

บทที่ 2

ทฤษฎี/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ामะพร้าวแก่

2.1.1 ปริมาณและองค์ประกอบ

น้ामะพร้าวแก่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปมะพร้าว โดยทั่วไปผู้ผลิตจะเฉาะเอาน้ामะพร้าวทิ้งและเก็บแต่ส่วนเนื้อส่งโรงงานแปรรูปมะพร้าวขาวต่อไป โดยทั่วไปผลมะพร้าว 1 ลูกประกอบไปด้วยเนื้อมะพร้าวเพียง 35% เท่านั้น ส่วนที่เหลืออีก 65% เป็นวัสดุเหลือทิ้งซึ่งประกอบด้วยเปลือกมะพร้าว 30% กะลามะพร้าว 15% และน้ामะพร้าว 20% [ทศพร ทองเที่ยงและคณะ, 2548] ผู้ประกอบการได้นำวัสดุเหลือทิ้งพวกเส้นใยมะพร้าวและกะลามะพร้าวไปใช้ประโยชน์เกือบทั้งหมดเหลือเพียงส่วนของขุยมะพร้าวซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการแยกเส้นใยมะพร้าวจากเปลือกมะพร้าวที่ถูกกองทิ้งไว้กลางแจ้ง และน้ामะพร้าวแก่ที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการแปรรูปเป็นน้ามะพร้าว วัตถุประสงค์ในการทำปุ๋ยหมักและน้ำหมักชีวภาพ ประมาณร้อยละ 20 ที่เหลือประมาณร้อยละ 80 หรือคิดเป็น 84.8 ล้านลิตร (2551) ถูกทิ้งไว้ทั้งบนพื้นดินและแหล่งน้ำ ส่งกลิ่นเหม็นและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมอย่างมาก [พรทิพย์ เฟื่องวรรณศรี, 2550]

น้ामะพร้าวแก่นี้สามารถบริโภคได้ เนื่องจากอุดมไปด้วยสารอาหารทั้งน้ำตาลและโปรตีน รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะธาตุโพแทสเซียมที่มีปริมาณสูงถึง 247.0 mg% ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ มีปริมาณแตกต่างจากในน้ामะพร้าวอ่อนเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 2.1 [นพมณี โทบุญญา นนท์, 2545; เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง และคณะ, 2542; Krishnankutty, 1987]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ामะพร้าวแก่และน้ामะพร้าวอ่อน

องค์ประกอบ	น้ामะพร้าวแก่	น้ामะพร้าวอ่อน
Total solids%	5.4	6.5
Reducing sugars %	0.2	4.4
Minerals %	0.5	0.6
Protein %	0.1	0.01
Fat %	0.1	0.01
Acidity 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)

2.1.2 การใช้ประโยชน์

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำน้ำมะพร้าวแก่มาใช้ประโยชน์ในหลายด้านดังต่อไปนี้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จากการที่น้ำมะพร้าวแก่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารหลายอย่าง เช่น น้ำตาลประมาณ 0.1% และ โปรตีน 0.1% รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ [นพฉณี โทบุญญานนท์, 2545; เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2542; Krishnankutty, 1987] จึงมีการนำน้ำมะพร้าวแก่มาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* และ *Candida utilis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีเทียบเท่ากับการเลี้ยงในอาหาร MY [อินทัย คมเสวต, 2519] สำหรับแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus* SR 4-2 และ *Lactobacillus pentosus* AP 17-1 ที่สามารถผลิตไดอะซิติลและอะซิโตนซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์นมหมักหลายชนิด สามารถใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีการผลิตชีวมวลสูงกว่าในอาหาร MRS [อัสนี จิระวิบูลย์เวช, 2548] นอกจากนี้สูตรอาหารน้ำมะพร้าวที่เติมเปปโทน 1% ผงสกัดจากยีสต์ 0.5% โซเดียมอะซิเตต 0.5% แอมโมเนียมซิเตรต 0.2% และทวิน 80 0.1% สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pasvulus*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* ได้ดีเทียบเท่ากับอาหาร MRS [สายชล ชิวปรีชา, 2520]

2. ฐานมะพร้าว (Nata de coco) ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Acetobactor xylinum* เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตฐานมะพร้าวในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากในน้ำมะพร้าวประกอบด้วยน้ำตาล และสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ [เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2542] แผ่นฐานที่เกิดจากการหมักโดยจุลินทรีย์ *A. xylinum* จัดเป็นเนื้อเยื่อประเภทเซลลูโลสซึ่งน้ำย่อยหรือเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ จึงถูกจัดเป็นสารอาหารประเภทเส้นใยอาหาร (Dietary fiber) ใช้เป็นอาหารในการลดน้ำหนักได้ และมีประโยชน์ในแง่การส่งเสริมสุขภาพช่วยระบบขับถ่าย [ปิยะรัชช กุลเมธี, 2551]

