจกทั้งสองข้าง วางกระจกแผ่นเล็กไว้ด้านบน Okdoyho นำกระจกที่ประกอบไว้ใส่ไปใน plate clamps และหมุนเกลียวให้แน่นพอที่จะสามารถยึดกระจกได้

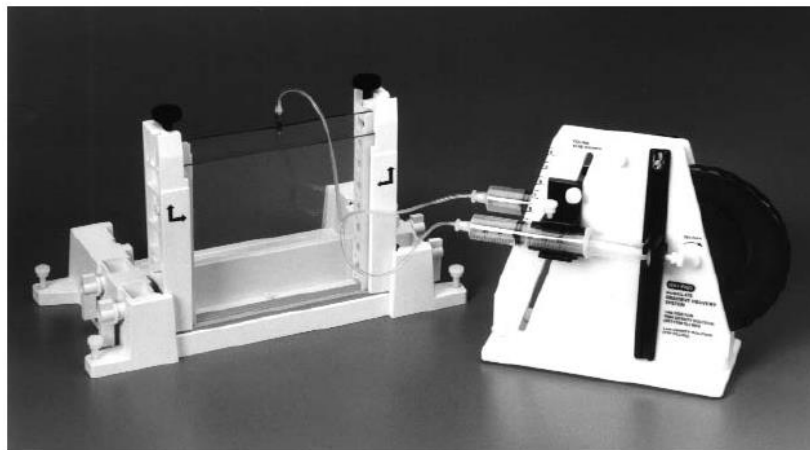


3. วางฟองน้ำลงบน casting stand แล้วยึดกระจกเข้ากับฐานของ casting stand

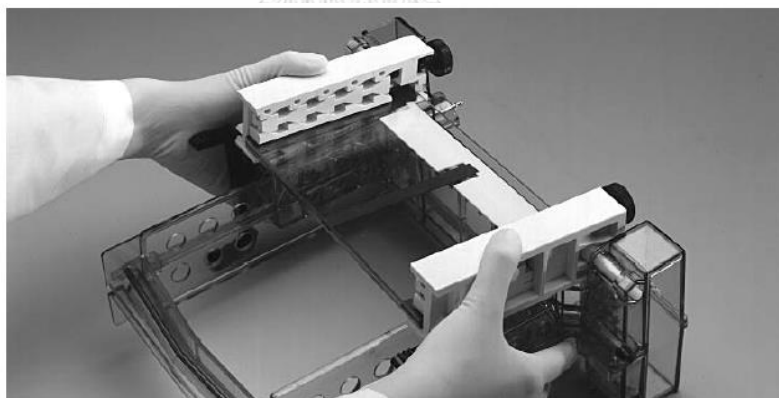


4. นำสารละลายเจล (gel solution) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 40 และ 70 ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมส่วนประกอบของสารให้เข้ากันและใช้ไซริงค์ดูดสารละลายที่เตรียมไว้ และประกอบเข้ากับชุด gradient delivery system

5. ค่อยๆปล่อยสารละลายเจล ลงในชุดกระจกที่ประกอบไว้ เสียบ comb ลงตรงกลางระวัง
ไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งเจลให้แข็งตัวข้ามคืน

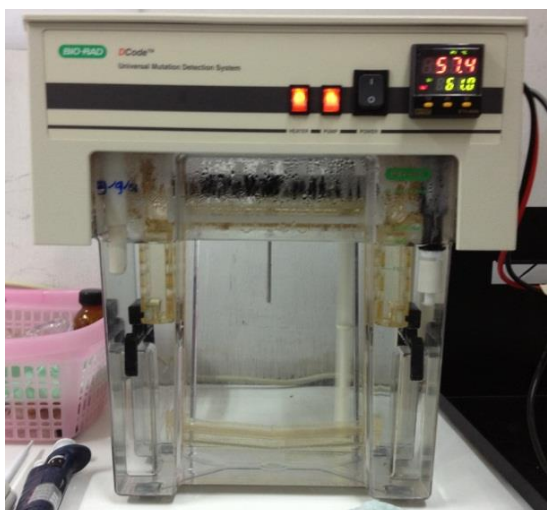


6. เมื่อเจลแข็งตัวให้ดึง comb ออก และนำชุดกระจกที่มีเจลอยู่ประกอบเข้ากับ sandwich core



7. นำ sandwich core ที่ประกอบไว้ ใส่ลงใน electrophoresis tank ที่บรรจุ running buffer (1XTAE buffer) ซึ่งให้ความร้อนไว้ล่วงหน้าแล้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

8. นำผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) อัตราส่วน 2:1 ใส่ลงในหลุมบนเจล และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ซีอาร์ภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงด้วยเครื่องเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System

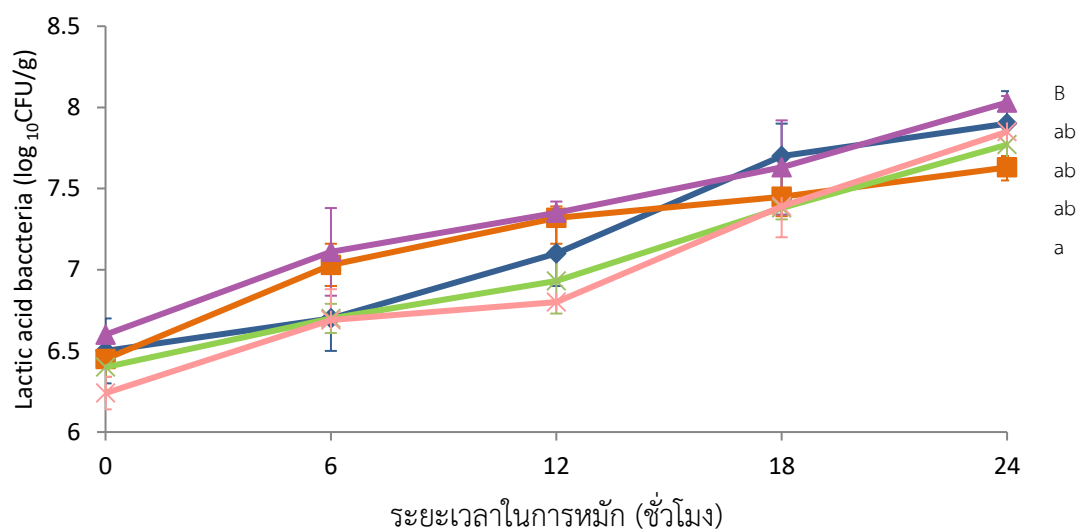


9. แกะแผ่นเจลออกจากกระบอก จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 25 นาที ล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 20 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation

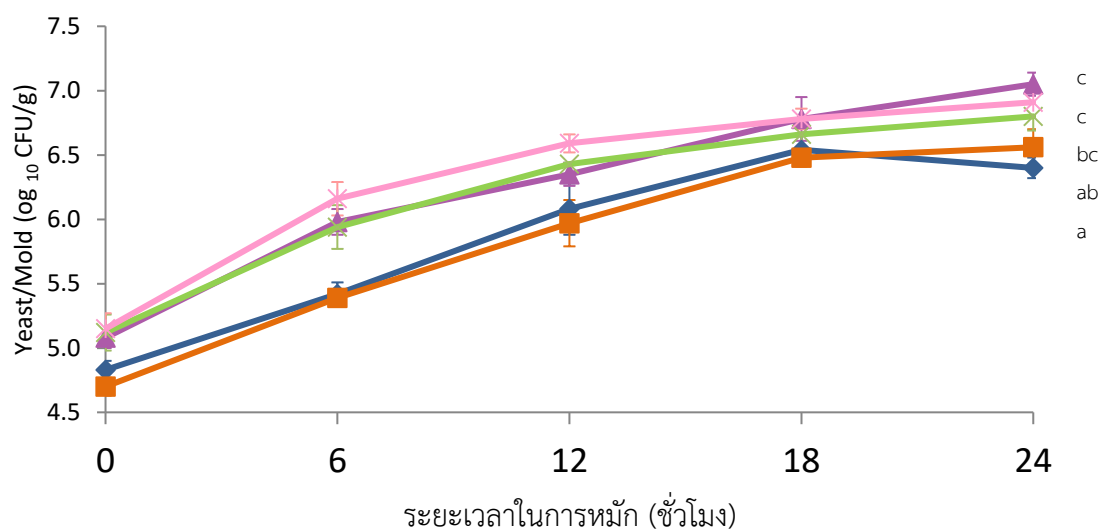
ภาคผนวก ง

รูปแบบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์

ก)



ข)



