ความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

ศตพร กันแก้ว

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2549

ความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

ศตพร กันแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ชื่อเรื่อง

ความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

โดย

ศตพร กันแก้ว

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ....

(อาจารย์ ดร.ธารารัตน์ ชื่อตอฟ)

วันที่...3...เดือน...เม.ย....พ.ศ...49...

กรรมการที่ปรึกษา ....

(อาจารย์ ดร.ศุภวัฒน์ สินสุวงศ์วัฒน์)

วันที่...3...เดือน...เม.ย....พ.ศ...49...

กรรมการที่ปรึกษา ....

(อาจารย์ ดร.ปิยะนุช บุญคุ้มเกล้า)

วันที่...3...เดือน...เม.ย....พ.ศ...49...

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร ....

(อาจารย์ ดร.สุชยา พิมพ์พิไล)

วันที่...3...เดือน...เม.ย....พ.ศ...49...

โครงการบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรงวุฒิ เพ็ชรประดับ)

รองประธานกรรมการโครงการบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่...7...เดือน...เม.ย....พ.ศ...49...

ชื่อเรื่อง	ความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหารเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก
ชื่อผู้เขียน	นายศตพร กันแก้ว
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.ธารารัตน์ ชือตอฟ

บทคัดย่อ

การผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมหลายประเภทมีของเสียที่เหลือจากกระบวนการผลิตหลายอย่าง ได้แก่ เศษวัตถุดิบ หรือผลพลอยได้จากการผลิตอาหารซึ่งต้องกำจัดเป็นปริมาณมากในแต่ละปี ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งที่จะนำเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตซึ่งยังคงมีสารอาหารอยู่มาใช้ประโยชน์ การศึกษานี้ได้นำน้ำเวย์ที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง น้ำมะพร้าวจากอุตสาหกรรมการผลิตกะทิ และกากมะเขือเทศที่เหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซอสมะเขือเทศมาใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สปีชีส์ ที่นิยมใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis* และ *Streptococcus thermophilus* โดยใช้น้ำที่ได้จากวัตถุดิบดังกล่าวร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานคือ GYP หรือ MRS ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดในอัตราส่วน 0, 20, 40, 60, 80, 100 เปอร์เซ็นต์ และ100 เปอร์เซ็นต์ผสมกลูโคส ผลการทดลองใช้น้ำจากวัตถุดิบทดแทนหรือเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอัตราส่วนที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดสำหรับ *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. lactis* และ *S. thermophilus* เป็นดังนี้ คือ น้ำเวย์ 60, 20, 100 เปอร์เซ็นต์ผสมกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ น้ำมะพร้าว 40, 40, 60 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และน้ำจากกากมะเขือเทศ 40, 80, 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลผลิตเซลจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดได้ค่าเซลสูงสุด 1.5×10^{8} ถึง 3.4×10^{9} cfu/ml จากการใช้เชื้อตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงในสภาวะเขย่า สรุปได้ว่าน้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำจากกากมะเขือเทศสามารถนำมาใช้เสริมหรือทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในสัดส่วนที่ต่างกันสำหรับการเลี้ยงเชื้อแต่ละสปีชีส์ ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารมาเพิ่มมูลค่าโดยการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลแบคทีเรียกรดแลคติกได้

Title	An Investigation of Possible Employment of Agricultural Wastes from Food Industries to Replace Synthetic Media in Culturing Lactic Acid Bacteria
Author	Mr.Sataporn Kankaew
Degree of	Master of Science in Food Technology
Advisor Committee Chairperson	Dr.Thararat Chitov

ABSTRACT

A large amount of agricultural wastes or by-products has been obtained along with food products from food industries, which is subject to disposal or other forms of waste management each year. Some agricultural wastes or by-products still have available nutrients for growth of microorganisms. This study investigated the possibility of making use of whey (from cheese production), coconut juice (from coconut milk production), and tomato extract (from tomato sauce production) in culturing lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria used in this study consisted of those that are commercially produced as diary starters, which are *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, and *Streptococcus thermophilus*. Waste preparations were incorporated into an appropriate culture medium (GYP or MRS) with the concentration of 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 %, and 100 % with addition of glucose. The maximum growth rate for *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. lactis*, and *S. thermophilus* was observed in a basal medium containing whey at 60 %, 20 %, 100 % with 0.5 % glucose, and 60 %, respectively, a basal medium containing coconut juice at 40 %, 40 %, 60 %, and 20 %, respectively, and a basal medium containing tomato extract at 40 %, 80 %, 40 %, and 20 %, respectively. All of the best preparation of media yielded the maximum cell concentration between 1.5×10^8 to 3.4×10^9 cfu/ml, using 10 % (v/v) inoculum, cultured in shaking condition. It can be concluded that concentration of waste preparation that can be best incorporated into a culture medium depends on bacterial species being cultured. Incorporation of these wastes into culture media in culturing lactic acid bacteria, therefore, is an alternative way to make use of and to increase the value of these wastes from the food industries.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธารารัตน์ ชือตอฟ อาจารย์ ดร.ศุภวัฒน์ สินสุวงศ์วัฒน์ และอาจารย์ ดร.ปิยะนุช บุญคุ้มเกล้า กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแก้ไขงานวิจัย ตลอดจนให้การดูแลเอาใจใส่จนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้ง รองศาสตราจารย์จีรวัฒน์ คมเศวต กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษาต่อ ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา รวมทั้งการอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย รวมทั้งภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อมงคล และคุณแม่ศิริพรรณ กันแก้ว ที่ได้ให้กำเนิด ให้การสนับสนุน ให้สติปัญญา ให้กำลังใจ และให้กำลังทรัพย์ ตลอดจนญาติพี่น้อง และเพื่อนๆ ที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจ และความช่วยเหลือต่างๆ ในการศึกษาจนได้สำเร็จการศึกษา และข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณครูบาอาจารย์ ตลอดจนอีกหลายท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และอบรมสั่งสอนข้าพเจ้าตั้งแต่เล็กจนโตตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ศตพร กันแก้ว
มีนาคม 2549

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
ABSTRACT	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญเรื่อง	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญตารางภาคผนวก	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ปัญหาและการเสียมูลค่าวัตถุดิบที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร	3
การใช้ประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้ที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหาร	3
แนวทางการใช้สารอาหารจากเศษวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมัก	4
ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกในด้านการใช้เป็นเชื้อตั้งต้น	8
การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์	11
วัตถุดิบที่มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในภาคเหนือ	16
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	23
จุลินทรีย์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	23
อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	23
วิธีการวิจัยและขั้นตอนการวิจัย	24
สถานที่ทำการวิจัย	28
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	66

หน้า

บรรณานุกรม 67

ภาคผนวก 73

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีเตรียม 74

ภาคผนวก ข การศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี drop plate และ pour plate 77

ภาคผนวก ค ตารางค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ 80

ภาคผนวก ง มูลค่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อลิตร 93

ภาคผนวก จ ประวัติผู้วิจัย 96

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด	7
2	ส่วนประกอบของน้ำเวย์	18
3	ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว	20
4	คุณค่าทางอาหารของมะเขือเทศ และผลิตภัณฑ์ในน้ำหนัก 100 กรัม	22
5	อัตราส่วนระหว่างน้ำวัตถุดิบ และอาหารเลี้ยงเชื้อ	27
6	จำนวนเซลที่มีชีวิตที่เลี้ยงโดยวิธี drop plate ในอาหาร GYP และ MRS โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %	31
7	จำนวนเซลที่มีชีวิตที่เลี้ยงโดยวิธี drop plate ในอาหาร GYP และ MRS โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	35
8	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	39
9	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	41
10	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	43
11	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	45
12	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	47
13	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	49
14	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	51
15	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	53
16	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	55

ตาราง		หน้า
17	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	57
18	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	59
19	ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	61
20	จำนวนเชื้อสูงสุดจากสัดส่วนของน้ำวัตถุดิบที่เลี้ยงเชื้อแล้วให้อัตราการเจริญที่ดีที่สุด	63

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
1	ค่าเซลที่มีชีวิตที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้วิธี drop plate เปรียบเทียบกับ pour plate ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดโดยวิธีใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	78
2	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหารเหลว MRS ผสมน้ำเวย์	81
3	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำเวย์	82
4	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำเวย์	83
5	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำเวย์	84
6	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมน้ำมะพร้าว	85
7	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว	86
8	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว	87
9	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว	88
10	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมน้ำกากมะเขือเทศ	89
11	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ	90
12	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ	91
13	ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ	92

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	กราฟการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %	32
2	กราฟการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS(△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %	32
3	กราฟการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP (■) และ MRS(△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %	33
4	กราฟการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP(■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %	33
5	กราฟการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร GYP(■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	36
6	กราฟการเจริญ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	36
7	กราฟการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP (■) และ MRS(△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	37
8	กราฟการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP(■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ	37
9	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	40
10	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	42
11	อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	44
12	อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์	46
13	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	48

ภาพ		หน้า
14	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	50
15	อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	52
16	อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์	54
17	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	56
18	อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	58
19	อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	60
20	อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์	62

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรม นอกจากจะได้อาหารที่ผลิตขึ้นได้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้วยังเกิดของเสียที่ใช้ประโยชน์ไม่ได้จากกระบวนการผลิต และผลพลอยได้จากการผลิตซึ่งไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล (molass) จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล, น้ำเวย์จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง เศษผัก และผลไม้จากอุตสาหกรรมแปรรูปผักผลไม้ และน้ำมะพร้าวจากอุตสาหกรรมผลิตกะทิ ซึ่งของเสียหรือผลพลอยได้ดังกล่าวหากไม่จำหน่ายต่อไปยังอุตสาหกรรมอื่นที่สามารถใช้ประโยชน์จากสิ่งของเหล่านี้ หรือนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์หรือปุ๋ยก็จะทำการบำบัดแล้วทิ้งเป็นของเสีย ซึ่งนอกจากจะมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดแล้วยังเป็นการเสียมูลค่าจากสารอาหารที่ยังคงเหลือซึ่งอาจจะนำไปใช้ประโยชน์ได้

เศษวัตถุดิบจากธรรมชาติที่มีมูลค่าทางการค้าต่ำ และผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ตามที่ได้กล่าวนี้ยังคงมีสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้เหล่านี้คือการนำมาผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเลี้ยงให้เกิดประโยชน์ได้ในเชิงพาณิชย์ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สมควรนำมาพิจารณา ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายชนิด โดยสามารถเปลี่ยนสารอาหารในวัตถุดิบให้เป็นกรดแลคติกซึ่งมีบทบาทในการถนอมอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแต่ละประเภท ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารหมักนิยมใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์ นอกจากช่วยให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลผลิตได้อย่างสม่ำเสมอดีกว่าการหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติแล้ว การใช้เชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์ยังลดอัตราการเจริญหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือเป็นเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย เนื่องจากอุตสาหกรรมอาหารหมักมีการขยายตัวมากขึ้นส่งผลให้มีความต้องการเชื้อตั้งต้นอาหารหมักเพิ่มมากขึ้น จึงเกิดอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อตั้งต้นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักขึ้นเป็นจำนวนมาก ได้แก่ เชื้อยีสต์สำหรับผลิตภัณฑ์ขนมอบและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์, เชื้อตั้งต้นแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น โดยปรกติในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เช่น De Man, Rogasa and Sharpe (MRS), All Purpose Medium (APT) และ Rogosa medium เป็นต้น (Atlas, 1993) แต่สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นการผลิตเชื้อตั้งต้นในปริมาณ

มากๆ การใช้อาหารสังเคราะห์ดังกล่าวทำให้ราคาของต้นทุนการผลิตจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น การศึกษานี้จึงมุ่งค้นคว้า และวิจัยหาวัตถุดิบจากธรรมชาติที่มีสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เสริมหรือทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ นอกจากเป็นการใช้ประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุธรรมชาติให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์ และลดปริมาณขยะอินทรีย์ที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมแล้วยังสามารถลดต้นทุนการผลิตเชื้อตั้งต้นได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เศษวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อเสริมหรือทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดของวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ และมีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจะเป็นแนวทางการใช้งานสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อตั้งต้นแบคทีเรียกรดแลคติก
2. เป็นการใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบที่ไม่มีประโยชน์ให้เกิดมูลค่าทางการค้า
3. อาจเป็นแนวทางในการกำจัดของเสียที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปัญหาการเสียมูลค่าวัตถุดิบที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหาร

ในกระบวนการผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรม สิ่งที่เกิดขึ้นนอกเหนือจากผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งจัดเป็นสินค้าที่มีมูลค่าในอุตสาหกรรมนั้นๆ มี 2 ประเภท ประเภทแรกคือผลพลอยได้จากการผลิตซึ่งยังมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอื่น เช่น กากน้ำตาลจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล, น้ำเวย์จากการผลิตเนยแข็ง และน้ำมะพร้าวที่เหลือจากอุตสาหกรรมผลิตกะทิ เป็นต้น ประเภทที่สองคือของเสียจากกระบวนการต่างๆ เช่น เศษวัตถุดิบทางการเกษตรที่ถูกคัดแยกออกจากกระบวนการผลิต ซึ่งต้องทำการกำจัดโดยการทิ้งเป็นขยะ ขายเป็นอาหารสัตว์หรือปุ๋ยซึ่งมีมูลค่าต่ำ นอกจากนี้การบำบัดน้ำเสียก่อนระบายทิ้งทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ดังตัวอย่างของน้ำเสียจากโรงงานนมมีโปรตีนละลายอยู่ในรูปสารคอลลอยด์ทำให้ค่าซีโอดีสูง การระบายทิ้งต้องทำการบำบัด 2 ขั้นตอน ขั้นแรกคือการตกตะกอนธรรมชาติ และขั้นที่ 2 คือการบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพก่อนที่จะทำการระบายทิ้ง (พิสิฐ, 2540)

การใช้ประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้ที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหาร

การจัดการกับผลพลอยได้จากการผลิตอาหารต่างๆ ทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความพร้อมและการประเมินด้านความคุ้มค่าในการจัดการ เช่น ในการผลิตน้ำตาล ผลพลอยได้จากการผลิตคือกากน้ำตาลซึ่งไม่มีประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตในโรงงานน้ำตาล วิธีการจัดการที่นิยมกระทำคือการจำหน่ายต่อไปยังอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่สามารถใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลหรือใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตในอุตสาหกรรมนั้นๆ ได้แก่ โรงงานผลิต และกลั่นแอลกอฮอล์หรือเอธานอล ซึ่งมีรายงานว่าได้มีการนำผลิตผลทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง และกากน้ำตาลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้ผสมในน้ำมันเบนซินเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศรวมทั้งลดงบประมาณในการแทรกแซงราคาสินค้าเกษตร (สุรพงษ์, 2547) หรือทำการจำหน่ายอีกทอดไปยังโรงงานสุราซึ่งใช้กากน้ำตาลในการหมักให้เป็นเอธานอล (ผู้จัดการรายวัน, 2548) เป็นต้น นอกจากนั้นกากน้ำตาลยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโรงงานผลิตอาหารสัตว์ซึ่งมีรายงานว่าการเติมกากน้ำตาล, ยูเรีย และแร่ธาตุอัดก้อนผสมอาหารที่ให้โคกินตามปกติมีผลทำให้โคมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และมีประสิทธิภาพดีกว่าอาหารเดิมอย่างมีนัยสำคัญ (บัญชา และคณะ, 2543)

สำหรับผลพลอยได้สำหรับอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำเวย์จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง มีการประมาณการณ์ว่าทั่วโลกมีเวย์ที่ผลิตได้กว่า 118 ล้านตัน เป็นเวย์จากยุโรป 66 %, อเมริกา 25 % และภูมิภาคอื่นๆ รวมกันประมาณ 9 % ซึ่งเวย์ดังกล่าวที่ผลิตได้จากยุโรป และอเมริกามีธุกิจที่นำไปสร้างประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหาร, ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และผลิตเป็นสารชำระล้าง (cleaning agent) (Spreer, 1998) แต่จากการสำรวจพบว่าในประเทศไทยยังไม่มีการนำน้ำเวย์ไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง อาจเนื่องมาจากปริมาณการผลิต และจำนวนของโรงงานที่ผลิตเนยแข็งยังมีจำนวนน้อย อย่างไรก็ตามได้มีการวิจัยเพื่อหาลู่ทางการนำน้ำเวย์ไปใช้ประโยชน์ เช่น ภัทรียา (2541) ได้รายงานการนำน้ำเวย์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งจากโรงงานผลิตเนยแข็งไปใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lb. bulgaricus* ผลจากการศึกษาพบว่าสามารถใช้น้ำเวย์มาใช้เป็นอาหารผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในแนวทางอื่น ได้แก่ การทำปุ๋ยหมัก และก๊าซชีวภาพ เป็นต้น (ศูนย์วิศวกรรมพลังงาน, 2546)

แนวทางการใช้สารอาหารจากเศษวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมัก

วิธีการหนึ่งที่ควรได้รับการพิจารณาในการจัดการกับเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากการผลิตจากอุตสาหกรรมอาหารคือการนำเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากการผลิตเหล่านี้ซึ่งยังคงมีสารอาหารสมบูรณ์ไปเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เชิงการค้า สมใจ (2534) ได้รายงานการนำเอาเศษวัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตเซลจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์ ได้แก่ โปรตีนเซลเดี่ยว (single cell protein; SCP) จากเซลยีสต์ และสาหร่ายเกลียวทอง เป็นต้น โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อใช้โปรตีนเซลเดี่ยวเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ในประเทศเยอรมันสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 หลังจากสิ้นสุดสงครามจึงมีการศึกษากว้างขวางขึ้นเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนเซลเดี่ยวจากแหล่งวัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่น เซลลูโลส, ข้าวสาลี, เวย์ (whey), ข้าวโพด, แป้งมันฝรั่ง เป็นต้น

การผลิตจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นมวลเซลในปัจจุบันเป็นธุรกิจที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากในปัจจุบันมีอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิดที่นิยมใช้เชื้อตั้งต้นที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ในการผลิต ได้แก่ Sauerkraut, มะกอกดอง, แตงกวาดอง, กิมจิ, ผลิตภัณฑ์นมหมัก และเนยแข็ง และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก เป็นต้น

สมใจ (2534) กล่าวว่าการผลิตจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกิดจากระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นตัวเซล (microbial cells biomass) การผลิตเซลจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการค้า ได้แก่ การผลิตเซลยีสต์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ และการผลิตเซลจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นอาหารของมนุษย์ และสัตว์

2. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นเอนไซม์ (microbial enzyme) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งที่ได้จากพืช และสัตว์แล้ว จุลินทรีย์นับว่าเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตได้คราวละมากๆ ในเวลาอันสั้นโดยใช้เทคโนโลยีในการควบคุมการหมัก นอกจากนั้นยังสามารถปรับปรุงให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นง่ายกว่าการผลิตเอนไซม์จากพืช และสัตว์ การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาหารเป็นหลัก

3. การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นสารเมตาบอไลต์ (microbial metabolite) แบ่งได้ 2 ประเภทคือ

3.1 สารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) คือสารต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ สารอาหารจำเป็นต่างๆ ที่มีบทบาทต่อการเจริญของเซลจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์, โปรตีน, กรดนิวคลีอิก, ไลปิด และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ขึ้นในช่วง log phase ของการเจริญ เช่น เอธานอล, กรดซิตริก, โพลีซัคคาไรด์ และวิตามิน เป็นต้น

3.2 สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ พบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง stationary phase ของการเจริญ และอาจจะพบในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) ที่มีอัตราการเจริญต่ำ ได้แก่ สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ สารกันเสียจากธรรมชาติ (natural preservative) เช่น ไนซิน (nisin) จัดเป็นสารกันเสียที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือที่เรียกว่าแบคเทริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (GRAS: Generally Recognized as Safe) และผลิตออกมาเชิงการค้าสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป เช่น Komitopoulou *et al.* (1999) ทดลองใช้แบคเทริโอซินเติมลงในน้ำผลไม้เพื่อควบคุมการเจริญของ *Alicyclobacillus acidoterrestris* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและที่ค่า pH ต่ำ โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบ และการก่อปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้พาสเจอไรซ์ในประเทศอังกฤษ

4. การหมักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของสารประกอบ (transformation process) เป็นกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในสภาพที่คล้ายกับสารตั้งต้นแต่มีราคาสูงขึ้น โดยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์หรือสารเคมีเป็นตัวเร่งการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากการเปลี่ยนเอธานอลให้เป็นกรดอะซิติกโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2534)

อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีสารอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายซึ่งมักเป็นอาหารสำเร็จรูปหรือเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากส่วนประกอบจากธรรมชาติที่ได้มาจากการสกัดวัตถุดิบให้อยู่ในรูปแบบที่จุลินทรีย์นำไปใช้งานได้ง่าย ได้แก่ กลูโคส, เปปโตน, beef extract และ yeast extract เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อ และส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาแพง และมีส่วนประกอบที่สลับซับซ้อน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ (**ตาราง 1**) ซึ่งหากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปเหล่านี้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลจะมีผลให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้มีราคาสูงตามต้นทุนการผลิต จึงได้มีการศึกษาวิธีการลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้เศษหรือกากวัตถุดิบที่เหลือจากการเกษตรมาเสริมหรือทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตเชื้อตั้งต้น เช่น Daba *et al.* (1993) ใช้น้ำเวย์ที่เหลือจากอุตสาหกรรมนม และเนยแข็งในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทริโอซิน พบว่าปริมาณการผลิตใกล้เคียงกับการผลิตโดยใช้อาหารสังเคราะห์ ภัทรียา (2541) ทดลองใช้เวย์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เพื่อผลิตกล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต 3 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Lb. acidophilus* จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ใช้เวย์ผสมกับสารสกัดจากยีสต์เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา นอกจากเวย์แล้วยังมีการทดลองใช้วัตถุดิบอื่นด้วย ดังที่ นฤมล (2544) ศึกษาการใช้เปลือกกุ้ง และกากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติกจาก *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง ผลการทดลองพบว่า ที่ pH 5.5 เป็น pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก แต่ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดก่อนการถ่ายเชื้อคือ 6.5 นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ 10% และยังพบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้นั้นแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ yeast extract

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้เศษวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเชื้อตั้งต้นมีความสำคัญ และความเป็นไปได้เป็นอย่างมาก นภา (2534) และสมใจ (2534) กล่าวว่าในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้วัตถุดิบธรรมชาติต้องมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างครบถ้วน โดยพื้นฐานสารอาหารเหล่านี้ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน, วิตามิน และเกลือแร่ เป็นต้น นอกจากนี้ ภัทรพล (2543) กล่าวเสริมว่าภายในสารอาหารที่ได้จากวัตถุดิบต่างๆ นั้นต้องไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ผลิต และจะต้องมีปริมาณที่มากพอสามารถจัดหาได้ง่าย

ตาราง 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ / ส่วนประกอบ	GYP[1]	MRS[2]	M 17[3]	APT[4]	LBS[5]	Tomato juice broth
glucose (กรัม)	5.0	20.0	-	10.0	20.0	10.0
tryptone (กรัม)	-	-	5.0	-	-	-
peptone (กรัม)	5.0	10.0	5.0	12.5	10.0	-
beef extract (กรัม)	-	-	5.0	-	-	-
meat extract (กรัม)	5.0	8.0	-	-	-	-
yeast extract (กรัม)	5.0	4.0	2.5	7.5	6.0	10.0
K_2HPO_4 (กรัม)	-	2.0	-	5.0	-	0.5
KH_2PO_4 (กรัม)	-	-	-	-	6.0	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (กรัม)	-	0.2	1.0	0.8	0.575	0.2
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (กรัม)	-	0.05	-	-	0.12	0.01
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (กรัม)	-	-	-	0.14	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (กรัม)	-	-	-	0.04	0.034	0.01
ammonium citrate (กรัม)	-	2.0	-	-	2.0	-
sodium acetate$\cdot 3H_2O$ (กรัม)	-	5.0	-	5.0	25.0	-
Tween 80 (มิลลิลิตร)	-	1.0	-	0.2	1.0	-
acetic acid, glacial (กรัม)	-	-	-	-	1.32	-
ascorbic acid (กรัม)	-	-	0.5	-	-	-
NaCl (กรัม)	-	-	-	5.0	-	0.01
Na_2CO_3 (กรัม)	-	-	-	1.25	-	-
disodium β-glycerophosphate (กรัม)	-	-	19.0	-	-	-
thiamine·HCl (มิลลิกรัม)	-	-	-	1.0	-	-
lactose solution (มิลลิลิตร)	-	-	50		-	-
tomato juice (มิลลิลิตร)	-	-	-	-	-	20.0
pH (ที่ 25°C)	6.5±0.2	6.2±0.2	6.9±0.02	7.7±0.2	5.4±0.2	6.7±0.2
จุลินทรีย์เป้าหมาย	*Leuconostoc* *Pediococcus*	แบคทีเรียกรดแลคติกทั่วไป	streptococci	lactobacilli จากเนื้อสัตว์ และจากอาหารอื่นๆ	คัดแยกและเลี้ยง lactobacilli	จุลินทรีย์ที่เจริญดีในสภาวะเป็นกรด

ที่มา : Atlas (1993) และ Lonvaud-Funel (2000)

หมายเหตุ * ส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที ในหม้อนึ่งความดันไอ

** 1 Glucose Yeast Peptone medium 2 De Man, Rogosa and Sharpe 3 Media for streptococci

ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกในด้านการใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

1. การเป็นเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์นม

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมนมประกอบด้วย 5 สกุล คือ *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Lactococcus* (นภา, 2534; Cogan and Accolas, 1996)

1.1 เชื้อตั้งต้นสกุล *Streptococcus*

เชื้อตั้งต้นสกุล *Streptococcus* ได้แก่ *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis* และ *S. lactis* subsp. *cremoris* โดยเฉพาะ *S. lactis* subsp. *diacetylactis* นอกจากจะเฟอร์เมนต์แลคโตสได้กรดแลคติกแล้วยังสามารถเมตาบอไลท์ซิเตรทเป็นไดอะซิธิล จึงมักใช้ในรูปเชื้อตั้งต้นแบบผสมเพื่อสร้างสารดังกล่าวอันเป็นกลิ่นเฉพาะของผลิตภัณฑ์ที่เฟอร์เมนต์โดยใช้จุลินทรีย์เหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ *S. thermophilus* ในผลิตภัณฑ์นมหมักอีกหลายชนิด

1.2 เชื้อตั้งต้นสกุล *Leuconostoc*

Leuconostoc เป็นจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างกลม มักพบเชื้อในลักษณะการเรียงตัวของเซลเป็นคู่และเป็นสายโซ่ยาว บ่อยครั้งพบเซลที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ซึ่งการจัดเรียงตัว และรูปร่างลักษณะของเซลจะมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม lactococci แบคทีเรียสกุลนี้ส่วนใหญ่เจริญในน้ำนมได้ช้ามากจึงไม่เหมาะสำหรับเป็นเชื้อตั้งต้นเพื่อการผลิตกรด แต่จากคุณสมบัติของเชื้อสกุลนี้ที่สามารถเมตาบอไลท์ซิเตรทเป็นสารไดอะซิธิล และอะซิโทอิน จึงมีการใช้เชื้อสกุลนี้ร่วมกับเชื้อตั้งต้นชนิดอื่น เช่น *Lactobacillus cremoris* subsp. *citrovolum* เพื่อผลิตสารที่ให้กลิ่นหอม และใช้ร่วมกับเชื้อที่ผลิตกรดได้ดี เช่น *Streptococcus* spp. หรือ *Lactobacillus* spp.