3. น้ำส้มสายชูหมัก โดยปกติสามารถใช้ผลไม้อาหารหลายชนิดเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ แต่ถ้าใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นวัตถุดิบจำเป็นต้องเติมน้ำตาลเพิ่มเพื่อให้เป็นอาหารของเชื้อยีสต์ในการหมักช่วงแรกที่มี

การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ หลังจากนั้นเชื้อน้ำส้มสายชูจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้กลายเป็นน้ำส้ม [กรมการจัดหางาน, 2554]

4. น้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยหมัก เกษตรกรนิยมใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นส่วนประกอบในการทำน้ำหมักชีวภาพ เนื่องจากมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และยังมีธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย [กองเกษตรเคมี, 2545] สำหรับการใช้น้ำมะพร้าวแก่ในปุ๋ยหมักนั้น ได้มีการศึกษาพบว่าการทำปุ๋ยหมักขุยมะพร้าวร่วมกับรำ มูลโค และกากน้ำตาลสามารถใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งสารอาหารและตัวปรับความชื้นเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ [Tripetchkul *et al.*, 2009]

2.2 โพรไบโอติก

2.2.1 ความหมายของโพรไบโอติก

โพรไบโอติก คืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย [Fuller, 1989] จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่เรียกว่าโพรไบโอติกนั้น ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ได้แก่ แลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส (*Lactobacillus acidophilus*), เอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis*), สเตรปโตคอคคัส เทอร์โมฟิลลัส (*Streptococcus thermophilus*) และ ไบฟิโดแบคทีเรียม ไบฟิเดียม (*Bifidobacterium bifidum*)

2.2.2 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์เหล่านี้ อาศัยอยู่ในร่างกายภายในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ให้กับเราได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย [ธารรัตน์ สุภศิริ, 2542] ดังนี้

1. กรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตออกมา จะทำให้สภาวะภายในลำไส้ มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค
2. ทำให้ระบบขับถ่ายดี ไม่เกิดการหมักหมมของของเสียในร่างกาย เป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งตับ
3. วิตามินบีที่ได้ จะทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ และยังทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้น
4. ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด
5. แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกช่วยลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด
6. แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนม ทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมดีขึ้น

ปัจจุบันนิยมเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร พบมากในผลิตภัณฑ์ประเภทนมหมักเช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว เป็นต้น [Situta-Cruce and Goulet, 2001] และมีแนวโน้มการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำผักและผลไม้ เป็นต้น เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง [Luckow and Delahunty, 2004; Yoon *et al.*, 2005; Sheenhan *et al.*, 2007] สำหรับโพรไบโอติกที่เหมาะสมแก่การนำมาเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารควรมีคุณสมบัติดังนี้ [วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541 ; Mattila-Sadholm, 2002]

1. สามารถขยายการผลิตสู่ระดับการค้าได้
2. มีความคงตัวและเก็บไว้ได้นาน
3. สามารถอยู่รอดในลำไส้สัตว์และมนุษย์ได้
4. ให้ประโยชน์ต่อสัตว์และมนุษย์ได้
5. มีคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสที่ดี
6. สามารถมีชีวิตรอดระหว่างกระบวนการผลิต
7. มีคุณสมบัติต้านทานต่อฟาจ

2.2.3 การผลิตเครื่องดื่มนมผสมโพรไบโอติกจากน้ำผักหรือผลไม้

การผลิตเครื่องดื่มโพรไบโอติกทำได้โดยเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกลงในเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการที่พบมากในท้องตลาดได้แก่เครื่องดื่มประเภทนม แต่ปัจจุบันมีความนิยมนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกเติมลงในน้ำผักและผลไม้หลากหลายชนิด [Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010] ที่มีสภาวะการผลิตแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติกจากน้ำผัก/ผลไม้

ชนิดของเชื้อ	ชนิดน้ำผัก/ ผลไม้	สภาวะที่ใช้ในการหมัก			คุณภาพของเครื่องดื่ม	
		pH เริ่มต้น	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (ชม.)	จำนวนจุลินทรีย์ (log CFU/ml)	การอยู่รอดของ จุลินทรีย์เมื่อเก็บ รักษาที่ 4 °ซ
<i>L. acidophilus</i>	ส้ม ¹	-	-	-	8	✓
	สับปะรด ¹	-	-	-	9	✓
	มะเขือเทศ ¹	-	-	-	9	✓
	หัวบีท ²	6.3	30	48	8	✗
<i>L. casei</i>	กะหล่ำปลี ³	5	30	24	8	✗
	หัวบีท ²	6.3	30	48	8	✓
	แคนตาลูป ⁴	6.1	31	8	8.3	✓
	ผลมะม่วง หิมพานต์ ⁵	6.4	30	16	7.48	✓



