

ผลของการเสริมกล้าเชื้อต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธีการหมัก

Effect of Starter Culture on the Extraction of Virgin Coconut Oil through the Fermentation

ฉัตรชัย สังข์ผุด*

Chatchai Sungpud*

บทคัดย่อ

น้ำมันมะพร้าวมีคุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ต่อสุขภาพจึงมีบทบาทที่โดดเด่นในอาหารและยาที่สำคัญได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเครื่องสำอาง การบริโภคน้ำมันมะพร้าวเป็นที่ยอมรับจากผู้คนในหลายส่วนของโลกมานานหลายศตวรรษ ปัจจุบันน้ำมันมะพร้าวจึงเป็นวัตถุดิบที่มีอัตราความต้องการสูง วิธีการสกัดน้ำมันมะพร้าวทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางกายภาพ เคมี และการหมักด้วยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ การหมักทำได้โดยการนำครีมไปหมักค้างคืนแล้วแยกชั้นน้ำมันออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า “น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์” ซึ่งเป็นวิธีการที่กระทำได้ง่ายและต้นทุนต่ำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแหล่งกล้าเชื้อจุลินทรีย์และปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดน้ำมันเพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณผลผลิต โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งผลิตน้ำมันมะพร้าวและจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) มาทดสอบ พบว่าผลการเสริมด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp.(BCC 38040) ที่เพาะเลี้ยงขยายในอาหารเหลว (สูตรน้ำกะทิสด 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5.0 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนตาเทรต 2.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม และแมงกานีสซัลเฟต 0.1 กรัม) ในปริมาณ 1.0% โดยปรับค่าพีเอชของส่วนครีมเป็น 6.0 หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมันเท่ากับ 96.93% คิดเป็นปริมาณผลผลิตสูงสุด 335 กรัมต่อลิตรของน้ำกะทิสด โดยมีค่าคุณภาพของน้ำมัน ได้แก่ ปริมาณน้ำ ค่าเปอร์ออกไซด์ ค่ากรดไขมันอิสระ และค่าซาฟอนิฟิเคชัน มีค่าเท่ากับ $0.11 \pm 0.01\%$, 1.68 ± 0.38 meq/kg, $0.42 \pm 0.02\%$ และ 258 ± 5 ตามลำดับ ซึ่งมีคุณภาพสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ของ มผช.670/2547 และมาตรฐานองค์การอาหารและยาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ. 2524)

คำสำคัญ : น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น การหมัก กล้าเชื้อ

*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

Abstract

Coconut oil has a unique role in the diet and pharmaceuticals as an important functional food and cosmetics. The health and nutritional benefits derived from consuming coconut oil have been recognized in many parts of the world for centuries. Coconut oil is the raw material that is in high demand nowadays. There are few techniques for coconut oil extraction, such as physical, chemical and fermentation or enzymatic processes. In the fermentation process, coconut cream is utilized for the fermentation overnight; the recovery oil product, is called "virgin coconut oil". The process is simple and low cost. This research aimed to screen sources of microbial culture and optimize conditions for the fermentation to increase oil quality and oil production efficiency. Starter cultures were isolated from different sources of coconut oil plants and obtained from National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC). The results showed that inoculation of 1.0% starter culture of *Lactobacillus* sp. (BCC 38040) pre-cultured in a liquid medium (1000 ml fresh coconut milk containing 20 g sucrose, 5.0 g yeast extract, 2.0 g potassium dihydrogen tartrate, 0.1 g magnesium sulfate and 0.1 g manganese sulfate) in the cream adjusted to pH 6.0 and incubation at 30°C for 24 hours resulted in 96.93% oil recovery efficiency, representing 335 g total oil yield per 1000 ml of fresh coconut milk. The qualities of the oil including moisture, peroxide value, free fatty acid, saponification value, were $0.11 \pm 0.01\%$, 1.68 ± 0.38 meq/kg, $0.42 \pm 0.02\%$ and 258 ± 5 , respectively, which are better than the product standards of Thai Industrial Standards Institute, OTOP standard 670/2547 and Thai Food and Drug Administration, notification No. 57 (2524).