1.3 เชื้อตั้งต้นสกุล *Lactobacillus*

จุลินทรีย์กลุ่มนี้ปรากฏพบทั้งพวก homofermentative และพวก heterofermentative แต่ที่นิยมผลิตเป็นเชื้อตั้งต้นทางการค้าสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นกลุ่ม homofermentative ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, และ *Lb. casei* เชื้อที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นของผลิตภัณฑ์นมหมักส่วนใหญ่ได้แก่ *Lb. bulgaricus* โดยมักใช้ร่วมกับเชื้อ *S. thermophilus* ซึ่งจัดเป็น thermophilic starter อีกชนิดหนึ่ง เชื้อทั้งสองสปีชีส์ดำเนินกิจกรรมการหมักโดยการทำงานร่วม และส่งเสริมซึ่งกันและกัน (synergistic effect) เช่น ในเชื้อตั้งต้นแบบ

ผสมของโยเกิร์ตประกอบด้วยแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งพบว่าสามารถผลิตกรดได้เร็วกว่าการใช้เชื้อตั้งต้นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เนื่องจาก *Lb. bulgaricus* เมื่อเจริญในน้ำนมพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้กรดอะมิโนหลายชนิด โดยเฉพาะฮีสทีดีนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *S. thermophilus* ในทำนองเดียวกันพบว่า *S. thermophilus* มีการผลิตกรดฟอร์มิกซึ่งจัดเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Lb. bulgaricus* เช่นกัน นอกจากนั้นพบว่า *Lb. bulgaricus* มีบทบาทในการผลิตอะเซธัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต (Spreer, 1998) นอกจากเชื้อในสกุล *Lb. bulgaricus* แล้วยังพบว่า *Lb. acidophilus* และ *Lb. casei* ยังมีบทบาทในนมหมักในชื่อ และลักษณะอื่นๆ ที่มีความแตกต่างกันไป เชื้อสกุล *Lb. acidophilus* พบว่าเป็นเชื้อที่มีบทบาทในการหมักนมเปรี้ยวที่เรียกว่า acidophilus milk เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ *Lb. acidophilus* เป็นเชื้อตั้งต้นเพียงชนิดเดียวนิยมบริโภคมากในสหภาพโซเวียต ยุโรปตะวันออกและประเทศในแถบสแกนดิเนเวีย (Howells, 1992) ส่วนเชื้อสกุล *Lb. casei* พบได้ในน้ำนมสด, เนยแข็ง, ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ในโรงงานนม, โดเปรี้ยว (sour dough) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ที่ใช้เชื้อ *Lb. casei* เป็นเชื้อตั้งต้น เช่น Yakult® ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มนมหมักชนิดเหลวของประเทศญี่ปุ่น และ Gefilus® เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มนมหมักชนิดเซ็ตที่มีการย่อยน้ำตาลแลคโตสผลิตจากเวย์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศฟินแลนด์ (Saloff-Coste, 1995)

1.4 เชื้อตั้งต้นสกุล *Enterococcus*

จุลินทรีย์กลุ่มนี้ปรากฏพบในรูปแบบที่เป็นเชื้อตั้งต้นธรรมชาติ (artisanal starter) และพบเพียงสองสายพันธุ์เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมหมัก ได้แก่ *Ent. faecalis* และ *Ent. faecium* คุณสมบัติสำคัญที่สามารถใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ได้แก่ สามารถสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว, ต้านทานกระบวนการแปรรูปเนยแข็งพวกฮาร์ดชีส (hard cheese) และสามารถทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5 % ได้ จุลินทรีย์ทั้งสองสปีชีส์สามารถเจริญได้ที่ 10°C และ 45° ที่ pH 9.6 (Cogan and Accolas, 1996)

1.5 เชื้อตั้งต้นสกุล *Lactococcus*

Lactococcus เป็นจุลินทรีย์ที่มีรูปร่างกลม มีทั้งที่พบเป็นเซลเดี่ยว อยู่เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ยาว แต่ที่พบทั่วไปคือการเรียงตัวของเซลเป็นรูปสายโซ่ยาว ในบางครั้งรูปร่างของเซลอาจคล้ายกับรูปแท่งจนมีลักษณะคล้าย lactobacilli ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ ได้แก่ *Lc. lactis* subsp. *lactis* และ *Lc. lactis* subsp. *hordniae* ซึ่งจัดเป็นพวก homofermentative สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล้วสร้าง L-lactate ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ เจริญได้ที่ 10°C แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45°C โดย

สายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการผลิตเซลเพื่อผลิตเป็นเชื้อตั้งต้น ได้แก่ *Lactococcus lactis* แบ่งย่อยได้ 2 ชนิด คือ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ซึ่ง Macura and Townsley (1984) กล่าวว่าในประเทศในแถบสแกนดิเนเวียนิยมใช้แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล lactococci ในผลิตภัณฑ์นมหมักเพราะสามารถสร้าง exopolysaccharide ได้ดี ซึ่งมีชื่อเรียกผลิตภัณฑ์นมในภูมิภาคนี้ในชื่อต่างๆ กัน เช่น Tatemilk, Langmjolk, Viili, Latte, Filmjolk เป็นต้น

2. การเป็นเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ นอกจากอุตสาหกรรมนม

มีรายงานว่า ในอุตสาหกรรมอาหารหมักนอกจากผลิตภัณฑ์นมหมักแล้วยังมีผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นที่นิยมใช้เชื้อตั้งต้นแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิต ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากผักผลไม้

Flemming *et al.* (1985) กล่าวว่ามีการใช้เชื้อตั้งต้น *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* subsp. *cerevisiae* ซึ่งเชื้อสามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดเพียงอย่างเดียว (homofermentative) ในการดองแตงกวา และมะกอกในระดับอุตสาหกรรมทั้งในรูปเชื้อตั้งต้นแบบไลโอฟิไลซ์ และเชื้อตั้งต้นแบบแช่แข็ง การใช้เชื้อตั้งต้นดังกล่าวสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น เช่น แก้ปัญหาแตงไส้แตกซึ่งเป็นผลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สร้างโดย *Lb. brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวก heterofermentative ที่พบในการหมักแตงกวาดองโดยวิธีการหมักตามธรรมชาติ

Choi *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาการหมักกิมจิ (Kim-Chi) โดยใช้ *Leuconostoc citreum* เป็นเชื้อตั้งต้น พบว่า *Leu. citreum* ที่คัดแยกได้จากกิมจิสามารถใช้เป็นเชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์ในการหมักกิมจิได้ ที่ระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 15°C ผลการทดลองที่ได้นี้นำมาใช้ในการพัฒนาการหมักกิมจิโดยใช้ *Leu. citreum* เป็นเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตกิมจิ

Ammor *et al.* (2005) ศึกษา *Lb. sakei* จำนวน 36 สายพันธุ์ที่แยกได้จากไส้กรอกหมักเพื่อศึกษาคุณสมบัติของการเป็นเชื้อตั้งต้น ได้แก่ การเจริญ, การสร้างกรด, ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน, ความสามารถในการเจริญที่ค่า pH ระดับต่างๆ และความเข้มข้นของเกลือในปริมาณสูง เป็นต้น จากการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้พบเชื้อสองสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้นเนื่องจากมีคุณสมบัติอันเหมาะสมหลายประการที่สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่มีคุณภาพดีได้

การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์

1. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกทั่วไปมีหลายชนิด ซึ่งอาหารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อแบคทีเรียกรดแลคติกต่างชนิดกัน ซึ่งส่วนประกอบของอาหารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ

De Man *et al.* (1960) เสนอ De Man, Rogasa and Sharpe (MRS) medium สำหรับเลี้ยงเชื้อและศึกษากิจกรรมต่างๆ ทางกายภาพของเชื้อ lactobacilli ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้เจริญได้ไม่ดีเท่ากับเชื้อชนิดอื่น และต้องการอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน MRS จึงมีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสกุลนี้ นอกจากนั้นการเติมน้ำมะเขือเทศลงในสูตรอาหารไม่มีความจำเป็นสำหรับเชื้อ lactobacilli

Car (1975) กล่าวว่าอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะธรรมชาติ และนิยมใช้กันคือ tomato juice agar เนื่องจากน้ำมะเขือเทศมีสารบางชนิดที่สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ดี ซึ่ง Yoshizumi (1975) ได้รายงานว่าเชื้อกลุ่มนี้ต้องการสารบางอย่างในน้ำมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นการเจริญ ในระยะแรกเรียกสารชนิดนี้ว่า Tomato juice factor (TF) ซึ่งต่อมา Amachi (1975) พบว่าโครงสร้างทางเคมี และลักษณะทางกายภาพของสารชนิดนี้เป็น D-pantothenic acid

1.2 ปริมาณน้ำอิสระสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

ปริมาณน้ำอิสระ หรือค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ (a_w) เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งต้องการน้ำอิสระสำหรับก่อเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซล ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณน้ำอิสระ ได้แก่ Troller and Stinson (1981) ศึกษาความต้องการปริมาณน้ำอิสระ (a_w) สำหรับการเจริญ และการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *Streptococcus cremoris*, *S. diacetilactis* และ *S. lactis* โดยใช้กลีเซอรอล และน้ำตาลซูโครสเป็นสารปรับค่า a_w (humectant) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ผลที่ได้การทดลองพบว่าค่า a_w ที่ต่ำที่สุดที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสามสายพันธุ์คือ 0.93 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกลีเซอรอล ในขณะที่อาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนผสมพบว่ามีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสามสายพันธุ์มากกว่าการใช้กลีเซอรอล

1.3 อุณหภูมิ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมนมหมักมีทั้งกลุ่มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (ระหว่าง 40-45°C, thermophilic starter) และกลุ่มที่เจริญได้ดีที่ระดับกลาง (ระหว่าง 25-30°C, mesophilic starter) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในนมหมัก ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* จุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophile) อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญคือระหว่าง 40-45°C Spreer (1998) อธิบายว่าในการผลิตโยเกิร์ตนั้นมีการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดนี้เป็นเชื้อตั้งต้น สภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของ *S. thermophilus* อยู่ในช่วง 38-42°C และ *Lb. bulgaricus* ที่ช่วง 42-45°C

นอกจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว Hutkins and Morris (1987) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสังเคราะห์โพลีซัคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลในสายพันธุ์ของ *S. thermophilus* ซึ่งสามารถสร้างโพลีซัคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำได้เมื่อเจริญที่ 30°C มากกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C ประมาณ 2 ถึง 5 เท่า ซึ่งจะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อเมื่อผ่านการแช่แข็ง

1.4 สภาวะความเป็นกรด-ด่างในการเลี้ยงเชื้อ (pH)

แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วงกว้างระหว่าง 4-7.5 แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-6.5 นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังผลิตกรดแลคติกออกมาทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่ำลง ซึ่งการเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดนอกจากจะทำให้การเจริญช้าลงยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ เมื่อถึงสภาวะหนึ่งที่มีกรดความเข้มข้นสูงเซลบางส่วนจะเกิดการบาดเจ็บจนไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้ตามปกติ สุดท้ายเซลจะตาย และลดจำนวนลงในที่สุด (นภา, 2534) จากการศึกษาของ Bozoglu *et al.* (1987) พบว่า *S. thermophilus* หากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 จะมีปริมาณเซลที่มีชีวิตเหลือรอดน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นสารเคมีที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Amoroso and Manca de Nadra (1992) ทดลองเลี้ยง *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* ในลักษณะเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม ซึ่งพบว่าการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5-6.8 สำหรับเชื้อ *Lb. bulgaricus* และ *S. thermophilus* จะมีปริมาณเซลที่มีชีวิต 3.8×10^{8} cfu/ml และ 1.8×10^{8} cfu/ml ตามลำดับ การศึกษาทำนองเดียวกันของ ภัทรียา (2541) ซึ่งศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Lb. acidophilus* พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 6.5 และ 7.0 โดยได้ค่าเซลที่มีชีวิต 3.4×10^{11} cfu/ml และ 6.6×10^{11} cfu/ml ตามลำดับ

นอกจากนี้ Gilliland (1976) กล่าวว่าสำหรับการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อให้ได้ปริมาณเซลที่มีชีวิตที่ยังคงมีกิจกรรมสูงจำเป็นต้องรักษาระดับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เลี้ยงเชื้อด้วย

1.5 ความเข้มข้นของก๊าซในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียกรดแลคติกบางกลุ่มมีการเมตาบอไลต์สารอาหารด้วยกระบวนการหมักในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงไม่ต้องการออกซิเจนในการเพาะเลี้ยง แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจึงต้องมีการกวนจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีออกซิเจนเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจะทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สภาวะเช่นนี้มีผลให้เชื้อเจริญได้ช้าลง อาจแก้ไขการเกิดปัญหานี้โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสหรือสารรีดิวส์อื่นๆ ลงไปถังหมัก (Gilliland, 1985) นอกจากนี้ Arsene-Ploetze and Bringle (2004) ยังพบว่าการเติมสารประกอบคาร์บอนในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ inorganic carbon, CO_2 และ HCO_3^- สำหรับการเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* และ *Enterococcus faecalis* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยา carboxylation สำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิด

1.6 สารส่งเสริมการเจริญ

ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่ต้องการสารอาหารซับซ้อนหรือเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาได้ยาก อาจต้องมีการเติมสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย บัญญัติ (2534) กล่าวว่าสารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์คือสารที่ส่งผลทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ดีขึ้น สารส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์มีหลายชนิด ได้แก่ วิตามิน, กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก ซึ่ง Biswas *et al.* (1995) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน และมีการเติม Tween 80 และ Mg^{2+} ลงไปจะให้ปริมาณมวลชีวภาพจุลินทรีย์ และปริมาณการผลิต pediocin ACH สูงสุด นอกจากนี้ Lonvaud-Funel (2000) ได้กล่าวถึงความต้องการสารอาหารสำหรับการเจริญของ *Leuconostoc* spp. ว่าเชื้อนี้มีความต้องการไม่เพียงแต่ส่วนประกอบพื้นฐานของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งของคาร์โบไฮเดรตเป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน, กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจน, เกลือ และวิตามินเท่านั้น แต่ยังมีส่วนประกอบอื่นๆ ที่ควรเติมลงไปด้วย เช่น Tween 80 ซึ่งมีกรดโอเลอิกเป็นสารส่งเสริมการเจริญ นอกจากนี้ยังมีการเติมน้ำมะเขือเทศลงไปด้วยซึ่งพบว่าเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยในน้ำมะเขือเทศพบว่ามี glucoside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ pantothenic acid โดยอาจจะใช้น้ำองุ่นแทนได้เพราะในน้ำองุ่นนอกจากพบว่ามี glucoside แล้วยังมีฟรุคโตสซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ดีกว่ากลูโคส นอกจากนี้ Partanen *et al.* (2001) ศึกษาอิทธิพลของ fatty acid และ fats ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ทำการศึกษาโดยทดสอบกับอาหารเหลว MRS ที่ดัดแปลงโดยไม่ได้เติม Tween 80 แต่ใช้ Tween 20, Tween 40 และ Tween 60 เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทั้งหมดเป็นกรดไขมันอิ่มตัวสายโซ่ยาวซึ่งจัดเป็นสารส่งเสริมการเจริญของ *Lb. delbrueckii* ทุกสายพันธุ์ ผลการทดลองปรากฏว่าใช้ Tween 20, Tween 40 และ Tween 60 ซึ่งจัดเป็น natural food oil ที่เป็น fatty acid สายโซ่ยาวเหล่านี้เป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus delbrueckii* อย่างได้ผล

Aredes Fernandez *et al.* (2003) ทำการทดสอบเกี่ยวกับผลของกรดอะมิโน และเพปไทด์ที่มีต่อการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* จากไวน์พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์และอาหารแบบเดียวกันที่มีส่วนผสมของพวกไดเพปไทด์ ได้แก่ leucine-leucine, leucine-proline, methyonine-proline และ glycine-glycine ในอาหารสมบูรณ์ มีชีวมวลสุดท้ายเป็น $1x10^8$ cfu/ml

2. รูปแบบการเลี้ยงเชื้อ และการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 รูปแบบการเลี้ยงเชื้อ

ดุษณี (2546) กล่าวว่าการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้น โดยทั่วไปนิยมเลี้ยง 2 วิธี คือ การเลี้ยงแบบเฟสคงที่ (static culture) และการเลี้ยงแบบเขย่า (shake flask) การเลี้ยงแบบเฟสคงที่นั้นเมื่อทำการถ่ายเชื้อลงในภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะบ่มโดยไม่มีการเคลื่อนไหวของภาชนะ ส่วนการเลี้ยงแบบเขย่าเป็นการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์บนเครื่องเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker) โดย Calam (1986) กล่าวว่าความเร็วรอบที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าใช้ระหว่าง 100-500 รอบต่อนาที และสามารถปรับเปลี่ยนความเร็วรอบของเครื่องเหวี่ยงดังกล่าวได้ตามความต้องการในลักษณะการเลี้ยงเชื้อในแบบต่างๆ

2.2 วิธีการวัดจำนวนเชื้อ

ระหว่างการเลี้ยงเชื้อต้องมีวิธีการทดสอบ และหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมก่อนการนำไปใช้งาน กำเนิด (2534) กล่าวว่าการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงโดยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นระหว่าง 350-1000 นาโนเมตร ทำควบคู่กับการหาค่าเซลที่มีชีวิตเป็นวิธีการที่ทำไปพร้อมกันเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับค่าเซลที่มีชีวิตกับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งกราฟที่ได้มีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในการเลี้ยงที่

สภาวะเดียวกับที่ทำการเลี้ยงเท่านั้น ซึ่งเมื่อได้กราฟการเจริญดังกล่าวแล้วอาจใช้เพียงวิธีการเดียวที่ตรวจวัดได้สะดวก และง่ายที่สุดในการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์

3. รูปแบบของเชื้อตั้งต้น

3.1 เชื้อตั้งต้นชนิดเหลว (liquid starter)

เป็นเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นในสารละลาย นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากทำการเก็บรักษาง่ายหรือผลิตในปริมาณน้อยเพียงพอต่อการใช้งานในการผลิตแต่ละครั้งเท่านั้น ข้อดีคือสามารถปรับความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น และตรวจสอบคุณลักษณะด้วยตาได้ก่อนการใช้ทุกครั้ง ข้อเสียคือความไม่สม่ำเสมอของสภาวะระหว่างการขนส่งทำให้กิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้แตกต่างกัน จึงต้องมีวิธีในการฟื้นฟูกิจกรรมของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมก่อนทำการผลิตทุกครั้ง (Nielsen and Ullum, 1989)

3.2 เชื้อตั้งต้นชนิดแช่แข็ง (frozen starter)

Tamime and Robinson (1985) กล่าวว่าการผลิตเชื้อตั้งต้นแบบแช่แข็งเตรียมจากเชื้อตั้งต้นชนิดเหลวก่อนแล้วจึงนำไปแช่แข็งโดยใช้ 2 วิธีการ

วิธีที่ 1 การนำเชื้อตั้งต้นมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 ถึง -40°C โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากนมพร่องไขมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์, ครีมสด (fresh cream) และโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ หรือเจลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวพบว่ามีความเหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 ถึง -40°C

วิธีที่ 2 คือเก็บเชื้อตั้งต้นที่ -196°C ในไนโตรเจนเหลว ซึ่ง Nielsen and Ullum (1989) รายงานว่าการผลิตเชื้อตั้งต้นชนิดนี้โดยเติมเชื้อลงในนม และทำให้มีสภาพเป็นกลางโดยการปรับด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นนำเชื้อตั้งต้นที่ได้ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการปั่นเหวี่ยงผสมรวมกับสารปกป้องเซล เช่น Tween 80 และโซเดียมโอลีเอท (Gilliland and Speck, 1977) จากนั้นนำเชื้อตั้งต้นที่ได้หยดลงในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จนเป็นเม็ดแข็ง จากนั้นบรรจุลงในภาชนะปลอดเชื้อที่บรรจุน้ำแข็งแห้งก่อนการขนส่ง การแช่แข็งวิธีนี้มีผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลหยุดการทำงานส่งผลต่อการอายุการเก็บรักษาเซลให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นานโดยอาศัยสารปกป้องเซลไม่ให้ถูกทำลายได้เนื่องจากความเย็น

3.3 เชื้อตั้งต้นชนิดแห้ง (dried starter)

ภัทรียา (2541) กล่าวว่าการผลิตเชื้อตั้งต้นแบบแห้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตเชื้อตั้งต้นชนิดเหลว, ต้องการเพิ่มอายุการเก็บรักษาของเชื้อตั้งต้นและเพื่อเป็นการสะดวกในการขนส่งโดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเชื้อตั้งต้น เชื้อตั้งต้นชนิดแห้งเป็นเชื้อตั้งต้นชนิดเข้มข้นที่มีเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ 1-2 % การนำมาใช้ต้องมีการต่อเชื้อก่อนที่จะนำมาใช้หลายครั้งเพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมต่างๆ สูงสุด การผลิตเชื้อตั้งต้นแบบแห้งมี 2 วิธี

วิธีที่ 1 เชื้อตั้งต้นชนิดพ่นแห้ง (spray dried culture) Mamaeva (1956) กล่าวถึงวิธีผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีพ่นแห้งโดยการควบคุมอุณหภูมิของเครื่องทำแห้ง (dryer) ให้มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 103-107°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับให้เป็นกลาง ภายหลังจากการทำแห้งทำให้เชื้อมีกิจกรรมลดลง ดังนั้นอายุของเชื้อที่นำมาผลิตต้องมีอายุที่พอเหมาะ และพบว่าอายุของเชื้อที่เลี้ยงที่ 8 ชั่วโมง มีกิจกรรมต่างๆ น้อยที่สุดเหมาะสำหรับการผลิตเชื้อตั้งต้นชนิดนี้

วิธีที่ 2 เชื้อตั้งต้นชนิดแช่แข็งแห้ง (freeze dried หรือ lyophilized culture) ขั้นตอนการผลิตมีดังนี้ ขั้นแรกเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพเป็นกลางโดยเติมสารปกป้องเซล เช่น อิโนซิทอล, ซอร์บิทอล และน้ำตาลกลูโคส ขั้นที่สองแช่แข็งเชื้อที่อุณหภูมิ -10 ถึง -20°C จากนั้นทำการระเหิดน้ำ (sublimation) ออกจากเชื้อตั้งต้นภายใต้ความดัน และสภาวะที่เป็นสูญญากาศเพื่อเป็นการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อตั้งต้น การทำแช่แข็งแห้งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ pre-freezing คือการทำให้ตัวอย่างมีสภาพเป็นของแข็งโดยการใช้ความเย็นระดับต่ำ, primary drying คือการกำจัดน้ำออกจากของแข็งโดยการระเหิดด้วยปั๊มสูญญากาศ และตัวดักจับความชื้น (moisture trap) ที่เรียกว่า condenser และ secondary drying ในขั้นตอนนี้ยังคงมีน้ำหลงเหลืออยู่เป็นน้ำแบบ bound water สามารถกำจัดโดยการระเหิดภายใต้อุณหภูมิของ condenser และความดันต่ำให้เหลือปริมาณความชื้นประมาณ 1 % (ในจุลินทรีย์บางชนิดอาจเหลือความชื้น 2-3 % เพื่อความคงทนของ จุลินทรีย์)

วัตถุดิบที่มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในภาคเหนือ

1. เศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากการผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรมที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เศษผักและผลไม้ที่เหลือจากการตัดแต่งหรือแปรรูปอาหารนั้น ซึ่งมีรายงานว่าสามารถนำไปผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกได้ ดังนี้

Kim *et al.* (2000) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* 145, *Lb. casei* 911, *Streptococcus thermophilus* th-116, *Bifidobacterium* sp. BB-12 และ *Bifidobacterium* sp. RD-65 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น ผัก, สาหร่าย, ธัญชาติต่างๆ และพวกพืชกินหัวชนิดต่างๆ ปรับ pH เป็น 7.2 โดยใช้ L-cysteine·HCl ทำการเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน ผลการวิจัยพบว่าการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ชนิด ในน้ำผักชนิดต่างๆ ได้ค่าเซลมากกว่า 10^8 cfu/ml ส่วนการเลี้ยงในน้ำจากพืชหัวชนิดต่างๆ ค่าเซลที่ได้ต่ำกว่า 10^8 cfu/ml เนื่องจากพบสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชเหล่านี้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ใช้สำหรับพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารหมักโดยใช้วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าว

Yoon *et al.* (2004) ศึกษาการหมัก *Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lb. casei* A4, *Lb. delbrueckii* D7 และ *Lb. plantarum* C3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำหัวบีท หมักที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 4 สามารถทำให้ค่า pH ลดลงจาก 6.3 เป็น 4.5 ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ช.ม. นอกจากนี้จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อพบเซลที่มีชีวิต 10^6-10^8 cfu/ml ภายหลังจากเก็บเชื้อที่ 4°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากข้อมูลดังกล่าววัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอาหารดังที่กล่าวไว้ข้างต้นน่าจะนำมาใช้ในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้

2. เศษวัตถุดิบ และผลพลอยได้ที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหารในภาคเหนือ

จากการสำรวจโรงงานอุตสาหกรรมอาหารในภาคเหนือที่มีเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตอาหาร พบว่าโรงงานเป้าหมายที่มีเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เช่น โรงงานแปรรูปผักและผลไม้ มูลนิธิโครงการหลวง (ดอยคำ) ต.แม่เหียะ จ.เชียงใหม่, บริษัท ซันสวีท ผลิตข้าวโพดบรรจุกระป๋อง อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่, บริษัท สันติภาพ ฮั่วเพ้ง 1992 แปรรูปผัก และผลไม้บรรจุกระป๋อง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีหน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ สังกัดกรมปศุสัตว์เชียงใหม่ ซึ่งพบการผลิตสินค้าจากสัตว์หลายชนิด ได้แก่ นม, เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก, แฮม โดยอุตสาหกรรมการผลิตอาหารต่างๆ เหล่านี้พบว่าเกิดเศษวัตถุดิบหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตหลายชนิดซึ่งสามารถใช้ผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ เช่น

2.1 น้ำเวย์

น้ำเวย์เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็งมีลักษณะเป็นของเหลวใส มี สีเขียวอมเหลืองพบว่าในน้ำเวย์มีปริมาณแลคโตสสูงกว่าสารอาหารอื่นๆ Alfa-Lavel (1987) แบ่งน้ำเวย์

ออกเป็นสองชนิด ชนิดแรกคือ สวีทเวย์หรือชีสเวย์ (sweet whey or cheese whey) เป็นน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็งเกาดา (gouda cheese) และเนยแข็งเชดดา (cheddar cheese) อีกชนิดคือแอสิดเวย์หรือเคซีนเวย์ (acid whey or casein whey) เป็นน้ำเวย์ที่ได้จากการผลิตเคซีน ได้จากการผลิตเนยแข็งคอตเทจ (cottage) น้ำเวย์มีส่วนประกอบดังตาราง 2

ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตเนยแข็งอยู่ไม่มาก ที่สำรวจพบเป็นโรงงานภายใต้การควบคุมของกรมปศุสัตว์ ได้แก่ หน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ ต.ห้วยแก้ว จ.เชียงใหม่ และเป็นโครงการสนองในพระราชดำริ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เช่น โรงงานผลิตนม และเนยแข็ง โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา เป็นต้น จากการสัมภาษณ์เจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิต หน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ ต.ห้วยแก้ว จ.เชียงใหม่ พบว่าที่โรงงานแห่งนี้ทำการผลิตเนยแข็ง 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ซึ่งการผลิตในแต่ละครั้งมีน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตกว่า 500 ลิตรต่อครั้ง และน้ำเวย์ที่ได้ไม่พบว่ามีการใช้ประโยชน์อันใดนอกจากทำการบำบัด และระบายทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม ดังนั้นการนำน้ำเวย์ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งมาใช้ประโยชน์จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับน้ำเวย์ และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้

ตาราง 2 ส่วนประกอบของน้ำเวย์

ส่วนประกอบ	Sweet whey (%)	Acid whey (%)
น้ำ	93-94	94-95
Dry matter	6-6.5	5-6
Lactose	4.5-5	3.8-4.3
Lactic acid	น้อยมาก	มากกว่า 0.8
Total protein	0.8-1.0	0.8-1.0
Whey protein	0.6-0.65	0.6-0.65
กรดซิตริก	0.1	0.1
แร่ธาตุต่างๆ	0.5-0.7	0.5-0.7
pH	6.4-6.2	5.0-4.6
SH value	ประมาณ 4	20-25

ที่มา : Spreer (1998)

