บทที่ 3

การทดลองที่ 1
การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค ในนมหมักกรด

บทนำ

นมหมักกรดเป็นผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากการนำนมมาหมักด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิค และกรดโปรปิโอนิค นมหมักกรดมีหลายชนิด เช่น น้ำนมเหลืองหมัก นมคุณภาพต่ำ-หมัก นมเทียมหมัก นมหมักกรดมีลักษณะจับตัวคล้ายโยเกิร์ต ไขมันแยกตัวลอยอยู่ด้านบน ส่วนกลางเป็นส่วนของ น้ำใส และส่วนล่างเป็นส่วนของเนื้อนม (ไพบูลย์, 2546) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของนมหมักกรดเป็นผลมาจากการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆในนม (Fields, 1977) สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจำนวนแบคทีเรียใน นมหมักกรดในครั้งนี้ เป็นการนำนมดิบที่มีคุณภาพดีมาหมักด้วยกรดอะซิติคที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ และเคมีของนมหมักกรดที่หมักด้วยกรดอะซิติคที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคในนมหมักกรดที่หมักด้วยกรดอะซิติคที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1. นมดิบ
2. กรดอะซิติคความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์
3. สารเคมี
   - สีย้อมแกรมประกอบด้วย crystal violet, gram iodine, แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ safranin O
   - โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
   - ฟีนอลทาลีน (phenolpthalein)
   - เพบโตน (peptone)
   - น้ำกลั่น
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
5. ขวดสำหรับบรรจุนมหมักกรด
6. ขวดฉีดฝอย
7. ขวดปากแคบวัดปริมาตร (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
8. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)
9. ขาตั้ง (stand) และบิวเรท (barette) ขนาด 25 มิลลิลิตร
10. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
11. เครื่องเขย่า (vortex mixer)
12. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
13. ตู้เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (laminar flow hood)
14. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
15. กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30
16. เครื่อง pH-SCT meter ของบริษัท YSI ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. วิธีการ

2.1. วิธีการทำนมหมักกรด และการเก็บตัวอย่างนมหมักกรด

นำนมดิบมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักแล้วเติมกรดอะซิติค ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของไพบูลย์ (2546) ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปบรรจุในขวดพลาสติกใสขนาด 30 มิลลิลิตร จำนวน 90 ขวด ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปเก็บไว้ในที่ไม่ถูกแสง เป็นเวลา 30 วัน ตรวจดูลักษณะทางกายภาพ สุ่มเก็บตัวอย่างนมหมักกรดจำนวน 3 ขวด ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วันของการหมัก เพื่อนำไปศึกษา pH เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด และจำนวนแบคทีเรียโดยใช้ตัวอย่างนมหมักกรดจากขวดเดียวกัน

2.2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของนมหมักกรด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของนมหมักกรดด้วยตาเปล่า โดยสังเกตการแยกชั้นของนมหลังจากหมักด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยพิจารณาจากลักษณะเนื้อนมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมตามหลักการของไพบูลย์ (2546) ซึ่งแบ่งส่วนของนมหมักกรดเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ไขมันแยกตัวลอยอยู่ด้านบน ส่วนกลางเป็นส่วนของน้ำใส หรือเวย์ และส่วนล่างเป็นส่วนของเนื้อนม โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกวัน ในเวลา 08.30 - 09.00 น.

2.3. การเปลี่ยนแปลง pH ของนมหมักกรด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่เกิดจากกระบวนการหมักโดยใช้ pH-SCT meter ในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วันของการหมัก ในเวลา 09.00 - 09.30 น.