ภาพที่ ง.1 รูปแบบการเจริญของ (ก) แบคทีเรียกรดแลคติก และ (ข) ยีสต์และรา ในระหว่าง

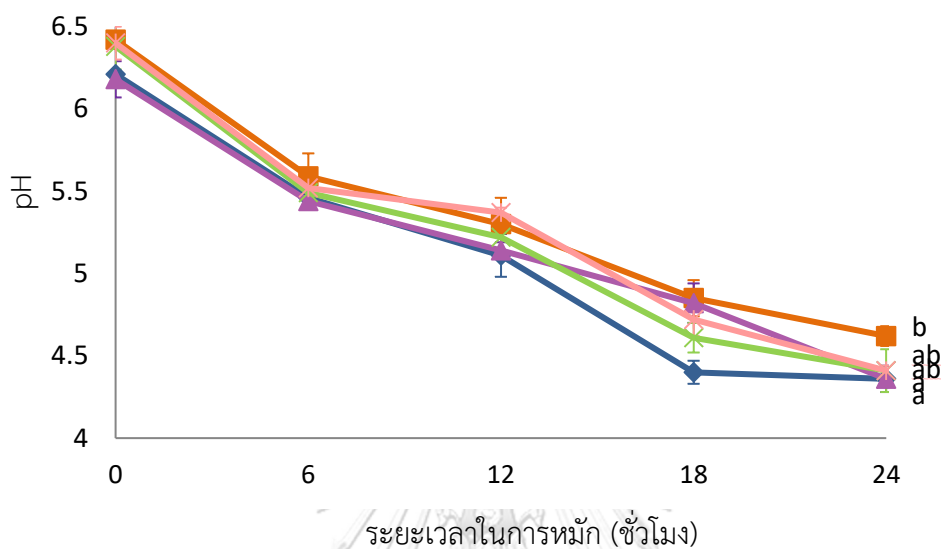
กระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยเม็ตคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ 1 (■) คีเฟอร์ 2 (■) คีเฟอร์ 3 (■) คีเฟอร์ 4 (■) และคีเฟอร์ 5 (■) ในห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

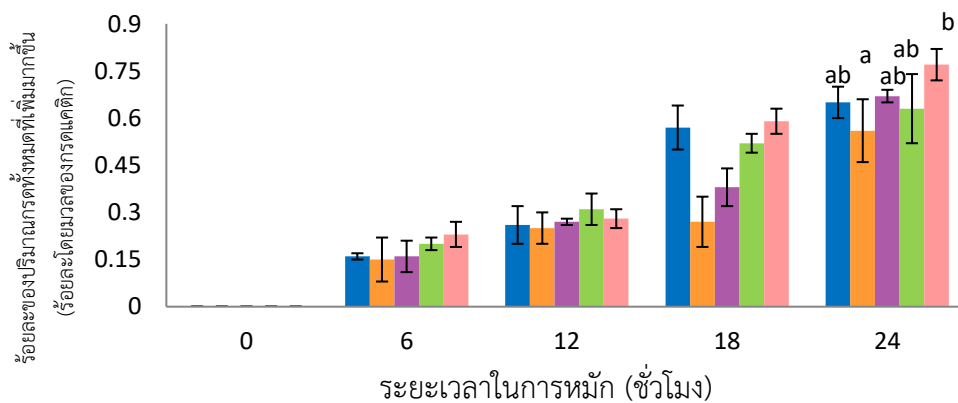
ภาคผนวก จ

รูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น

ก)



ข)



ภาพที่ จ.1 รูปแบบ (ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (ข) ปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มมากขึ้น

(ร้อยละโดยมวลของกรดแลคติก) ในระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ด้วยเมล็ดคีเฟอร์

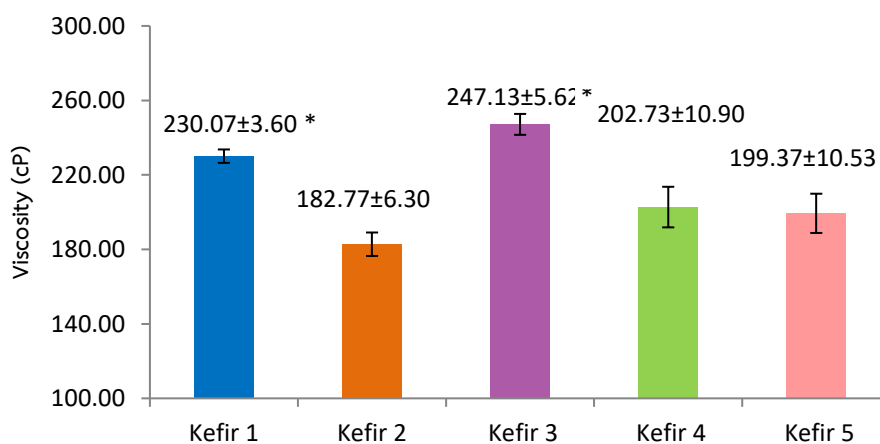
จากคีเฟอร์ 1 (■) คีเฟอร์ 2 (■) คีเฟอร์ 3 (■) คีเฟอร์ 4 (■) และคีเฟอร์ 5 (■)

ห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาคผนวก ฉ

ค่าความหนืดของคีเฟอร์

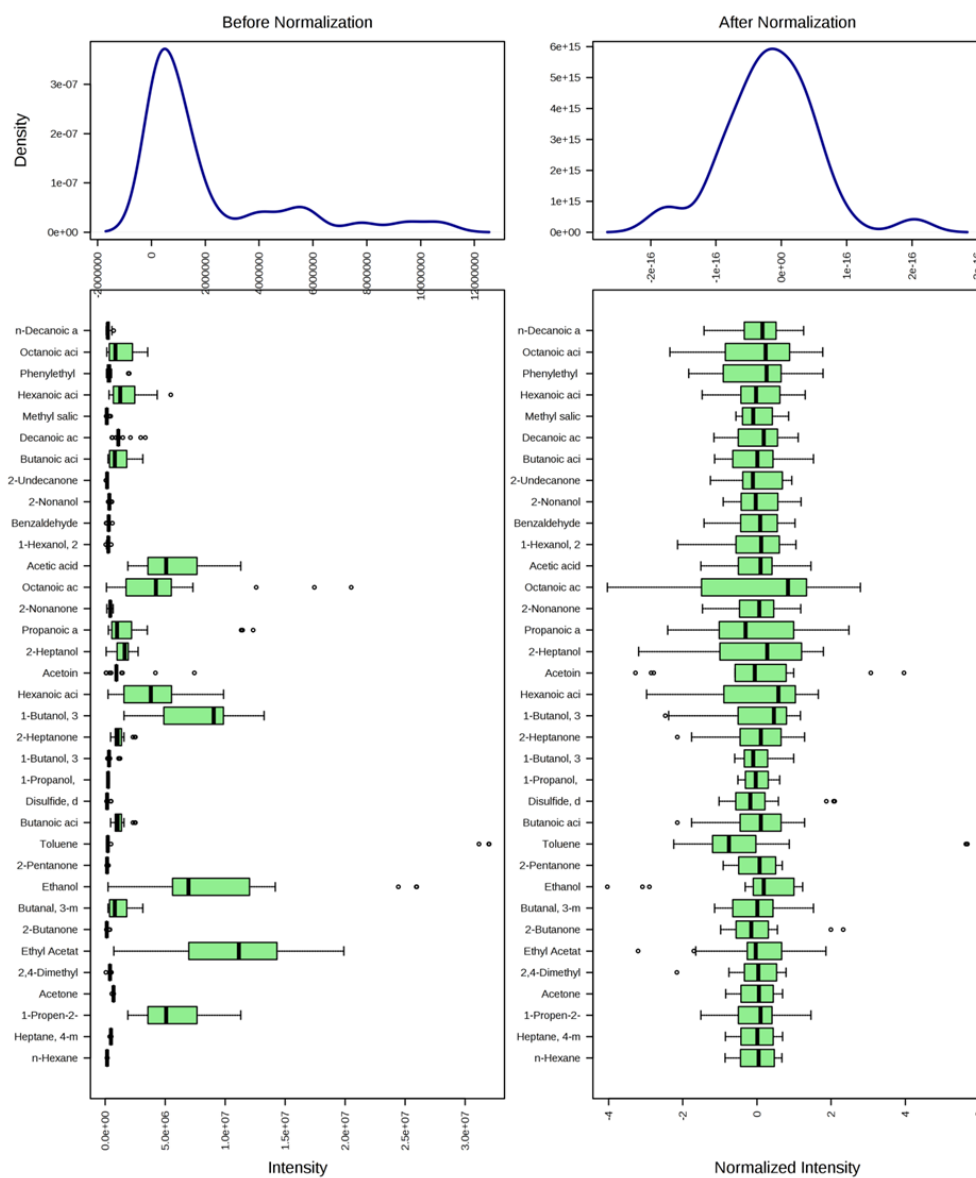


ภาพที่ ฉ.1 ค่าความหนืดของคีเฟอร์ที่ชั่วโมงการหมักที่ 24 โดยหมักด้วยเมื่อดคีเฟอร์ 1 (■) เมื่อดคีเฟอร์ 2 (■) เมื่อดคีเฟอร์ 3 (■) เมื่อดคีเฟอร์ 4 (■) และเมื่อดคีเฟอร์ 5 (■) ในห้องปฏิบัติการ