<i>L.delbrueckii</i>	ส้ม ¹	-	-	-	3	
	สับปะรด ¹	-	-	-	8	
	มะเขือเทศ ¹	-	-	-	8	✓
	กะหล่ำปลี ³	5.8	30	24	8	✗
	หัวบีท ²	6.3	30	48	8	✓
<i>L.plantarum</i>	กะหล่ำปลี ³	5.8	30	24	8	✓
	หัวบีท ²	6.3	30	48	8	✓
<i>L.acidophilus</i> และ	ส้ม ¹	-	-	-	8	✓
<i>L. delbrueckii</i> (เชื้อผสม)	สับปะรด ¹	-	-	-	9	✓
	มะเขือเทศ ¹	-	-	-	9	✓

ที่มา: 1. ศรีสา ทวีแสง และคณะ (2005) 2. Yoon *et al.* (2005) 3. Yoon *et al.* (2006)
4. Fonteles *et al.* (2011) 5. Pereira *et al.* (2010)

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติก

2.2.4.1 ชนิดของวัตถุดิบ

ชนิดของวัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติกเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยทั่วไปนิยมใช้เครื่องดื่มประเภทนมในการผลิตเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติกที่เห็นได้ทั่วไปในท้องตลาด เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เป็นต้นทำให้เครื่องดื่มโพรไบโอติกที่ได้มีคุณค่าทางอาหารสูง [Situta-Cruce and Goulet, 2001] เป็นที่นิยมของผู้บริโภคที่รักสุขภาพ นอกจากนมแล้วในปัจจุบันยังมีการวิจัยและพัฒนาเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติกจากวัตถุดิบอื่น ๆ เช่น น้ำผักผลไม้ [Luckow and Delahunty, 2004; Yoon *et al.*, 2005; Sheenhan *et al.*, 2007] เพื่อสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่รักสุขภาพแต่ไม่สามารถดื่มนมได้ หรือเป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่แปลกใหม่แต่คงคุณค่าทางอาหารสูง ในการศึกษาการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* ลงในน้ำผักผลไม้ ได้แก่ น้ำมะเขือเทศ น้ำกะหล่ำปลี และน้ำหัวบีท พบว่าแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถใช้ในน้ำผักและผลไม้เป็นอาหารเพื่อเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ได้โดยไม่ต้องมีการปรับค่า pH และเติมสารอาหารอื่น ๆ เพิ่ม [Yoon *et al.*, 2005] อย่างไรก็ตามน้ำผลไม้บางชนิดอาจไม่เหมาะแก่การนำมาผลิตเครื่องดื่มผสมโพรไบโอติกเนื่องจากอาจมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เช่น สารพวกฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนส์ในน้ำส้มเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [ศรีสา ทวีแสง และคณะ, 2548] หรือน้ำสตอเบอร์รี่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L.delbrueckii* ได้ 4 สายพันธุ์ [Vinderola *et al.*, 2002] เป็นต้น ดังนั้นการคัดเลือกชนิด

ของวัตถุดิบที่ใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มนมผสมโพรไบโอติกจึงเป็นสิ่งสำคัญ

2.2.4.2 ชนิดของหัวเชื้อ

ชนิดของหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเครื่องดื่มนมผสมโพรไบโอติกมีทั้งเชื้อชนิดเดียวหรือเชื้อผสม โดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกันส่งผลต่อทั้งรสชาติ กลิ่นรส และคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในเครื่องดื่มนมผสมโพรไบโอติก

ชนิดของเชื้อ	หน้าที่หลัก	ชนิดของผลิตภัณฑ์
<i>Lactobacilli</i>		
<i>L. bulgaricus</i>	กลิ่นรส	โยเกิร์ต, คีเฟอร์, ภูมิสส์
<i>L. jugurti</i>	กลิ่นรส	โยเกิร์ต
<i>L. acidophilus</i>	กลิ่นรสและสุขภาพ	โยเกิร์ต, นมอะซิโดฟิลัส
<i>L. casei</i>	กลิ่นรสและสุขภาพ	นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม
<i>Bifidobacteria</i>		
<i>B. bifidum</i>	สุขภาพ	โยเกิร์ต, นมบีฟิดัส
<i>B. infantis</i>	สุขภาพ	โยเกิร์ต, นมบีฟิดัส
<i>B. breve</i>	สุขภาพ	โยเกิร์ต, นมบีฟิดัส
<i>B. longum</i>	สุขภาพ	โยเกิร์ต, นมบีฟิดัส
<i>Streptococci</i>		
<i>S. thermophilus</i>	กลิ่นรส	โยเกิร์ต
<i>S. lactis</i>	กลิ่นรส	โยเกิร์ต
<i>S. cremoris</i>	กลิ่นรส	โยเกิร์ต