2.2 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวมีลักษณะเป็นของเหลว ใส อยู่ภายในผลมะพร้าว มีส่วนประกอบสำคัญดัง **ตาราง 3** ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านั้น Gonzalez (1941) ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนน้ำตาลส่วนใหญ่เป็น reducing sugar ปริมาณ 2.5 % (w/v) ส่วนน้ำมะพร้าวแก่มีเพียง 1.45 % (w/v) น้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในน้ำมะพร้าวแก่เป็นกลูโคส ในน้ำมะพร้าวอ่อนมีประมาณ 2.5 % (w/v) แต่ในน้ำมะพร้าวแก่มีมากกว่าประมาณ 6 % (w/v) ซึ่ง Gonzalez สรุปว่าเมื่อผลมะพร้าวอ่อนเจริญเป็นมะพร้าวแก่ ทั้งปริมาณ และชนิดของน้ำตาลตลอดจนของแข็งทั้งหมดภายในน้ำมะพร้าวต่างมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับส่วนประกอบต่างๆ ภายในน้ำมะพร้าว โดย Vanderbelt (1945) วิเคราะห์น้ำมะพร้าวแก่ พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่ 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยวิตามินบีรวม (B-complex) ดังนี้ คือ nicotinic acid 0.64 ไมโครกรัม, pantothenic acid 0.52 ไมโครกรัม, biotin 0.02 ไมโครกรัม, riboflavin 0.01 ไมโครกรัม และ folic acid 0.003 ไมโครกรัม นอกจากนี้ Child (1964) พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่ 10 มิลลิลิตร มีกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) ประมาณ 0.7-3.7 มิลลิกรัม และยังประกอบไปด้วย สารเคมีซึ่งเป็นสารจำพวกโพแทสเซียมเป็นส่วนใหญ่ ข้อมูลจากงานวิจัยทั้งสามนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่ตัวเลขปริมาณส่วนประกอบต่างๆ มีความแตกต่างกันบ้าง น่าจะเกิดจากความแตกต่างกันในด้านของพันธุ์มะพร้าว และแหล่งที่ปลูก

ตาราง 3 ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว

ส่วนประกอบ	น้ำมะพร้าวแก่ (%)	น้ำมะพร้าวอ่อน (%)
ของแข็งทั้งหมด	5.4	6.5
รีดิวซิ่ง ชูการ์	0.2	4.4
แร่ธาตุต่างๆ	0.5	0.6
โปรตีน	0.1	0.01
ไขมัน	0.1	0.01
กรดต่างๆ (mg)	60.0	120.0
pH	5.2	4.5
Potassium (mg)	247.0	290.0
Sodium (mg)	48.0	42.0
Calcium (mg)	40.0	44.0
Magnesium (mg)	15.0	10.0
Phosphorous (mg)	6.3	9.2
Iron (mg)	79.0	106.0
Copper (mg)	26.0	26.0

ที่มา : Krishnankutty (1987)

จากการสำรวจโรงงานผลิตมะพร้าวเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมกะทิ พบว่าโรงงานในจังหวัดเชียงใหม่ มีมากกว่า 50 โรงงาน ซึ่งทั้งหมดเป็นโรงงานขนาดเล็กที่มีทุนประกอบการไม่สูงมากนัก ซึ่งข้อมูลที่ได้รับจากจากโรงงาน ต.หายยา อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ผลิตมะพร้าวผ่าซีกเพื่อนำไปผลิตกะทิ และได้น้ำมะพร้าวประมาณ 1,000 ลิตรต่อวัน ซึ่งน้ำมะพร้าวที่ได้ออกมานั้นไม่พบการนำไปใช้ประโยชน์ใดๆ นอกจากการระบายทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเป็นปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อม หากสามารถนำของเสียเหล่านั้นให้เกิดประโยชน์ได้จะเป็นการแก้ปัญหาที่อาจจะเกิดขึ้นดังกล่าวได้

3.3 น้ำกากมะเขือเทศ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง ไฉน (2542) แบ่งมะเขือเทศออกเป็นสองชนิดตามประเภทการใช้ประโยชน์ ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์

บริโภคสด เช่น พันธุ์สีดา, พันธุ์ฟลอราเดล, พันธุ์แอล-22 และพันธุ์คาลิบโซ เป็นต้น และมะเขือเทศพันธุ์สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมสำหรับแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น มะเขือเทศเข้มข้น (paste), ซอสมะเขือเทศ และน้ำมะเขือเทศ ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารแสดงดังตาราง 4 มะเขือเทศที่นิยมนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมนั้น ไฉนกล่าวว่าในภาคเหนือนิยมปลูก และใช้มะเขือเทศพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ เช่น พีโต 94, วีเอฟ 145, บี 78, บี 79, โรมาวีเอฟ, วีเอฟ 134-1-2, เซทเตอร์ 502, เซตเตอร์ 600, เอสอาร์ ดีซี 201, คาลเจ และ ฟอร์จูน 360 เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานอีกว่าพบการปลูกมะเขือเทศเป็นจำนวนมากในหลายภูมิภาคเพื่อส่งให้แก่โรงงานทำน้ำมะเขือเทศเข้มข้น โดยเฉพาะในจังหวัดหนองคายเป็นแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดในประเทศ และมีโรงงานผลิตน้ำมะเขือเทศเข้มข้นถึง 5 แห่ง ซึ่งพบว่าสิ่งที่เหลือจากกระบวนการผลิตคือกากมะเขือเทศ ปริมาณกากมะเขือเทศที่ได้มานั้นมีประมาณ 520 ตันต่อปี (จากน้ำหนักแห้ง) โดยกากมะเขือเทศที่นำมาทดลองเป็นเศษเหลือจากกระบวนการแยกเอาน้ำ และเนื้อมะเขือเทศออก มีส่วนเหลือเป็นเปลือก, เศษเนื้อมะเขือเทศ, เมล็ด และแกนกลาง ทำให้โรงงานเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการกำจัดกากมะเขือเทศเหล่านี้โดยนำไปทิ้งหรือทำเป็นปุ๋ย ซึ่งเป็นการสูญเสียมูลค่า ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อมูลจาก วัชรินทร์ และคณะ (2536)พบว่ากากมะเขือเทศแห้งมีโปรตีนหยาบสูงถึง 14-20 % นอกจากนี้ GEA Niro Inc. (2005) ซึ่งได้วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมะเขือเทศ พบว่ามีน้ำ 93-96 %, น้ำตาล (กลูโคส และฟรุคโตส) 0.2-3.5 %, ปริมาณกรด 0.25-0.5 %, ส่วนประกอบที่ไม่ละลายน้ำ 0.7-1 %, กรดอะมิโนและโปรตีน 0.6-1.2 %, แร่ธาตุ 0.3-0.6 % และเกลือ 0.05-0.15 % กากมะเขือเทศจากอุตสาหกรรมจึงเป็นสิ่งที่สมควรนำมาพิจารณาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้

ตาราง 4 คุณค่าทางอาหารของมะเขือเทศ และผลิตภัณฑ์ในน้ำหนัก 100 กรัม

ธาตุอาหาร	มะเขือเทศสด	มะเขือเทศเข้มข้น	น้ำมะเขือเทศ
ความชื้น (%)	94.00	94.00	94.00
พลังงาน (แคลอรี่)	19.00	21.0	19.00
โปรตีน (กรัม)	0.70	0.80	0.80
ไขมัน (กรัม)	น้อยมาก	น้อยมาก	น้อยมาก
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	4.00	4.00	4.00
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	12.00	6.00	7.00
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	24.00	19.00	18.00
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.40	0.50	0.90
โปแตสเซียม (มิลลิกรัม)	222.00	217.00	227.00
วิตามินเอ (ไอยู)	822.00	900.00	798.00
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.05	0.05	0.05
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.04	0.03	0.03
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	21.00	17.00	16.00
ไนอาซีน (มิลลิกรัม)	0.70	0.70	0.80

ที่มา: ไฉน (2542)

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

จุลินทรีย์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ซึ่งได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมีดังนี้

1.1 *Lactobacillus acidophilus* TISTR450

1.2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR892

1.3 *Streptococcus lactis* TISTR457

1.4 *Streptococcus thermophilus* TISTR458

2. สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัยมี 2 ชนิดและบัฟเฟอร์ 1 ชนิด ซึ่งส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lambda 2
2. Incubator Shaker ยี่ห้อ Innova™ รุ่น 4320
3. Incubator ยี่ห้อ Termaks รุ่น B8000
4. Hot air oven ยี่ห้อ Termaks รุ่น TS8000
5. Larminar air flow ยี่ห้อ Holten รุ่น HB 2472
6. Water Bath ยี่ห้อ Poly Science รุ่น 8306
7. Centrifuge ยี่ห้อ Ependorf รุ่น 5417C
8. Blender ยี่ห้อ Paloma
9. pH meter ยี่ห้อ Metrohm รุ่น 744
10. Deep freezer (-70°C) ยี่ห้อ Harris รุ่น SLT-13R-85R35

11. Freezer (-20°C) ยี่ห้อ Sunyo รุ่น MRP-1410-R

12. Mini Shaker ยี่ห้อ Vortex รุ่น MS-1

วิธีการวิจัย และขั้นตอนการวิจัย

1. วิธีการวิจัย

1.1 การเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดทำการเก็บไว้ที่ -70°C จากเชื้อตั้งต้นชนิดแช่แข็งแห้ง (lyophilized culture) เลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผสมเชื้อที่เลี้ยงได้กับ glycerol 30 % ใส่ในหลอดทนความเย็น จากนั้นนำไปเก็บที่ -70°C เมื่อจะใช้งานดูดเชื้อจากหลอดทนความเย็นลงในอาหารแข็ง MRS ผิวหน้าเอียง บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4°C เพื่อใช้เป็นสต็อกเชื้อสำหรับการวิจัย

1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 200 ม.ล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ประมาณปริมาณเชื้อโดยวัดจากค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของเชื้อในอาหารที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

1.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 200 ม.ล. ในฟลาสก์ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเชื้อทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24

1.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 นำตัวอย่างที่เก็บได้วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของจุลินทรีย์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง

ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใน phosphate buffer solution ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.2 ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} ดูดเชื้อที่เจือจางแต่ละระดับหาค่าเซลที่มีชีวิตโดยใช้อาหารแข็ง GYP โดยใช้ 2 วิธีการดังนี้

1.5.1 วิธี drop plate : ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางมา 10 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนอาหารแข็ง GYP ที่มีผิวหน้าอาหารแห้ง ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5.2 วิธี pour plate : ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางมา 1 ม.ล. เทอาหาร GYP ที่ยังไม่แข็งตัว อุณหภูมิประมาณ 50°C ลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออยู่ จากนั้นผสมเชื้อกับอาหารแข็ง GYP ที่ยังไม่แข็งตัวให้เข้ากัน รอจนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % (v/v)

เตรียมเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.2 ในอาหารเหลว MRS เลี้ยงจนได้ OD_{600} ประมาณ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้น 2 % (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS และ GYP ปริมาตร 200 ม.ล. ในฟลาสก์ขนาด 500 ม.ล. บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดค่า OD_{600} และค่า log ของเซลที่มีชีวิต (log cfu/ml) กับเวลาทุก 4 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD_{600} และค่า log ของเซลที่มีชีวิตกับเวลาเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า OD_{600} กับค่าเซลที่มีชีวิตเทียบกับเวลา ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อมีอัตราการเจริญที่ดีที่สุดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผสมกับน้ำที่ได้จากวัตถุดิบ

2.2 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากสต็อกเชื้อที่เก็บที่ -70°C มา 100 ไมโครลิตร มายังผิวหน้าอาหารแข็ง MRS แบบเอียง และใช้ห่วงถ่ายเชื้อขีดเชื้อบนผิวอาหาร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4°C นำเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายเชื้อโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว GYP และ MRS ปริมาตร 200 ม.ล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงเชื้อและทำการวิเคราะห์ค่า OD_{600} และจำนวนเซลที่มีชีวิตตามวิธีการในข้อ 1.3, 1.4 และ1.5 ตามลำดับ นำผลที่ได้จากการดำเนินการวิจัยสร้างกราฟระหว่างค่า OD_{600} และค่า log ของเซลที่มีชีวิตที่สัมพันธ์กับเวลาเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า OD_{600} กับค่าเซล

ที่มีชีวิตเทียบกับเวลา ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผสมกับน้ำที่ได้จากวัตถุดิบต่อไป

2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี drop plate และ pour plate

ดำเนินการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYP และ MRS เลี้ยงเชื้อตามวิธีการวิจัยข้อ 1.3 และวัดการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2

2.4 การศึกษาสัดส่วนของน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 การเตรียมน้ำวัตถุดิบ

2.4.1.1 น้ำเวย์

น้ำเวย์ที่ได้รับจากหน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ห้วยแก้วนำมาเก็บที่ -20°C เมื่อจะนำมาใช้ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิ 4°C (ใช้เวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง) จะเห็นลักษณะเป็นของเหลวแยกจากตะกอน เอาเฉพาะเวย์ที่มีลักษณะใสมาใช้โดยใส่ในขวดปิดฝาหลวมให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 70°C เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แยกตะกอนที่ได้จากการให้ความร้อนกรองผ่านชั้นสำลีหลวมๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทบ 3-4 ชั้น นำของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl ฆ่าเชื้อที่ 110°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อซ้ำที่สภาวะเดิมอีกครั้งหนึ่ง

2.4.1.2 น้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวได้รับจากโรงงานผลิตมะพร้าวผ่าซีกเพื่อส่งไปยังโรงงานผลิตกะทิ เป็นน้ำมะพร้าวแก่ที่รวบรวมจากมะพร้าวแต่ละผล ใช้ผ้าขาวบางทบ 3-4 ชั้น กรองแยกกากที่มีขนาดใหญ่ออกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวเก็บที่ -20°C เมื่อจะนำมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิ 4°C จนตกตะกอนออกมาจากส่วนใสที่ 4°C นำส่วนน้ำให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 70°C 15 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แยกตะกอนที่ได้จากการให้ความร้อนกรองผ่านชั้นสำลีหลวมๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทบ 3-4 ชั้น นำเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใสผสมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

2.4.1.3 น้ำกากมะเขือเทศ

น้ำกากมะเขือเทศได้ทำการเตรียมเองในห้องปฏิบัติการจากมะเขือเทศสุกพันธุ์คาสแจ ซึ่งวัดค่าของแข็งทั้งหมด (°Brix) เท่ากับ 5 นำกากมะเขือเทศที่ได้จากการสกัดแยกกากออกจากน้ำมะเขือเทศ ก่อนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บกากมะเขือเทศที่ 4°C เตรียมโดยการบดและ

ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นที่ความเร็วรอบสูงสุด จากนั้นเติมมะเขือเทศที่ปั่นละเอียดลงในบีกเกอร์ ให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C เป็นเวลา 1-2 นาที กรองแยกกากออกจากน้ำมะเขือเทศด้วยตะแกรงขนาด 35 เมซ ซึ่งมีช่องว่างระหว่างช่องตะแกรง 0.005 เซนติเมตร จากนั้นชั่งกากที่ได้ และผสมน้ำในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 80°C เป็นเวลา 5 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และกรองผ่านชั้นสำลีหลวมๆ หนาประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทบ 3-4 ชั้น เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ 4°C เมื่อจะใช้นำส่วนใสผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

น้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติทั้ง 3 ชนิด ได้นำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อโดยปรับสัดส่วนตามข้อ 2.4.2 แต่ละทรีตเมนต์บรรจุ 200 ม.ล. ในฟลาสก์ขนาด 500 ม.ล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ

ถ่ายเชื้อที่เตรียมตามวิธีการวิจัยข้อ 1.2 ซึ่งวัดค่า OD_{600} ได้ประมาณ 1-1.5 ลงใน ฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในสัดส่วนต่างๆ (**ตาราง 5**) ทั้ง 7 ทรีตเมนต์ โดยให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 10 % (v/v) เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พร้อมกันทั้ง 7 ทรีตเมนต์ เก็บตัวอย่างเชื้อทุก 2 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 และวัดการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.5.1

ตาราง 5 อัตราส่วนระหว่างน้ำวัตถุดิบ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทรีตเมนต์	น้ำวัตถุดิบ (%)	อาหารเลี้ยงเชื้อ (%)
1	0	100
2	20	80
3	40	60
4	60	40
5	80	20
6	100	0
7	100+กลูโคส	0

หมายเหตุ : น้ำจากวัตถุดิบ 100%+กลูโคส โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบคือ 0.5 % สำหรับ GYP และ 2 % สำหรับ MRS

2.5 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลการทดลอง

2.5.1 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYP และ MRS คำนวณผลการนับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (cfu/ml) และแปลงค่าเป็น log ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่นับได้ (log cfu/ml) แสดงผลโดยใช้กราฟที่พล็อตข้อมูลระหว่างค่า log cfu/ml กับเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24

2.5.2 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ คำนวณผลการนับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแปลงค่าเป็น log ในการแสดงผลแสดงโดยพล็อตกราฟระหว่างจำนวนแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ เทียบกับจำนวนที่เวลาเริ่มต้นกับเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24

จำนวนแบคทีเรียที่เวลาหนึ่งๆ เทียบกับจำนวนที่เวลาเริ่มต้น $= \log N - N_0$

$= \log [N/N_0]$

โดย N_0 คือจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในชั่วโมงที่ 0

N คือจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชั่วโมงต่างๆ

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % (v/v)

จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จำนวนเซลด้วยวิธี drop plate เปรียบเทียบกับวิธี pour plate พบว่าได้ผลใกล้เคียงกัน (ดูใน**ภาคผนวก ข**) จึงได้ใช้วิธี drop plate ในการวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่มีชีวิตตลอดการศึกษาแทนวิธี pour plate

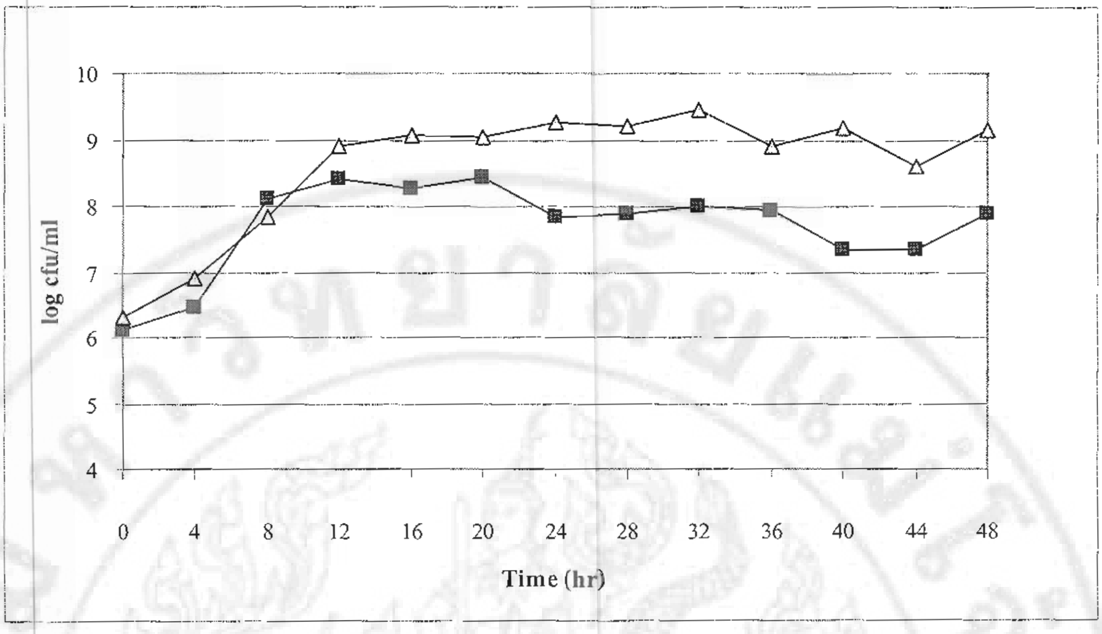
จากการศึกษาการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis* และ *S. thermophilus* ในอาหารเหลว GYP และ MRS โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % เพาะเลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์จำนวนเซลที่มีชีวิตโดยวิธี drop plate ได้ผลดังแสดงใน**ตาราง 6** ส่วนค่า pH ที่เวลาต่างๆ แสดงใน**ภาคผนวก ค** เมื่อนำค่าจำนวนเซลที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลว GYP และ MRS (จาก**ตาราง 6**) มาพล็อตกราฟพบว่า *Lb. acidophilus* เจริญในอาหารเหลว MRS ได้ดีกว่าอาหารเหลว GYP (**ภาพ 1**) ส่วนเชื้อ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. lactis* และ *S. thermophilus* เจริญในอาหารเหลว GYP ได้ดีกว่าในอาหารเหลว MRS (**ภาพ 2-4**) โดยพิจารณาจากจำนวนเซลสูงสุดประกอบกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ late-log phase หรือ early-stationary phase เมื่อพิจารณาส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อใน**ตาราง 1** พบว่าอาหาร MRS มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนกว่า GYP โดยเฉพาะส่วนประกอบจำพวกเกลือแร่ ได้แก่ ammonium citrate และ sodium acetate ซึ่ง Evan and Niven (1951) และ Tittsler *et al.* (1952) กล่าวว่าเกลือ acetate และ citrate มีผลช่วยในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ดี สอดคล้องกับที่ สายชล (2520) ได้กล่าวไว้ว่าอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อจะลดลงกว่าเท่าตัวหากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไม่มีการเติม ammonium citrate และ sodium acetate ลงไป นอกจากนี้ส่วนประกอบสำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ Tween 80 ซึ่งเป็นสารอาหารจำพวกกรดไขมัน ซึ่ง Gilliland *et al.* (1974) กล่าวว่า Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดโอเลอิกผสมอยู่ซึ่งมีผลให้เยื่อหุ้มเซลของ *Lb. bulgaricus* มีความทนทานแข็งแรงมากขึ้น และ Partanen *et al.* (2001) ยังกล่าวเสริมอีกว่า fatty acid และ fats ได้แก่ Tween 20, Tween 40 และ Tween 60 โดย fatty acid ทุกชนิดที่ใช้เติมลงในอาหาร MRS ล้วนแต่มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* อย่างไรก็ตามจากการเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ชนิดในอาหารเหลว GYP และ MRS

ในการทดลองนี้มีเพียง *Lb. acidophilus* เท่านั้นที่เจริญได้ดีใน MRS จึงสันนิษฐานว่า *Lb. acidophilus* น่าจะมีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และต้องการเกลือแร่กับกรดไขมันเป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญมากกว่าเชื้ออีกสามชนิดที่เหลือ

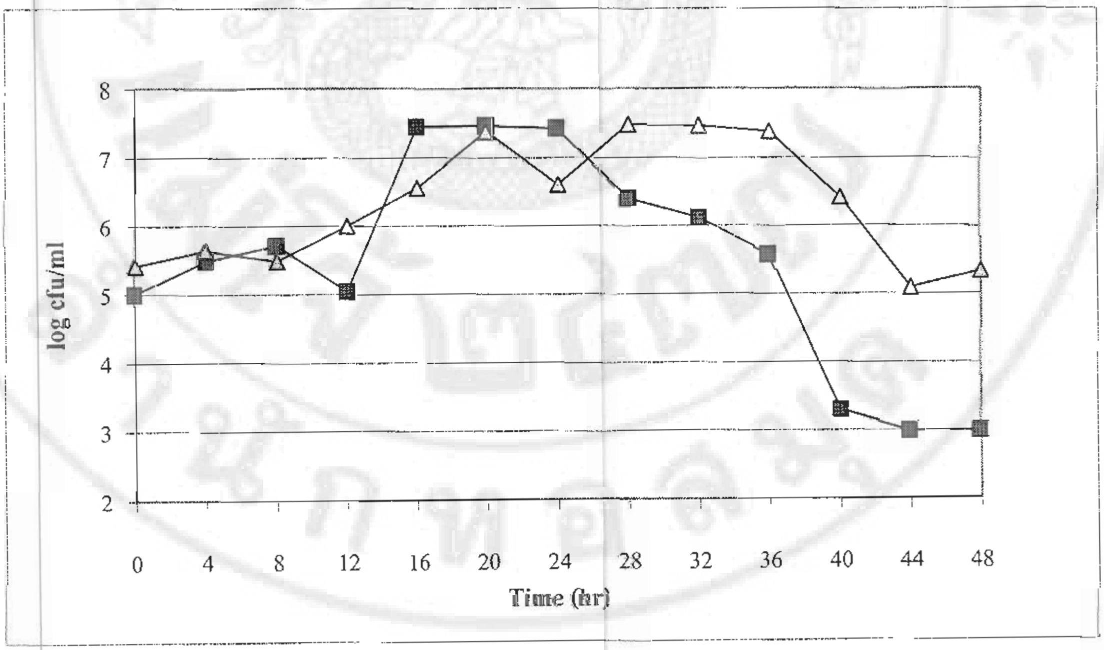
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๒๔๗๗ สำนักหอสมุด

ตาราง 6 จำนวนเซลที่มีชีวิตที่เลี้ยงโดยวิธี drop plate ในอาหารเหลว GYP และMRS โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %

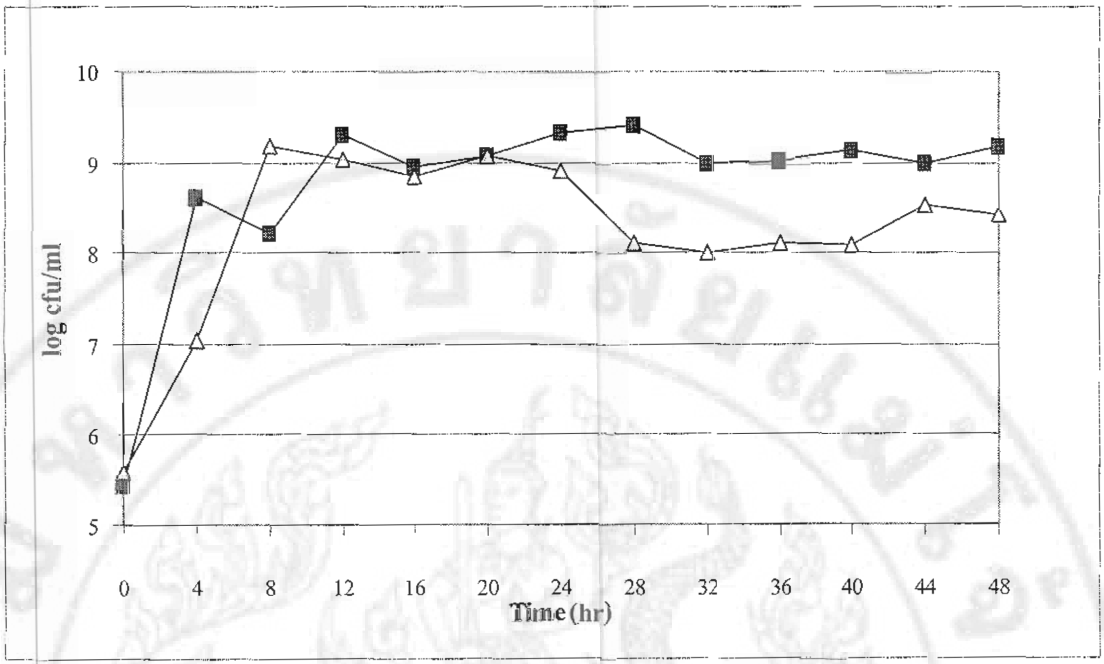
เวลา	จำนวนเชื้อที่มีชีวิต (cfu/ml)															
	Lb. acidophilus				*Lb. delbruekii* subsp *bulgaricus*				*S. lactis*				*S. thermophilus*			
	GYP	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**
0	1.3×10^6	6.11	2.0×10^6	6.30	1.0×10^5	5.00	2.6×10^5	5.41	2.7×10^5	5.43	3.8×10^5	5.58	4.2×10^6	6.62	4.5×10^6	6.65
4	3.0×10^6	6.48	8.0×10^6	6.90	3.0×10^5	6.48	4.3×10^5	5.63	4.1×10^8	8.61	1.1×10^7	7.04	3.4×10^8	8.53	1.3×10^9	9.11
8	1.3×10^8	8.11	7.0×10^7	7.85	5.1×10^5	5.71	3.0×10^5	6.48	1.6×10^8	8.20	1.5×10^8	8.18	3.5×10^8	8.54	3.1×10^9	9.49
12	2.5×10^8	8.39	8.0×10^8	8.90	1.1×10^5	5.04	1.0×10^6	6.00	2.0×10^9	9.30	1.1×10^9	9.04	3.6×10^9	9.56	6.0×10^9	9.77
16	1.9×10^8	8.28	1.2×10^9	9.08	2.8×10^7	7.45	3.6×10^6	6.56	9.0×10^9	9.95	7.0×10^8	8.84	4.2×10^8	8.62	9.6×10^8	8.98
20	2.7×10^8	8.43	1.1×10^9	9.04	2.9×10^7	7.46	2.4×10^7	7.38	1.2×10^9	9.08	1.2×10^9	9.08	2.2×10^9	9.34	1.9×10^8	8.28
24	6.8×10^7	7.83	1.8×10^9	9.25	2.7×10^7	7.43	4.0×10^6	6.60	2.1×10^9	9.32	8.0×10^8	8.90	1.8×10^7	7.25	6.3×10^6	6.79
28	7.9×10^7	7.89	1.58×10^9	9.19	2.5×10^6	6.39	3.0×10^7	7.48	2.6×10^9	9.41	1.3×10^8	8.00	4.5×10^8	8.65	7.7×10^8	8.88
32	1.0×10^8	8.00	2.8×10^9	9.45	1.3×10^6	6.11	2.9×10^7	7.46	1.0×10^9	9.00	1.0×10^8	8.00	1.8×10^8	8.25	6.0×10^7	7.78
36	9.0×10^7	7.95	8.0×10^8	8.90	3.8×10^5	5.57	2.4×10^7	7.38	1.1×10^9	9.04	1.3×10^8	8.11	1.8×10^9	8.25	5.2×10^8	8.72
40	1.3×10^8	8.11	1.5×10^9	9.18	2.0×10^5	5.30	2.6×10^6	6.41	1.4×10^9	9.15	1.2×10^8	8.08	2.6×10^8	8.41	4.7×10^9	9.67
44	2.2×10^7	7.34	4.0×10^8	8.60	1.0×10^3	3.00	1.2×10^5	5.08	1.0×10^9	9.00	3.4×10^8	8.53	2.7×10^8	8.43	5.1×10^9	9.71
48	8.0×10^7	7.90	1.4×10^9	9.15	1.0×10^3	3.00	2.1×10^5	5.32	1.5×10^9	9.18	2.6×10^8	8.41	4.7×10^9	9.67	3.3×10^8	8.52