Keywords: Virgin Coconut Oil, Fermentation Process, Starter Culture

บทนำ

จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2556) พบว่า ปี 2555 ไทยมีพื้นที่ปลูกมะพร้าว 1,337,364 ไร่ ให้ผลผลิต 1,056,658 ตัน สถิติราคามะพร้าวผลใหญ่ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ตั้งแต่ปี 2539 – 2552 พบว่ามีราคาคต่ำแปรผันอยู่ในช่วง 2.88-8.71 บาทต่อผล (สำนักงานการค้าภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2552) ต่อมาปลายปี 2556 ถึงต้นปี 2557 ราคาปรับขึ้นสูงถึง 15 บาทต่อผล (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ประมาณ 2% ของผลผลิตดังกล่าวถูกนำไปเพิ่มมูลค่าต่อการผลิตเป็นน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (virgin coconut oil) โดยใช้กระบวนการหมักตามธรรมชาติ (Fuangworawong et al.,

2008, 13-31) การสืบค้นราคาจำหน่ายปลีกน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นในตลาดออนไลน์ (webgoogle search) พบว่าปัจจุบันมีราคาจำหน่ายสูงตั้งแต่ 300-1,000 บาทต่อลิตร โดยขึ้นอยู่กับแหล่งบริษัทผู้ผลิตและขนาดบรรจุต่อหน่วย

มีงานวิจัยหลายชิ้นพัฒนาวิธีการสกัดน้ำมันมะพร้าวให้ได้คุณภาพและปริมาณผลผลิตสูงด้วยวิธีสกัดเย็น เริ่มต้นจาก McGlone และคนอื่นๆ (1986, 695-697) พบว่าการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟา-อะมัยเลส โพลีกลาแลกทูโรเนส และเอนไซม์โปรตีเอสในเนื้อมะพร้าวบดเปียกให้ผลผลิตน้ำมันคุณภาพดีสูงถึง 80% ต่อมา Suhardiyono (1992, 51-68) ประยุกต์ใช้สัตช์ขนมปังเพื่อเป็นแหล่งของ

เอนไซม์ในระหว่างการผลิตพบว่าการเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่า จากนั้น Che Man และอื่นๆ (1992, 38-42) ศึกษาผลการเติมกรดอะซิติก(25%) ในปริมาณ 0.1-0.4% พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวน้ำมันที่คุณภาพดีได้ 58.3-60.3% ต่อมาChe Man และคนอื่นๆ (1996, 683-686) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 73.8% เมื่อมีการผสมเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟา-อะมัยเลส โพลีกลูตาไมด์ และ โปรตีนเอสอย่างละ 1% (w/w) ที่ระดับค่าพีเอช7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

การพัฒนาการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่องเริ่มจาก Che Man และคนอื่นๆ (1997, 1115-1119) พบว่าเมื่อมีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM ลงไปจำนวน 5% ในระหว่างการหมักอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้ผลผลิตสูงถึง 95.06% Handayani และคนอื่นๆ (2009, 151-157) ศึกษาวิธีการหมักด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย พบว่าการหมักโดยเติมกลีเซอรอล *Lactobacillus bulgaricus* ลงไปจำนวน 5% ให้ผลผลิตน้ำมันสูงสุด และน้ำมันยังมีคุณสมบัติด้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญหลายชนิดต่ำสุด Marasabessy และคนอื่นๆ (2010, 1141-1148) พัฒนาภูมิปัญญาการใช้เนื้อมะพร้าวผสมกับเนื้อมะพร้าวขูดแล้วนำไปหมักสกัดน้ำมันของชาวชาวพบว่าสามารถสกัดน้ำมันออกได้ 54% (w/w) และเมื่อนำเนื้อมะพร้าวไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อประยุกต์ใช้เป็นกลีเซอรอลเริ่มสำหรับการหมักสกัดน้ำมันจากสบู่ดำพบว่าจุลินทรีย์ชนิดที่มีบทบาทสำคัญคือ *Bacillus licheniformis* strain BK23

สภาพปัจจุบันกระบวนการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทยยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับปริมาณการเก็บเกี่ยวผลผลิตแต่ละครั้งไม่คงที่ หรือบางครั้งไม่เกิดการแยกชั้นและผลิตภัณฑ์หืนง่ายเนื่องจากยังคง