ภาคผนวก ข

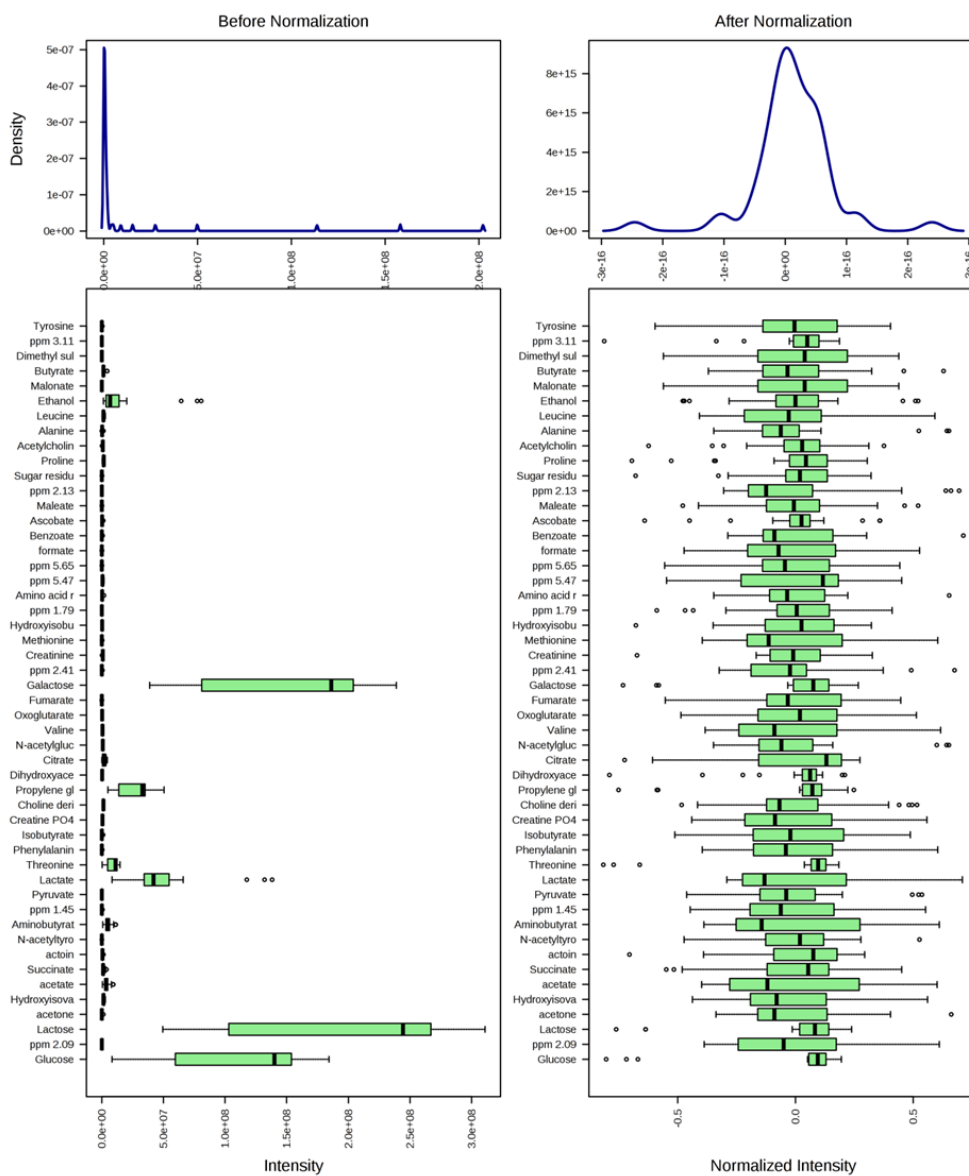
การแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบที่ง่ายต่อการนำไปวิเคราะห์ (normalize)

ข1 ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ระเหยง่าย



ภาพที่ ข. 1 รูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายก่อน (ก) และหลัง (ข) การจัดการข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบมาตรฐาน (normalize)

ช2 ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก



ภาพที่ ช.2 รูปแบบการกระจายตัวของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากในตัวอย่างคีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ตคีเฟอร์ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างคีเฟอร์ทางการค้า และนมยูเอชทีใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมักคีเฟอร์ ก่อน (ก) และหลัง (ข) การจัดการข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบมาตรฐาน (normalize)

ภาคผนวก ข

การประมวลข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยาก

ตารางที่ ข. 1 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยยากของผลิตภัณฑ์ไก่รีตและซีเฟอรทางการค้า

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	ผลิตภัณฑ์ไก่รีตทางการค้า				ผลิตภัณฑ์ซีเฟอรทางการค้า			
	โยเกิร์ต ตราสินค้า A	โยเกิร์ต ตราสินค้า A ดิก	โยเกิร์ต ตราสินค้า B	โยเกิร์ต ตราสินค้า C	ซีเฟอร ตราสินค้า D	ซีเฟอร ตราสินค้า E	ซีเฟอร ตราสินค้า F	ซีเฟอร ตราสินค้า F
กรดอะมิโน และอนุพันธ์								
Aminobutyrate	6.47±0.81 ^b	6.56±0.82 ^b	6.50±0.13 ^b	6.05±0.12 ^a	6.88±0.03 ^c	7.05±0.04 ^d	7.67±0.03 ^c	
Alanine	8.29±0.03 ^e	8.41±0.01 ^f	8.17±0.02 ^d	8.15±0.02 ^d	7.62±0.03 ^c	6.37±0.07 ^a	7.56±0.02 ^b	
Betaine	7.19±0.03 ^d	7.29±0.02 ^e	7.18±0.09 ^d	7.03±0.01 ^c	6.55±0.03 ^b	5.71±0.09 ^a	6.47±0.02 ^b	
Creatine	7.46±0.04 ^d	7.50±0.01 ^d	7.22±0.02 ^{bc}	7.28±0.04 ^c	7.25±0.03 ^{bc}	6.22±0.08 ^a	7.19±0.02 ^b	
Creatinine	7.05±0.03 ^d	7.15±0.02 ^e	6.99±0.01 ^c	6.91±0.02 ^b	6.03±0.03 ^b	6.00±0.05 ^a	6.02±0.03 ^b	
Isoleucine	5.89±0.10 ^{bcd}	5.72±0.15 ^b	5.93±0.13 ^{cd}	5.36±0.16 ^a	6.00±0.04 ^{de}	6.19±0.03 ^e	5.78±0.06 ^{bc}	
Leucine	7.94±0.03 ^f	8.00±0.01 ^g	7.85±0.04 ^e	7.78±0.03 ^d	7.59±0.03 ^c	6.67±0.03 ^a	7.51±0.02 ^b	
Methionine	5.12±0.20 ^b	5.21±0.05 ^b	5.27±0.14 ^b	4.90±0.13 ^a	5.32±0.06 ^{bc}	5.49±0.02 ^c	5.11±0.06 ^b	
N-Acetylserotonin	4.94±0.14 ^{bc}	4.47±0.10 ^{ab}	4.68±0.04 ^{bc}	4.10±0.52 ^a	5.01±0.06 ^c	5.07±0.05 ^c	4.92±0.42 ^{bc}	
N-Acetyltyrosine	4.22±0.29 ^b	3.85±0.23 ^{ab}	3.89±0.20 ^{ab}	3.65±0.22 ^a	4.34±0.04 ^b	4.36±0.17 ^b	4.32±0.62 ^b	
Phenylalanine	5.39±0.09 ^{bc}	5.08±0.09 ^b	5.22±0.10 ^{bc}	4.74±0.22 ^a	5.40±0.06 ^{bc}	5.49±0.04 ^c	5.34±0.34 ^{bc}	
Proline	7.29±0.08 ^d	7.40±0.04 ^d	7.32±0.14 ^d	7.08±0.04 ^c	7.00±0.03 ^c	6.49±0.03 ^a	6.84±0.02 ^b	
Tyrosine	5.27±0.14 ^c	4.76±0.15 ^{ab}	4.95±0.10 ^{abc}	4.66±0.29 ^a	5.27±0.04 ^c	5.33±0.07 ^c	5.14±0.48 ^{bc}	
Valine	5.82±0.21 ^b	5.83±0.17 ^b	5.96±0.15 ^{bc}	5.33±0.24 ^a	5.99±0.06 ^{bc}	6.16±0.07 ^c	5.80±0.15 ^b	

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	สารเมตาบอไลต์	ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า			ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า		
		โยเกิร์ต ตราสินค้า A	โยเกิร์ต ตราสินค้า B	โยเกิร์ต ตราสินค้า C	โยเกิร์ต ตราสินค้า D	โยเกิร์ต ตราสินค้า E	โยเกิร์ต ตราสินค้า F
กรดอะมิโนและ อนุพันธ์	Sarcosine	5.97±0.02 ^e	5.93±0.06 ^e	5.62±0.08 ^d	4.81±0.09 ^b	4.66±0.15 ^a	5.39±0.07 ^c
	Amino acid residues	5.80±0.07 ^b	5.68±0.17 ^b	5.29±0.15 ^a	5.60±0.05 ^{ab}	5.68±0.04 ^b	5.62±0.44 ^{ab}
แอลกอฮอล์	Ethanol	8.15±0.03 ^c	8.00±0.03 ^b	8.01±0.02 ^b	7.80±0.03 ^a	8.10±0.05 ^c	7.81±0.02 ^a
	Galactose	8.82±0.03 ^e	8.90±0.01 ^f	8.66±0.02 ^d	8.35±0.03 ^c	7.88±0.05 ^a	8.28±0.02 ^b
คาร์โบไฮเดรตและ อนุพันธ์	Glucose	8.73±0.04 ^d	8.82±0.01 ^e	8.57±0.02 ^c	8.23±0.03 ^b	6.95±0.10 ^a	8.16±0.02 ^b
	Lactose	8.84±0.03 ^e	8.93±0.01 ^f	8.70±0.02 ^d	8.47±0.03 ^c	7.81±0.05 ^a	8.42±0.02 ^b
N-Acetylglucosamine		7.47±0.06 ^e	7.48±0.04 ^e	7.22±0.03 ^d	6.78±0.03 ^c	6.26±0.05 ^a	6.64±0.02 ^b
	Sucrose	8.80±0.03 ^e	8.91±0.01 ^f	8.65±0.02 ^d	8.13±0.03 ^c	7.19±0.06 ^a	8.06±0.02 ^b
กรดอินทรีย์	Sugar residues	6.15±0.11 ^{bc}	6.33±0.05 ^c	5.83±0.08 ^{bc}	5.00±0.19 ^a	5.15±0.45 ^a	5.11±0.61 ^a
	Acetate	6.01±0.04 ^a	6.23±0.05 ^b	5.53±0.07 ^d	6.76±0.03 ^e	6.94±0.05 ^f	6.60±0.01 ^s
กรดอินทรีย์	Benzoate	5.32±0.14 ^b	5.21±0.09 ^{ab}	4.74±0.36 ^a	5.21±0.06 ^{ab}	5.10±0.12 ^{ab}	5.11±0.65 ^{ab}
	Butyrate	6.02±0.16 ^b	6.22±0.07 ^b	5.85±0.16 ^a	6.27±0.05 ^b	6.67±0.01 ^c	6.16±0.05 ^b
กรดอินทรีย์	Hydroxyisobutyrate	7.76±0.03 ^e	7.89±0.00 ^f	7.63±0.02 ^d	7.39±0.03 ^c	6.47±0.07 ^a	7.32±0.01 ^b
	Citrate	6.77±0.01 ^c	6.83±0.02 ^c	6.76±0.05 ^c	5.53±0.12 ^a	5.41±0.27 ^a	6.37±0.02 ^b
กรดอินทรีย์	Formate	5.27±0.03 ^c	4.95±0.07 ^b	5.04±0.05 ^{bc}	5.07±0.04 ^{bc}	4.18±0.15 ^a	4.87±0.26 ^b