2.4. การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของนมหมักกรด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของนมหมักกรดในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วันของการหมัก โดยคำนวนเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของ นมหมักกรดออกมาในรูปของกรดแลคติค ซึ่งนำนมหมักกรดมาไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์

(NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ตามวิธีการของทองยศ (2527) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (แลคติค) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (แลคติค) ในนม} = \frac{\text{ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร) x 0.009 x 100}}{\text{ปริมาณนมหมักกรด (มิลลิลิตร)}}$$

2.5. การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียในนมหมักกรด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในนมหมักกรดในช่วงวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วันของการหมัก โดยทำการตรวจนับเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี direct microscopic count ตามวิธีของ George และ Jackson (1998) แล้วนำปริมาณเซลล์ที่นับได้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(A1+A2+A3+.....An) \times 1000 \times B}{30 \times n \times C \times D}$$

n	=	จำนวนซ้ำ (30 ซ้ำ)
$A_1, A_2, A_3 .... A_n$	=	ปริมาณเซลล์ที่นับได้แต่ละซ้ำ
B	=	พื้นที่เสมียร์ตัวอย่าง (ไมโครเมตร)
C	=	พื้นที่ของเลนส์ใกล้วัตถุ (ไมโครเมตร)
D	=	ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการเสเมียร์ (ไมโครลิตร)

2.6. การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติค (lactic acid bacteria) ในนมหมักกรด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติคในนมหมักกรดในช่วงวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วันของการหมัก ตามวิธีนับมาตรฐาน (standard plate count) ตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร MRS

ตามวิธีของ George และ Jackson (1998) บันทึกค่า CFU (colony forming unit) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์ โดยคำนวณจากสูตร

X	=	$Nx10^n$ CFU ต่อมิลลิลิตร
X	=	จำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตร
N	=	ค่าเฉลี่ยโคโลนีที่ได้จากตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร
n	=	dilution ของหลอดที่นับจำนวนแบคทีเรีย

สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จะนำไปย้อมสีแกรม และจัดกลุ่มโดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลการเปลี่ยนแปลง pH เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติค มาคำนวนหาค่าเฉลี่ย

4. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการหมักนม และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี จำนวนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคในนมหมักกรด ณ ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาการ-จัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ผลและวิจารณ์

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของนมหมักกรด

ผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของนมหมักกรดได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่า ลักษณะทางกายภาพของนมหมักกรดหลังจากเติมกรดอะซิติคจะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงไป เริ่มตั้งแต่หลังเติมกรดอะซิติค โดยนมหมักกรดจะค่อยๆ จับตัวกันคล้ายโยเกิร์ต และในวันที่ 6 ของการหมัก นมหมักกรดเกิดการแยกเป็น 3 ส่วน (ชั้น) โดยไขมันลอยตัวอยู่ด้านบน มีส่วนของเหลวใส หรือเวย์ อยู่ตรงกลาง และเนื้อนมอยู่ด้านล่าง และนมหมักกรดจะอยู่ในสภาพการแยกชั้นเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 30 ของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของไพบูลย์ (2546) และสุชาติ และคณะ (2547) สำหรับชั้นของไขมันซึ่งอยู่ตอนบน เกิดจากการรวมตัวของไขมันเป็นเม็ดขนาดใหญ่ และลอยขึ้นข้างบน เพราะไขมันมีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าองค์ประกอบอื่นๆ สำหรับของแข็งซึ่งเป็นโปรตีนเคซีนมีความถ่วงจำเพาะสูงสุดจึงตกตะกอน เนื่องมาจากสภาพความเป็นกรดในนมหมักกรดซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 4.7 หรือต่ำกว่า (วรรณา และ วิบูลย์ศักดิ์, 2531)

การเปลี่ยนแปลง pH และเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของนมหมักกรด

จากการศึกษา พบว่าขณะที่ยังไม่ได้เติมกรดอะซิติค นมดิบมีค่า pH เท่ากับ 6.31 แต่หลังจากเติมกรดอะซิติค นมหมักกรดมีค่า pH ลดลงเป็น 5.38 และ pH ในนมจะค่อยๆ ลดลงจนมีค่า เท่ากับ 3.63 ในวันที่ 30 ของการหมัก ขณะที่เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของนมหมักกรดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจาก 0.14 ในวันที่ 0 เป็น 1.49 ในวันที่ 30 ของการหมัก (ตารางที่ 4) ค่า pH ของนมหมักกรดที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งหลังจากการเติมกรดอะซิติคนมหมักกรดจะมีสภาพเอื้ออำนวยต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งเกิดกระบวนการหมักน้ำตาลแลคโตสแบบโฮโมเฟอร์เมนเตตีฟ (homofermentative) เกิดกรดแลคติคขึ้นทำให้นมมีความเป็นกรดสูงขึ้น (Weiser *et al.*, 1971) ผลการศึกษาในครั้งนี้นมหมักกรดมีค่า pH ต่ำกว่ารายงานของสุชาติ และคณะ (2547) ที่รายงานว่า หลังจากปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติคที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ นมหมักกรดมีการลดลงของ pH จาก 5.94 ในวันที่ 1 ของการหมัก และ pH ลดลงเหลือ 4.29 ในวันที่ 15 ของการหมัก