อาศัยการหมักด้วยเชื้อตามธรรมชาติ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแหล่งกลีเซอรอลเชื้อจุลินทรีย์และปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดน้ำมันเพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณผลผลิต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วิธีการแยกเชื้อจากธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างชั้นฝ้า ชั้นครีม และชั้นน้ำเปรี้ยวที่ได้จากขั้นตอนการผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นจากผู้ผลิตแหล่งต่างๆ มาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อMRSagar

2. วิธีการเตรียมกลีเซอรอล

นำเชื้อที่คัดแยกได้เอง 4 ชนิดและเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) คือเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (BCC 47647) และเชื้อ *Lactobacillus* sp.(BCC 38040) มาเพาะเลี้ยงขยายในสูตรอาหารพัฒนาใหม่ ซึ่งประกอบด้วย น้ำกะทิสด 1000 มิลลิลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5.0 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนทาเทรต 2.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม และแมกนีเซียซัลเฟต 0.1 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อทั้งหมดด้วยวิธี USFDA-BAMOnline (2001, Chapter 3)

3. วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าว

3.1 กรรมวิธีการเตรียมครีม

นำมะพร้าวระยะสุกจัดเปลือกสีน้ำตาลขูดเอาเนื้อแล้วเข้าเครื่องบีบคั้นเพื่อเอาเฉพาะกะทิ จากนั้นผสมกับน้ำกรองในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องกวนความเร็วสูง 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วแบ่งบรรจุใส่ถุงพลาสติกใส จากนั้นใช้ยางผูกมัดปิดปากถุงให้แน่นโดยไม่มีช่องว่างอากาศ นำไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำและครีม จากนั้นใช้เข็มเจาะกันถุงเพื่อปล่อยน้ำเปรี้ยวทิ้งแล้วเก็บส่วนที่เป็นครีมเพื่อใช้สำหรับการสกัดน้ำมัน

3.2 วิธีการคัดเลือกแหล่งของกล้าเชื้อ

นำส่วนที่เป็นครีมมาใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อจากแหล่งต่างๆ ปริมาตร 1.0% ใช้กระดาษทิชชูปิดเพื่อป้องกันแสงและการปนเปื้อน บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการหมักและแยกชั้นของน้ำมันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตักน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นออกและกรองแยกด้วยกระดาษทิชชู บรรจุในขวดแก้วสีเขียว ดังภาพที่ 1 ไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจนปิดฝา แล้วซั่ง

น้ำหนักของน้ำมันที่ได้เพื่อวิเคราะห์หาผลของแหล่งกล้าเชื้อต่อปริมาณผลผลิตเทียบกับน้ำกะทิ(% Virgin coconut oil (VCO) yield from coconut milk) ประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน(% oil recovery from coconut milk) ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน มาทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ด้านกลิ่นหอม กลิ่นมะพร้าว กลิ่นหมักกลิ่นหืน ความขุ่น และสี ด้วยแบบทดสอบแบบพรรณนา 10 ระดับค่าคะแนน โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายและเป็นที่นิยมในท้องตลาดคือยี่ห้อปาริสุทธิ์เป็นตัวอย่างอ้างอิง

ผลผลิตน้ำมัน = $\{VCO(g)/\text{น้ำหนักน้ำกะทิเริ่มต้น}(g)\} \times 100$

ประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน = $\{\text{ผลผลิตน้ำมันที่สกัดได้}(\%)/\text{ปริมาณไขมันในน้ำกะทิ}^*(\%)\} \times 100$

* วิเคราะห์ด้วยชุดสกัด Soxhlet apparatus โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นสารสกัด ตามวิธี AOAC.(2000)



ก. เติมกล้าเชื้อ



ข. หมักเพื่อแยกชั้นน้ำมัน



ค. ตักน้ำมันกรอง

ภาพที่ 1 กรรมวิธีการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

3.3 วิธีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดด้วยเชื้อ *Lactobacillus* sp.