ตารางที่ ช.1 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า					ผลิตภัณฑ์ซีฟองทางการค้า				
	โยเกิร์ต ตราสินค้า A	โยเกิร์ตโปรไบโอติก ตราสินค้า A	โยเกิร์ต ตราสินค้า B	โยเกิร์ต ตราสินค้า C	โยเกิร์ต ตราสินค้า D	ซีฟอง ตราสินค้า E	ซีฟอง ตราสินค้า F	ซีฟอง ตราสินค้า G	ซีฟอง ตราสินค้า H	ซีฟอง ตราสินค้า I
กรดอินทรีย์										
Fumarate	4.33±0.18 ^b	3.90±0.24 ^b	4.00±0.49 ^b	4.32±0.32 ^b	2.97±0.57 ^a	4.01±0.40 ^b	4.28±0.71 ^b			
Isobutyrate	5.89±0.10 ^{bcd}	5.72±0.15 ^b	5.93±0.13 ^{cd}	5.36±0.16 ^a	6.00±0.04 ^{de}	6.19±0.03 ^e	5.77±0.06 ^{bc}			
Lactate	7.84±0.02 ^b	7.79±0.03 ^b	7.84±0.04 ^b	7.72±0.03 ^a	7.81±0.02 ^b	8.12±0.04 ^c	7.69±0.02 ^a			
Malonate	4.88±0.42 ^a	5.25±0.15 ^a	5.18±0.21 ^a	4.62±0.81 ^a	5.16±0.06 ^a	4.85±0.12 ^a	5.19±0.07 ^a			
Oxoglutarate	5.77±0.23 ^a	5.90±0.10 ^a	5.91±0.13 ^a	5.68±0.15 ^a	5.75±0.05 ^a	5.87±0.04 ^a	5.83±0.03 ^a			
Propylene glycol	8.18±0.03 ^f	8.31±0.01 ^s	8.07±0.04 ^e	8.02±0.02 ^d	7.79±0.03 ^c	6.73±0.06 ^a	7.56±0.01 ^b			
Pyruvate	5.51±0.20 ^{abc}	5.65±0.12 ^{bc}	5.68±0.15 ^c	5.36±0.19 ^a	5.64±0.04 ^{bc}	5.67±0.02 ^c	5.41±0.06 ^{ab}			
Succinate	5.80±0.05 ^c	5.58±0.04 ^b	5.78±0.04 ^c	5.43±0.04 ^a	5.64±0.03 ^b	6.55±0.05 ^e	5.88±0.01 ^d			
Valerate* and derivatives	6.22±0.10 ^b	6.11±0.13	6.23±0.14 ^b	5.78±0.16 ^a	6.26±0.04 ^b	6.57±0.04 ^c	6.10±0.04 ^b			
ไขมันและ อนุพันธ์										
Acetylcholine	7.70±0.02 ^e	7.74±0.02 ^e	7.61±0.05 ^d	7.54±0.03 ^d	7.41±0.03 ^c	6.19±0.08 ^a	7.33±0.02 ^b			
Choline and derivatives	7.31±0.03 ^d	7.35±0.02 ^d	7.26±0.10 ^d	7.17±0.10 ^c	7.17±0.03 ^{bc}	6.26±0.06 ^a	7.06±0.01 ^b			
Glycerophosphocholine	8.29±0.03 ^e	8.37±0.01 ^f	8.13±0.02 ^d	8.12±0.02 ^d	7.96±0.05 ^c	7.50±0.05 ^a	7.91±0.01 ^b			
Phosphocholine	7.65±0.02 ^d	7.76±0.00 ^e	7.53±0.03 ^c	7.52±0.02 ^c	7.07±0.03 ^b	6.19±0.07 ^a	7.01±0.02 ^b			

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

สารประกอบ	ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทางการค้า						ผลิตภัณฑ์เฟออร์ททางการค้า					
	โยเกิร์ต ตราสินค้า A	โยเกิร์ต ตราสินค้า A	โยเกิร์ต ตราสินค้า B	โยเกิร์ต ตราสินค้า C	โยเกิร์ต ตราสินค้า D	โยเกิร์ต ตราสินค้า E	คีเฟอร์ ตราสินค้า A	คีเฟอร์ ตราสินค้า B	คีเฟอร์ ตราสินค้า C	คีเฟอร์ ตราสินค้า D	คีเฟอร์ ตราสินค้า E	คีเฟอร์ ตราสินค้า F
สารประกอบคาร์บอนิล												
Acetone	5.21±0.18 ^a	5.49±0.05 ^a	5.39±0.10 ^a	5.40±0.10 ^a	5.28±0.18 ^a	5.38±0.62 ^a	5.41±0.05 ^a					
Acetoin	6.01±0.12 ^a	6.10±0.03 ^a	6.07±0.15 ^a	5.86±0.15 ^a	5.84±0.09 ^a	6.05±0.34 ^a	5.88±0.08 ^a					
Dihydroxyacetone	5.86±0.04 ^{bc}	5.93±0.04 ^b	5.81±0.11 ^{bc}	5.61±0.13 ^{bc}	5.57±0.03 ^b	4.91±0.39 ^a	5.63±0.11 ^{bc}					
Maleate	4.91±0.20 ^a	4.78±0.13 ^a	4.40±0.32 ^a	4.74±0.12 ^a	4.600.12 ^a	4.38±0.30 ^a	4.63±0.53 ^a					
อื่น ๆ												
Dimethyl sulfone	4.88±0.43 ^a	5.250.15 ^a	5.180.20 ^a	4.62±0.81 ^a	5.16±0.06 ^a	4.85±0.11 ^a	5.19±0.07 ^a					
Glycerol	8.48±0.03 ^d	8.59±0.00 ^e	8.33±0.02 ^c	8.35±0.02 ^c	8.10±0.03 ^b	7.73±0.05 ^a	8.05±0.01 ^d					
Phenylpropionate	5.98±0.10 ^d	5.88±0.08 ^e	6.04±0.20 ^c	5.27±0.32 ^c	5.72±0.06 ^b	5.98±0.11 ^a	5.64±0.18 ^b					

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c, d, e, f และ g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ข. 2 ปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ได้ออกมาจากการหมักด้วยเชื้อราในห้อยปฏิบัติการ และนมยูเอชทีที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้น

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	สารเมตาบอไลต์	นมยูเอชที	เชื้อราที่ใช้จากการหมักด้วยเชื้อรา				
			คีเฟอร์ 1	คีเฟอร์ 2	คีเฟอร์ 3	คีเฟอร์ 4	คีเฟอร์ 5
กรดอะมิโนและ อนุพันธ์	Aminobutyrate	6.07±0.03 ^a	6.57±0.04 ^{bc}	6.51±0.04 ^b	6.58±0.02 ^{bc}	6.50±0.09 ^b	6.65±0.01 ^c
	Alanine	5.32±0.01 ^a	5.21±0.32 ^a	5.49±0.04 ^a	5.53±0.02 ^a	5.29±0.28 ^a	5.43±0.14 ^a
	Creatine	5.66±0.05 ^a	5.63±0.05 ^a	5.65±0.05 ^a	5.53±0.02 ^a	5.52±0.14 ^a	5.63±0.04 ^a
	Creatinine	6.03±0.01 ^a	5.94±0.05 ^a	5.96±0.04 ^a	5.93±0.03 ^a	5.94±0.12 ^a	5.96±0.05 ^a
	Isoleucine	5.85±0.03 ^b	5.74±0.09 ^{ab}	5.65±0.01 ^a	5.67±0.12 ^a	5.65±0.03 ^a	5.69±0.03 ^{ab}
	Leucine	6.26±0.02 ^b	5.8±0.16 ^a	6.04±0.01 ^{ab}	6.00±0.08 ^{ab}	5.92±0.15 ^a	5.96±0.08 ^a
	Methionine	5.00±0.07 ^a	4.76±0.24 ^a	4.94±0.05 ^a	4.83±0.03 ^a	4.70±0.29 ^a	4.82±0.15 ^a
	N-Acetylserotonin	4.43±0.17 ^a	4.40±0.09 ^a	4.32±0.15 ^a	4.76±0.11 ^a	4.67±0.26 ^a	4.43±0.14 ^a
	Phenylalanine	5.11±0.09 ^a	4.96±0.11 ^a	4.89±0.18 ^a	5.24±0.13 ^a	5.15±0.19 ^a	4.99±0.02 ^a
	Proline	5.94±0.04	5.77±0.10	5.81±0.08	5.77±0.03	5.77±0.18	5.79±0.09
	Tyrosine	4.79±0.18 ^{ab}	4.65±0.10 ^{ab}	4.26±0.51 ^a	5.08±0.12 ^b	4.94±0.40 ^{ab}	4.69±0.12 ^{ab}
	Valine	5.69±0.03 ^b	5.41±0.09 ^a	5.41±0.04 ^a	5.37±0.10 ^a	5.34±0.11 ^a	5.40±0.02 ^a
	Sarcosine	5.27±0.03	5.40±0.23	5.45±0.12	5.19±0.12	5.24±0.24	5.32±0.07
	Threonine	6.18±0.09	5.95±0.03	6.03±0.15	5.89±0.19	6.15±0.21	5.79±0.17