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลง pH เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด และลักษณะทางกายภาพของนมหมักกรด

ระยะเวลาการหมัก	pH	% lactic acid	ลักษณะทางกายภาพ
ก่อนปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์			
0	6.31	0.14	นมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน
หลังปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์			
0	5.38	0.16	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
1	5.10	0.36	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
3	4.91	0.54	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
6	4.17	0.69	เริ่มมีการแยกชั้นของนมเป็น 3 ชั้น
9	4.06	0.88	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
12	3.95	0.98	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
15	3.84	1.1	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
18	3.83	1.12	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
21	3.76	1.19	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
24	3.66	1.28	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
27	3.65	1.48	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
30	3.63	1.49	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย และแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติคในนมหมักกรด

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคในนมหมัก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 โดยตรวจพบแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมในนมดิบก่อนเติมกรดอะซิติคที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว เท่ากับ 2.81×10^6, 5.26×10^6 และ 5.75×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตรวจพบแบคทีเรียย้อมไม่ติดสีแกรมมีรูปร่างกลม เท่ากับ 1.79×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเติมกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในนมดิบแล้วทำการสุ่มตรวจจำนวนแบคทีเรีย (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า แบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว ที่ย้อมติดสีแกรมมีจำนวนลดลง เท่ากับ 1.23×10^6, 1.91×10^6 และ 1.39×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รวมทั้งจำนวนของแบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีแกรมก็มีจำนวนลดลงเช่นกัน (1.39×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลังจากหมักนม นาน 1 วัน ไม่พบ

แบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีแกรม การลดลงของแบคทีเรียหลังจากเติมกรดนั้นเป็นผลมาจากการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดจากการเติม ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดมีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ (Fields, 1977) แต่ในช่วงการหมักนม นาน 3 วัน จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว เพิ่มจำนวนขึ้น เท่ากับ 1.40×10^{6}, 2.40×10^{6} และ 6.98×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่อยๆ ลดจำนวนลงในช่วงเวลาวันที่ 6, 9, 12 และ 15 วันของการหมัก จนไม่พบจำนวนของแบคทีเรียในวันที่ 18 ของการหมัก ซึ่ง Weiser และคณะ (1971) อธิบายว่า ในสภาพที่เอื้ออำนวย แบคทีเรีย *Streptococcus lactis* จะเติบโตเด่นขึ้น และสร้างกรดแลคติคเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณมากจนยับยั้งการเติบโตของเชื้อชนิดนี้ แบคทีเรียในกลุ่มแลคโตบาซีลลัสจะเติบโตเด่นขึ้นมาแทน และสร้างกรดออกมาอีก มีผลทำให้นมหมักกรดมีความเป็นกรดสูงมากจนแลคโตบาซีลลัสไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และตายไปเรื่อย ๆ

สำหรับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติค (ตารางที่ 5) พบว่า ในนมดิบพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติค เท่ากับ 1.6×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร แต่หลังจากเติมกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 8.75×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก โดยมีจำนวนเท่ากับ 9.32×10^{12} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นประชากรแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนตรวจไม่พบเลยในวันที่ 18 ของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ สุชาติ และคณะ (2547) ที่พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคมีปริมาณที่สูงในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นจึงมีจำนวนลดลง

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติครูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรม มีจำนวนมากที่สุด แต่ในวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติครูปร่างท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรม มีจำนวนมากที่สุด