ศึกษาผลของการปรับค่าพีเอชโดยนำส่วนที่เป็นครีมมาปรับค่าพีเอชเป็น 3 ระดับคือ 4.0 5.0 และ 6.0 ด้วยกรดอะซิติกเติมกล้าเชื้อ 1.0% หมักสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศึกษาผลของอุณหภูมิในการหมักโดยนำส่วนที่เป็นครีมมาปรับระดับพีเอช 6.0 เติมกล้าเชื้อ 1.0% แล้วหมักสกัดที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ศึกษาผลของระยะเวลาในการหมักโดยนำครีมที่ปรับระดับพีเอช 6.0 เติมกล้าเชื้อ 1.0% หมักสกัดที่

อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกน้ำมันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิต และคำนวณค่าประสิทธิภาพการสกัดน้ำมันดังภาพที่ 1

4. การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

นำตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไปวัดค่า free fatty acid (%) ด้วยวิธี ISO 660: 1996 วัดค่า moisture and volatile matter (%) ด้วยวิธี ISO 622: 1998 วัดค่า peroxide value (meq/kg) ด้วยวิธี IUPAC 2.501 วัดค่า iodine value (wijs) ด้วยวิธี IUPAC 2.205 และวัดค่า saponification value (mgKOH/g) ด้วยวิธี IUPAC 2.202 เพื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

1. ผลการแยกเชื้อจากธรรมชาติ

ผลการเก็บตัวอย่างชั้นฟ้า ชั้นครีม และชั้นน้ำเปรี้ยวที่ได้จากขั้นตอนการผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นจากผู้ผลิตแหล่งต่างๆ มาคัดแยกเชื้อที่โคเคนให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 4 ไอโซเลต พบว่าเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง จึงเป็นแบคทีเรียคนละกลุ่มกับรายงานวิจัยของ Che Man และคนอื่นๆ (1997, 1115-1119) ทดลองหมักใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM Handayani และคนอื่นๆ (2009, 151-157) ทดลองใช้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และ Marasabessy และคนอื่นๆ (2010, 1141-1148) ทดลองใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* strain BK23 ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ พบว่ามีผลต่อการเพิ่มผลผลิตการสกัดน้ำมันมะพร้าว โดยเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

2. ผลการทดสอบวิธีเตรียมกล้ำเชื้อ

การเพาะขยายกล้ำเชื้อในสูตรอาหารเหลวที่พัฒนาใหม่พบว่าจำนวนเชื้อแต่ละชนิดที่เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นมีปริมาณแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$) โดยเชื้อที่คัดแยกมาจากกระบวนการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวตามธรรมชาติ (Isolated No. 2) ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นมีอัตราการเจริญสูงสุด วัดปริมาณของเชื้อได้สูงถึง $9.48 \pm 0.01 \text{ LogCFU/ml}$ ในการใช้เวลานานเพียง 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *Lactobacillus* sp. (BCC 38040) ซึ่งเป็นเชื้อคัดแยกมาจากผักดองมีอัตราการเจริญต่ำสุด วัดปริมาณเชื้อได้ $5.11 \pm 0.22 \text{ LogCFU/ml}$ (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามช่วงปริมาณความเข้มข้นของกล้ำเชื้อดังกล่าวมีปริมาณสูงเพียงพอต่อการใช้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานผลวิจัยของ Handayani และคนอื่นๆ (2009, 151-157) ซึ่งได้ศึกษาผลการใช้เชื้อบริสุทธิ์ในปริมาณ 1-10% ต่อการเพิ่มผลผลิตการสกัดน้ำมันมะพร้าว ด้วยการเพาะเลี้ยงขยายกล้ำเชื้อในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าว ครีมมะพร้าว สับปะรดหรือ malt extract ชูเรีย และกากน้ำตาล ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันกับงานวิจัยนี้ พบว่ากล้ำเชื้อสามารถเติบโต และสร้างเอนไซม์กลุ่มอะมัยเลสและโปรติเอสได้ดี โดยปริมาณของกล้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการใช้งานคือ 5% แต่สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าการใช้ปริมาณกล้ำเชื้อเพียง 1.0% ก็สามารถหมักสกัดน้ำมันให้แยกชั้นได้เสร็จสิ้นภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าว