ตารางที่ ช.2 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	สารเมตาบอไลต์	นมยูเอชที	คีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยคีเฟอร์				
			คีเฟอร์ 1	คีเฟอร์ 2	คีเฟอร์ 3	คีเฟอร์ 4	คีเฟอร์ 5
กรดอะมิโนและ อนุพันธ์	Uridine	4.46±0.23 ^a	4.59±0.44 ^a	4.39±0.25 ^a	5.01±0.18 ^a	5.02±0.50 ^a	4.37±0.32 ^a
	Amino acid residues	5.87±0.06 ^b	5.54±0.12 ^a	5.5±0.11 ^{ab}	5.79±0.10 ^{ab}	5.77±0.16 ^{ab}	5.60±0.03 ^{ab}
แอลกอฮอล์	Ethanol	5.81±0.00 ^a	7.00±0.14 ^c	6.80±0.03 ^{bc}	6.75±0.14 ^b	6.95±0.03 ^{bc}	7.24±0.05 ^b
คาร์โบไฮเดรต และอนุพันธ์	Galactose	8.41±0.02 ^b	8.26±0.05 ^a	8.25±0.02 ^a	8.26±0.03 ^a	8.23±0.05 ^a	8.29±0.01 ^a
	Glucose	8.31±0.02 ^b	8.15±0.01 ^a	8.14±0.02 ^a	8.15±0.03 ^a	8.12±0.06 ^a	8.17±0.01 ^a
	Lactose	8.55±0.01 ^b	8.38±0.06 ^a	8.39±0.02 ^a	8.39±0.03 ^a	8.35±0.05 ^a	8.41±0.01 ^a
	N-Acetylglucosamine	6.31±0.02 ^b	5.94±0.08 ^a	5.96±0.05 ^a	6.05±0.08 ^a	6.08±0.08 ^a	5.97±0.03 ^a
	Fucose	5.56±0.02 ^{ab}	5.75±0.10 ^b	5.47±0.07 ^a	5.44±0.08 ^a	5.69±0.08 ^b	5.71±0.04 ^b
	Sugar residues	5.04±0.28	5.37±0.36	4.94±0.41	5.61±0.18	5.73±0.28	5.25±0.22
กรดอินทรีย์	Acetate	5.42±0.01	6.47±0.07	6.38±0.04	6.50±0.02	6.41±0.09	6.56±0.02
	Benzoate	5.10±0.09 ^a	4.99±0.04 ^a	4.94±0.20 ^a	5.31±0.13 ^a	5.22±0.33 ^a	5.02±0.06 ^a
	Butyrate	6.29±0.01 ^b	6.03±0.14 ^a	6.12±0.01 ^{ab}	5.98±0.07 ^a	5.98±0.15 ^a	6.03±0.08 ^{ab}
	Hydroxyisobutyrate	7.44±0.02 ^b	7.27±0.07 ^a	7.28±0.02	7.28±0.03	7.23±0.06	7.30±0.01
	Citrate	6.79±0.01 ^b	6.45±0.18 ^a	6.57±0.03 ^{ab}	6.43±0.03 ^a	6.44±0.08 ^a	6.48±0.08 ^a
	Formate	4.53±0.06 ^b	3.72±0.42 ^a	3.91±0.28 ^{ab}	4.16±0.09 ^{ab}	4.28±0.18 ^{ab}	4.04±0.11 ^{ab}

ตารางที่ ข.2 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	สารเมตาบอไลต์	นโมยเอชที	คีเพอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเม็ดคีเพอร์				
			คีเพอร์ 1	คีเพอร์ 2	คีเพอร์ 3	คีเพอร์ 4	คีเพอร์ 5
กรดอินทรีย์	Fumarate	3.83±0.15 ^a	3.47±1.23 ^a	3.91±0.12 ^a	4.45±0.19 ^a	4.15±0.92 ^a	3.94±0.32 ^a
	Isobutyrate	4.24±0.19 ^a	4.91±0.34 ^a	4.01±0.70 ^a	4.14±0.29 ^a	4.70±0.22 ^a	4.78±0.26 ^a
	Lactate	6.11±0.06 ^a	7.60±0.07 ^b	7.52±0.02 ^b	7.58±0.03 ^b	7.55±0.07 ^b	7.61±0.02 ^b
	Malonate	4.98±0.19 ^a	4.95±0.07 ^a	4.97±0.20 ^a	4.59±0.08 ^a	4.75±0.31 ^a	4.87±0.13 ^a
	Oxoglutarate	5.46±0.12 ^a	5.36±0.13 ^a	5.50±0.14 ^a	5.29±0.02 ^a	5.26±0.36 ^a	5.40±0.14 ^a
	Propylene glycol	7.68±0.02	7.52±0.06	7.52±0.02	7.53±0.03	7.49±0.06	7.55±0.01
	Pyruvate	5.56±0.01	5.32±0.11	5.39±0.03	5.41±0.05	5.32±0.19	5.40±0.08
	Succinate	5.17±0.04	6.10±0.05	6.07±0.04	6.21±0.05	6.08±0.11	6.21±0.01
	Valerate and derivatives	6.18±0.02 ^a	6.00±0.12 ^a	6.05±0.02 ^a	6.01±0.08 ^a	6.02±0.12 ^a	6.01±0.01 ^a
	Ascorbate	6.16±0.07 ^a	6.06±0.04 ^a	6.02±0.14 ^a	6.06±0.18 ^a	6.25±0.18 ^a	5.94±0.08 ^a
	Hippurate	5.23±0.09 ^a	4.97±0.11 ^a	4.91±0.21 ^a	5.26±0.12 ^a	5.18±0.28 ^a	4.94±0.07 ^a
	Hydroxyisovalerate	6.41±0.01 ^b	6.23±0.08 ^a	6.14±0.02 ^a	6.13±0.09 ^a	6.21±0.06 ^a	6.20±0.01 ^a
ไขมันและ อนุพันธ์	Acetylcholine	6.17±0.01 ^c	5.98±0.05 ^{ab}	5.99±0.02 ^{ab}	6.06±0.01 ^{bc}	5.93±0.08 ^a	6.04±0.03 ^{ab}

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ข.2 (ต่อ)

กลุ่มสารเคมี ประกอบ	สารเมตาบอไลต์	นมยูเอชที	คีเฟอร์ที่ได้จากการหมักด้วยเมดคีเฟอร์				
			คีเฟอร์ 1	คีเฟอร์ 2	คีเฟอร์ 3	คีเฟอร์ 4	คีเฟอร์ 5
ไขมันและ อนุพันธ์	Choline and derivative	5.98±0.04 ^{ab}	6.10±0.05 ^b	6.06±0.02 ^{ab}	5.93±0.05 ^a	6.05±0.11 ^{ab}	6.12±0.03 ^b
	Glycerophosphocholine	5.80±0.08 ^a	5.63±0.03 ^a	5.69±0.15 ^a	5.46±0.15 ^a	5.82±0.21 ^a	5.45±0.16 ^a
	Phosphocholine	6.29±0.02 ^b	6.12±0.03 ^a	6.13±0.05 ^a	6.19±0.03 ^{ab}	6.15±0.10 ^{ab}	6.14±0.04 ^a
สารประกอบ คาร์บอนิล	Acetyl carnithine	4.66±0.50 ^{ab}	4.79±0.08 ^b	4.76±0.34 ^b	3.37±0.95 ^a	4.53±0.43 ^{ab}	4.56±0.23 ^{ab}
	Acetone	5.07±0.03 ^b	4.21±0.47 ^a	4.80±0.08 ^{ab}	4.65±0.11 ^{ab}	4.46±0.38 ^{ab}	4.64±0.18 ^{ab}
	Acetoin	5.33±0.02 ^a	5.23±0.47 ^a	5.67±0.08 ^a	5.72±0.06 ^a	5.69±0.24 ^a	5.58±0.17 ^a
	Dihydroxyacetone	5.74±0.04 ^a	5.66±0.02 ^a	5.62±0.20 ^a	5.48±0.28 ^a	5.82±0.22 ^a	5.46±0.17 ^a
	Maleate	4.64±0.17 ^a	4.71±0.07 ^a	4.53±0.19 ^a	4.89±0.09 ^a	4.85±0.24 ^a	4.69±0.09 ^a
อื่นๆ	Dimethyl sulfone	4.99±0.19 ^a	4.95±0.07 ^a	4.97±0.20 ^a	4.59±0.07 ^a	4.75±0.31 ^a	4.88±0.13 ^a
	Glycerol	8.05±0.01 ^c	7.91±0.05 ^{ab}	7.90±0.21 ^{ab}	7.90±0.02 ^{ab}	7.85±0.04 ^a	7.95±0.01 ^b