ที่มา : Nakazawa and Hosono (1992)

1. หัวเชื้อชนิดเดียว เป็นการเติมหัวเชื้อเพียงชนิดเดียวลงในเครื่องดื่มนมเพื่อเพิ่มคุณสมบัติให้แก่ผลิตภัณฑ์ เช่น การเติม *Lactobacillus casei* ลงในนมเพื่อผลิตนมเปรี้ยว [Nakazawa and Hosono, 1992] หรือการเติมเชื้อ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* หรือ *Lactobacillus paracasei* ลงในน้ำส้มและน้ำสับปะรด [Sheenhan et al., 2007] เป็นต้น ซึ่งการเติมหัวเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างชนิดกันนี้ส่งผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในเครื่องดื่มนม จากการศึกษการผลิตผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกจากน้ำหัวบีท (red beet juice) โดยการเติมแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* ลงในน้ำหัวบีท แล้วหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำหัวบีทเป็นอาหารในการสร้าง

เซลล์และผลิตภัณฑ์ได้ตีทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. acidophilus* และ *L. plantarum* สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. casei* และ *L. delbrueckii* [Yoon et al., 2005] นอกจากนี้การเติมหัวเชื้อลงในเครื่องคั้นยังส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาการเติมเชื้อโพรไบโอติกลงในน้ำส้มพบว่า การเติม *L. plantarum* ลงในน้ำส้มก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเปรี้ยวและรสชาติที่ไม่ดี [Luckow and Delahunty, 2004]

2. หัวเชื้อผสม การผลิตเครื่องคั้นผสมโพรไบโอติกอาจมีการเติมเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิด เพื่อเพิ่มคุณประโยชน์และให้ได้กลิ่นและรสชาติที่ดี โดยอาจเติมเชื้อบริสุทธิ์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ตัวอย่างเช่น การเติม *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii* ลงในน้ำส้มช่วยให้จุลินทรีย์เหลืรอดอยู่ในน้ำส้มเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 21 วันได้ถึง 8 log CFU/ml ซึ่งสูงกว่าการเติม *L. delbrueckii* เพียงชนิดเดียวที่มีจุลินทรีย์เหลืรอดเพียง 2 log CFU/ml เท่านั้น การผลิตโยเกิร์ตนิยมเติมเชื้อ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* ในอัตราส่วนเท่ากัน [นรินทร์ ทองศิริ, 2531] เพื่อให้ได้กลิ่นรสที่ดีและเพิ่มคุณค่าทางด้านอาหาร นอกจากนี้ยังมีการใช้หัวเชื้อผสมที่ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเรียกว่า เม็ดคีเฟอร์ (Kefir grain) เป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับผลิตคีเฟอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่กำลังเป็นที่นิยมในหมู่ผู้บริโภคที่รักสุขภาพ เม็ดคีเฟอร์ประกอบด้วยคีเฟอร์เรน (kefiran) และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. kefiranofaciens*, *L. casei*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* และ *Saccharomyces cerevisiae* รูปร่างเหมือนดอกกะหล่ำเล็ก ๆ สีขาว [Irigoyen et al., 2005; Witthuhn et al., 2005] โดยคีเฟอร์ที่ผลิตได้จากเม็ดคีเฟอร์นี้ประกอบด้วยจุลินทรีย์พวก *Lactobacilli* เป็นหลักประมาณ 65-80% นอกจากนี้ยังประกอบด้วย Lactic acid bacteria, yeast และ Mycelial fungi อีกหลายชนิด [Witthuhn et al., 2005]

2.2.4.3 ปริมาณของหัวเชื้อ

ปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตเครื่องคั้นผสมโพรไบโอติกส่งผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์ ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นประมาณ 5 – 7 log CFU/ml [Yoon et al., 2005; Yoon et al., 2006; Fonteles et al., 2011; Pereira et al., 2010] จากการศึกษาการเติมเม็ดคีเฟอร์ปริมาณ 1% และ 5% ของปริมาณนมทั้งหมด พบว่าคีเฟอร์ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อ 1% มีปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลแลคโตส และค่า pH สูงกว่าคีเฟอร์ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อ 5% แต่มีปริมาณยีสต์และแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกและค่าความหนืดต่ำกว่า [Irigoyen et al., 2005] และ