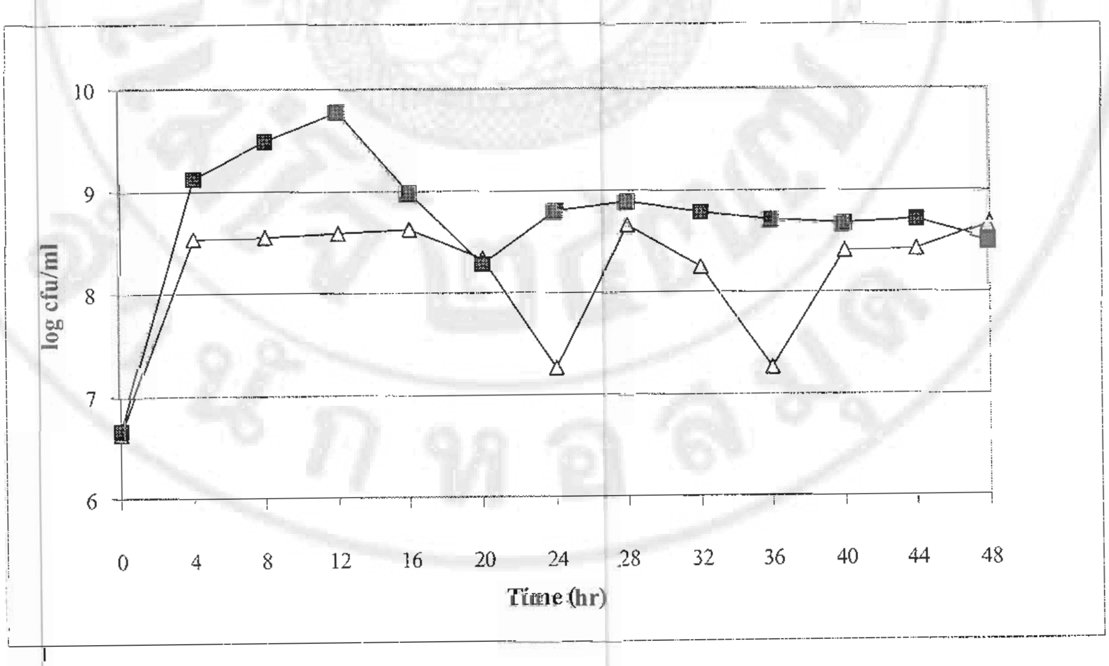
ภาพ 1 กราฟการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %



ภาพ 2 กราฟการเจริญของ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %



ภาพ 3 กราฟการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %



ภาพ 4 กราฟการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %

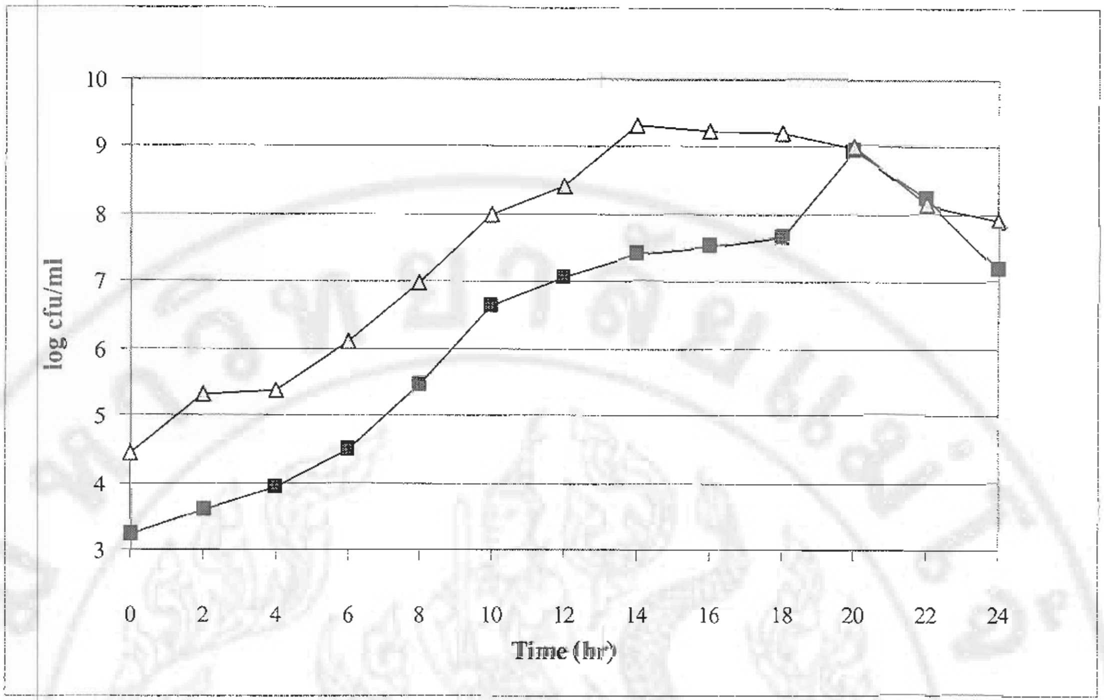
4.2 ผลการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ

จากการศึกษาการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis* และ *S. thermophilus* ในอาหารเหลว GYP และ MRS โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง มาวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่มีชีวิตโดยวิธี drop plate ได้ผลดังตาราง 7 และเมื่อนำค่าจำนวนเซลที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตรในอาหารเหลว GYP และ MRS มาพล็อตกราฟเทียบกับเวลา พบว่าการเจริญของเชื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเลี้ยงโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % คือ *Lb. acidophilus* เจริญในอาหารเหลว MRS ได้ดีกว่าอาหารเหลว GYP (**ภาพ 5**) จาก ส่วน *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. lactis* และ *S. thermophilus* เจริญในอาหารเหลว GYP ได้ดีกว่าในอาหาร MRS (**ภาพ 6-8**) จาก**ภาพ 5-8** จะเห็นว่าเนื่องจากความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นมีน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % การเจริญของเชื้อช่วงแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนี้จึงเป็นไปอย่างช้าๆ จนถึงระยะที่เชื้อสามารถปรับสภาพตัวเองกับสภาพแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจึงมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง log phase อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อสูงสุดที่ได้ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % ยกเว้น *S. thermophilus* ที่ได้ปริมาณเชื้อสูงสุดน้อยกว่าการเลี้ยงโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 %

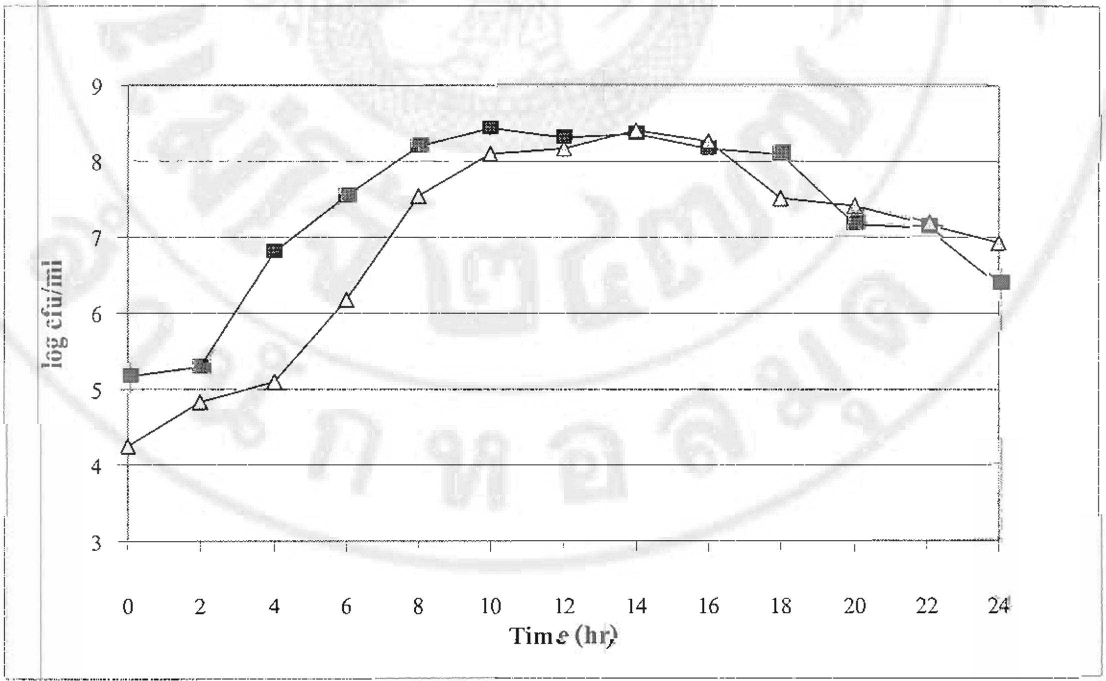
จากผลการเจริญของเชื้อที่เลี้ยงโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเซลที่มีชีวิตและมีกิจกรรมสูงสุดสำหรับเป็นเชื้อตั้งต้น เช่นเดียวกับที่นักวิจัยหลายท่านที่เลี้ยงเชื้อและเก็บเซลในระยะ late-log phase เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Hong and Marshall (2001) ศึกษาผลการรอดชีวิตของ *S. thermophilus* ที่มีในผลิตภัณฑ์ขนมที่มีนมเป็นส่วนผสมแช่แข็งโดยเก็บเซลในระยะ early-log phase, mid-log phase, late-log phase และ stationary phase ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 4, 10, 15 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าเซลที่เก็บในช่วง late log phase มีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าเซลที่ทำการเก็บในช่วงเวลาอื่น ส่วนเชื้อในระยะ early-log phase พบว่าเชื้อมีความไวต่อการถูกทำลายโดยความเย็นระดับที่ใช้แช่แข็ง จำนวนเซลที่มีชีวิตที่เลี้ยงในระยะ mid-log phase กับ stationary phase พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Briczinski and Roberts (2002) ซึ่งได้เลี้ยง *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* โดยเลี้ยงและเก็บเซลในระยะ mid-late log phase เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ exopolysaccharide ที่ได้จากกระบวนการหมัก จากข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ การเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในการศึกษาจึงได้ทำการเลี้ยงและเก็บเซลในระยะ late-log phase เป็นเชื้อตั้งต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำจากวัตถุดิบในสัดส่วนต่างๆ

ตาราง 7 จำนวนเซลที่มีชีวิตที่เลี้ยงโดยวิธี drop plate ในอาหารเหลว GYP และMRS โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ

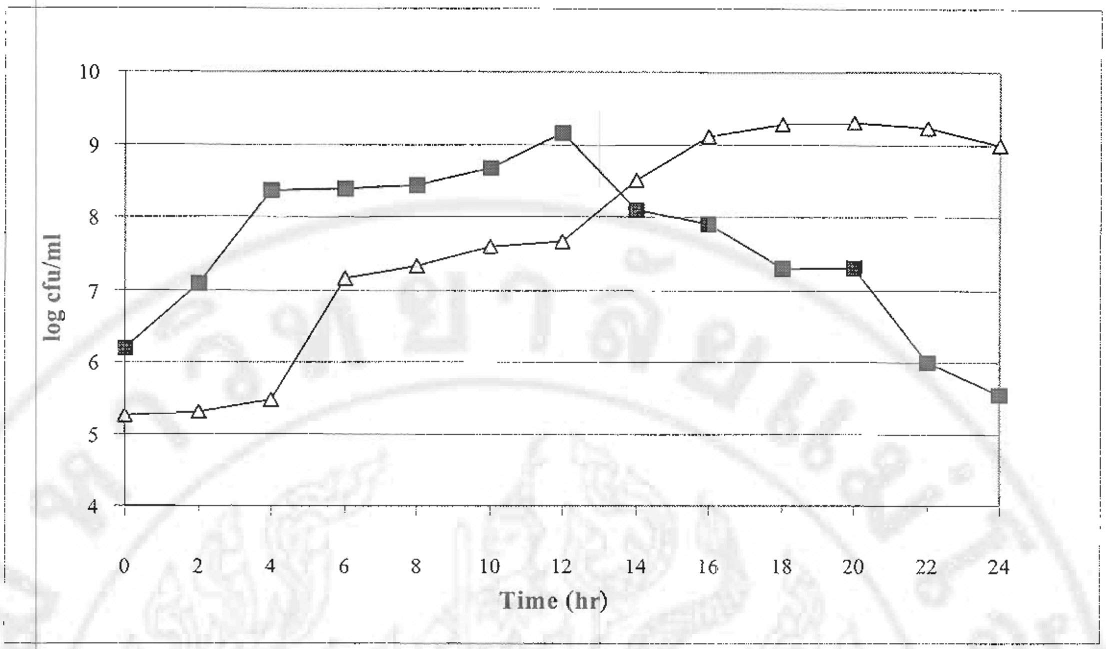
เวลา	จำนวนเชื้อที่มีชีวิต (cfu/ml)															
	Lb. acidophilus				*Lb. delbruekii* subsp *bulgaricus*				*S. lactis*				*S. thermophilus*			
	GYP	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**	**GYP**	**log**	**MRS**	**log**
0	1.65×10^{3}	3.22	2.8×10^{4}	4.45	1.45×10^{4}	4.16	1.75×10^{4}	4.24	1.6×10^{6}	6.2	1.75×10^{5}	5.24	9.5×10^{3}	3.98	1.5×10^{3}	3.18
2	3.8×10^{3}	3.58	2.05×10^{5}	5.31	2.0×10^{5}	5.3	6.6×10^{4}	4.82	1.2×10^{7}	7.08	1.95×10^{5}	5.29	9.0×10^{3}	3.95	6.5×10^{3}	3.81
4	8.5×10^{3}	3.93	2.35×10^{5}	5.37	6.5×10^{6}	6.81	1.26×10^{5}	5.1	2.25×10^{8}	8.41	2.95×10^{5}	5.47	1.05×10^{5}	5.02	9.5×10^{3}	3.98
6	3.15×10^{4}	4.49	1.3×10^{6}	6.11	3.4×10^{7}	7.53	1.45×10^{6}	6.16	2.4×10^{8}	8.38	1.4×10^{7}	7.15	2.05×10^{6}	6.31	1.15×10^{4}	4.06
8	2.9×10^{5}	5.46	9.65×10^{6}	6.98	1.6×10^{8}	8.2	3.35×10^{7}	7.53	2.65×10^{8}	8.42	2.1×10^{7}	7.32	8.5×10^{6}	6.93	2.05×10^{4}	4.31
10	4.3×10^{6}	6.63	9.85×10^{7}	7.99	2.75×10^{8}	8.44	1.25×10^{8}	8.09	4.75×10^{8}	8.67	3.9×10^{7}	7.59	5.4×10^{8}	8.73	3.4×10^{5}	5.53
12	1.15×10^{7}	7.06	2.6×10^{8}	8.41	2.05×10^{8}	8.31	1.45×10^{8}	8.16	1.4×10^{9}	9.15	4.7×10^{7}	7.67	3.95×10^{7}	7.59	3.4×10^{6}	6.53
14	2.6×10^{7}	7.42	2.05×10^{9}	9.31	2.3×10^{8}	8.36	2.65×10^{8}	8.42	1.25×10^{8}	8.09	3.2×10^{8}	8.51	1.3×10^{7}	7.11	4.05×10^{7}	7.61
16	3.3×10^{7}	7.52	1.7×10^{9}	9.23	1.45×10^{8}	8.16	1.85×10^{7}	7.27	8.0×10^{7}	7.9	1.3×10^{9}	9.11	8.5×10^{6}	6.93	2.5×10^{8}	8.39
18	4.5×10^{8}	8.65	1.6×10^{9}	9.2	1.25×10^{8}	8.09	3.2×10^{7}	7.51	2.05×10^{7}	7.31	1.9×10^{9}	9.28	9.0×10^{5}	5.95	3.85×10^{8}	8.59
20	8.5×10^{8}	8.93	9.4×10^{8}	8.97	1.5×10^{7}	7.17	2.55×10^{7}	7.41	2.0×10^{7}	7.3	1.95×10^{9}	9.29	7.0×10^{5}	5.85	3.0×10^{8}	8.48
22	1.7×10^{8}	8.23	1.4×10^{8}	8.15	1.3×10^{7}	7.11	1.45×10^{7}	7.16	1.0×10^{6}	6	1.65×10^{9}	9.22	1.1×10^{5}	5.04	3.25×10^{8}	8.51
24	1.5×10^{7}	7.18	8.0×10^{7}	7.90	2.35×10^{6}	6.37	8.5×10^{6}	6.93	3.5×10^{5}	5.54	1.0×10^{9}	9	7.0×10^{4}	4.85	2.0×10^{8}	8.3



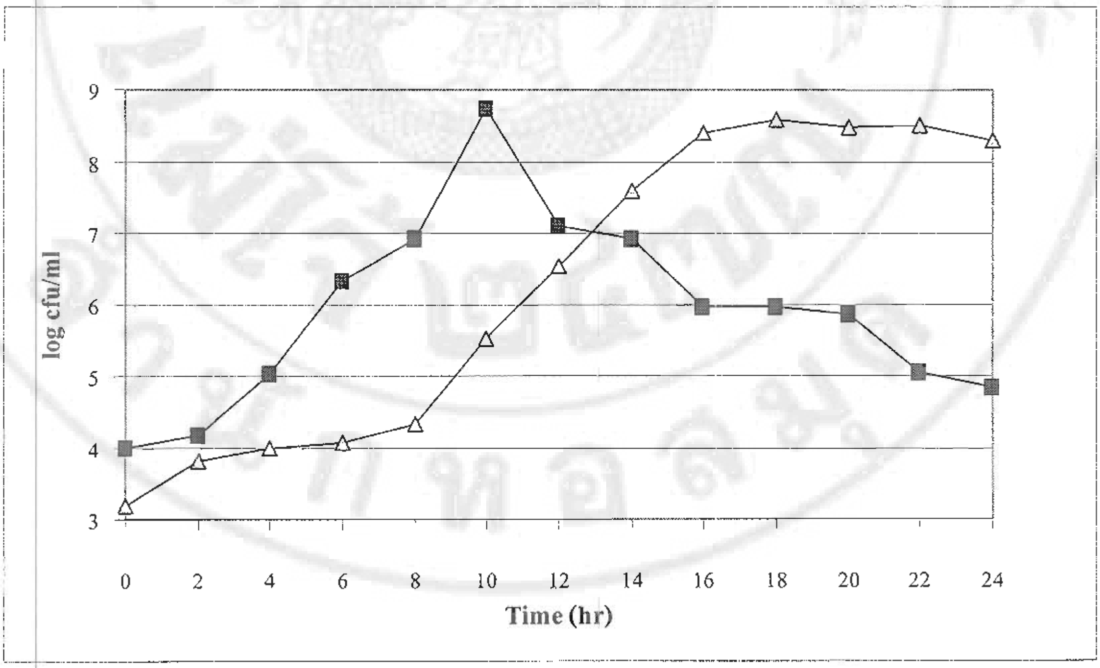
ภาพ 5 กราฟการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ



ภาพ 6 กราฟการเจริญของ *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ



ภาพ 7 กราฟการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ



ภาพ 8 กราฟการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP (■) และ MRS (△) โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ

4.3 การศึกษาสัดส่วนของน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อ

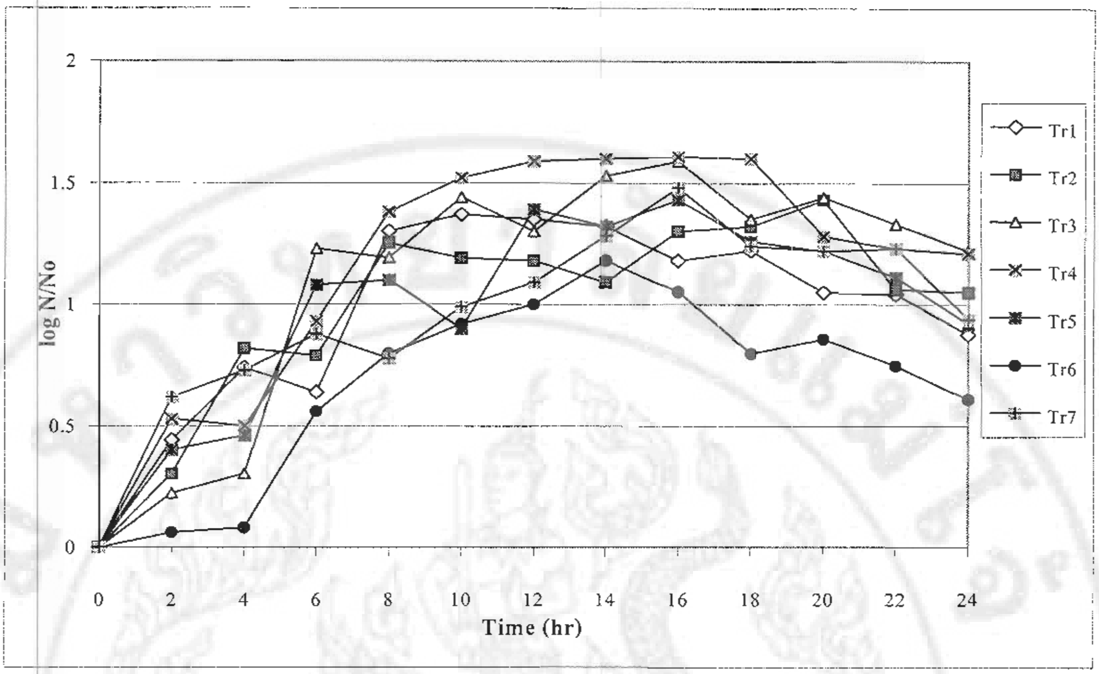
จากข้อมูลการเลี้ยงเชื้อโดยวิธี drop plate และ pour plate ในข้อ 4.1 พบว่าอาหารเหลว MRS เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* และ อาหารเหลว GYP เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis* และ *S. thermophilus* จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อเป็นอาหารพื้นฐานในการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมในการผสมกับน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ โดยถ่ายเชื้อตั้งต้น 10 % (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ผสมน้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศทั้ง 7 ทรีตเมนต์ ตาม**ตาราง 5** และเลี้ยงเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง มาวิเคราะห์จำนวนเชื้อที่มีชีวิตโดยวิธี drop plate พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำจากวัตถุดิบในสัดส่วนต่างๆ ให้ผลการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป การเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมหรือทดแทนด้วยน้ำเวย์สัดส่วนต่างๆ แสดงใน**ตาราง 8-11** และ**ภาพ 9-12** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมหรือทดแทนด้วยน้ำมะพร้าวสัดส่วนต่างๆ แสดงใน**ตาราง 12-15** และ**ภาพ 13-16** และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมหรือทดแทนด้วยน้ำกากมะเขือเทศสัดส่วนต่างๆ แสดงใน**ตาราง 16-19** และ**ภาพ 17-20**

ตาราง 8 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N$_0$]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	5.0×10^{7}	6.45×10^{7}	4.45×10^{7}	5.25×10^{7}	5.8×10^{7}	5.4×10^{7}	4.3×10^{7}	0	0	0	0	0	0	0
2	1.35×10^{8}	1.3×10^{8}	7.35×10^{7}	1.8×10^{8}	1.45×10^{8}	6.25×10^{7}	1.8×10^{8}	0.44	0.3	0.22	0.53	0.4	0.06	0.62
4	2.7×10^{8}	4.3×10^{8}	9.0×10^{7}	1.65×10^{8}	1.65×10^{8}	6.4X107	2.3×10^{8}	0.74	0.82	0.3	0.5	0.46	0.08	0.73
6	2.15×10^{8}	4.0×10^{8}	7.55×10^{8}	4.45×10^{8}	6.95×10^{8}	1.95×10^{8}	3.25×10^{8}	0.64	0.79	1.23	0.93	1.08	0.56	0.88
8	9.95×10^{8}	1.15×10^{9}	6.85×10^{8}	1.26×10^{9}	7.2×10^{8}	3.35×10^{8}	2.6×10^{8}	1.3	1.25	1.19	1.38	1.1	0.8	0.78
10	1.15×10^{9}	1.01×10^{9}	1.25×10^{9}	1.75×10^{9}	4.55×10^{8}	4.45×10^{8}	4.2×10^{8}	1.37	1.19	1.44	1.52	0.9	0.92	0.99
12	1.085×10^{9}	9.95×10^{8}	8.85×10^{8}	2.05×10^{9}	1.4×10^{9}	5.35×10^{8}	5.2×10^{8}	1.35	1.18	1.3	1.59	1.39	1	1.09
14	1.03×10^{9}	7.95×10^{8}	1.5×10^{9}	2.1×10^{9}	1.2×10^{9}	8.05×10^{8}	8.2×10^{8}	1.32	1.09	1.53	1.6	1.32	1.18	1.28
16	7.5×10^{8}	1.3×10^{9}	1.75×10^{9}	2.15×10^{9}	1.55×10^{9}	6.0×10^{8}	1.3×10^{9}	1.18	1.3	1.59	1.61	1.43	1.05	1.48
18	8.1×10^{8}	1.35×10^{9}	1.0×10^{9}	2.1×10^{9}	1.05×10^{9}	3.35×10^{8}	7.5×10^{8}	1.22	1.32	1.35	1.6	1.26	0.8	1.24
20	5.55×10^{8}	1.75×10^{9}	1.25×10^{9}	1.0×10^{9}	9.6×10^{8}	3.9×10^{8}	7.1×10^{8}	1.05	1.43	1.44	1.28	1.22	0.86	1.22
22	5.4×10^{8}	7.41×10^{8}	9.5×10^{8}	9.0×10^{8}	7.5×10^{8}	3.05×10^{8}	7.3×10^{8}	1.04	1.06	1.33	1.23	1.11	0.75	1.23
24	3.75×10^{8}	7.2×10^{8}	7.5×10^{8}	8.5×10^{8}	4.85×10^{8}	2.2×10^{8}	3.75×10^{8}	0.88	1.05	1.22	1.21	0.92	0.61	0.94

