



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การผลิตโยเกิร์ตนมแพะโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก
ที่คัดแยกได้จากนมแพะ
และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)

โดย

อาจารย์ ดร. พรศรี เจริญพานิช

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

อาจารย์ ดร. ทักษิณ ทองอร่าม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

อาจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยเชิงบูรณาการระหว่างคณะวิชา

กองทุนวิจัยและสร้างสรรค์ส่วนกลาง ประจำปี 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนวิจัยและสร้างสรรค์ส่วนกลาง ประจำปี 2560 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ในการอนุมัติเงินทุนอุดหนุนการวิจัย และขอขอบคุณผู้ใหญ่อุดร หมั่นมณี รวมถึงเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะนม ในหมู่บ้านชาวไทยมุสลิม ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างนมแพะดิบ สำหรับแยกเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

31 ตุลาคม 2561

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: “การผลิตโยเกิร์ตนมแพะโดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากนมแพะ และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29)”

ชื่อผู้วิจัย: 1. อาจารย์ ดร. พรศรี เจริญพานิช (หัวหน้าโครงการ)
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. อาจารย์ ดร. ทักษิณ ทองอร่าม (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย: กองทุนวิจัยและสร้างสรรค์ส่วนกลาง ประจำปีงบประมาณ 2560
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ: 2561

ประเภทการวิจัย: การวิจัยพื้นฐาน

สาขาวิชา: เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

นมแพะเป็นอีกทางเลือกที่ดีสำหรับผู้บริโภคที่แพ้นมวัวและนับเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากนมแพะดิบ ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะ จากตัวอย่างนมแพะดิบสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท นำมาทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์ ประกอบด้วยความสามารถในการทนกรดและเกลือ น้ำดี ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ นอกจากนี้ยังทดสอบความปลอดภัยโดยดูจากความสามารถในการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นจึงนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะ จากผลการทดสอบพบว่า 5 ไอโซเลทที่ทนกรด pH 2.5 ได้นาน 4 ชั่วโมง โดยมีอัตราการรอดชีวิตระหว่าง 58-87% และมี 8 ไอโซเลทที่ทนเกลือ น้ำดีความเข้มข้น 0.3% ได้นานถึง 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการรอดชีวิตระหว่าง 49-74% ทั้งนี้มีเพียง 2 ไอโซเลท คือ GM51 และ GM52 ที่ไม่ย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงและน่าจะปลอดภัย จึงนำมาทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, และ *Pseudomonas aeruginosa* และไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 เมื่อทดสอบการหมักโยเกิร์ตนมแพะพบว่าทั้ง GM51 และ GM52 มีอัตราการหมักกรดค่อนข้างสูง แต่มีเพียงโยเกิร์ตนมแพะที่หมักด้วย GM51 เท่านั้นที่มีคุณลักษณะพึงประสงค์ ใกล้เคียงกับโยเกิร์ตนมแพะที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้า YC-X16 จึงสรุปได้ว่า GM51 น่าจะมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะได้

คำสำคัญ: โพรไบโอติกส์, นมแพะ, โยเกิร์ต

Abstract

Research title: “Production of goat milk yogurt with lactic acid bacteria isolated from goat milk and study of anti-proliferative activity on colon cancer cell line (HT-29)”

Researcher: 1. Dr. Pornsri Charoenpanich (Project Leader)
Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University

2. Dr. Taksawan Thongaram (Co-Researcher)
Faculty of Science, Silpakorn University
3. Assist. Prof. Dr. Adisri Charoenpanich (Co-Researcher)
Faculty of Science, Silpakorn University

Research grants: Central Fund for Research and Creative Work, Fiscal Year 2017
Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion: 2018