3.1 ผลของการคัดเลือกแหล่งกล้ำเชื้อ

เมื่อนำส่วนที่เป็นครีมมาหมักสกัดโดยการเติมกล้ำเชื้อชนิดต่างๆ ที่ผ่านการเพาะขยายในอาหารเหลวสูตรน้ำกะทิ ปริมาณ 1.0% พบว่าให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์และประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมันแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 276 ถึง 317 กรัมต่อลิตร ผลการเสริมด้วยกล้ำเชื้อ *Lactobacillus* sp. (BCC 38040) ให้ประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมันสูงสุด 93.34% หรือคิดเป็นปริมาณผลผลิตน้ำมันเท่ากับ 31.7% จาก

น้ำกะทิ (ตารางที่ 1) เมื่อเทียบกับผลของ Che Man และคนอื่น ๆ (1996, 683-686) ซึ่งได้มีการผสมเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟา-อะมัยเลส โพลีกลาแลคทูโรเนส และโปรตีเอสอย่างละ 1% (w/w) ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงถึง 73.8% ต่อมา Che Man และคนอื่น ๆ (1997, 1115-1119) ได้เพิ่มเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM ลงไปจำนวน 5% พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสูงถึง 95.06% เช่นเดียวผลการศึกษาของ Handayani และคนอื่น ๆ (2009, 151-157) หมักโดยเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* จำนวน 5% ให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันสูงสุด 26.8% จากน้ำกะทิ

จากการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบกับหมักปกติโดยไม่เสริมเชื้อพบว่ามีประสิทธิภาพในการสกัด

86.82% โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับการเสริม แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการเสริมด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีผลช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน เนื่องจากสามารถทำลายคุณสมบัติการเป็นอิมัลชันของน้ำกะทิไม่ให้ความคงตัว จึงทำให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันอยู่ด้านบน สำหรับโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและน้ำจะอยู่ชั้นล่าง (Soeka *et al*, 2008, 91-95; Rahayu *et al*, 2008, 679-686) นอกจากนี้ยังทำให้ให้น้ำมันมีลักษณะใสและเกิดกลิ่นหมักน้อย

ตารางที่ 1 ผลการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยใช้กล้าเชื้อชนิดต่างๆ

ชนิดของกล้าเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในกล้าเชื้อ (LogCFU/ml)	ปริมาณผลผลิตน้ำมันจากน้ำกะทิ (%)	ประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน (%)
ชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ)	-	29.43 ± 0.48	86.82 ^{ab} ± 2.42
Isolated No. 1	8.22 ^b ± 0.14	27.57 ± 2.96	81.48 ^b ± 10.53
Isolated No. 2	9.48 ^a ± 0.01	27.89 ± 2.25	82.41 ^b ± 8.55
Isolated No. 3	8.27 ^b ± 0.03	31.20 ± 1.59	91.96 ^a ± 2.63
Isolated No. 4	6.49 ^c ± 0.19	29.07 ± 0.87	85.81 ^{ab} ± 4.52
<i>Lactobacillus</i> sp.	5.11 ^c ± 0.22	31.66 ± 1.67	93.34 ^a ± 2.76
<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.54 ^d ± 0.27	30.77 ± 1.75	90.70 ^{ab} ± 3.24