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

- เย็นหทัย แน่นหนา. 2549. สเปกโทรสโกปี สำหรับเคมีอินทรีย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: 175-326.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 339). การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร. (3 สิงหาคม พ.ศ. 2554).
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 353) พ.ศ. 2556. นมเปรี้ยว. (24 กรกฎาคม พ.ศ. 2556).
- ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และมยุรี เหลืองวิไลย์. 2559. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 2560:1-16.
- ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และอัญชิสรา กุลทวีสุข. 2561. นมเปรี้ยวคีเฟอร์: เทคโนโลยีชีวภาพจากมุมมองวิทยาการด้านโอมิกส์. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 13(1):1-8

ภาษาอังกฤษ

- Abushelaibi, A., S. Al-Mahadin, K. El-Tarabily, N. P. Shah, and M. Ayyash. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology* 79:316-325.
- Adriana, N., M. Ilona, Ś. Katarzyna, L. Zdzisława, and K. Elżbieta. 2016. Adherence of probiotic bacteria to human colon epithelial cells and inhibitory effect against enteric pathogens – In vitro study. *International Journal of Dairy Technology* 69(4):532-539.
- Aghlara, A., S. Mustafa, Y. A. Manap, and R. Mohamad. 2009. Characterization of Headspace Volatile Flavor Compounds Formed During Kefir Production: Application of Solid Phase Microextraction. *International Journal of Food Properties* 12(4):808-818.
- Akal, C., Ş. Budak, and A. Yetisemiyen. 2018. Potential probiotic microorganisms in kefir. Pages 276-296.
- Altay, F., F. Karbancıoğlu-Güler, C. Daskaya-Dikmen, and D. Heperkan. 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation

- process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology* 167(1):44-56.
- 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.
- Anton, D., P. Raudsepp, M. Roasto, K. Meremäe, S. Kuusik, P. Toomik, P. Elias, K. Laikoja, T. Kaart, M. Lepiku, and T. Püssa. 2016. Comparative study of microbiological, chemical and sensory properties of kefir produced in Estonia, Latvia and Lithuania. *Journal of Dairy Research* 83(1):89-95.
- Aru, V., K. Sørensen, B. Khakimov, T. Toldam-Andersen, and S. Balling Engelsen. 2018. Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for ^1H -NMR Analysis. *Molecules* 23(1):160.
- Aryana, K. J. and D. W. Olson. 2017. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science* 100(12):9987-10013.
- Ayar, A., H. Sıçramaz, and İ. Çetin. 2016. The effect of bovine colostrum on the lactic flora of yogurt and kefir. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering* 3(4):1063.
- Baltasar, M., A. P. Tamara, F. María, K. Magdalena, Á. M. Pablo, and B. Jacek. 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Pages 3-33 in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*.
- Baschali, A., E. Tsakalidou, A. Kyriacou, N. Karavasiloglou, and A. L. Matalas. 2017. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Reviews* 30(1):1-24.
- Beckonert, O., H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon, and J. K. Nicholson. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* 2:2692.
- Bourrie, B. C., B. P. Willing, and P. D. Cotter. 2016. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology* 7:647.
- Burgé, G., C. Saulou-Bérion, M. Moussa, F. Allais, V. Athes, and H.-E. Spinnler. 2015. Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or

- Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *Journal of Microbiology* 53(10):702-710.
- Capozzi, F. and A. Trimigno. 2015. Using metabolomics to describe food in detail. Pages 203-229.
- Chahorm, K. and C. Prakitchaiwattana. 2018. Application of Reverse Transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods. *International Journal of Food Microbiology* 264:46-52.
- Chanprasartsuk, O., C. Prakitchaiwattana, and R. Sanguandeeikul. 2013. Comparison of methods for identification of yeasts isolated during spontaneous fermentation of freshly crushed pineapple juices. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15:1479-1490.
- Chen, C., S. Zhao, G. Hao, H. Yu, H. Tian, and G. Zhao. 2017. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*:1-15.
- Chen, Z., J. Shi, X. Yang, Y. Liu, B. Nan, and Z. Wang. 2016. Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides. *International Journal of Dairy Technology* 69(3):410-417.
- Chhetri, V., C. Prakitchaiwattana, and S. Settachaimongkon. 2019. A potential protective culture; halophilic *Bacillus* isolates with bacteriocin encoding gene against *Staphylococcus aureus* in salt added foods. *Food Control* 104:292-299.
- Chong, J., O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D. S. Wishart, and J. Xia. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research* 46(W1):W486-W494.
- Chong, J., M. Yamamoto, and J. Xia. 2019. MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights. *Metabolites* 9(3).
- Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dreesen, P. Glaser, and D. Jahn. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology* 182(11):3072-3080.
- da Silva, V. B. and M. P. da Costa. 2019. 11 - Influence of Processing on Rheological and Textural Characteristics of Goat and Sheep Milk Beverages and Methods of

- Analysis. Pages 373-412 in *Processing and Sustainability of Beverages*. A. M. Grumezescu and A. M. Holban, ed. Woodhead Publishing.
- Dan, T., D. Wang, R. L. Jin, H. P. Zhang, T. T. Zhou, and T. S. Sun. 2017. Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science* 100(4):2488-2500.
- De Filippis, F., E. Parente, and D. Ercolini. 2017. Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial Biotechnology* 10(1):91-102.
- Delong, R. K. and Q. Zhou. 2015. Experiment 6 - Polymerase Chain Reaction (PCR). Pages 59-66 in *Introductory Experiments on Biomolecules and their Interactions*. R. K. Delong and Q. Zhou, ed. Academic Press, Boston.
- Dertli, E. and A. H. Çon. 2017. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology* 85:151-157.
- Diosma, G., D. E. Romanin, M. F. Rey-Burusco, A. Londero, and G. L. Garrote. 2014. Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(1):43-53.
- Dobson, A., O. O'Sullivan, P. D. Cotter, P. Ross, and C. Hill. 2011. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS microbiology letters* 320(1):56-62.
- Domingues, L., P. M. R. Guimarães, and C. Oliveira. 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioeng Bugs* 1(3):164-171.
- Ebbels, T. M. D., J. C. Lindon, and M. Coen. 2011. Processing and Modeling of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Metabolic Profiles. Pages 365-388 in *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*. T. O. Metz, ed. Humana Press, Totowa, NJ.
- Emwas, A.-H. M. 2015. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. Pages 161-193 in *Metabonomics: Methods and Protocols*. J. T. Bjerrum, ed. Springer New York, New York, NY.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56(3):297-314.

- Erdogan, F. S., S. Ozarlan, Z. B. Guzel-Seydim, and T. Kok Tas. 2019. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Research International* 115:408-413.
- Foroutan, A., A. C. Guo, R. Vazquez-Fresno, M. Lipfert, L. Zhang, J. Zheng, H. Badran, Z. Budinski, R. Mandal, B. N. Ametaj, and D. S. Wishart. 2019. Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(17):4897-4914.
- French, D. 2017. Chapter Five - Advances in Clinical Mass Spectrometry. Pages 153-198 in *Advances in Clinical Chemistry*. Vol. 79. G. S. Makowski, ed. Elsevier.
- Furdíková, K., K. Makyšová, and I. Spáňik. 2017. Effect of Indigenous *S. cerevisiae* Strains on Higher Alcohols, Volatile Acids, and Esters in Wine. Vol. 35.
- G. L. Garrote, A. G. Abraham, and G. L. D. Antoni. 1997. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 30:77-84.
- Gao, J., F. Gu, J. He, J. Xiao, Q. Chen, H. Ruan, and G. He. 2013. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *European Food Research and Technology* 236(3):549-556.
- Gao, W. and L. Zhang. 2019. Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks. *Food Research International* 116:137-144.
- Gao, W., L. Zhang, Z. Feng, H. Liu, N. Shigwedha, X. Han, H. Yi, W. Liu, and S. Zhang. 2015. Microbial diversity and stability during primary cultivation and subcultivation processes of Tibetan kefir. *International Journal of Food Science & Technology* 50(6):1468-1476.
- Garibyan, L. and N. Avashia. 2013. Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology* 133(3):1-4.
- Garofalo, C., A. Osimani, V. Milanović, L. Aquilanti, F. De Filippis, G. Stellato, S. Di Mauro, B. Turchetti, P. Buzzini, D. Ercolini, and F. Clementi. 2015b. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* 49:123-133.