Type of research: basic research

Subject: Agriculture and Biology

Goat milk is an excellent alternative for consumers who are allergic to cow milk and also considered a good source of probiotic bacteria. This study aimed to select lactic acid bacteria (LAB) isolated from raw goat milk for potential goat milk yoghurt starter. A total of 26 LAB strains were successfully isolated from raw goat milk samples. Their probiotic properties, including, resistance to low pH and bile salt, antimicrobial activity, antiproliferative activity, and haemolytic activity, were characterized. The selected LAB strains were then tested for the ability to ferment goat milk yoghurt. Out of 26 isolates, 5 isolates were capable of surviving (58-87% survival rate) exposure to environment at pH 2.5 for 4 h. Also, 8 isolates were resistant (49-74% survival) to bile salt at a concentration of 0.3% for up to 24 h. Only two isolates, GM51 and GM52, showed non-haemolytic activity, indicating that these isolates were potentially safe. GM51 and GM52 seemed to possess no antibacterial (against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*) and antiproliferative (against human colon cancer cell line, HT-29) activity. However, both GM51 and GM52 showed a relatively high acidification rate during goat milk yoghurt fermentation. Only the goat milk yoghurt fermented with GM51 obtained satisfactory characteristics similar to yoghurt fermented with the commercial starter YC-X16. Thus, GM51 is a potential goat milk yoghurt starter.

Key words: Probiotics, goat milk, yogurt

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจสอบเอกสาร	3
2.1 นมวัวและนมแพะ	3
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก	7
2.3 โพรไบโอติกส์	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	11
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	11
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมนมแพะ	15
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	18
4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เคตาเลสและความสามารถในการเคลื่อนที่	26
4.4 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้	27
4.5 การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกส์	30
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นหัวเชื้อหมักโยเกิร์ตนมแพะ	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	41
แนวทางในการดำเนินงานวิจัยต่อไป	42
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของนมจากสัตว์ชนิดต่าง ๆ (โดยเฉลี่ย)	4
ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่จำเป็นในนม 100 กรัม	4
ตารางที่ 3 กรดไขมันในนม 100 กรัม	5
ตารางที่ 4 องค์ประกอบของนมแพะ นมวัว และนมมนุษย์ จากการวิเคราะห์ในประเทศสหรัฐอเมริกา (ปริมาณน้ำนม 100 กรัม)	6
ตารางที่ 5 ข้อมูลของตัวอย่างน้ำนมแพะที่นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก	15
ตารางที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS	17
ตารางที่ 7 ผลการศึกษาการย้อมแกรม รูปร่างลักษณะของเซลล์ และการจัดเรียงตัว	18
ตารางที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS และลักษณะ สัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์	19
ตารางที่ 9 ผลการสร้างเอนไซม์เคตาเลส และความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ	26
ตารางที่ 10 กลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้และผลการทดสอบคุณสมบัติบางประการของโพร ไบโอติกส์	28
ตารางที่ 11 อัตราการรอดชีวิต (%) ของแบคทีเรียที่ pH 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	31
ตารางที่ 12 อัตราการรอดชีวิต (%) ของแบคทีเรียในสภาวะที่มี 0.3% bile salt ที่ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	33
ตารางที่ 13 ผลความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร blood agar	35
ตารางที่ 14 ลักษณะเนื้อสัมผัส (ความหนืดและความแข็ง) และปริมาณจุลินทรีย์ของ ผลิตภัณฑ์สุดท้าย	40

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลกติก	8
รูปที่ 2 ลักษณะอาหารแข็ง MRS ที่มี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์	16
รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Bromocresol purple	16
รูปที่ 4 (A) ลักษณะการเกิดการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar อย่างสมบูรณ์ (GM91) และ (B) ไม่พบการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar (GM51)	32
รูปที่ 5 ลักษณะการเกิดการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar เพียงบางส่วน (GM114 และ GM131)	33
รูปที่ 6 ลักษณะการเกิดการสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ทั้งหมด 26 ไอโซเลท	33
รูปที่ 7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion	37
รูปที่ 8 แสดงผลเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกส์สูตร MRS แบบ ปรับ pH และสารที่เชื้อ GM51 เชื้อ YC-X16 ผลิตขึ้นขณะเจริญเติบโต	38
รูปที่ 9 ค่า pH และปริมาณกรดระหว่างการหมักนมแพะด้วย GM51, GM52 และหัวเชื้อทางการค้า YC-X16	39
รูปที่ 10 ค่า pH ลักษณะปรากฏของโยเกิร์ตนมแพะชนิดคงตัวที่ผลิตได้	40