หมายเหตุ : ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



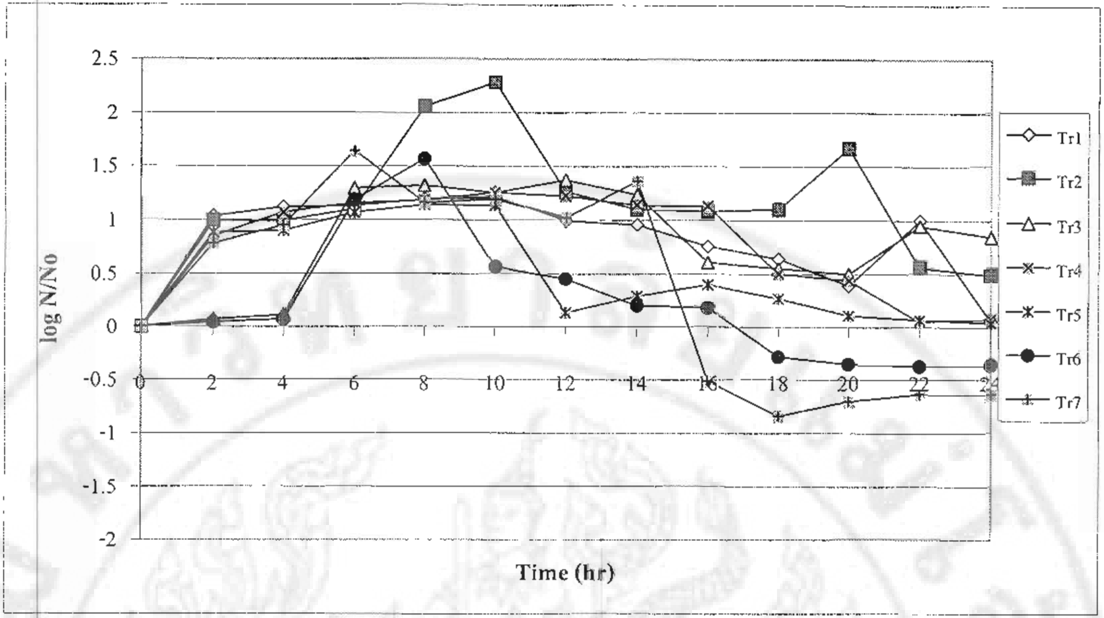
ภาพ 9 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำเวย์ 20 % T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำเวย์ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำเวย์ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำเวย์ 80 %, T6 คือน้ำเวย์ 100 % และ T7 คือน้ำเวย์ 100 %ผสมกลูโคส 2 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T4 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 9 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N_0]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	2.65×10^7	1.8×10^7	1.05×10^7	1.5×10^7	2.2×10^7	1.25×10^7	2.25×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	2.8×10^8	1.75×10^8	1.25×10^7	1.05×10^8	1.65×10^8	1.12×10^7	1.35×10^8	1.03	0.99	0.07	0.85	0.88	0.04	0.78
4	3.5×10^8	1.75×10^8	1.35×10^7	1.75×10^8	1.75×10^8	1.45×10^7	2.0×10^8	1.12	0.99	0.11	1.07	0.9	0.07	0.95
6	3.55×10^8	2.25×10^8	2.05×10^8	2.15×10^8	2.6×10^8	1.85×10^8	2.5×10^8	1.13	1.1	1.29	1.16	1.07	1.18	1.64
8	4.05×10^8	2.05×10^9	2.2×10^8	2.25×10^8	3.05×10^8	4.6×10^7	3.25×10^8	1.19	2.06	1.32	1.18	1.14	1.57	1.16
10	4.3×10^8	3.4×10^9	1.85×10^8	2.65×10^8	3.0×10^8	4.5×10^7	3.5×10^8	1.21	2.28	1.25	1.25	1.13	0.56	1.19
12	2.55×10^8	3.25×10^8	2.5×10^8	2.45×10^8	2.95×10^7	3.5×10^7	2.35×10^8	0.99	1.26	1.37	1.22	0.13	0.45	1.02
14	2.4×10^8	2.25×10^8	1.8×10^8	2.05×10^8	4.25×10^7	1.95×10^7	5.1×10^8	0.96	1.1	1.23	1.14	0.29	0.2	1.36
16	1.5×10^8	2.15×10^8	4.25×10^7	2.0×10^8	5.5×10^7	1.85×10^7	7.0×10^6	0.76	1.08	0.61	1.13	0.4	0.18	-0.51
18	1.15×10^8	2.25×10^8	3.7×10^7	4.65×10^7	4.1×10^7	6.4×10^6	3.2×10^6	0.64	1.1	0.55	0.5	0.27	-0.28	-0.84
20	6.5×10^7	8.5×10^7	3.35×10^7	4.05×10^7	2.8×10^7	5.5×10^6	4.5×10^6	0.39	1.67	0.5	0.44	0.11	-0.35	-0.7
22	2.65×10^7	6.5×10^7	9.5×10^7	1.65×10^7	1.85×10^7	5.2×10^6	5.25×10^6	1	0.56	0.95	0.05	0.07	-0.37	-0.63
24	3.05×10^7	5.5×10^7	7.55×10^7	1.25×10^7	2.0×10^7	5.35×10^6	5.1×10^6	0.06	0.49	0.85	0.08	0.04	-0.36	-0.64

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



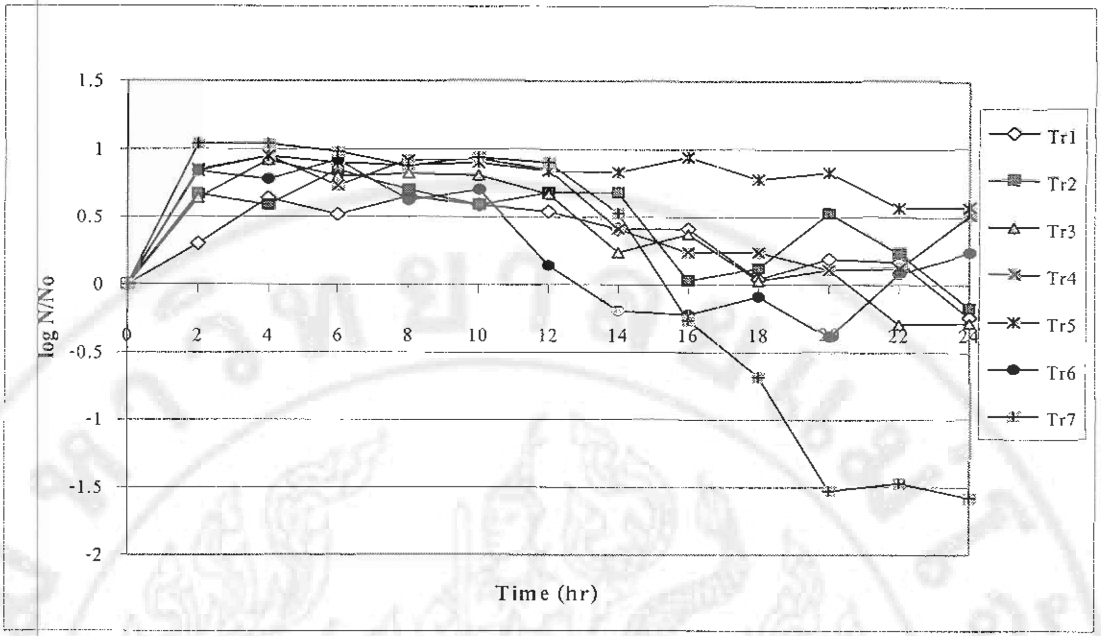
ภาพ 10 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำเวย์ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำเวย์ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำเวย์ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำเวย์ 80 %, T6 คือน้ำเวย์ 100 % และ T7 คือน้ำเวย์ 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T2 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 10 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							$\log [N/N_0]$						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	3.35×10^7	2.8×10^7	2.25×10^7	2.25×10^7	2.6×10^7	3.45×10^7	2.35×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	6.6×10^7	1.75×10^8	9.95×10^7	1.6×10^8	1.8×10^8	2.4×10^8	2.6×10^8	0.3	0.67	0.64	0.85	0.84	0.84	1.04
4	1.45×10^8	1.1×10^8	1.85×10^8	2.0×10^8	2.3×10^8	2.1×10^8	2.6×10^8	0.64	0.59	0.92	0.95	0.95	0.78	1.04
6	1.1×10^8	2.0×10^8	1.4×10^8	1.2×10^8	2.05×10^8	2.9×10^8	2.25×10^8	0.52	0.85	0.8	0.73	0.9	0.92	0.98
8	1.5×10^8	1.4×10^8	1.5×10^8	1.85×10^8	1.9×10^8	1.45×10^8	1.8×10^8	0.65	0.7	0.82	0.92	0.88	0.62	0.88
10	1.3×10^8	1.1×10^8	1.45×10^8	1.9×10^8	2.05×10^8	1.75×10^8	2.05×10^8	0.59	0.59	0.81	0.93	0.9	0.7	0.94
12	1.15×10^8	1.35×10^8	1.05×10^8	1.6×10^8	1.8×10^8	4.75×10^7	1.9×10^8	0.54	0.68	0.67	0.85	0.84	0.14	0.9
14	8.5×10^7	1.35×10^8	3.9×10^7	5.7×10^7	1.75×10^8	2.25×10^7	8.0×10^7	0.41	0.68	0.24	0.41	0.83	-0.19	0.53
16	8.5×10^7	3.0×10^7	5.3×10^7	3.9×10^7	2.25×10^8	2.1×10^7	1.3×10^7	0.41	0.03	0.37	0.24	0.94	-0.22	-0.26
18	3.65×10^7	3.75×10^7	2.4×10^7	3.9×10^7	1.55×10^8	2.8×10^7	5.0×10^6	0.04	0.12	0.03	0.24	0.78	-0.09	-0.68
20	5.15×10^7	9.5×10^7	2.9×10^7	2.9×10^7	1.75×10^8	1.4×10^7	7.0×10^5	0.19	0.53	0.11	0.11	0.83	-0.39	-1.53
22	4.9×10^7	4.8×10^7	1.5×10^7	3.85×10^7	9.5×10^7	4.65×10^7	8.0×10^5	0.17	0.23	-0.29	0.12	0.57	0.08	-1.47
24	1.9×10^7	1.9×10^7	1.2×10^7	7.35×10^7	9.5×10^7	5.9×10^7	6.1×10^5	-0.24	-0.17	-0.28	0.51	0.57	0.23	-1.58

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



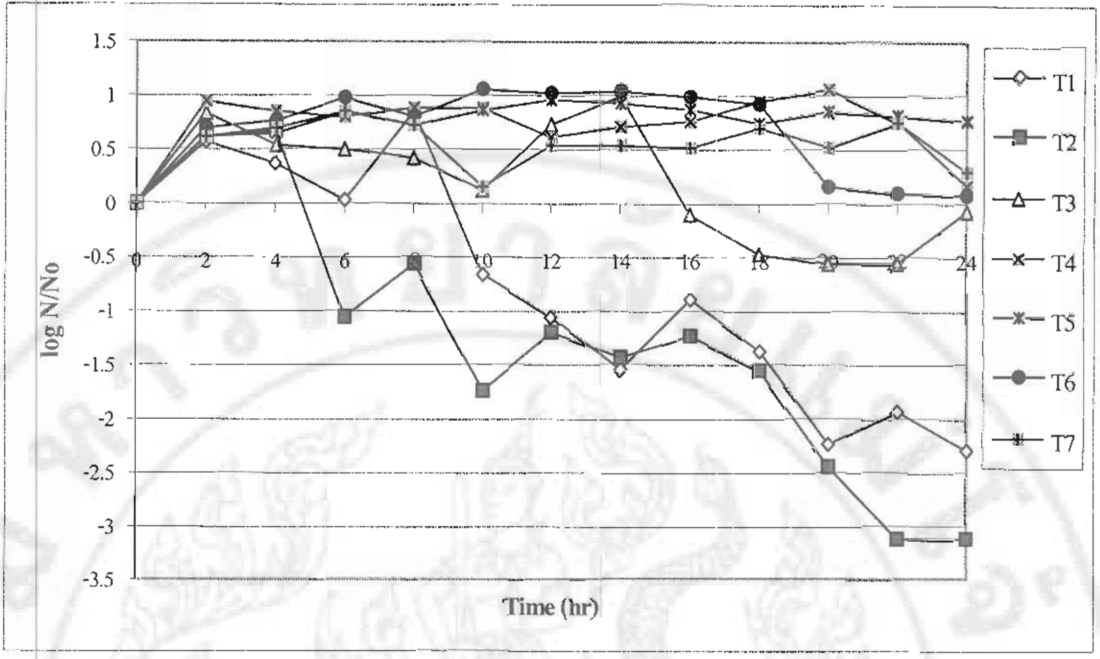
ภาพ 11 อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์: โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำเวย์ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำเวย์ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำเวย์ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำเวย์ 80 %, T6 คือน้ำเวย์ 100 % และ T7 คือน้ำเวย์ 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T7 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 11 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log $[N/N_0]$						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	1.15×10^{8}	1.35×10^{8}	7.75×10^{7}	6.95×10^{7}	1.01×10^{8}	5.9×10^{7}	6.65×10^{7}	0	0	0	0	0	0	0
2	4.35×10^{8}	5.5×10^{8}	5.2×10^{8}	6.1×10^{8}	4.2×10^{8}	2.9×10^{8}	2.75×10^{8}	0.58	0.61	0.83	0.94	0.58	0.69	0.62
4	2.75×10^{8}	6.45×10^{8}	2.65×10^{8}	5.0×10^{8}	4.45×10^{8}	3.4×10^{8}	3.3×10^{8}	0.38	0.68	0.53	0.85	0.61	0.76	0.7
6	2.5×10^{8}	1.2×10^{7}	2.4×10^{8}	4.45×10^{8}	7.0×10^{8}	5.6×10^{8}	4.75×10^{8}	0.33	-1.05	0.49	0.81	0.8	0.98	1.04
8	8.3×10^{8}	3.7×10^{7}	2.0×10^{8}	5.3×10^{8}	5.3×10^{8}	3.75×10^{8}	3.5×10^{8}	0.86	-0.56	0.41	0.88	0.68	0.8	0.99
10	2.5×10^{7}	2.5×10^{6}	1.0×10^{8}	5.35×10^{8}	7.4×10^{8}	6.75×10^{8}	9.5×10^{7}	-0.67	-1.74	0.11	0.89	0.83	1.06	0.16
12	1.0×10^{7}	8.5×10^{6}	4.15×10^{8}	2.85×10^{8}	9.25×10^{8}	6.3×10^{8}	2.3×10^{8}	-1.06	-1.2	0.73	0.61	0.93	1.02	0.54
14	3.2×10^{6}	5.0×10^{6}	7.55×10^{8}	3.6×10^{8}	8.55×10^{8}	6.55×10^{8}	3.35×10^{8}	-1.56	-1.44	0.99	0.72	0.89	1.05	0.71
16	1.45×10^{7}	7.85×10^{6}	6.1×10^{7}	4.0×10^{8}	7.55×10^{8}	5.85×10^{8}	2.2×10^{8}	-0.9	-1.24	-0.11	0.76	0.84	1	0.52
18	4.8×10^{6}	3.75×10^{6}	2.6×10^{7}	6.3×10^{8}	5.6×10^{8}	4.95×10^{8}	3.7×10^{8}	-1.38	-1.56	-0.47	0.95	0.71	0.92	0.75
20	6.7×10^{5}	4.85×10^{5}	2.1×10^{7}	8.6×10^{8}	7.15×10^{8}	8.5×10^{7}	1.3×10^{8}	-2.23	-2.44	-0.57	1.09	0.81	0.16	0.29
22	1.32×10^{6}	1.0×10^{5}	2.1×10^{7}	3.9×10^{8}	6.55×10^{8}	7.25×10^{7}	6.45×10^{7}	-1.94	-3.13	-0.57	0.75	0.78	0.09	-0.01
24	5.8×10^{5}	1.0×10^{5}	1.2×10^{7}	1.0×10^{8}	5.8×10^{8}	7.05×10^{7}	1.06×10^{8}	-2.3	-3.13	-0.81	0.16	0.72	0.08	0.2

หมายเหตุ : (วงรี) ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



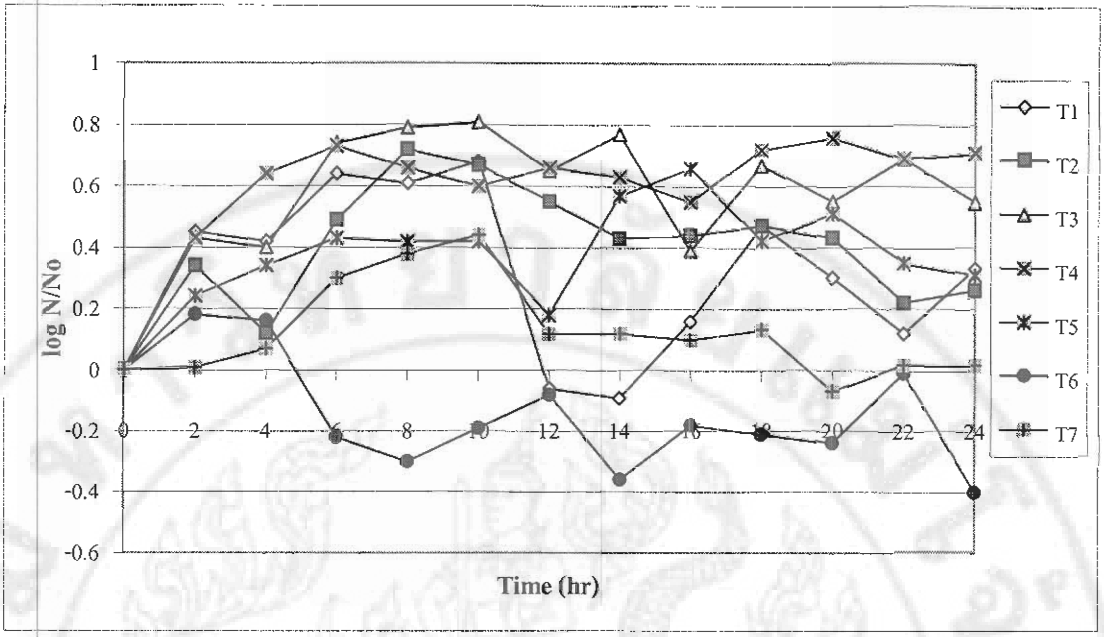
ภาพ 12 อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำเวย์ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำเวย์ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำเวย์ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำเวย์ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำเวย์ 80 %, T6 คือน้ำเวย์ 100 % และ T7 คือน้ำเวย์100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T4 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 12 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N_0]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	1.7×10^8	1.8×10^8	1.0×10^8	7.5×10^7	1.25×10^8	1.15×10^8	1.25×10^8	0	0	0	0	0	0	0
2	4.8×10^8	3.95×10^8	2.7×10^8	2.05×10^8	2.2×10^8	1.75×10^8	1.3×10^8	0.45	0.34	0.43	0.44	0.25	0.18	0.02
4	4.5×10^8	2.35×10^8	2.55×10^8	3.3×10^8	2.75×10^8	1.7×10^8	1.5×10^8	0.42	0.12	0.41	0.65	0.35	0.17	0.08
6	7.55×10^8	5.5×10^8	5.55×10^8	4.05×10^8	3.4×10^8	6.8×10^7	2.5×10^8	0.65	0.49	0.74	0.74	0.44	0.77	0.3
8	7.0×10^8	9.45×10^8	6.2×10^8	3.45×10^8	3.35×10^8	5.75×10^7	2.7×10^8	0.61	0.72	0.79	0.67	0.44	-0.3	-0.66
10	8.3×10^8	8.4×10^8	6.6×10^8	3.0×10^8	3.3×10^8	7.35×10^7	3.5×10^8	0.69	0.67	0.82	0.61	0.43	-0.19	0.45
12	1.5×10^8	6.4×10^8	4.5×10^8	3.5×10^8	1.89×10^8	9.5×10^7	1.65×10^8	-0.06	0.56	0.65	0.67	0.18	-0.09	0.13
14	1.4×10^8	4.8×10^8	6.0×10^8	3.2×10^8	4.65×10^8	5.0×10^7	1.7×10^8	-0.08	0.43	0.78	0.64	0.58	-0.37	0.14
16	2.5×10^8	4.9×10^8	2.5×10^8	2.7×10^8	5.8×10^8	7.5×10^7	1.6×10^8	0.16	0.44	0.39	0.56	0.67	-0.24	0.11
18	5.15×10^8	5.35×10^8	4.7×10^8	3.95×10^8	3.3×10^8	7×10^7	1.4×10^8	0.48	0.48	0.67	0.72	0.43	-0.22	0.06
20	3.4×10^8	4.85×10^8	3.6×10^8	4.35×10^8	4.1×10^8	6.5×10^7	1.05×10^8	0.3	0.43	0.56	0.77	0.52	-0.25	-0.07
22	2.25×10^8	3.0×10^8	4.95×10^8	3.75×10^8	2.85×10^8	1.1×10^8	1.3×10^8	0.12	0.23	0.69	0.67	0.36	-0.02	0.02
24	3.65×10^8	3.3×10^8	3.55×10^8	3.4×10^8	2.6×10^8	4.55×10^7	1.85×10^8	0.33	0.27	0.55	0.66	0.33	-0.4	0.17

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



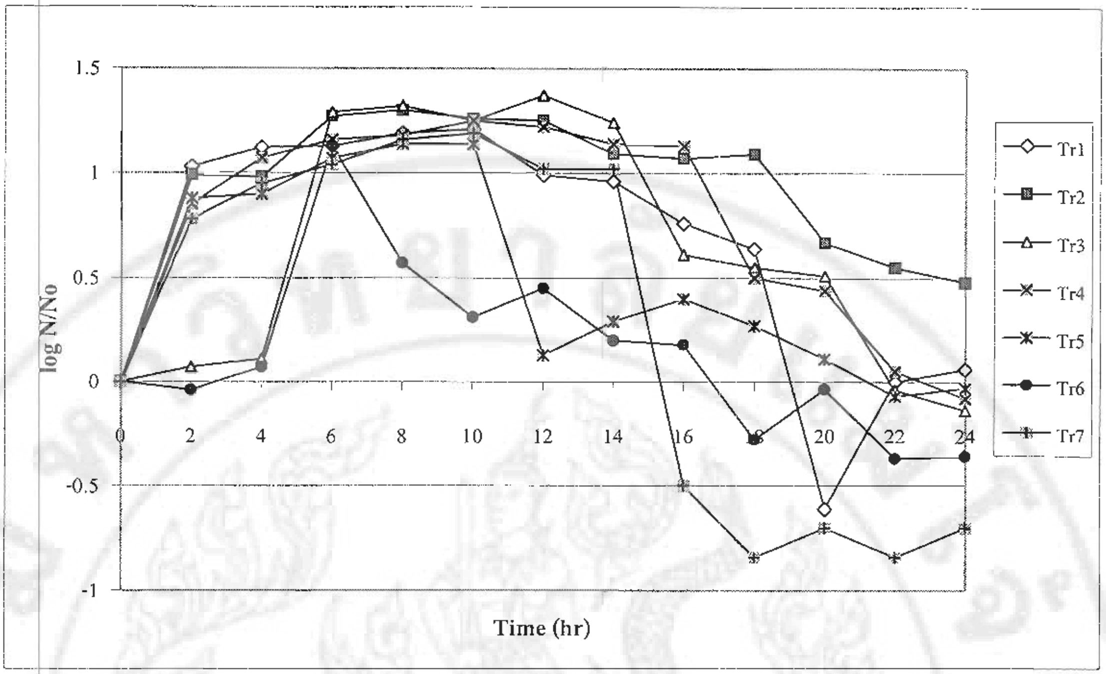
ภาพ 13 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำมะพร้าว 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำมะพร้าว 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำมะพร้าว 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำมะพร้าว 80 %, T6 คือน้ำมะพร้าว 100 % และ T7 คือน้ำมะพร้าว 100 % ผสมกลูโคส 2 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T3 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 13 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N$_0$]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	2.65×10^{7}	1.8×10^{7}	1.05×10^{7}	1.5×10^{7}	2.2×10^{7}	1.25×10^{7}	2.25×10^{7}	0	0	0	0	0	0	0
2	2.80×10^{8}	1.75×10^{8}	1.25×10^{7}	1.05×10^{8}	1.65×10^{8}	1.12×10^{7}	1.35×10^{8}	1.03	0.99	0.07	0.85	0.88	-0.04	0.78
4	3.5×10^{8}	1.75×10^{8}	1.35×10^{7}	1.75×10^{8}	1.75×10^{8}	1.45×10^{7}	2.0×10^{8}	1.12	0.98	0.11	1.07	0.9	0.07	0.95
6	3.55×10^{8}	2.25×10^{8}	2.05×10^{8}	2.15×10^{8}	2.6×10^{8}	1.65×10^{8}	2.5×10^{8}	1.13	1.27	1.29	1.16	1.07	1.13	1.04
8	4.05×10^{8}	3.65×10^{8}	2.2×10^{8}	2.25×10^{8}	3.05×10^{8}	4.6×10^{7}	3.25×10^{8}	1.19	1.3	1.32	1.18	1.14	0.57	1.16
10	4.3×10^{8}	3.35×10^{8}	1.85×10^{8}	2.65×10^{8}	3.00×10^{8}	4.5×10^{7}	3.5×10^{8}	1.21	1.26	1.25	1.25	1.14	0.31	1.19
12	2.55×10^{8}	3.25×10^{8}	2.5×10^{8}	2.45×10^{8}	2.95×10^{7}	3.5×10^{7}	2.35×10^{8}	0.99	1.25	1.37	1.22	0.13	0.45	1.02
14	2.4×10^{8}	2.25×10^{8}	1.8×10^{8}	2.05×10^{8}	4.25×10^{7}	1.95×10^{7}	5.1×10^{8}	0.96	1.09	1.24	1.14	0.29	0.2	1.02
16	1.5×10^{8}	2.15×10^{8}	4.25×10^{7}	2.00×10^{8}	5.5×10^{7}	1.85×10^{7}	7.0×10^{6}	0.76	1.07	0.61	1.13	0.4	0.18	-0.5
18	1.15×10^{8}	2.25×10^{8}	3.7×10^{7}	4.65×10^{7}	4.1×10^{7}	6.4×10^{6}	3.2×10^{6}	0.64	1.09	0.55	0.5	0.27	-0.28	-0.84
20	6.5×10^{7}	8.5×10^{7}	3.35×10^{7}	4.05×10^{7}	2.8×10^{7}	5.5×10^{6}	4.5×10^{6}	-0.61	0.67	0.51	0.44	0.11	-0.035	-0.7
22	2.65×10^{7}	6.5×10^{7}	9.5×10^{6}	1.65×10^{7}	1.85×10^{7}	5.2×10^{6}	5.25×10^{6}	0	0.55	-0.04	0.05	-0.07	-0.37	-0.84
24	3.05×10^{7}	5.5×10^{7}	7.55×10^{6}	1.25×10^{7}	2.0×10^{7}	5.35×10^{6}	5.1×10^{6}	0.06	0.48	-0.14	-0.08	-0.03	-0.36	-0.7

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



ภาพ 14 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำมะพร้าว 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำมะพร้าว 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำมะพร้าว 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำมะพร้าว 80 % T6 คือน้ำมะพร้าว 100 % และ T7 คือน้ำมะพร้าว 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T3 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