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคในนมหมักกรด

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์/มล.)						จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (CFU/มล.)	ลักษณะทางสัญฐานวิทยา
	ย้อมติดสีแกรม			ย้อมไม่ติดสีแกรม				
	รูปร่างกลม	รูปร่างท่อนสั้น	รูปร่างท่อนยาว	รูปร่างกลม	รูปร่างท่อนสั้น	รูปร่างท่อนยาว		
ก่อนปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์								
0	2.81E+06	5.26E+06	5.75E+05-	1.79E+07	-		1.6E+3	Cocci /gram positive
หลังปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์								
0	1.23E+06	1.91E+06	1.39E+04	1.39E+05	-	-	8.75E+3	Cocci /gram positive
1	4.41E+05	3.54E+05	1.41E+05	-	-	-	1.27E+5	Cocci /gram positive
3	1.40E+06	6.98E+05	2.40E+05	-	-	-	9.32E+12	Cocci and short rod / gram positive
6	9.24E+04	3.21E+05	1.96E+05	-	-	-	3.80E+11	Short rod/ gram positive
9	-	7.86E+04	1.80E+05	-	-	-	2.35E+11	Short rod /gram positive
12	-	2.77E+04	6.93E+03	-	-	-	1.28E+11	Short rod /gram positive
15	-	9.24E+03	2.31E+03	-	-	-	7.59E+9	Short rod /gram positive
18	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลง pH เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด และลักษณะทางกายภาพของนมหมักกรด

ระยะเวลาการหมัก	pH	% lactic acid	ลักษณะทางกายภาพ
ก่อนปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์			
0	6.31	0.14	นมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน
หลังปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์			
0	5.38	0.16	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
1	5.10	0.36	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
3	4.91	0.54	ไม่มีการแยกชั้นของนม แต่มีลักษณะคล้ายโยเกิร์ต
6	4.17	0.69	เริ่มมีการแยกชั้นของนมเป็น 3 ชั้น
9	4.06	0.88	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
12	3.95	0.98	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
15	3.84	1.1	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
18	3.83	1.12	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
21	3.76	1.19	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
24	3.66	1.28	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
27	3.65	1.48	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น
30	3.63	1.49	นมมีการแยกชั้น เป็น 3 ชั้น

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย และแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติคในนมหมักกรด

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคในนมหมัก ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 โดยตรวจพบแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมในนมดิบก่อนเติมกรดอะซิติคที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว เท่ากับ 2.81×10^6, 5.26×10^6 และ 5.75×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตรวจพบแบคทีเรียย้อมไม่ติดสีแกรมมีรูปร่างกลม เท่ากับ 1.79×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเติมกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในนมดิบแล้วทำการสุ่มตรวจจำนวนแบคทีเรีย (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า แบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว ที่ย้อมติดสีแกรมมีจำนวนลดลง เท่ากับ 1.23×10^6, 1.91×10^6 และ 1.39×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รวมทั้งจำนวนของแบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีแกรมก็มีจำนวนลดลงเช่นกัน (1.39×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หลังจากหมักนม นาน 1 วัน ไม่พบ

แบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีแกรม การลดลงของแบคทีเรียหลังจากเติมกรดนั้นเป็นผลมาจากการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยกรดจากการเติม ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดมีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ (Fields, 1977) แต่ในช่วงการหมักนม นาน 3 วัน จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว เพิ่มจำนวนขึ้น เท่ากับ 1.40×10^{6}, 2.40×10^{6} และ 6.98×10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่อยๆ ลดจำนวนลงในช่วงเวลาวันที่ 6, 9, 12 และ 15 วันของการหมัก จนไม่พบจำนวนของแบคทีเรียในวันที่ 18 ของการหมัก ซึ่ง Weiser และคณะ (1971) อธิบายว่า ในสภาพที่เอื้ออำนวย แบคทีเรีย *Streptococcus lactis* จะเติบโตเด่นขึ้น และสร้างกรดแลคติคเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีปริมาณมากจนยับยั้งการเติบโตของเชื้อชนิดนี้ แบคทีเรียในกลุ่มแลคโตบาซีลลัสจะเติบโตเด่นขึ้นมาแทน และสร้างกรดออกมาอีก มีผลทำให้นมหมักกรดมีความเป็นกรดสูงมากจนแลคโตบาซีลลัสไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และตายไปเรื่อย ๆ

สำหรับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติค (ตารางที่ 5) พบว่า ในนมดิบพบจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติค เท่ากับ 1.6×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร แต่หลังจากเติมกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 8.75×10^{3} CFU ต่อมิลลิลิตร และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก โดยมีจำนวนเท่ากับ 9.32×10^{12} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นประชากรแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนตรวจไม่พบเลยในวันที่ 18 ของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ สุชาติ และคณะ (2547) ที่พบว่า แบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคมีปริมาณที่สูงในวันที่ 3 ของการหมัก จากนั้นจึงมีจำนวนลดลง

เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติครูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรม มีจำนวนมากที่สุด แต่ในวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติครูปร่างท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรม มีจำนวนมากที่สุด

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย และจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคในนมหมักกรด

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์/มล.)						จำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (CFU/มล.)	ลักษณะทางสัญฐานวิทยา
	ย้อมติดสีแกรม			ย้อมไม่ติดสีแกรม				
	รูปร่างกลม	รูปร่างท่อนสั้น	รูปร่างท่อนยาว	รูปร่างกลม	รูปร่างท่อนสั้น	รูปร่างท่อนยาว		
ก่อนปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์								
0	2.81E+06	5.26E+06	5.75E+05-	1.79E+07	-		1.6E+3	Cocci /gram positive
หลังปรุงแต่งด้วยกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์								
0	1.23E+06	1.91E+06	1.39E+04	1.39E+05	-	-	8.75E+3	Cocci /gram positive
1	4.41E+05	3.54E+05	1.41E+05	-	-	-	1.27E+5	Cocci /gram positive
3	1.40E+06	6.98E+05	2.40E+05	-	-	-	9.32E+12	Cocci and short rod / gram positive
6	9.24E+04	3.21E+05	1.96E+05	-	-	-	3.80E+11	Short rod/ gram positive
9	-	7.86E+04	1.80E+05	-	-	-	2.35E+11	Short rod /gram positive
12	-	2.77E+04	6.93E+03	-	-	-	1.28E+11	Short rod /gram positive
15	-	9.24E+03	2.31E+03	-	-	-	7.59E+9	Short rod /gram positive
18	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-

สรุป

1. นมหมักกรดจะเกิดการแยกเป็น 3 ชั้น มีไขมันลอยตัวอยู่ด้านบน ส่วนน้ำ หรือ เวย์อยู่ตรงกลาง และส่วนของแข็งอยู่ด้านล่าง ค่า pH ของนมหมักกรดลดลงจาก 6.31 ในวันที่ 0 เหลือ 3.63 ในวันที่ 30 ของการหมัก ขณะที่เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดของนมหมักกรดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจาก 0.14 ในวันที่ 0 เป็น 1.49 ในวันที่ 30 ของการหมัก

2. ตรวจพบแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว และแบคทีเรียที่ย้อมติดไม่สีแกรมที่มีรูปร่างกลมหลังจากเติมกรดอะซิติค หลังจากหมักนม นาน 1 วัน ไม่พบแบคทีเรียที่ย้อมไม่ติดสีแกรม ในช่วงการหมักนมนาน 3 วัน จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรของแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมที่มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และท่อนยาว มีจำนวนมากที่สุด และค่อยๆ ลดจำนวนลงในช่วงเวลาวันที่ 6, 9, 12 และ 15 วันของการหมัก จนไม่พบจำนวนของแบคทีเรียในวันที่ 18 ของการหมัก

สำหรับจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติค เพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากเติมกรดอะซิติค 0.02 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก โดยมีจำนวนเท่ากับ 9.32×10^{12} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นประชากรแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนตรวจไม่พบเลยในวันที่ 18 ของการหมัก เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติคที่มีรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรม แต่ในวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 ของการหมัก ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติคที่มีรูปร่างท่อนสั้น ย้อมติดสีแกรม