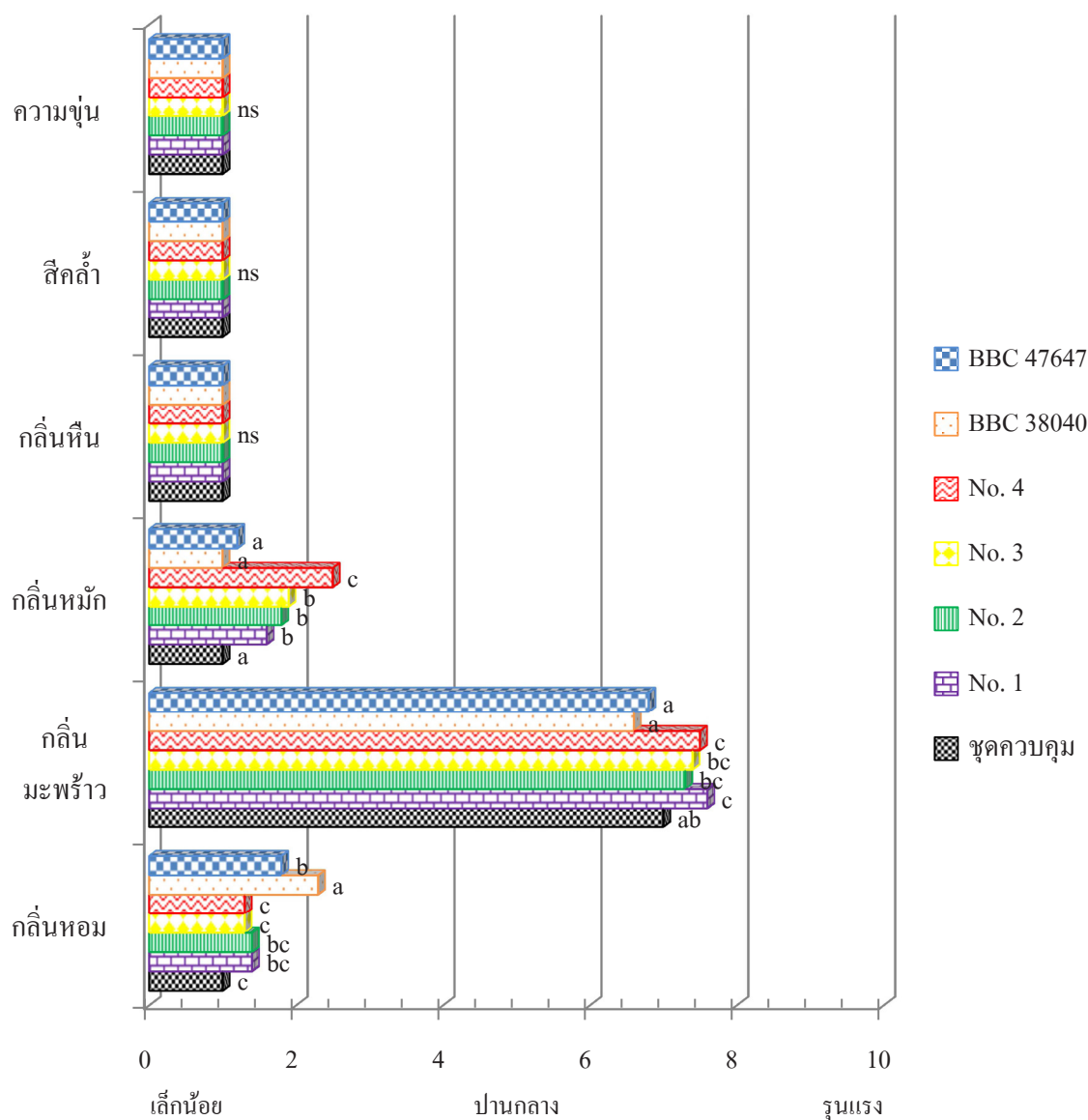
หมายเหตุ : เครื่องหมาย a และ b ในสัณคมักเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดไม่ได้แปรผันโดยตรงกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการทดลองนี้เมื่อเสริมด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp. (BCC 38040) ซึ่งมีอัตราการเติบโตทำให้ประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมันสูงสุด 93.34 ± 2.76% ในขณะที่

เชื้อ Isolated No.2 ซึ่งมีอัตราการเติบโตสูงมี ประสิทธิภาพในการหมักสกัดต่ำคือ 82.41 ± 8.55% ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นประสิทธิภาพการสกัดจึงน่าจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อมากกว่าปริมาณหรืออัตราการเติบโตของเชื้อ

เมื่อนำผลิตภัณฑ์น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นที่ได้ไปทดสอบ
คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น สี และความ
ชุ่ม ด้วยใช้แบบทดสอบแบบพรรณนาโดยใช้ผลิตภัณฑ์
น้ำมันมะพร้าวหือปาริสูทซ์ซึ่งเป็นที่นิยมในท้องตลาด
เป็นตัวอย่างอ้างอิง พบว่าการหมักโดยการเสริมเชื้อต่าง
ชนิดกันมีผลต่อการช่วยให้ผลิตภัณฑ์เกิดลักษณะสีใส
ไม่คั่ว ไม่ขุ่น และไม่มึนกลื่นหืนที่ไม่แตกต่างกัน แต่ผล
การใช้เชื้อบางชนิดมีผลทำให้เกิดกลิ่นหมัก หรือกลิ่น
หอมพิเศษที่แตกต่างกัน โดยผลการเสริมด้วยเชื้อ
Lactobacillus sp.(BCC 38040) นอกจากมีผลต่อการ
เพิ่มประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมัน ได้สูงสุดแล้ว