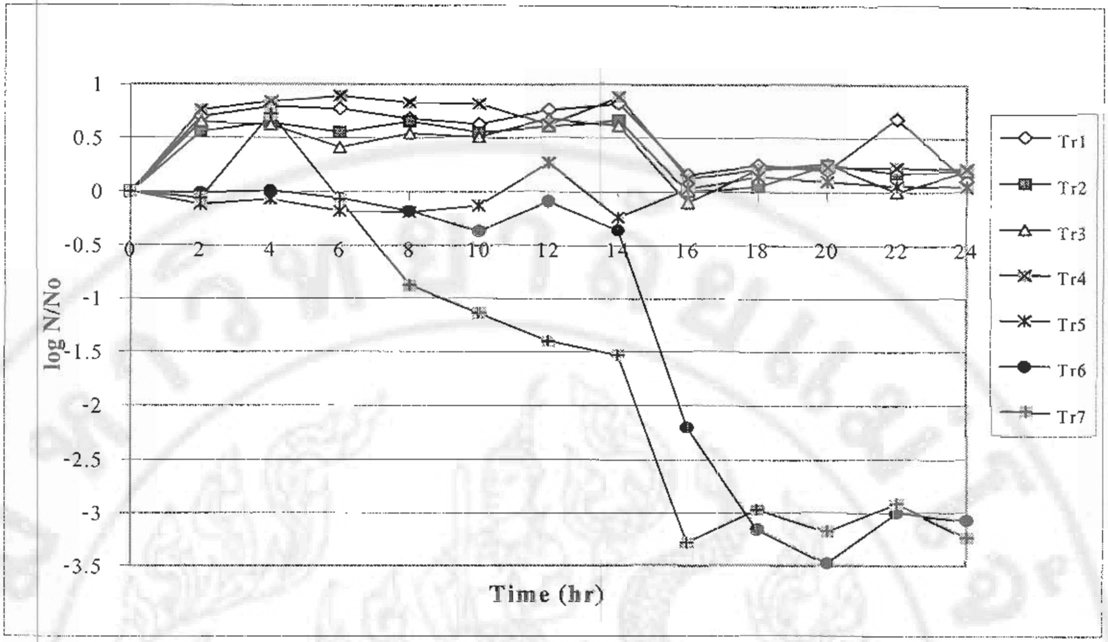
ตาราง 14 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N$_0$]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	4.0×10^7	4.75×10^7	4.85×10^7	2.9×10^7	4.65×10^7	3.45×10^7	3.0×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	2.0×10^8	1.7×10^8	2.15×10^8	1.65×10^8	3.55×10^7	3.4×10^7	2.65×10^7	0.7	0.56	0.65	0.76	-0.12	-0.01	-0.06
4	2.5×10^8	2.05×10^8	2.0×10^8	2.0×10^8	4.0×10^7	3.6×10^7	1.6×10^8	0.79	0.64	0.62	0.84	-0.07	0.01	0.72
6	2.35×10^8	1.65×10^8	1.25×10^8	2.25×10^8	3.15×10^7	3.05×10^7	2.55×10^7	0.77	0.55	0.41	0.89	-0.18	-0.06	-0.07
8	1.9×10^8	2.1×10^8	1.65×10^8	1.95×10^8	3.05×10^7	2.3×10^7	4.0×10^6	0.68	0.65	0.54	0.83	-0.19	-0.18	-0.88
10	1.7×10^8	1.65×10^8	1.55×10^8	1.9×10^8	3.45×10^7	1.5×10^7	2.2×10^6	0.63	0.55	0.51	0.82	-0.13	-0.37	-1.14
12	2.3×10^8	1.85×10^8	2.3×10^8	1.2×10^8	8.7×10^7	2.8×10^7	1.2×10^6	0.76	0.6	0.68	0.62	0.27	-0.09	-1.4
14	2.6×10^8	2.15×10^8	1.95×10^8	2.2×10^8	2.7×10^7	1.5×10^7	9.0×10^5	0.82	0.66	0.61	0.88	-0.24	-0.36	-1.53
16	5.85×10^7	4.65×10^7	3.85×10^7	3.8×10^7	5.05×10^7	2.2×10^5	1.6×10^4	0.16	0	-0.1	0.12	0.03	-2.2	-3.28
18	7.2×10^7	5.2×10^7	7.75×10^7	4.75×10^7	6.4×10^7	2.4×10^4	3.2×10^4	0.25	0.05	0.21	0.21	0.14	-3.16	-2.97
20	6.35×10^7	8.3×10^7	8.85×10^7	4.9×10^7	5.95×10^7	1.15×10^4	2.0×10^4	0.2	0.25	0.26	0.23	0.1	-3.48	-3.18
22	4.75×10^7	7.0×10^7	4.8×10^7	5.0×10^7	5.4×10^7	3.4×10^4	3.65×10^4	0.07	0.18	0	0.23	0.06	-3.01	-2.92
24	5.05×10^7	7.3×10^7	7.45×10^7	5.8×10^7	5.25×10^7	2.95×10^4	1.75×10^4	0.1	0.19	1.9	0.21	0.05	-3.08	-3.24

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100

และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



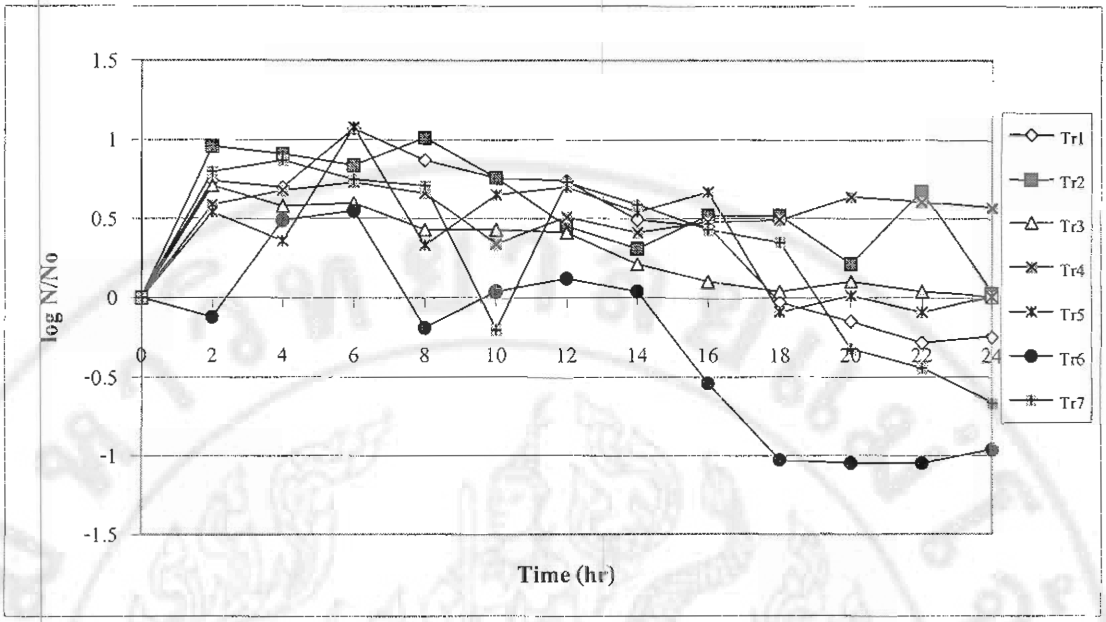
ภาพ 15 อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์: โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำมะพร้าว 20 % T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำมะพร้าว 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำมะพร้าว 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำมะพร้าว 80 %, T6 คือน้ำมะพร้าว 100 % และ T7 คือน้ำมะพร้าว 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T4 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 15 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N$_0$]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	2.1×10^7	1.5×10^7	2.75×10^7	2.3×10^7	1.3×10^7	2.25×10^7	1.85×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	1.15×10^8	1.35×10^8	1.4×10^8	9.0×10^7	4.5×10^7	1.7×10^7	1.05×10^8	0.74	0.96	0.71	0.59	0.54	-0.12	0.8
4	1.05×10^8	1.2×10^8	1.05×10^8	1.1×10^8	2.95×10^7	7.0×10^7	1.25×10^8	0.7	0.91	0.58	0.68	0.36	0.49	0.87
6	2.5×10^8	1.05×10^8	1.1×10^8	1.25×10^8	1.55×10^8	8.0×10^7	9.5×10^7	1.07	0.84	0.6	0.73	1.08	0.55	0.75
8	1.55×10^8	1.5×10^8 (circled)	7.5×10^7	1.05×10^8	2.75×10^7	1.45×10^7	8.5×10^7	0.87	1.01	0.43	0.66	0.33	-0.19	0.71
10	1.2×10^8	8.5×10^7	7.5×10^7	5.05×10^7	5.7×10^7	2.5×10^7	1.05×10^7	0.76	0.76	0.43	0.34	0.65	0.04	-0.2
12	1.15×10^8	4.2×10^7	7.0×10^7	7.5×10^7	6.5×10^7	2.95×10^7	9.0×10^7	0.74	0.45	0.41	0.51	0.7	0.12	0.73
14	6.5×10^7	3.0×10^7	4.5×10^7	5.85×10^7	4.5×10^7	2.5×10^7	6.5×10^7	0.49	0.31	0.21	0.41	0.54	0.04	0.59
16	5.85×10^7	5.0×10^7	3.5×10^7	6.9×10^7	6.0×10^7	6.5×10^6	4.5×10^7	0.45	0.52	0.1	0.48	0.67	-0.54	0.43
18	1.95×10^7	5.0×10^7	3.0×10^7	7.0×10^7	1.05×10^7	2.1×10^6	3.75×10^7	-0.03	0.52	0.04	0.49	-0.09	-1.03	0.35
20	1.5×10^7	2.4×10^7	3.5×10^7	1.0×10^8	1.3×10^7	2.0×10^6	8.0×10^6	-0.15	0.21	0.1	0.64	0.01	-1.05	-0.32
22	1.1×10^7	7.0×10^7	3.05×10^7	9.5×10^7	1.05×10^7	2.0×10^6	6.0×10^6	-0.28	0.68	0.04	0.61	-0.09	-1.05	-0.44
24	1.2×10^7	1.6×10^7	2.8×10^7	8.5×10^7	1.3×10^7	2.45×10^6	3.6×10^6	-0.24	0.03	0.01	0.57	0.01	-0.96	-0.66

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



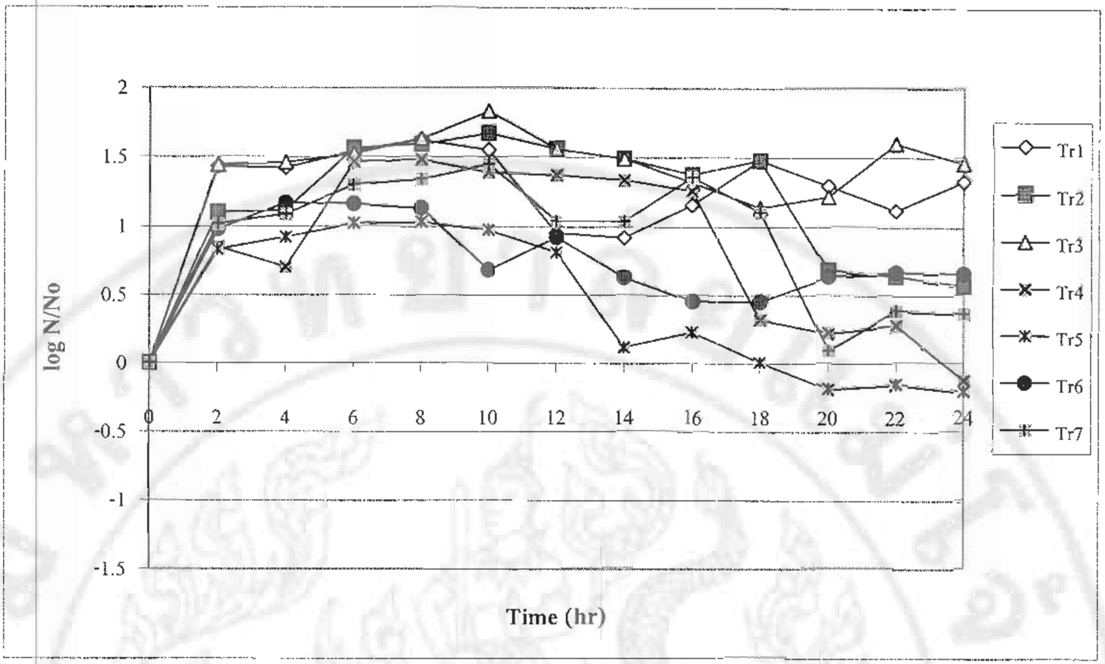
ภาพ 16 อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำมะพร้าว 7 ทรีตเมนต์: โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำมะพร้าว 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำมะพร้าว 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำมะพร้าว 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำมะพร้าว 80 %, T6 คือน้ำมะพร้าว 100 % และ T7 คือน้ำมะพร้าว 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T2 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 16 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							$\log [N/N_0]$						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	1.7×10^7	1.8×10^7	1.25×10^7	1.5×10^7	3.2×10^7	1.15×10^7	1.25×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	4.8×10^8	1.45×10^8	3.35×10^8	1.05×10^8	2.2×10^8	1.12×10^7	1.3×10^8	1.43	1.1	1.44	0.85	0.83	0.98	1.02
4	4.5×10^8	2.25×10^8	3.55×10^8	7.5×10^8	2.75×10^8	1.7×10^8	1.5×10^8	1.42	1.12	1.46	0.7	0.92	1.17	1.09
6	7.55×10^8	2.35×10^7	4.05×10^8	4.25×10^8	3.4×10^8	1.68×10^8	2.5×10^8	1.54	1.56	1.52	1.46	1.02	1.16	1.3
8	7.0×10^8	6.5×10^7	5.25×10^8	4.5×10^8	3.35×10^8	1.55×10^8	2.7×10^7	1.62	1.59	1.63	1.48	1.03	1.13	1.34
10	6.05×10^8	7.0×10^7	8.3×10^8	3.6×10^8	3.0×10^8	5.5×10^7	3.5×10^8	1.55	1.67	1.83	1.39	0.97	0.68	1.45
12	1.5×10^8	8.4×10^7	4.45×10^8	3.5×10^8	2.09×10^8	9.5×10^7	1.35×10^8	0.95	1.56	1.56	1.37	0.81	0.92	1.04
14	1.4×10^8	6.4×10^7	3.8×10^8	3.2×10^8	4.25×10^7	5.0×10^7	1.6×10^8	0.92	1.49	1.49	1.34	0.12	0.63	1.04
16	2.5×10^8	5.5×10^7	2.55×10^7	2.7×10^8	5.5×10^7	3.2×10^7	2.85×107	1.16	1.38	1.32	1.26	0.23	0.45	1.36
18	5.15×10^8	4.25×10^7	1.7×10^7	3.15×10^8	3.3×10^7	3.2×10^7	1.4×10^7	1.48	1.48	1.14	0.32	0.01	0.45	1.11
20	3.4×10^8	5.35×10^7	2.05×10^7	2.85×10^8	2.1×10^7	5.0×10^7	1.5×10^7	1.3	0.68	1.22	0.22	-0.19	0.63	0.09
22	2.25×10^8	8.5×10^7	4.95×10^7	2.75×10^8	2.25×10^7	5.25×10^7	3.0×10^7	1.12	0.63	1.6	0.27	-0.16	0.66	0.38
24	3.65×10^8	6.5×10^7	3.55×10^7	1.1×10^8	2.0×10^7	5.1×10^7	2.85×10^7	1.33	0.56	1.46	-0.13	-0.21	0.65	0.36

หมายเหตุ : (วงรี) ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



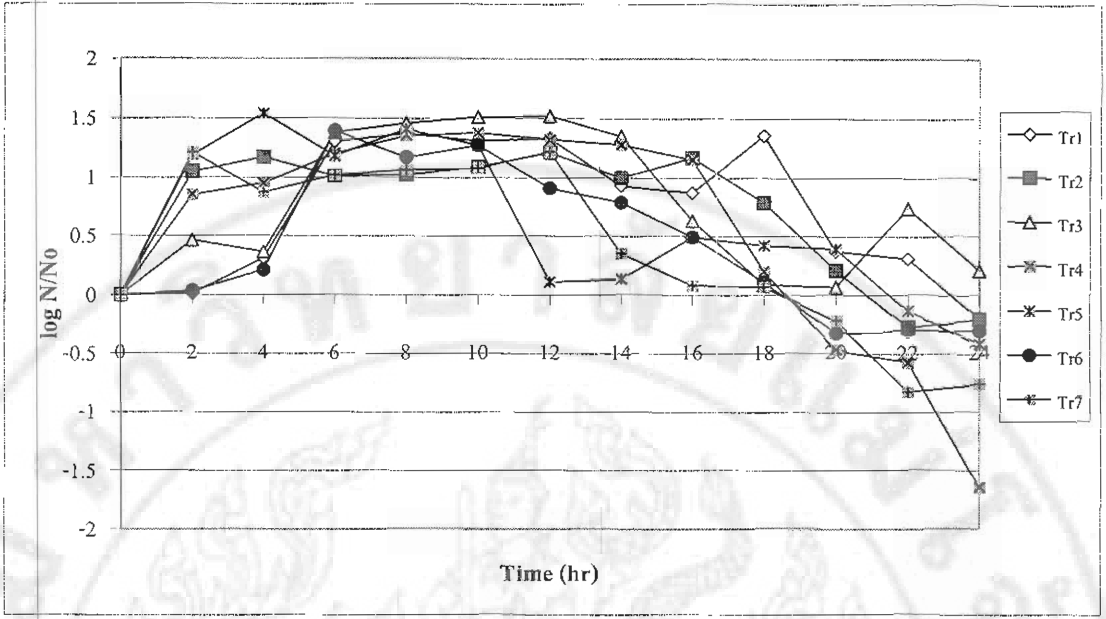
ภาพ 17 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหาร MRS ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 80 %, T6 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % และ T7 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % ผสมกลูโคส 2 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T3 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

ตาราง 17 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N_0]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	1.4×10^{7}	2.0×10^{7}	1.0×10^{7}	1.35×10^{7}	1.05×10^{7}	1.05×10^{7}	2.05×10^{7}	0	0	0	0	0	0	0
2	1.45×10^{7}	2.25×10^{8}	2.9×10^{7}	9.5×10^{7}	1.65×10^{8}	1.12×10^{7}	3.3×10^{8}	0.01	1.05	0.46	0.85	1.19	0.03	1.21
4	2.9×10^{7}	2.95×10^{8}	2.3×10^{7}	1.2×10^{8}	3.7×10^{8}	1.7×10^{7}	1.5×10^{8}	0.31	1.17	0.36	0.95	1.54	0.21	0.87
6	2.8×10^{8}	2.05×10^{8}	2.4×10^{8}	2.15×10^{8}	1.6×10^{8}	2.6×10^{8}	2.15×10^{8}	1.3	1.01	1.38	1.2	1.18	1.39	1.02
8	3.35×10^{8}	2.1×10^{8}	2.9×10^{8}	3.0×10^{8}	2.7×10^{8}	1.55×10^{8}	2.35×10^{8}	1.37	1.02	1.46	1.35	1.41	1.17	1.06
10	2.9×10^{8}	2.5×10^{8}	3.2×10^{8}	3.2×10^{8}	1.95×10^{8}	1.95×10^{8}	2.45×10^{8}	1.31	1.09	1.51	1.38	1.27	1.27	1.08
12	3.0×10^{8}	3.2×10^{8}	3.3×10^{8}	2.85×10^{8}	1.35×10^{7}	8.5×10^{7}	3.35×10^{8}	1.33	1.21	1.52	1.32	0.11	0.91	1.22
14	1.2×10^{8}	2.0×10^{8}	2.25×10^{8}	2.55×10^{8}	1.4×10^{7}	6.5×10^{7}	4.6×10^{7}	0.93	1	1.35	1.28	0.13	0.79	0.35
16	1.05×10^{8}	2.95×10^{8}	4.35×10^{7}	1.9×10^{8}	3.2×10^{7}	3.2×10^{7}	2.5×10^{7}	0.87	1.17	0.63	1.15	0.49	0.49	0.08
18	3.25×10^{8}	1.25×10^{8}	1.25×10^{7}	2.15×10^{7}	2.75×10^{7}	1.35×10^{7}	2.4×10^{7}	1.36	0.79	0.09	0.2	0.42	0.11	0.07
20	3.3×10^{7}	3.25×10^{7}	1.2×10^{7}	4.6×10^{6}	2.6×10^{7}	5.0×10^{6}	1.25×10^{7}	0.37	0.21	0.07	-0.47	0.39	-0.33	-0.22
22	2.9×10^{7}	1.05×10^{7}	5.55×10^{7}	3.6×10^{6}	7.5×10^{6}	5.25×10^{6}	3.1×10^{6}	0.31	-0.28	0.74	-0.57	-0.14	-0.3	-0.82
24	9.0×10^{6}	1.25×10^{7}	1.65×10^{7}	3.0×10^{6}	4.0×10^{6}	5.1×10^{6}	3.55×10^{6}	-0.2	-0.21	0.21	-1.65	-0.42	-0.31	-0.76

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100 และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



ภาพ 18 อัตราการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์: โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 60 % T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 80 %, T6 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % และT7 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T5 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

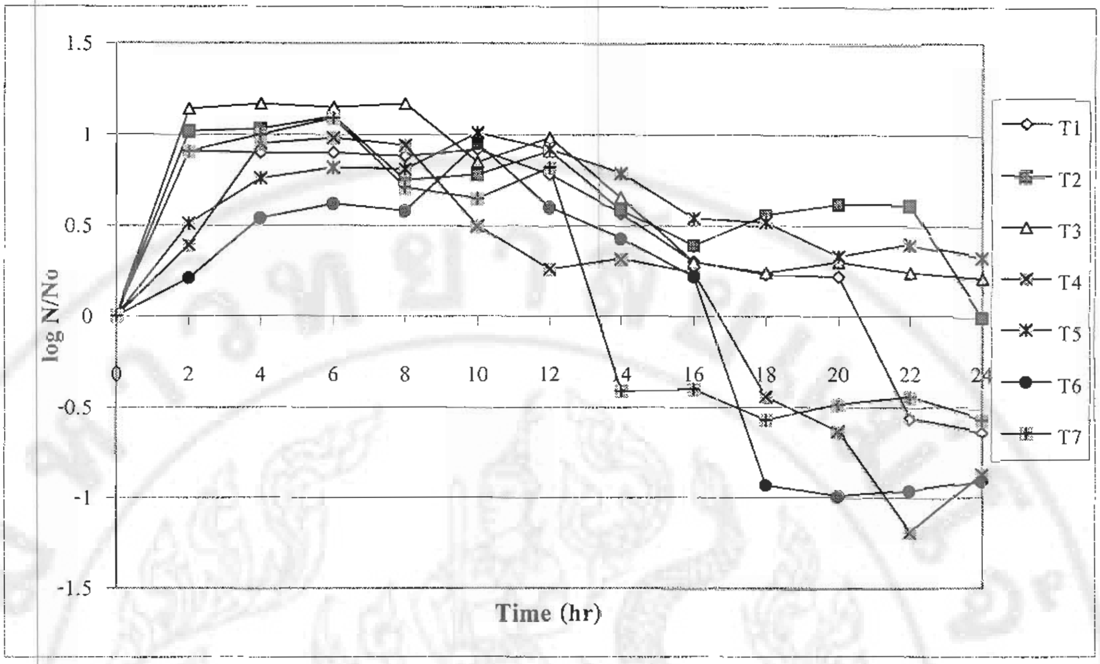
ตาราง 18 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N_0]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	3.25×10^{7}	2.05×10^{7}	1.75×10^{7}	2.35×10^{7}	2.0×10^{7}	2.75×10^{7}	1.65×10^{7}	0	0	0	0	0	0	0
2	2.65×10^{8}	3.05×10^{8}	2.45×10^{8}	5.85×10^{7}	6.5×10^{7}	4.5×10^{7}	1.35×10^{8}	0.91	1.02	1.14	0.39	0.51	0.21	0.91
4	2.55×10^{8}	3.0×10^{8}	2.6×10^{8}	2.05×10^{8}	1.15×10^{8}	9.5×10^{7}	1.65×10^{8}	0.9	1.03	1.17	0.95	0.76	0.54	1
6	2.55×10^{8}	2.25×10^{8}	2.45×10^{8}	2.25×10^{8}	1.35×10^{8}	1.15×10^{8}	2.05×10^{8}	0.9	1.1	1.15	0.98	0.82	0.62	1.09
8	2.45×10^{8}	1.15×10^{8}	2.55×10^{8}	2.05×10^{8}	1.25×10^{8}	1.05×10^{8}	8.5×10^{7}	0.88	0.75	1.17	0.94	0.81	0.58	0.71
10	2.7×10^{8}	1.25×10^{8}	2.15×10^{8}	7.5×10^{7}	2.05×10^{8}	2.5×10^{7}	7.55×10^{7}	0.92	0.78	0.85	0.5	1.01	0.95	0.65
12	1.95×10^{8}	1.65×10^{8}	2.2×10^{8}	4.25×10^{7}	1.65×10^{8}	1.1×10^{8}	1.1×10^{8}	0.78	0.91	0.98	0.26	0.92	0.6	0.82
14	1.2×10^{8}	8.0×10^{7}	1.25×10^{8}	5.0×10^{7}	1.25×10^{8}	7.5×10^{7}	6.5×10^{6}	0.57	0.59	0.66	0.32	0.79	0.43	-0.41
16	6.5×10^{7}	5.05×10^{7}	3.5×10^{7}	4.05×10^{7}	7.0×10^{7}	4.55×10^{5}	6.55×10^{6}	0.3	0.39	0.3	0.24	0.54	0.22	-0.4
18	5.5×10^{7}	7.5×10^{7}	3.0×10^{7}	8.5×10^{6}	6.55×10^{7}	3.2×10^{6}	4.5×10^{5}	0.23	0.56	0.24	-0.44	0.52	-0.93	-0.57
20	5.35×10^{7}	8.5×10^{7}	3.5×10^{7}	5.5×10^{6}	4.5×10^{7}	1.15×10^{6}	5.5×10^{6}	0.22	0.62	0.3	-0.63	0.33	-0.99	-0.48
22	9.0×10^{6}	8.6×10^{7}	3.05×10^{7}	1.5×10^{6}	5.05×10^{7}	3.05×10^{6}	6.0×10^{6}	-0.56	0.62	0.24	-1.19	0.4	-0.96	-0.44
24	7.5×10^{6}	2.05×10^{7}	2.8×10^{7}	3.2×10^{6}	4.3×10^{7}	3.45×10^{6}	4.6×10^{6}	-0.63	0	0.21	-0.86	0.33	-0.9	-0.56

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100

และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



ภาพ 19 อัตราการเจริญของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมง ที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 80 %, T6 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % และ T7 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T3 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

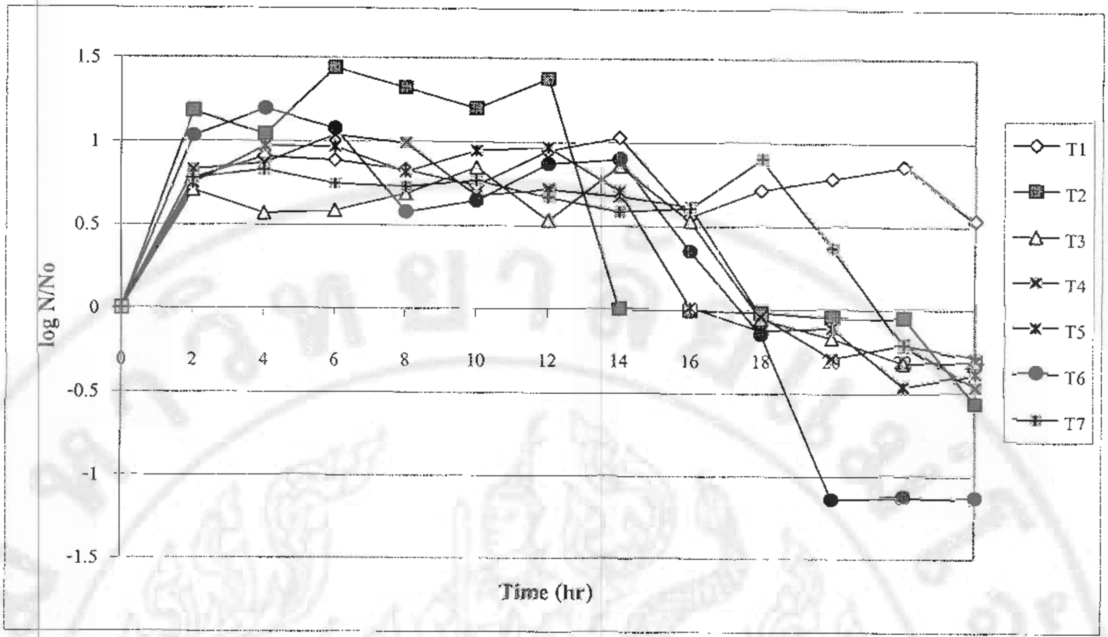
ตาราง 19 ค่าเซลที่มีชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์