2.2.4.4 ระยะเวลาในการเก็บรักษา

โดยทั่วไปในเครื่องคั้นผสมโพรไบโอติกจะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของหัวเชื้อและวัตถุดิบตัวอย่างเช่น ในการเก็บรักษาคีเฟอร์ (หัวเชื้อผสม) ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 28 วันพบว่าปริมาณของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกลดลงประมาณ 1.5

log unit [Irigoyen *et al.*, 2005] การศึกษาเก็บรักษาเครื่องคั้นผสมโพรไบโอติกที่ผลิตจากน้ำหัวบีทที่ใช้ *Lactobacillus acidophilus* เป็นหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณ *L. acidophilus* ลดลงจาก ประมาณ 10^8 CFU/ml เหลือประมาณ 10^4 CFU/ml เท่านั้น ทั้งนี้เนื่อง *L. acidophilus* ไม่ทนต่อสภาวะที่มี pH ก่อนข้างต่ำ (3.7) และ acidity สูง (0.98) [Yoon *et al.*, 2005]

2.2.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานใดออกมาตรฐานที่ชัดเจนของผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องคั้นผสมโพรไบโอติกจากน้ำผลไม้ ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงได้นำมาตรฐานที่ใกล้เคียงกันคือ มาตรฐานนมเปรี้ยวกำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2548 (ตารางที่ 2.4) และมาตรฐานน้ำหมักชีวภาพจากพืชเพื่อการบริโภคกำหนดโดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน พ.ศ. 2547 มีรายละเอียดดังนี้

คุณลักษณะที่เหมาะสมของน้ำหมักชีวภาพจากพืชเพื่อการบริโภคอ้างอิงตามมาตรฐานเกณฑ์ มพช.481/2547 ระบุเกณฑ์มาตรฐานที่สำคัญดังนี้

1. เติลแอลกอฮอล์ต้องไม่เกินร้อยละ 3 โดยปริมาณ
2. เมทิลแอลกอฮอล์ต้องไม่เกิน 240 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. ความเป็นกรด-ด่างต้องไม่เกิน 4.3
4. จุลินทรีย์

ซาลโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 50 กรัม

สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่พบในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม

เอสเชอริเชีย โคไล โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2.4 มาตรฐานนมเปรี้ยวกำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข (2548)

มาตรฐาน	โยเกิร์ต	นมเปรี้ยว แอซิโดฟิลัส	นมเปรี้ยวเคเฟอร์	นมเปรี้ยว ญูมิส	นมเปรี้ยว อื่นๆ
1. มีกลิ่นรสตามลักษณะของนมเปรี้ยว	✓	✓	✓	✓	✓
2. มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.7 ของน้ำหนัก	✓	✓	✓	x	✓
3. มีมันเนยน้อยกว่าร้อยละ 15 ของน้ำหนัก	✓	✓	x	x	x
4. มีมันเนยน้อยกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนัก	x	x	✓	✓	✓
5. มีค่าความเป็นกรดแลคติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.6 ของน้ำหนัก	✓	✓	✓	x	x
6. มีค่าความเป็นกรดแลคติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.7 ของน้ำหนัก	x	x	x	✓	x
7. มีค่าความเป็นกรดแลคติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.3 ของน้ำหนัก	x	x	x	x	✓
8. มีแบคทีเรียไม่น้อยกว่า 10,000,000 โคโลนี/กรัม	✓	✓	✓	✓	✓
9. มียีสต์ไม่น้อยกว่า 10,000 โคโลนี/กรัม	✓	✓	✓	✓	✓
10. ไม่ใช้วัตถุกันเสีย	✓	✓	✓	✓	✓
11. ไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	✓	✓	✓	✓	✓
12. ตรวจพบแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มน้อยกว่า 3 ต่อนมเปรี้ยว 1 กรัม โดยวิธี MPN	✓	✓	✓	✓	✓
13. ตรวจพบเชื้อราได้ไม่เกิน 100 โคโลนี/กรัม สำหรับนมเปรี้ยวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก	✓	✓	✓	✓	✓
14. ตรวจพบยีสต์ไม่เกิน 100 โคโลนี/กรัม สำหรับนมเปรี้ยวที่ไม่ได้ใช้ยีสต์ในการหมักและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก	✓	✓	✓	✓	✓
15. ตรวจพบยีสต์และเชื้อราได้ไม่เกิน 10 โคโลนี/กรัม สำหรับนมเปรี้ยวที่ผ่านการฆ่าเชื้อหลังการหมัก	✓	✓	✓	✓	✓