- Goldansaz, S. A., A. C. Guo, T. Sajed, M. A. Steele, G. S. Plastow, and D. S. Wishart. 2017. Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PloS one* 12(5):e0177675.
- Grønnevik, H., M. Falstad, and J. A. Narvhus. 2011. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal* 21(9):601-606.
- Gut, A. M., T. Vasiljevic, T. Yeager, and O. N. Donkor. 2019. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods* 58:56-66.
- Guzel-Seydim, Z. B., T. Kok-Tas, A. K. Greene, and A. C. Seydim. 2011. Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(3):261-268.
- Hati, S., S. Mandal, and J. Prajapati. 2013. *Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products*. Vol. 1.
- HÉBerger, K. 2008. Chapter 7 - Chemoinformatics—multivariate mathematical—statistical methods for data evaluation. Pages 141-169 in *Medical Applications of Mass Spectrometry*. K. Vékey, A. Telekes, and A. Vertes, ed. Elsevier, Amsterdam.
- Heine, R. G., F. AlRefaee, P. Bachina, J. C. De Leon, L. Geng, S. Gong, J. A. Madrazo, J. Ngamphaiboon, C. Ong, and J. M. Rogacion. 2017. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children - common misconceptions revisited. *World Allergy Organ J* 10(1):41-41.
- Hu, J.-B., S. Gunathilake, Y.-C. Chen, and P. L. Urban. 2014. On the dynamics of kefir volatome. *RSC Advances* 4(55):28865.
- Hu, J. Z., D. N. Rommereim, K. R. Minard, A. Woodstock, B. J. Harrer, R. A. Wind, R. P. Phipps, and P. J. Sime. 2008. Metabolomics in lung inflammation: a high-resolution (1)h NMR study of mice exposed to silica dust. *Toxicol Mech Methods* 18(5):385-398.
- Irigoyen, A., M. Ortigosa, S. GarcÍA, F. C. IbÁÑEz, and P. Torre. 2012. Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. *International Journal of Dairy Technology* 65(4):578-584.
- Jelen, H. H., M. Majcher, and M. Dziadas. 2012. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica Chimica Acta* 738:13-26.

- Jeong, D., D.-H. Kim, I.-B. Kang, H. Kim, K.-Y. Song, H.-S. Kim, and K.-H. Seo. 2017. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control* 78:436-442.
- Kabak, B. and A. D. W. Dobson. 2011. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(3):248-260.
- Kalamaki, M. S. and A. S. Angelidis. 2017. Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. *International Journal of Dairy Technology* 70(2):261-268.
- Kechagia, M., D. Basoulis, S. Konstantopoulou, D. Dimitriadi, K. Gyftopoulou, N. Skarmoutsou, and E. M. Fakiri. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr* 2013:481651-481651.
- Kesenkaş, H., O. Gürsoy, and H. Özbaş. 2017. Kefir. Pages 339-361.
- Kesmen, Z. and N. Kacmaz. 2011. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal of Food Science* 76(5).
- Kim, D.-H., D. Jeong, H. Kim, I.-B. Kang, J.-W. Chon, K.-Y. Song, and K.-H. Seo. 2016. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 36(6):787-790.
- Klein, M. S., M. F. Almstetter, G. Schlamberger, N. Nürnberg, K. Dettmer, P. J. Oefner, H. H. D. Meyer, S. Wiedemann, and W. Gronwald. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science* 93(4):1539-1550.
- Klumpp, S. and T. Hwa. 2014. Bacterial growth: global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition. *Current Opinion in Biotechnology* 28:96-102.
- Koh, W. Y., U. Utra, R. Ahmad, I. A. Rather, and Y. H. Park. 2018. Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains. *Food Science and Biotechnology* 27(5):1369-1376.
- Korsak, N., B. Taminiou, M. Leclercq, C. Nezer, S. Crevecoeur, C. Ferauche, E. Detry, V. Delcenserie, and G. Daube. 2015. Short communication: Evaluation of the

- microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of dairy science* 98(6):3684-3689.
- Kotova, I. B., T. A. Cherdyntseva, and A. I. Netrusov. 2016. Russian Kefir Grains Microbial Composition and Its Changes during Production Process. Pages 93-121 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 932.
- Koutinas, A. A. 2017. 1 - Fermented Dairy Products. Pages 3-24 in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. A. Pandey, M. Á. Sanromán, G. Du, C. R. Soccol, and C.-G. Dussap, ed. Elsevier.
- Kowalczyk, M., B. Mayo, M. Fernández, and T. Aleksandrak-Piekarczyk. 2015. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria in the Light of the “Omic” Technologies. Pages 1-18.
- Laureys, D. and L. De Vuyst. 2014. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 80(8):2564-2572.
- Laureys, D. and L. De Vuyst. 2017. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *Journal of Applied Microbiology* 122(3):719-732.
- Laureys, D., A. Van Jean, J. Dumont, and L. De Vuyst. 2017. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(7):2811-2819.
- Lee, S. M., Y. R. Hwang, M. S. Kim, M. S. Chung, and Y.-S. Kim. 2019. Comparison of Volatile and Nonvolatile Compounds in Rice Fermented by Different Lactic Acid Bacteria. *Molecules* 24(6):1183.
- Leite, A. M., B. Mayo, C. T. Rachid, R. S. Peixoto, J. T. Silva, V. M. Paschoalin, and S. Delgado. 2012a. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology* 31(2):215-221.
- Leite, A. M., M. A. Miguel, R. S. Peixoto, P. Ruas-Madiedo, V. M. Paschoalin, B. Mayo, and S. Delgado. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science* 98(6):3622-3632.
- Leite, A. M. O., D. C. A. Leite, E. M. Del Aguila, T. S. Alvares, R. S. Peixoto, M. A. L. Miguel, J. T. Silva, and V. M. F. Paschoalin. 2013. Microbiological and chemical

- characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science* 96(7):4149-4159.
- Likotrafiti, E., P. Valavani, A. Argiriou, and J. Rhoades. 2015. In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. *International Dairy Journal* 45:23-30.
- Lošdorfer Božič, A. and R. Podgoršek. 2017. pH Dependence of Charge Multipole Moments in Proteins. *Biophys Journal* 113(7):1454-1465.
- Luang-In, V. and S. Deeseenthum. 2016. Exopolysaccharide-producing isolates from Thai milk kefir and their antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology* 73:592-601.
- Luangwilai, M., K. Duangma, and S. Settachaimongkon. 2017. Comparative metabolomic profiling of liquid milk products in Thailand using ¹H-NMR technique. in Proc. The 29th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Swissôtel Le Concorde, Bangkok, Thailand.
- Maccaferri, S., A. Klinder, P. Brigidi, P. Cavina, and A. Costabile. 2012. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4):956.
- Machado de Oliveira Leite, A., M. Antonio Lemos Miguel, R. Peixoto, A. Rosado, J. Trajano Silva, and V. Paschoalin. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A Natural Probiotic Beverage. Vol. 44.
- Macori, G. and P. D. Cotter. 2018. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 49:172-178.
- Magalhaes, K. T., M. P. G. V. de, D. R. Dias, and R. F. Schwan. 2010. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(7):1241-1250.
- Maher, A. D. and S. J. Rochfort. 2014. Applications of NMR in dairy research. *Metabolites* 4(1):131-141.
- Makwana, M. and S. Hati. 2019. 1 - Fermented Beverages and Their Health Benefits. *Fermented Beverages*. Woodhead Publishing.

- Maldonado Galdeano, C., S. I. Cazorla, J. M. Lemme Dumit, E. Vélez, and G. Perdigón. 2019. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition and Metabolism* 74(2):115-124.
- Marsh, A. J., O. O'Sullivan, C. Hill, R. P. Ross, and P. D. Cotter. 2013. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PloS one* 8(7):e69371.
- Marshall, V. M. and H. L. Rawson. 1999. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology* 34(2):137-143.
- Martin-Cabrejas, M., Y. Aguilera, V. Benítez, and R. Reiter. 2017. Melatonin Synthesis in Fermented Foods. Pages 105-129.
- Masco, L., G. Huys, E. De Brandt, R. Temmerman, and J. Swings. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* 102(2):221-230.
- McAuliffe, O., K. Kilcawley, and E. Stefanovic. 2019. Symposium review: Genomic investigations of flavor formation by dairy microbiota. *Journal of Dairy Science* 102(1):909-922.
- McCarthy, O. J. 2011. *Rheology of Liquid and Semi-Solid Milk Products*. Vol. 4.
- McPhee, C., J. Reed, and I. Zubizarreta. 2015. Chapter 11 - Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Pages 655-669 in *Developments in Petroleum Science*. Vol. 64. C. McPhee, J. Reed, and I. Zubizarreta, ed. Elsevier.
- Menestrina, F., J. Osorio Grisales, and C. B. Castells. 2016. Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography. *Microchemical Journal* 128:267-273.
- Menezes, A. G. T., C. L. Ramos, G. Cenzi, D. S. Melo, D. R. Dias, and R. F. Schwan. 2019. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Miguel, M. G. d. C. P., P. G. Cardoso, L. d. A. Lago, and R. F. Schwan. 2010. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International* 43(5):1523-1528.