เวลา	จำนวนเซลที่มีชีวิต (cfu/ml) จากทรีตเมนต์ที่							log [N/N_0]						
(ช.ม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	3.4×10^7	1.65×10^7	4.25×10^7	4.0×10^7	3.95×10^7	3.0×10^7	4.05×10^7	0	0	0	0	0	0	0
2	2.05×10^8	1.35×10^8	2.2×10^8	2.7×10^8	2.2×10^8	3.25×10^8	2.45×10^8	0.78	1.18	0.71	0.83	0.75	1.03	0.78
4	2.75×10^8	1.85×10^8	1.6×10^8	2.95×10^8	3.65×10^8	4.65×10^8	2.75×10^8	0.91	1.04	0.57	0.87	0.97	1.19	0.83
6	2.65×10^8	2.05×10^8	1.65×10^8	4.35×10^8	3.65×10^8	3.65×10^8	2.3×10^8	0.89	1.44	0.59	1.04	0.97	1.08	0.75
8	2.3×10^8	8.5×10^7	2.1×10^8	3.0×10^8	3.1×10^8	1.15×10^8	2.2×10^8	0.83	1.32	0.69	0.99	0.82	0.58	0.73
10	1.85×10^8	7.55×10^7	3.0×10^8	1.9×10^8	3.45×10^8	1.35×10^8	2.4×10^8	0.74	1.2	0.85	0.68	0.95	0.65	0.77
12	3.0×10^8	1.1×10^8	1.45×10^8	2.1×10^8	3.6×10^8	2.25×10^8	1.9×10^8	0.95	1.38	0.53	0.72	0.97	0.87	0.67
14	3.6×10^8	1.65×10^7	3.1×10^8	1.9×10^8	2.0×10^8	2.4×10^8	1.6×10^8	1.03	0	0.86	0.68	0.71	0.9	0.59
16	1.25×10^8	1.6×10^7	1.45×10^8	1.65×10^8	4.0×10^7	1.4×10^8	1.65×10^8	0.56	-0.01	0.53	0.62	0.01	0.35	0.61
18	1.8×10^8	1.45×10^7	3.75×10^7	3.65×10^7	2.95×10^7	2.15×10^7	3.2×10^8	0.72	-0.02	-0.06	-0.04	-0.13	-0.15	0.9
20	2.1×10^8	1.55×10^7	2.9×10^7	2.05×10^7	3.05×10^7	2.2×10^6	9.5×10^7	0.79	-0.05	-0.17	-0.29	-0.11	-1.14	0.37
22	2.45×10^8	1.4×10^7	2.05×10^7	2.5×10^7	1.35×10^7	2.25×10^6	2.5×10^7	0.86	-0.06	-0.32	-0.21	-0.46	-1.13	-0.22
24	1.15×10^8	5.5×10^6	2.0×10^7	1.35×10^7	1.6×10^7	2.2×10^6	2.1×10^7	0.53	-0.57	-0.32	-0.47	-0.39	-1.14	-0.29

หมายเหตุ : ⬭ ค่าเซลสูงสุดในทรีตเมนต์ที่มีอัตราการเจริญดีที่สุด

สัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน:น้ำจากวัตถุดิบเป็นดังนี้ T1 = 100:0, T2 = 80:20, T3 = 60:40, T4 = 40:60, T5 = 20:80, T6 = 0:100

และ T7 = 0:100 ผสมกลูโคสโดยมีความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับวัตถุดิบ



ภาพ 20 อัตราการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ปรับสัดส่วนกับน้ำกากมะเขือเทศ 7 ทรีตเมนต์ : โดย N_0 คือค่าเซลที่มีชีวิตที่ชั่วโมงที่ 0, N คือค่าเซลที่มีชีวิตที่นับได้ที่ชั่วโมงต่างๆ, T1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 %, T2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 80 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 20 %, T3 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 60 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 40 %, T4 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 40 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 60 %, T5 คืออาหารเลี้ยงเชื้อ 20 % ผสมน้ำกากมะเขือเทศ 80 %, T6 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % และ T7 คือน้ำกากมะเขือเทศ 100 % ผสมกลูโคส 0.5 % ซึ่งพบว่าสัดส่วนใน T2 ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด

จากการศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติในสัดส่วนต่างๆ (**ตาราง 5**) ผลการศึกษาพบ *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. lactis* และ *S. thermophilus* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศ ในสัดส่วนต่างๆ มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน ซึ่งสังเกตได้จากระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อที่เข้าสู่ระยะ late-log phase หรือ early-stationary phase ประกอบกับจำนวนเซลสูงสุด โดยทั่วไปจากกราฟการเจริญของเชื้อ (**ภาพ 9-20**) ทรีตเมนต์ที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดสามารถสังเกตได้ชัดเจนยกเว้นสำหรับเชื้อ *S. thermophilus* ที่เลี้ยงในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว พบว่าจำนวนเซลสูงสุดที่เพิ่มจากจำนวนเซลเริ่มต้นได้จากทรีตเมนต์ที่ 5 ที่ชั่วโมงที่ 6 (**ภาพ 16**) แต่หลังจากนั้นจำนวนเซลได้ลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่ทรีตเมนต์ที่ 2 มี

อัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ early-stationary phase เร็วที่สุด และคงอยู่ในระยะยาวถึงชั่วโมงที่ 8 โดยมีความเข้มข้นของเชื้อไม่น้อยกว่า 10^8 cfu/ml ดังนั้นจึงได้นับทรีตเมนต์ที่ 2 เป็น ทรีตเมนต์ที่ให้อัตราการเจริญของเชื้อดีที่สุด อีกกรณีหนึ่งคือเชื้อ *Lb. delbreukii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ จากภาพที่ 18 จะเห็นว่าทรีตเมนต์ที่ 5 มีอัตราการเจริญสูงที่สุดภายในชั่วโมงที่ 4 แต่หลังจากนั้นกลับลดลงต่ำกว่าอีกหลายทรีตเมนต์ และในทรีตเมนต์ที่ 3 แม้ว่าอัตราการเจริญจะต่ำกว่าทรีตเมนต์ที่ 5 ในช่วงแรก แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 8 มีปริมาณเชื้อสูงสุดและคงอยู่ในระยะ stationary phase เป็นเวลานานที่สุด (4 ชั่วโมง) ดังนั้นทรีตเมนต์ที่ให้อัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อ *Lactobacillus delbreukii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมกับน้ำกากมะเขือเทศคือทรีตเมนต์ที่ 5 ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และทรีตเมนต์ที่ 3 ภายหลังจากนั้น

จำนวนเชื้อสูงสุดของเชื้อแต่ละสปีชีส์ในอาหารพื้นฐานที่ผสมน้ำวัตถุดิบแต่ละชนิดรวมทั้งสัดส่วนของน้ำวัตถุดิบที่สูงที่สุดที่สามารถผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ได้นำมาสรุปไว้ใน**ตาราง 20**

ตาราง 20 จำนวนเชื้อสูงสุดจากสัดส่วนของน้ำวัตถุดิบที่เลี้ยงเชื้อแล้วให้อัตราการเจริญที่ดีที่สุด

วัตถุดิบ	จำนวนเชื้อ (cfu/ml)				สัดส่วนของน้ำวัตถุดิบที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ** (%)			
	LA*	LB*	SL*	ST*	LA*	LB*	SL*	ST*
น้ำเวย์	2.15×10^9	3.4×10^9	2.6×10^8	8.6×10^8	60	20	100+ กลูโคส	60
น้ำมะพร้าว	6.6×10^8	2.5×10^8	2.25×10^8	1.5×10^8	40	40	60	20
น้ำกากมะเขือเทศ	8.3×10^8	3.7×10^8	2.6×10^8	2.05×10^8	40	80	40	20

หมายเหตุ : * LA = *Lactobacillus acidophilus* LB = *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
SL = *Streptococcus lactis* ST = *S. thermophilus*

** อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับ LA คือ MRS, สำหรับ LB, SL และ ST คือ GYP

ในการพิจารณาสัดส่วนของน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดีที่สุด ได้ใช้หลักการที่เสนอโดยกำเนิด (2534) และสมใจ (2534) ซึ่งกล่าวว่าการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตเซลจุลินทรีย์นั้น วัตถุดิบที่มีความเหมาะสมต้องสามารถใช้เลี้ยงเชื้อ

โดยใช้ระยะเวลาไม่มากในการเลี้ยงเชื้อและได้ผลผลิตมวลเซลสูงที่สุด นอกจากนี้การเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เลี้ยงพร้อมกันทั้ง 7 ทรีตเมนต์ ใช้การคำนวณอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (ขั้นตอนการวิจัยข้อ 2.5.2) เนื่องจากการนำค่าจำนวนเซลที่มีชีวิตมาทำการพล็อตกราฟโดยตรงไม่สามารถแสดงผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารทรีตเมนต์ต่างๆ ได้เพราะมีจำนวนเชื้อตั้งต้นไม่เท่ากัน แต่เมื่อทำการคำนวณการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เทียบกับจำนวนเริ่มต้นดังกล่าวสามารถทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อและระบุทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดได้ เนื่องจากค่าที่คำนวณได้จากทุกทรีตเมนต์จะเริ่มจาก 0 เช่นเดียวกันทุกทรีตเมนต์

เมื่อพิจารณาสารอาหารที่มีในวัตถุดิบทั้งสามชนิดที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ น้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศ โดยอาศัยข้อมูลในตาราง 2, 3 และ 4 จะเห็นได้ว่าวัตถุดิบแต่ละชนิดยังคงมีสารอาหารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ โดยน้ำเวย์จัดเป็นวัตถุดิบธรรมชาติที่มีผู้นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตเซลหรือผลผลิตที่เป็นสารสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น Flores and Alegre (2001) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ATCC 7962 เพื่อเก็บเกี่ยวไนซินที่เชื้อสังเคราะห์ได้ Briczinski and Roberts (2002) ใช้น้ำเวย์ที่ถูกย่อยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เพื่อดูการผลิต exopolysaccharide ที่เชื้อผลิตขึ้น และภัทรียา (2541) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lb. acidophilus* เพื่อผลิตเชื้อตั้งต้นผลิตภัณฑ์นมหมักแบบแช่แข็งโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นำมาใช้ในการศึกษาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ผสมน้ำเวย์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในน้ำเวย์ได้ อาหารที่ผสมน้ำเวย์จึงมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเพียงอย่างเดียว

สำหรับน้ำมะพร้าว จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ และเมื่อใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ผลดีกว่าการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามน้ำมะพร้าวไม่สามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแทนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวซึ่งประกอบด้วยวิตามินบีหลายชนิด (B-complex) และมีปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่เป็น reducing sugar คาดว่าสารอาหารเหล่านี้มีผลทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดี นอกจากนี้สารที่วิเคราะห์ออกมาจากน้ำมะพร้าวนั้นมีบางชนิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น panthotenic acid ซึ่ง Car (1975) และ

0.2 % และ Tween 80 0.1 % เป็นสูตรการเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด โดยให้อัตราการเจริญใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยอาหาร MRS

การใช้น้ำกากมะเขือเทศเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีการทดลองและรายงานมาบ้าง เช่น Atlas (1993) มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มะเขือเทศเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น Tomato juice agar โดย Yoshizumi (1975) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการสารบางอย่างในน้ำมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นการเจริญของเซล สารนั้นคือ D-panthotenic acid ในการศึกษานี้พบว่าสามารถใช้น้ำกากมะเขือเทศในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้ หากแต่เปอร์เซ็นต์การผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ได้ไม่เกิน 40 % โดยการเตรียมด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ซึ่งเลียนแบบการแยกกากมะเขือเทศจากการผลิตซอสมะเขือเทศในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ Yoon *et al.* (2004) เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติค ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 และ *Lactobacillus delbrueckii* D7 ในน้ำมะเขือเทศ พบว่าสามารถใช้น้ำมะเขือเทศเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกเหล่านี้ได้ทั้งหมด

สำหรับค่าเซลที่มีชีวิตสูงสุดที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติจะเห็นว่าจำนวนสูงสุดของเซลที่มีชีวิตในทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดนั้นอยู่ระหว่าง 1.5×10^8 ถึง 3.4×10^9 cfu/ml หรือไม่น้อยกว่า 10^8 cfu/ml ซึ่งถือเป็นระดับที่น่าพอใจ และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดประมาณ 10-12 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อตั้งต้น 10 % ผลจากการศึกษานี้จะเป็นแนวทางในการนำสัดส่วนการใช้วัตถุดิบเหล่าที่เหมาะสมไปใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเชื้อตั้งต้นได้

โดยใช้ระยะเวลาไม่มากในการเลี้ยงเชื้อและได้ผลผลิตมวลเซลสูงที่สุด นอกจากนี้การเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เลี้ยงพร้อมกันทั้ง 7 ทรีตเมนต์ ใช้การคำนวณอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (ขั้นตอนการวิจัยข้อ 2.5.2) เนื่องจากการนำค่าจำนวนเซลที่มีชีวิตมาทำการพล็อตกราฟโดยตรงไม่สามารถแสดงผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารทรีตเมนต์ต่างๆ ได้เพราะมีจำนวนเชื้อตั้งต้นไม่เท่ากัน แต่เมื่อทำการคำนวณการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เทียบกับจำนวนเริ่มต้นดังกล่าวสามารถทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อและระบุทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดได้ เนื่องจากค่าที่คำนวณได้จากทุกทรีตเมนต์จะเริ่มจาก 0 เช่นเดียวกันทุกทรีตเมนต์

เมื่อพิจารณาสารอาหารที่มีในวัตถุดิบทั้งสามชนิดที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ น้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศ โดยอาศัยข้อมูลในตาราง 2, 3 และ 4 จะเห็นได้ว่าวัตถุดิบแต่ละชนิดยังคงมีสารอาหารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ โดยน้ำเวย์จัดเป็นวัตถุดิบธรรมชาติที่มีผู้นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตเซลหรือผลผลิตที่เป็นสารสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น Flores and Alegre (2001) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ATCC 7962 เพื่อเก็บเกี่ยวไนซินที่เชื้อสังเคราะห์ได้ Briczinski and Roberts (2002) ใช้น้ำเวย์ที่ถูกย่อยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เพื่อดูการผลิต exopolysaccharide ที่เชื้อผลิตขึ้น และภัทรียา (2541) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lb. acidophilus* เพื่อผลิตเชื้อตั้งต้นผลิตภัณฑ์นมหมักแบบแช่แข็งโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นำมาใช้ในการศึกษาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ผสมน้ำเวย์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในน้ำเวย์ได้ อาหารที่ผสมน้ำเวย์จึงมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเพียงอย่างเดียว

สำหรับน้ำมะพร้าว จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ และเมื่อใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ผลดีกว่าการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามน้ำมะพร้าวไม่สามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแทนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวซึ่งประกอบด้วยวิตามินบีหลายชนิด (B-complex) และมีปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่เป็น reducing sugar คาดว่าสารอาหารเหล่านี้มีผลทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดี นอกจากนี้สารที่วิเคราะห์ออกมาจากน้ำมะพร้าวนั้นมีบางชนิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น panthotenic acid ซึ่ง Car (1975) และ

0.2 % และ Tween 80 0.1 % เป็นสูตรการเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด โดยให้อัตราการเจริญใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยอาหาร MRS

การใช้น้ำกากมะเขือเทศเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีการทดลองและรายงานมาบ้าง เช่น Atlas (1993) มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มะเขือเทศเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น Tomato juice agar โดย Yoshizumi (1975) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการสารบางอย่างในน้ำมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นการเจริญของเซล สารนั้นคือ D-panthotenic acid ในการศึกษานี้พบว่าสามารถใช้น้ำกากมะเขือเทศในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้ หากแต่เปอร์เซ็นต์การผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ได้ไม่เกิน 40 % โดยการเตรียมด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ซึ่งเลียนแบบการแยกกากมะเขือเทศจากการผลิตซอสมะเขือเทศในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ Yoon *et al.* (2004) เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติค ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 และ *Lactobacillus delbrueckii* D7 ในน้ำมะเขือเทศ พบว่าสามารถใช้น้ำมะเขือเทศเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกเหล่านี้ได้ทั้งหมด

สำหรับค่าเซลที่มีชีวิตสูงสุดที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติจะเห็นว่าจำนวนสูงสุดของเซลที่มีชีวิตในทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดนั้นอยู่ระหว่าง 1.5×10^8 ถึง 3.4×10^9 cfu/ml หรือไม่น้อยกว่า 10^8 cfu/ml ซึ่งถือเป็นระดับที่น่าพอใจ และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดประมาณ 10-12 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อตั้งต้น 10 % ผลจากการศึกษานี้จะเป็นแนวทางในการนำสัดส่วนการใช้วัตถุดิบเหล่าที่เหมาะสมไปใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเชื้อตั้งต้นได้

โดยใช้ระยะเวลาไม่มากในการเลี้ยงเชื้อและได้ผลผลิตมวลเซลสูงที่สุด นอกจากนี้การเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่เลี้ยงพร้อมกันทั้ง 7 ทรีตเมนต์ ใช้การคำนวณอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (ขั้นตอนการวิจัยข้อ 2.5.2) เนื่องจากการนำค่าจำนวนเซลที่มีชีวิตมาทำการพล็อตกราฟโดยตรงไม่สามารถแสดงผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารทรีตเมนต์ต่างๆ ได้เพราะมีจำนวนเชื้อตั้งต้นไม่เท่ากัน แต่เมื่อทำการคำนวณการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เทียบกับจำนวนเริ่มต้นดังกล่าวสามารถทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อและระบุทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดได้ เนื่องจากค่าที่คำนวณได้จากทุกทรีตเมนต์จะเริ่มจาก 0 เช่นเดียวกันทุกทรีตเมนต์

เมื่อพิจารณาสารอาหารที่มีในวัตถุดิบทั้งสามชนิดที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ ได้แก่ น้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศ โดยอาศัยข้อมูลในตาราง 2, 3 และ 4 จะเห็นได้ว่าวัตถุดิบแต่ละชนิดยังคงมีสารอาหารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ โดยน้ำเวย์จัดเป็นวัตถุดิบธรรมชาติที่มีผู้นิยมนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตเซลหรือผลผลิตที่เป็นสารสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น Flores and Alegre (2001) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ATCC 7962 เพื่อเก็บเกี่ยวไนซินที่เชื้อสังเคราะห์ได้ Briczinski and Roberts (2002) ใช้น้ำเวย์ที่ถูกย่อยเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เพื่อดูการผลิต exopolysaccharide ที่เชื้อผลิตขึ้น และภัทริยา (2541) ใช้น้ำเวย์ในการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lb. acidophilus* เพื่อผลิตเชื้อตั้งต้นผลิตภัณฑ์นมหมักแบบแช่แข็งโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นำมาใช้ในการศึกษาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ผสมน้ำเวย์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในน้ำเวย์ได้ อาหารที่ผสมน้ำเวย์จึงมีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเพียงอย่างเดียว

สำหรับน้ำมะพร้าว จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ และเมื่อใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้ผลดีกว่าการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามน้ำมะพร้าวไม่สามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแทนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวซึ่งประกอบด้วยวิตามินบีหลายชนิด (B-complex) และมีปริมาณน้ำตาลส่วนใหญ่เป็น reducing sugar คาดว่าสารอาหารเหล่านี้มีผลทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดี นอกจากนี้สารที่วิเคราะห์ออกมาจากน้ำมะพร้าวนั้นมีบางชนิดเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น panthotenic acid ซึ่ง Car (1975) และ Yoshizumi (1975) กล่าวว่าเป็นสารที่กระตุ้นให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดี และสายชล (2520) ซึ่งใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดจากอาหารหมัก พบว่าอาหารน้ำมะพร้าวที่เติม peptone 1 %, yeast extract 0.5 %, sodium acetate 0.5 %, ammonium citrate

0.2 % และ Tween 80 0.1 % เป็นสูตรการเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุด โดยให้อัตราการเจริญใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วยอาหาร MRS

การใช้น้ำกากมะเขือเทศเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีการทดลองและรายงานมาบ้าง เช่น Atlas (1993) มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มะเขือเทศเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น Tomato juice agar โดย Yoshizumi (1975) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการสารบางอย่างในน้ำมะเขือเทศเพื่อกระตุ้นการเจริญของเซล สารนั้นคือ D-panthotenic acid ในการศึกษานี้พบว่าสามารถใช้น้ำกากมะเขือเทศในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกได้ หากแต่เปอร์เซ็นต์การผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ได้ไม่เกิน 40 % โดยการเตรียมด้วยวิธีที่ใช้ในการศึกษานี้ซึ่งเลียนแบบการแยกกากมะเขือเทศจากการผลิตซอสมะเขือเทศในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ Yoon *et al.* (2004) เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติค ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* LA39, *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 และ *Lactobacillus delbrueckii* D7 ในน้ำมะเขือเทศ พบว่าสามารถใช้น้ำมะเขือเทศเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกเหล่านี้ได้ทั้งหมด

สำหรับค่าเซลที่มีชีวิตสูงสุดที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเสริมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติจะเห็นว่าจำนวนสูงสุดของเซลที่มีชีวิตในทรีตเมนต์ที่ดีที่สุดนั้นอยู่ระหว่าง 1.5×10^8 ถึง 3.4×10^9 cfu/ml หรือไม่น้อยกว่า 10^8 cfu/ml ซึ่งถือเป็นระดับที่น่าพอใจ และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดประมาณ 10-12 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อตั้งต้น 10 % ผลจากการศึกษานี้จะเป็นแนวทางในการนำสัดส่วนการใช้วัตถุดิบเหล่าที่เหมาะสมไปใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเชื้อตั้งต้นได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมกับเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* คือ MRS ส่วนเชื้อ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus lactis* และ *S. thermophilus* คืออาหาร GYP ซึ่งสามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ GYP เป็นอาหารพื้นฐานผสมน้ำจากวัตถุดิบ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศ สำหรับใช้เลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ข้างต้นตามความเหมาะสมได้

สัดส่วนของน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ ได้แก่ น้ำเวย์, น้ำมะพร้าว และน้ำกากมะเขือเทศในสัดส่วนที่ต่างกันมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อแตกต่างกัน โดยน้ำวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เสริมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานให้ผลการเจริญของเชื้อดีกว่าการใช้เพียงอาหารพื้นฐานเท่านั้น แต่สัดส่วนการผสมที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปสำหรับแต่ละสปีชีส์ สัดส่วนที่ดีที่สุดของการผสมวัตถุดิบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเลี้ยงเชื้อแต่ละสปีชีส์นั้นให้จำนวนเซลมีชีวิตสูงสุดไม่ต่ำกว่า 10^8 cfu/ml ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้สำหรับการผลิตเชื้อตั้งต้น

ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำส่วนที่เหลือใช้ของวัตถุดิบทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อผลิตเป็นเชื้อตั้งต้นในระดับอุตสาหกรรมได้ ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาการกำจัดและเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษวัตถุดิบที่เหลือหรือผลพลอยได้จากการผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรม

5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับวัตถุดิบอื่นๆ ที่เหลือจากอุตสาหกรรมเกษตรในท้องถิ่นต่างๆ สามารถใช้การศึกษานี้เป็นแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งควรได้รับการศึกษาต่อไป

ในการศึกษาขั้นต่อไปอาจมีการพิจารณาการนำเศษวัตถุดิบมากกว่า 1 ชนิดมาใช้ร่วมกันในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ ซึ่งสารอาหารที่มีในวัตถุดิบแต่ละชนิดที่แตกต่างกันอาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้

บรรณานุกรม

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534. **จุลชีวอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ไฉน ยอดเพชร. 2542. **พืชผักอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ริมเขียว.

ดุษณี ธณะบริพัฒน์. 2546. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพฯ: หจก.ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

นฤมล ทองไว. 2544. **การแปรสภาพของเสียหรือวัสดุชีวภาพที่มีค่าทางการค้าต่ำจากโรงงานอุตสาหกรรมให้เป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง**. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บัญชา สัจจาพันธ์, วิทยา สุมามาลย์, สำราญ จิตรพันธ์ และ ประดิษฐ์ กุกแก้ว. 2543. ผลการใช้ยูเรีย, กากน้ำตาล และแร่ธาตุอัดก้อนเป็นอาหารเสริมโคเนื้อ. น. 109-119. <u>ใน</u> **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2543**: กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ผู้จัดการรายวัน. 2548. โรงงานน้ำตาลโต้โมลาสไม่ได้ขาด. **ข่าวเศรษฐกิจเกี่ยวกับอ้อยและน้ำตาล (เดือนสิงหาคม 2548)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.sugarzone.in.th/news/aug48.htm (2 กันยายน 2548).

พิสิฐ ศรีสุริยจันทร์. 2540. **การบำบัดน้ำเสียจากโรงนมโดยใช้แบคทีเรียแลคติก**. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพรินทร์ บุตรกระจ่าง. 2544. **ผลยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนอุณหภูมิสูงต่อการเจริญของ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus flavus***. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภัทรียา จุฑามาศ. 2541. **การใช้น้ำเวย์เพื่อผลิตกล้าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและผลของสารปกป้องเซลต่อการอยู่รอดของเชื้อ**. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) **สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทริโอซินโดย *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* (SN11) ที่ถูกตรึง**. สงขลา: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงสวัสดิ์มานิต. 2534. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วัชรินทร์ บุญภักดี, ฉายแสง ไผ่แก้ว, วิทยา สุมามาลย์, ทวีศักดิ์ ชื่นปรีชา, พิมพาพร พลเสน สุจินดา สระคูพันธ์ และ บัญชา สังจาพันธ์. 2536. การสำรวจและประเมินคุณค่าทางอาหารสัตว์ของผลพลอยได้และวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์. น. 242-249. ใน **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 12 ประจำปี 2536.** กรมปศุสัตว์: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์วิศวกรรมพลังงาน. 2546. **"ไบโอก๊าซ" สิ่งล้ำค่าจากขยะที่ถูกลืม.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://phoenix.eng.psu.ac.th/eec/jn103.html (14 สิงหาคม 2548).

สมใจ ศิริโภค. 2534. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สายชล ชีวปรีชา. 2520. **การศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเก็บบัคเตรีที่ผลิตกรดแลคติก.** กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพงษ์ เจริญรัถ. 2547. **รายงานพิเศษ เอทานอล (Ethanol) จากมันสำปะหลัง พลังงานเชื้อเพลิงทดแทนของไทย.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://policy.biotec.or.th/ (8 กันยายน 2548).

Alfa-Lavel. 1987. Dairy Handbook. In Alfa-Laval (ed.). **Dairy and Food Engineering Division.** Sweden: AB.

Amachi, T. 1975. Chemical structure of a growth factor (TSF) and its physiological significance for malo-lactic acid bacteria. pp. 103-118. In Carr, J.G., C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds.). **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods.** New York: Academic Press.

Ammor, S., E. Dufour, M. Zagorec, S. Chaillou and I. Chevallier. 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. **Food Microbiology.** 22: 529-538.

Amoroso, M.J. and M.C. Manca de Nadra. 1992. Growth and sugar utilization by mixed cultures of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from Argentina yoghurt. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 8: 50-54.

Aredes Fernandez, P.A., F.M. Saguir and M.C. Manca De Nadra. 2003. Effect of amino Acids and peptides on growth of *Pediococcus pentosaceus* from wine. **Latin American Applied Research**. 3: 225-229.

Arsene-Ploetze, F. and F. Bringel. 2004. Role of inorganic carbon in lactic acid bacteria metabolism. **Lait**. 84: 49-59.

Atlas, R.M. 1993. **Handbook of Microbiological Media**. U.S.A: CRD Press Inc.

BEC Foods India. 2001. **Consumer Product: Tomato Sauce**. [online]. Available at http://www.becfoods.com/specs/sauce_tomato.htm (9 September 2005).

Biswas, S.R., P. Ray, M.C. Johnson and B. Ray. 1995. Influence of growth condition on production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pedicoccus acidilactici* H. **Applied and Environmental Microbiology**. 57: 1265-1267.

Bozoglu, T.F., M. Ozigen and U. Bakia. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter culture during and after freeze drying. **Enzyme and Microbial Technology**. 9: 531-537.