- Mozzi, F., M. E. Ortiz, J. Bleckwedel, L. De Vuyst, and M. Pescuma. 2013. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International* 54(1):1152-1161.
- Musteata, F. M. 2012. 11 - Ligand—Receptor Binding and Determination of Free Concentrations. Pages 383-397 in *Handbook of Solid Phase Microextraction*. J. Pawliszyn, ed. Elsevier, Oxford.
- Najafov, A. and G. Hoxhaj. 2017. Chapter 1 - Introduction. Pages 1-6 in *PCR Guru*. A. Najafov and G. Hoxhaj, ed. Academic Press.
- Nalbantoglu, U., A. Cakar, H. Dogan, N. Abaci, D. Ustek, K. Sayood, and H. Can. 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology* 41:42-51.
- Neilson, J. W., F. L. Jordan, and R. M. Maier. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 92(3):256-263.
- Nielsen, B., G. C. Gurakan, and G. Unlu. 2014. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 6(3-4):123-135.
- Noh, H. J., H. M. Seo, J. H. Lee, and Y. H. Chang. 2013. Physicochemical and Sensory Properties of Yogurt Supplemented with *Corni fructus* during Storage. *Preventive Nutrition and Food Science* 18(1):45-49.
- Oelschlaeger, T. A. 2010. Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology* 300(1):57-62.
- Pham, V. H. T. and J. Kim. 2012. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology* 30(9):475-484.
- Piras, C., F. Cesare Marincola, F. Savorani, S. B. Engelsens, S. Cosentino, S. Viale, and M. B. Pisano. 2013. A NMR metabolomics study of the ripening process of the Fiore Sardo cheese produced with autochthonous adjunct cultures. *Food Chemistry* 141(3):2137-2147.
- Plessas, S., C. Nouska, I. Mantzourani, Y. Kourkoutas, A. Alexopoulos, and E. Bezirtzoglou. 2016. Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. *Fermentation* 3(1):1.

- Pogacic, T., M. B. Maillard, A. Leclerc, C. Herve, V. Chuat, F. Valence, and A. Thierry. 2016. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(5):2335-2346.
- Prado, M. R., L. M. Bandon, L. P. Vandenberghe, C. Rodrigues, G. R. Castro, V. Thomaz-Soccol, and C. R. Soccol. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology* 6:1177.
- Ralli, E., M. Amargianitaki, E. Manolopoulou, M. Misiak, G. Markakis, S. Tachtalidou, A. Kolesnikova, P. Dais, and A. Spyros. 2018. NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. Pages 203-211 in *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*. G. A. Theodoridis, H. G. Gika, and I. D. Wilson, ed. Springer New York, New York, NY.
- Rosa, D. D., M. M. Dias, L. M. Grzeskowiak, S. A. Reis, L. L. Conceicao, and M. D. Peluzio. 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews* 30(1):82-96.
- Rowan, D. D. 2011. Volatile metabolites. *Metabolites* 1(1):41-63.
- Sanlidere Aloglu, H., E. Demir Ozer, and Z. Oner. 2016. Assimilation of cholesterol and probiotic characterisation of yeast strains isolated from raw milk and fermented foods. *International Journal of Dairy Technology* 69(1):63-70.
- Scalbert, A., L. Brennan, C. Manach, C. Andres-Lacueva, L. O. Dragsted, J. Draper, S. M. Rappaport, J. J. van der Hooft, and D. S. Wishart. 2014. The food metabolome: a window over dietary exposure. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99(6):1286-1308.
- Schwan, R. F., K. T. Magalhães-Guedes, and D. R. Dias. 2015. Kefir - Grains and Beverages: A Review. *Scientia Agraria Paranaensis* 14(1):1-9.
- Settachaimongkon, S., M. J. R. Nout, E. C. Antunes Fernandes, K. A. Hettinga, J. M. Vervoort, T. C. M. van Hooijdonk, M. H. Zwietering, E. J. Smid, and H. J. F. van Valenberg. 2014a. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 177:29-36.
- Settachaimongkon, S., M. J. R. Nout, E. C. Antunes Fernandes, T. C. M. van Hooijdonk, M. H. Zwietering, E. J. Smid, and H. J. F. Van Valenberg. 2014b. The impact of selected

- strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *International Dairy Journal* 38(1):1-10.
- Settachaimongkon, S., H. J. F. van Valenberg, I. Gazi, M. J. R. Nout, T. C. M. van Hooijdonk, M. H. Zwietering, and E. J. Smid. 2016. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. *Food Microbiology* 59:14-22.
- Shao, Y., N. Lu, Z. Wu, C. Cai, S. Wang, L.-L. Zhang, F. Zhou, S. Xiao, L. Liu, X. Zeng, H. Zheng, C. Yang, Z. Zhao, G. Zhao, J.-Q. Zhou, X. Xue, and Z. Qin. 2018. Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature* 560(7718):331-335.
- Shokryazdan, P., M. Faseleh Jahromi, J. B. Liang, and Y. W. Ho. 2017. Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition* 36(8):666-676.
- Sivieri, K., F. C. Freire, N. P. Lopes, C. T. D. Shiraishi, A. C. M. S. Pires, A. C. D. Lima, A. C. M. Zavarizi, L. Sgarbosa, and F. Bianchi. 2017. Synbiotic Yogurts and the Elderly. 259-271.
- Smid, E. J. and M. Kleerebezem. 2014. Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology* 5:313-326.
- Smit, G., B. A. Smit, and W. J. M. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29(3):591-610.
- Stefanovic, E., G. Fitzgerald, and O. McAuliffe. 2017. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology* 61:33-49.
- Tang, W., C. Li, Z. He, F. Pan, S. Pan, and Y. Wang. 2018. Probiotic Properties and Cellular Antioxidant Activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 Isolated from Tibetan Kefir Grains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 10(3):523-533.
- Temiz, H. and K. Dagyildiz. 2017. Effects of Microbial Transglutaminase on Physicochemical, Microbial and Sensorial Properties of Kefir Produced by Using Mixture Cow's and Soymilk. *Korean Journal for Food Science of Animal resources* 37(4):606-616.

- Terpou, A., A. Bekatorou, M. Kanellaki, A. A. Koutinas, and P. Nigam. 2017. Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. *Process Biochemistry* 55:1-10.
- Tu, R.-J., H.-Y. Wu, Y.-S. Lock, and M.-J. Chen. 2010. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. *Food Microbiology* 27(4):460-467.
- Tunick, M. H., S. K. landola, and D. L. Van Hekken. 2013. Comparison of SPME Methods for Determining Volatile Compounds in Milk, Cheese, and Whey Powder. *Foods* 2(4):534-543.
- Uriot, O., S. Denis, M. Junjua, Y. Roussel, A. Dary-Mouro, and S. Blanquet-Diot. 2017. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *Journal of Functional Foods* 37:74-89.
- Vieira, C. P., T. S. Álvares, L. S. Gomes, A. G. Torres, V. M. F. Paschoalin, and C. A. Conte-Junior. 2015. Kefir Grains Change Fatty Acid Profile of Milk during Fermentation and Storage. *PloS one* 10(10):e0139910.
- Walsh, A. M., F. Crispie, K. Kilcawley, O. O'Sullivan, M. G. O'Sullivan, M. J. Claesson, and P. D. Cotter. 2016. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *mSystems* 1(5):e00052-00016.
- Wang, J., Z. Xing, W. Tang, Y. Zheng, and Y. Wang. 2015. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of one *Lactococcus* from Kefir grain. *Food Science and Biotechnology* 24(5):1775-1780.
- Wishart, D. S. 2008. Metabolomics: Applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology* 19(9):482-493.
- Wittmann, C., M. Hans, and W. Bluemke. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 19(15):1351-1363.
- 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):91-109.
- Wszolek, M., B. Kupiec-Teahan, H. Skov Guldager, and A. Y. Tamime. 2007. Production of Kefir, Koumiss and other Related Products. Pages 174-216 in *Fermented Milks*. Blackwell Publishing Ltd.

- Xing, Z., W. Tang, W. Geng, Y. Zheng, and Y. Wang. 2017. In vitro and in vivo evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefiranofaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(6):2467-2477.
- Yerlikaya, O. 2019. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* 102(1):124-134.
- Yu, P., A. S.-L. Yeo, M.-Y. Low, and W. Zhou. 2014. Identifying key non-volatile compounds in ready-to-drink green tea and their impact on taste profile. *Food Chemistry* 155:9-16.
- Zago, M., M. E. Fornasari, D. Carminati, P. Burns, V. Suarez, G. Vinderola, J. Reinheimer, and G. Giraffa. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28(5):1033-1040.
- Zeng, X. Q., D. D. Pan, and Y. X. Guo. 2010. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *Journal of Applied Microbiology* 108(6):2059-2066.
- Zhou, J., X. Liu, H. Jiang, and M. Dong. 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology* 26(8):770-775.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	อัญชิสรา กุลทวีสุข
วัน เดือน ปี เกิด	3 กุมภาพันธ์ 2537
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง) จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2558 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2559
ที่อยู่ปัจจุบัน	99 ซ.วัดมหาพฤฒาราม ถนนสีพระยา แขวงมหาพฤฒาราม เขตบางรัก กทม. 10500
ผลงานตีพิมพ์	ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ อัญชิสรา กุลทวีสุข, 2561. นมเปรี้ยวคีเฟอร์: เทคโนโลยีชีวภาพจากมุมมองวิทยาการด้านโอมิกส์ Kefir: Biotechnology from “~omics” Perspectives. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 (มกราคม – มิถุนายน 2561). Kuntaveesuk, A., Prakitchaiwattana C. and Settachaimongkon, S., 2018. Molecular characterization of commercial yoghurt and kefir products in Thailand using ¹ H-NMR based metabolomics. Proceeding of The 20th Food Innovation Asia Conference 2018. Creative Food for Future and Sustainability. 14th Jun 2018. Bitech, Bangkok, Thailand
รางวัลที่ได้รับ	First Runner-up The oral presentation Award In Food Innovation Asia Conference 2018