Briczinski, E.P. and R.F. Roberts. 2002. Production of an exopolysaccharide containing whey protein concentrate by fermentation of whey. **Journal of Dairy Science**. 85: 3189-3197.

Car, J.G. 1975. Lactic of the world unite. In Carr, J.G., C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds.). **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**. New York: Academic Press.

Calam, C.T. 1986. Shake-Flask Fermentations. pp. 59-65 In Demain, A.L. and J. Davies. (eds.). **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington DC: American Society for Microbiology.

Child, R. 1964. **Coconut**. London and Colchester: Spottiswoode, Ballantyne and Co.,Ltd.

Choi, I.K., S.H. Jung, B.J. Kim, S.Y. Park, J. Kim. and H.U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of Kim Chi, a fermented cabbage product. **Antonie van Leeuwenhoek**. 84: 247–253.

Cogan, T.M. and J.P. Accolas. 1996. **Dairy Starter Culture**. New York: VCH Publisher Inc.

Daba, H., L. Christophe, H. Jun and E.S. Ronald. 1993. Influence of growth conditions on production of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and Environmental Microbiology**. 39: 166-173.

De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. **The Journal of Applied Bacteriology**. 23: 130-135.

Evan, J.B. and C.F. Niven Jr. 1951. Nutrition of hetero-fementative lactobacilli that cause greening of cured meat product. **Journal of Bacteriology**. 62: 599-603.

Flemming, H.P., R.F. Mcfeeters and M.A. Daeschel. 1985. The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. pp. 97-118. In Gilliland, S.E. (ed.). **Bacterial Starter Culture for Foods**. Boca Raton, Florida: Academic Press.

Flores, S.H. and R.M. Alegre. 2001. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 34: 103-107.

GEA Niro Inc. 2005. **Tomato Juice**. [Online]. Available http://www.niroinc.com/html/soavi/tomato_juice.htm (9 September 2005).

Gilliland, S.E. 1976. Preparation and storage of concentrated cultures of lactic streptococci. **Journal of Dairy Science**. 60: 805-809.

__________. 1985. Concentrate starter culture. pp. 145-157. In Gilliland, S.E. (ed.). **Bacterial Starter Cultures for Foods**. Boca Raton, Florida: Academic Press.

Gilliland, S.E., R.B. Smittle, M.L. Speek and W.M. Walter. 1974. Relation of fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. **Journal of Applied Microbiology**. 27: 738.

Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1977. Enumeration and identify of lactobacilli in dietary Products. **Journal of Food Protection**. 40: 760-762.

Gonzalez, B.M.Y.S. 1941. Change in sugar composition of coconut water during maturation and germination. In Philippiness Agri & Forester. **Journal of Science and Food Agriculture**. 1: 326-329.

Hong, S.H. and R.T. Marshall. 2001. Natural exopolysaccharides enhance survival of lactic acid bacteria in frozen dairy desserts. **Journal of Dairy Science**. 84: 1367-1374.

Howells, B.W. 1992. **Functions of Fermented Milk**. England: Elseveir Science Publisher Ltd.

Hutkins, R.W. and H.A. Morris. 1987. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*. A Reveiw. **Journal of Food Protection**. 50: 876-884.

Kim, H.Y., J.H. Min, J.H. Lee and G.E. Ji. 2000. Growth of lactic acid bacteria in natural media using vegetables, seaweeds, grains and potatoes. **Food Science and Biotechnology**. 9: 322-324.

Komitopoulou, E., I.S. Boziaris, E.A. Davies, J. Delves-Broughton and M.R. Adams. 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal of Food Science & Technology**. 34: 81-85.

Krishnankutty, S. 1987. Analysis of mature coconut water. ใน สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2004. **ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว (coconut water)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/chapter/composition%20 coconut%20 water.html (8 กันยายน 2548).

Lonvaud-Funel, A. 2000. Leuconostoc. pp. 1183-1194. In Robinson, K., C.A. Batt and P.D. Patel, (eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology 2**. California: Academic Press.

Macura, D. and P.M. Townsley. 1984. Scandinavian ropy milk: identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular extraction. **Journal of Dairy Science**. 67: 735-744.

Mamaeva, P. 1956. Dry Koumiss culture. **Dairy Science Abstract**. 18: 639.

Nielsen, E.W. and J.A. Ullum. 1989. **Dairy Technology 2**. Denmark: Danish Turkey Dairies Ltd.

Ohta, T. 1986. Natto. pp. 85–93. In Reddy, N. R., M.D. Pierson and D.K. Salunkhe. (eds.) **Legume-based Fermented Foods**. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Partanen, L., N. Martinen and T. Alatossava. 2001. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. **Systematic and Applied Microbiology**. 24: 500-507.

Saloff-Coste, C.J. 1995. *Lactobacillus casei*. **Danone World Newsletter No.7**, [Online]. Available http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_7/ sum.html (25 August 2005).

Tittsler, R.P., P.S. Pederson, E.E. Snell, D. Hendlin and C.F. Niven Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. **Bacteriological Reviews**. 16: 227-260.

Spreer, E. 1998. **Milk and Dairy Product Technology**. New York: Marcel Dekker Inc.

Tamime, A.Y. and R.K. Robinson. 1985. **Yogurt: Science and Technology**. Oxford: Pergamon Press.

Troller, J.A. and J.V. Stinson. 1981. Moisture requirement for growth and metabolite production by lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 42: 687-692.

Vanderbelt, J.M. 1945. Nutritive value of coconut. **Nature**. 156: 174-175.

Yoon, K.Y., E.E. Wooddams and Y.D. Hang. 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid Bacteria. **The Journal of Microbiology**. 42: 315-318.

Yoshizumi, H. 1975. A malo-lactic bacterium and its growth factor. pp. 87–102. In Carr, J.G. C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds.). **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**. London: Academic Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการเตรียม

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1.1 MRS broth (Atlas, 1993)

glucose	20	กรัม
peptone	10	กรัม
beef Extract	10	กรัม
yeast Extract	5	กรัม
Tween 80	1	มล.
sodium acetate trihydrate	5	กรัม
tri-ammonium citrate	2	กรัม
magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
manganese sulphate tetrahydrate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05	กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

<u>วิธีเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.5 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง ความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 GYP Broth (Atlas, 1993)

glucose	5	กรัม
peptone	5	กรัม
beef Extract	5	กรัม
yeast Extract	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 GYP Agar (Atlas, 1993)

วิธีเตรียม

เตรียมเช่นเดียวกับ GYP broth แต่เติม agar ลงไป 1.5 % นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 **การเตรียม phosphate buffer saline (PBS)** (ไพรินทร์, 2544)

Stock PBS

KH_2PO_4	34	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ปรับ pH ด้วย 1N NaOH ให้ได้ pH 7.2

Working PBS

NaCl	85	กรัม
Stock PBS	1.25	มล.
น้ำกลั่น	1,000	มล.

วิธีเตรียม

ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH ให้ได้ pH 7.2 นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธี drop plate และ pour plate

การศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี drop plate และ pour plate

การวิเคราะห์ผลการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธี drop plate และ pour plate พบว่าวิธีหาค่าเซลที่มีชีวิตทั้งสองวิธีได้จำนวนเซลที่มีชีวิตใกล้เคียงกัน ดัง**ตารางภาคผนวก 1**

ตารางภาคผนวก 1 ค่าเซลที่มีชีวิตที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้วิธี drop plate เปรียบเทียบกับ pour plate ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด โดยวิธีใช้ห่วงถ่ายเชื้อ

จุลินทรีย์	เวลา (ช.ม.)	GYP (cfu/ml)		MRS (cfu/ml)	
		drop plate	pour plate	drop plate	pour plate
LA*	0	2.9×10^{4}	2.21×10^{4}	6.4×10^{4}	3.0×10^{4}
	4	3.15×10^{4}	2.76×10^{4}	6.75×10^{4}	8.25×10^{4}
	8	4.65×10^{5}	6.4×10^{5}	6.05×10^{5}	4.15×10^{5}
	12	2.25×10^{6}	3.54×10^{6}	1.5×10^{7}	2.17×10^{6}
	16	1.0×10^{7}	8.15×10^{6}	3.3×10^{8}	1.83×10^{8}
	20	2.85×10^{7}	5.6×10^{7}	2.05×10^{9}	1.08×10^{9}
	24	8.0×10^{7}	3.9×10^{7}	1.65×10^{9}	3.53×10^{8}
LB*	0	1.45×10^{4}	2.02×10^{4}	1.75×10^{4}	2.75×10^{4}
	4	6.5×10^{6}	2.45×10^{6}	1.26×10^{5}	1.7×10^{5}
	8	1.6×10^{8}	1.42×10^{8}	3.35×10^{7}	5.0×10^{7}
	12	2.05×10^{8}	2.75×10^{8}	1.45×10^{8}	4.35×10^{8}
	16	1.45×10^{8}	9.55×10^{7}	1.85×10^{7}	2.65×10^{8}
	20	1.5×10^{7}	6.25×10^{6}	2.55×10^{7}	8.7×10^{6}
	24	2.35×10^{6}	3.26×10^{5}	8.5×10^{6}	3.21×10^{4}
SL*	0	1.6×10^{6}	1.49×10^{6}	1.75×10^{5}	7.2×10^{4}
	4	2.25×10^{8}	5.77×10^{7}	2.95×10^{5}	3.48×10^{5}
	8	2.65×10^{8}	1.8×10^{8}	2.1×10^{7}	4.5×10^{6}
	12	1.4×10^{9}	1.61×10^{9}	4.7×10^{7}	5.1×10^{7}
	16	8.0×10^{7}	1.55×10^{8}	1.3×10^{9}	8.65×10^{8}
	20	2.0×10^{7}	6.7×10^{7}	1.95×10^{9}	1.29×10^{9}
	24	3.5×10^{5}	5.0×10^{5}	1.0×10^{9}	2.25×10^{8}

ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เวลา (ช.ม.)	GYP (cfu/ml)		MRS (cfu/ml)	
		drop plate	pour plate	drop plate	pour plate
	0	9.5×10^{3}	5.2×10^{3}	1.5×10^{3}	7.0×10^{2}
	4	1.05×10^{5}	7.5×10^{4}	9.5×10^{3}	1.25×10^{3}
	8	8.5×10^{6}	3.05×10^{7}	2.05×10^{4}	4.5×10^{4}
ST*	12	3.95×10^{7}	1.465×10^{8}	3.4×10^{6}	4.3×10^{6}
	16	8.5×10^{6}	1.35×10^{6}	2.5×10^{8}	2.785×10^{8}
	20	7.0×10^{5}	1.7×10^{6}	3.0×10^{8}	1.96×10^{8}
	24	7.0×10^{4}	2.75×10^{6}	2.0×10^{8}	1.0×10^{8}

หมายเหตุ : * LA = *Lactobacillus acidophilus* LB = *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

SL = *Streptococcus lactis* ST = *S. thermophilus*

ภาคผนวก ค

ตารางค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่ผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ

ตารางค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ

ตารางภาคผนวก 2 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหารเหลว MRS ผสมน้ำเวย์

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	5.24	5.19	5.16	5.03	5.08	5.03	5.06
2	4.68	4.59	4.62	4.55	4.42	4.21	4.18
4	4.29	4.15	4.17	4.11	4.15	4.16	3.98
6	4.05	3.94	3.88	3.86	3.97	4.14	3.86
8	3.88	3.8	3.75	3.75	3.86	4.1	3.76
10	3.79	3.78	3.66	3.73	3.87	4.08	3.69
12	3.73	3.7	3.62	3.71	3.86	4.06	3.62
14	3.66	3.64	3.63	3.7	3.88	4.01	3.58
16	3.63	3.62	3.63	3.71	3.87	3.95	3.53
18	3.64	3.58	3.61	3.71	3.87	4.03	3.54
20	3.62	3.58	3.64	3.71	3.87	3.94	3.48
22	3.63	3.6	3.61	3.71	3.87	3.93	3.46
24	3.66	3.6	3.62	3.71	3.87	3.91	3.42

ตารางภาคผนวก 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ใน อาหาร GYP ผสมน้ำเวย์

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.43	6.37	6.09	6.01	6.01	6.02	5.99
2	5.22	5.38	5.70	5.80	5.81	5.86	5.83
4	4.84	4.39	4.23	4.31	4.54	4.59	4.91
6	4.84	4.10	4.19	4.15	4.32	4.57	4.76
8	4.83	4.14	4.15	4.04	4.20	4.65	4.67
10	4.81	4.00	3.95	4.02	4.10	4.46	4.44
12	4.80	3.92	3.89	3.98	4.11	4.37	4.35
14	4.3	3.93	3.69	3.83	3.96	4.27	4.26
16	4.27	379	3.49	3.76	3.9	4.23	4.02
18	4.27	3.58	3.45	3.6	3.82	4.02	4.23
20	4.23	3.52	3.34	3.56	3.79	4.01	4.31
22	4.23	3.5	3.36	3.49	3.77	4.08	4.3
24	4.23	3.5	3.29	3.47	4.77	4.08	4.3

ตารางภาคผนวก 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำเวย์

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.82	6.75	6.73	6.67	6.45	6.47	6.57
2	6.8	6.8	6.41	6.67	6.56	6.53	6.58
4	6.5	5.83	5.8	6	6.6	6.67	6.53
6	6.37	5.27	5.32	5.37	5.76	6.84	6.73
8	5.9	5.27	5.12	5.15	5.49	6.98	6.32
10	6.02	5.66	5.16	5.2	5.74	7.02	6.17
12	6.43	6.09	5.21	5.38	6.24	7.14	6.08
14	6.53	6.25	5.39	5.63	6.87	7.03	5.92
16	6.45	6.17	5.72	5.99	6.69	7.06	5.96
18	6.45	6.14	6.24	5.87	7.03	7.12	5.86
20	6.46	5.96	6.26	5.59	7.49	7.12	5.83
22	6.35	5.86	5.95	5.15	7.31	7.04	5.79
24	6.29	5.82	5.7	4.85	7.24	6.96	5.75

ตารางภาคผนวก 5 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำเวย์

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.05	5.99	5.95	5.96	5.83	5.92	5.95
2	5.44	5.64	5.58	5.42	5.22	5.25	5.28
4	4.77	4.93	4.82	4.86	4.98	5.18	5.03
6	4.7	4.57	4.61	4.67	5.03	5.03	4.89
8	4.43	4.47	4.51	4.7	5.15	5.4	4.83
10	4.57	4.4	4.58	4.86	5.29	5.45	4.8
12	4.36	4.41	4.67	4.93	5.35	5.56	4.73
14	4.55	4.45	4.72	4.99	5.48	5.65	4.74
16	4.37	4.53	4.76	5.03	5.61	5.86	4.7
18	4.46	4.56	4.81	5.19	5.84	6.2	4.67
20	4.5	4.58	4.84	5.3	6.02	6.53	4.63
22	4.52	4.59	4.87	5.44	6.35	6.59	4.59
24	4.54	4.61	4.9	5.63	6.74	6.76	4.6

ตารางภาคผนวก 6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหารเหลว MRS ผสมน้ำมะพร้าว

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	5.19	5.24	5.12	5.05	5.03	5	4.99
2	4.49	4.51	4.52	4.46	4.3	3.94	3.95
4	4.21	4.17	4.09	4.04	4	3.81	3.83
6	3.89	3.85	3.86	3.8	3.79	3.72	3.71
8	3.84	3.74	3.71	3.72	3.68	3.65	3.65
10	3.68	3.7	3.61	3.59	3.58	3.58	3.58
12	3.72	3.64	3.62	3.6	3.58	3.59	3.59
14	3.69	3.62	3.58	3.56	3.53	3.57	3.55
16	3.66	3.59	3.55	3.52	3.49	3.53	3.51
18	3.64	3.56	3.52	3.48	3.46	3.51	3.49
20	3.63	3.55	3.5	3.46	3.42	3.48	3.47
22	3.62	3.55	3.5	3.44	3.39	3.46	3.44
24	3.62	3.55	3.49	3.43	3.38	3.45	3.43

ตารางภาคผนวก 7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.61	6.47	6.34	6.18	6.01	6.05	5.91
2	5.36	5.47	5.56	5.67	5.65	5.94	5.40
4	4.90	4.87	4.97	4.98	5.02	5.61	5.48
6	4.91	4.89	4.98	5.00	5.04	5.60	5.50
8	4.93	4.91	5.01	5.04	5.06	5.59	5.55
10	4.94	4.98	5.01	5.02	5.08	5.65	5.70
12	4.94	5.04	5.01	5.02	5.08	5.65	5.72
14	5.3	5.03	4.69	4.83	4.94	5.27	5.26
16	5.27	4.79	4.49	4.76	4.89	5.23	5.02
18	5.57	4.58	4.45	4.6	4.86	5.02	5.23
20	5.53	4.39	4.34	4.56	4.81	4.87	5.31
22	5.52	4.38	4.36	4.49	4.79	4.85	5.31
24	5.53	4.39	4.29	4.47	4.79	4.85	5.31

ตารางภาคผนวก 8 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.7	6.8	6.88	6.77	6.35	6.3	6.3
2	6.64	6.65	6.81	6.21	5.25	5.03	4.71
4	6.62	6.58	6.25	6.35	4.95	4.71	4.71
6	6.13	5.95	6.18	6.12	4.95	4.84	4.71
8	5.87	5.97	6.24	5.93	4.93	4.84	4.71
10	5.87	5.9	6.32	5.98	4.9	4.84	4.72
12	6.25	6.26	6.38	5.83	4.86	4.83	4.72
14	5.77	5.98	6	5.35	4.85	4.83	4.72
16	5.24	5.4	5.3	5.07	4.82	4.83	4.72
18	5.01	5.07	5.07	4.93	4.78	4.83	4.83
20	4.86	4.91	4.97	4.89	4.77	4.83	4.73
22	4.93	4.94	4.93	4.93	4.77	4.83	4.73
24	4.98	4.97	4.98	4.92	4.72	4.83	4.73

ตารางภาคผนวก 9 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำมะพร้าว

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.2	6.07	6.03	5.96	5.87	5.92	5.98
2	6.0	5.73	5.89	5.66	5.04	5.05	5.05
4	4.73	4.63	4.74	4.99	4.70	4.87	4.97
6	4.52	4.50	4.57	4.55	4.57	4.74	4.83
8	4.38	4.40	4.46	4.44	4.47	4.69	4.81
10	4.30	4.34	4.38	4.36	4.39	4.64	4.78
12	4.25	4.30	4.31	4.29	4.31	4.58	4.73
14	4.25	4.27	4.29	4.24	4.22	4.55	4.70
16	4.27	4.27	4.28	4.24	4.18	4.50	4.67
18	4.33	4.32	4.30	4.24	4.12	4.43	4.63
20	4.38	4.36	4.33	4.25	4.06	4.38	4.59
22	4.40	4.39	4.37	4.26	4.03	4.33	4.53
24	4.41	4.42	4.40	4.27	3.99	4.32	4.45

ตารางภาคผนวก 10 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus acidophilus* ในอาหารเหลว MRS ผสมน้ำกากมะเขือเทศ

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	4.06	4.01	3.97	3.91	3.83	3.79	3.77
2	3.92	3.87	3.84	3.80	3.77	3.75	3.67
4	3.78	3.72	3.72	3.66	3.63	3.74	3.65
6	3.76	3.71	3.69	3.64	3.58	3.70	3.60
8	3.73	3.70	3.67	3.63	3.57	3.64	3.62
10	3.73	3.67	3.62	3.58	3.51	3.47	3.57
12	3.74	3.68	3.62	3.57	3.51	3.44	3.53
14	3.66	3.64	3.62	3.57	3.88	3.45	3.58
16	3.63	3.62	3.62	3.52	3.87	3.45	3.53
18	3.64	3.59	3.61	3.52	3.87	3.65	3.54
20	3.64	3.58	3.64	3.54	3.87	3.64	3.48
22	3.63	3.57	3.61	3.5	3.87	3.63	3.46
24	3.66	3.57	3.62	3.5	3.88	3.63	3.42

ตารางภาคผนวก 11 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.27	6.28	6.06	6.08	6	6.02	6.04
2	6.20	6.23	6.02	6.01	5.79	5.74	5.78
4	6.09	6.23	5.99	5.95	5.75	5.72	5.62
6	6.01	6.13	5.9	5.92	5.71	5.69	5.55
8	5.94	5.87	5.61	5.65	5.64	5.63	5.52
10	5.63	5.66	5.24	5.16	5.26	5.37	5.46
12	5.61	5.61	5.05	4.95	5.02	5.32	5.4
14	5.61	5.03	4.69	4.83	4.96	5.27	5.26
16	5.47	4.79	4.49	4.76	4.9	5.23	5.02
18	5.47	4.58	4.45	4.6	4.82	5.02	5.23
20	5.43	4.39	4.34	4.56	4.79	4.81	5.31
22	5.43	4.38	4.36	4.49	4.77	4.8	5.3
24	5.43	4.39	4.29	4.47	4.77	4.8	5.3

ตารางภาคผนวก 12 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus lactis* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.32	6.07	6.03	5.986	5.87	5.92	5.98
2	6.15	5.73	5.89	5.66	5.04	5.05	5.5
4	5.73	4.63	4.74	4.99	4.7	4.87	4.97
6	5.22	4.5	4.57	4.55	4.57	4.74	4.83
8	4.98	4.4	4.46	4.44	4.47	4.69	4.81
10	4.6	4.34	4.38	4.36	4.39	4.64	4.78
12	4.45	4.3	4.31	4.29	4.31	4.58	4.73
14	4.45	4.29	4.29	4.24	4.22	4.55	4.71
16	4.47	4.25	4.28	4.24	4.18	4.52	4.67
18	4.43	4.3	4.3	4.24	4.12	4.43	4.63
20	4.38	4.3	4.33	4.25	4.06	4.38	4.63
22	4.38	4.31	4.37	4.25	4.03	4.33	4.63
24	4.38	4.32	4.4	4.25	4.03	4.32	4.65

ตารางภาคผนวก 13 ค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Streptococcus thermophilus* ในอาหาร GYP ผสมน้ำกากมะเขือเทศ

เวลา	ค่าความเป็นกรด-ด่างในทรีตเมนต์						
(ชม.)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
0	6.05	6.07	6.03	5.98	5.98	5.97	5.98
2	5.71	5.73	5.89	5.66	5.64	5.65	5.25
4	4.73	4.63	4.74	4.99	4.87	4.97	4.97
6	4.52	4.5	4.57	4.55	4.57	4.74	4.83
8	4.38	4.4	4.46	4.44	4.47	4.69	4.81
10	4.31	4.34	4.38	4.36	4.39	4.64	4.78
12	4.25	4.32	4.31	4.29	4.31	4.58	4.73
14	4.25	4.27	4.29	4.24	4.22	4.55	4.7
16	4.27	4.27	4.28	4.24	4.18	4.5	4.67
18	4.33	4.32	4.32	4.24	4.12	4.43	4.63
20	4.38	4.36	4.33	4.25	4.06	4.38	4.59
22	4.4	4.39	4.31	4.26	4.03	4.33	4.53
24	4.41	4.42	4.31	4.27	4.0	4.32	4.55

ภาคผนวก ง

มูลค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อลิตร

มูลค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อลิตร

จากการสำรวจมูลค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการวิจัย 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว MRS ซึ่งมีจำหน่ายในรูปอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปแบบผง และอาหารเหลว GYP (เตรียมจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ) นอกจากนี้ยังมีการคำนวณราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมน้ำจากวัตถุดิบในสัดส่วนต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อเชื้อแต่ละชนิดดังที่อ้างใน**ตาราง 20** อาหารชนิดต่างๆ มีมูลค่าดังนี้

1. อาหารเหลว MRS

พบเป็นอาหารสำเร็จรูปแบบผง 2 ยี่ห้อ ดังนี้

1) ยี่ห้อ A ราคา 3,920 บาท ใช้ 52 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (360 บาท/ ลิตร)

2) ยี่ห้อ B ราคา 1,926 บาท ใช้ 62 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (347 บาท/ ลิตร)

โดยเฉลี่ยอาหาร MRS แบบเหลว 1 ลิตร ประมาณ 353.50 บาท/ ลิตร

2. อาหารเหลว GYP

เตรียมจากส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด มีดังนี้

1) เปปโตน ราคา 2,185 บาท/450 กรัม ใช้ 5 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (24 บาท/ลิตร)

2) เนื้อวัวสกัด ราคา 2,250 บาท/450 กรัม ใช้ 5 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (25 บาท/ลิตร)

3) ยีสต์สกัด ราคา 2,850 บาท/500 กรัม ใช้ 5 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (28.5 บาท/ลิตร)

4) กลูโคส ราคา 20 บาท/1,000 กรัม ใช้ 5 กรัม : น้ำ 1 ลิตร (0.10 บาท/ลิตร)

เฉลี่ยแล้วอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 1 ลิตร ประมาณ 77.60 บาท/ลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำเวย์

น้ำเวย์ที่นำมาทำวิจัยจากหน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์พบว่าไม่มีมูลค่า เนื่องจากไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อันใดเลย นอกจากทำการบำบัดและระบายสู่สิ่งแวดล้อม

1) สำหรับ *Lactobacillus acidophilus* (MRS 40 % : เวย์ 60 %) 141.4 บาท/ลิตร

2) สำหรับ *Lb. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* (GYP 80 % : เวย์ 20 %) 62.08 บาท/ลิตร

3) สำหรับ *Streptococcus lactis* (GYP 0 % : เวย์ 100 % + กลูโคส) 0.10 บาท/ลิตร

4) สำหรับ *S. thermophilus* (GYP 40 % : เวย์ 60 %) 31.04 บาท/ลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวจากโรงงานผลิตกะทิที่นำมาทำวิจัยพบว่าไม่มีมูลค่า เนื่องจากการสัมภาษณ์ไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อันใดเลย นอกจากทิ้งเป็นของเสียสู่สิ่งแวดล้อม

1) สำหรับ *Lactobacillus acidophilus* (MRS 60 % : น้ำมะพร้าว 40 %) 212.1 บาท/ลิตร
2) สำหรับ *Lb. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* (GYP 60 % : น้ำมะพร้าว 40 %) 46.56 บาท/ลิตร
3) สำหรับ *Streptococcus lactis* (GYP 40 % : น้ำมะพร้าว 60 %) 31.04 บาท/ลิตร
4) สำหรับ *S. thermophilus* (GYP 80 % : น้ำมะพร้าว 20 %) ประมาณ 62.08 บาท/ลิตร

5. อาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำกากมะเขือเทศ

กากมะเขือเทศที่นำมาทำวิจัยไม่ทราบมูลค่าที่แน่นอน เนื่องจากการนำไปใช้ประโยชน์ที่ทราบคือการนำไปเป็นอาหารเสริมของสัตว์ มูลค่าไม่ทราบชัดเจนจึงเทียบเป็นของเสียที่ไม่มีมูลค่าเช่นเดียวกับวัตถุดิบ 2 ชนิดแรก

1) สำหรับ *L. acidophilus* (MRS 60 % : น้ำมะพร้าว 40 %) 212.1 บาท/ลิตร
2) สำหรับ *Lb. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* (GYP 20 % : น้ำกากมะเขือเทศ 80 %) 15.52 บาท/ลิตร
3) สำหรับ *S. lactis* (GYP 60 % : น้ำกากมะเขือเทศ 40 %) 46.56 บาท/ลิตร
4) สำหรับ *S. thermophilus* (GYP 80 % : น้ำกากมะเขือเทศ 20 %) 62.08 บาท/ลิตร

หมายเหตุ: (1) ราคาของ MRS และส่วนประกอบอาหาร GYP เป็นราคาปลายปี 2548

(2) ราคาที่คำนวณได้เป็นราคาจากปริมาณอาหารสำเร็จรูปหรือส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเตรียมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

(2) อาหารที่ผสมวุ้น (agar) 1 ลิตร บวกเพิ่มอีก 20 บาท (agar ราคา 600 บาท ขนาดบรรจุ 450 กรัม อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ใช้ 15 กรัม)

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักหอสมุด

ภาคผนวก จ

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายศตพร กันแก้ว	
เกิดเมื่อ	27 มีนาคม 2521	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกาวิละวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2544	ปริญญาตรี สถาบันราชภัฏเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๒๔๗๗ สำนักหอสมุด