ยังได้ผลิตภัณฑ์น้ำมันที่เกิดกลิ่นหมักเพียงเล็กน้อยคือ
กลิ่นไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมพิเศษเกิดขึ้นอีก
ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งเป็นคุณลักษณะพิเศษของ
กลุ่มแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่สามารถสร้างสารให้
กลิ่นรสได้แก่ diacetyl ได้ดีในระหว่างกระบวนการ
หมัก นอกจากนี้ยังสร้างสารกลุ่มแบคทีริโอซิน
(bacteriocin) ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิด
อื่นๆซึ่งปัจจุบันแบคทีเรียแลคติกบางชนิดกำลังผ่านการ
ยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (GRAS status) โดย
องค์การอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา (US-
FDA)



ระดับความเข้มข้นของแต่ละคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ภาพที่ 2 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำมันมะพร้าวที่หมักสกัดโดยใช้กล้าเชื้อชนิดต่างๆ

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในแต่ละคุณลักษณะแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.2 ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก
สกัดด้วยเชื้อ *Lactobacillus* sp.

3.2.1 ผลของพีเอชที่ใช้ในการหมักสกัดผล
การปรับค่าพีเอชของครีมเป็น 4.0 มีผลทำให้น้ำมันมี

การแยกชั้นน้อยมาก แต่เมื่อเพิ่มระดับค่าพีเอชเป็น 6.0
หรือชุดควบคุมพีเอช 6.2 พบว่าการแยกชั้นระหว่าง
น้ำมันกับน้ำและครีมเกิดขึ้นค่อนข้างสมบูรณ์ ดังภาพที่
2 ทำให้ง่ายต่อการกรองเพื่อแยกเก็บเกี่ยวน้ำมัน ซึ่งได้

ปริมาณผลผลิตสูงสุดเท่ากับ $33.03 \pm 1.68\%$ หรือประมาณ 330 กรัมต่อลิตรของน้ำกะทิสด เมื่อเทียบกับการไม่ปรับค่าพีเอช(ชุดควบคุม) พบว่าจะให้ปริมาณผลผลิตลดลงเหลือเพียง $27.93 \pm 0.43\%$ ดังแสดงในตารางที่ 2

เนื่องจากค่าพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกลไกการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้สำหรับการสร้างพลังงาน (Jay, 1992, 42) ภายในเซลล์จุลินทรีย์จะมีค่าพีเอชประมาณ 7.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเมแทบอลิซึมที่บริเวณเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์จะไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่านเข้าออกแต่จะมีกลไกป้องกัน H^+ ออกนอกเซลล์การที่จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอาจทำให้มีผลต่อการทำงานของ

เอนไซม์เพอร์มิเอส (permeases) ที่ใช้ในการนำสารอาหารรวมทั้งไอออนที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์การสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกภายนอกเซลล์และมีผลต่อการสร้างสาร ATP ในแบคทีเรีย ถ้าเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่าพีเอชสูงมากจะทำให้ระบบเซลล์เมมเบรนถูกทำลายทำให้ H^+ และ OH^- เข้าสู่ภายในเซลล์จนเป็นผลให้เอนไซม์ถูกทำลายและทำเซลล์ตายในที่สุด (ฉัตรชัย สังข์ผุด, 2551, 122) ดังนั้นในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มที่ช่วยทำให้เกิดการแยกชั้นของไขมันด้วยการทำลายอิมัลชันคือพีเอช 6.0 หากค่าพีเอชมีสภาพเป็นกรด (พีเอช 4.0) พบว่าจะเกิดการแยกชั้นน้อยมากและยังเกิดกลิ่นหมักอีกด้วย

ตารางที่ 2 ผลการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยใช้กลไกเชื้อ *Lactobacillus* sp.(BCC 38040) ที่ระดับพีเอชต่างๆ

ระดับค่าพีเอชของครีม	ปริมาณผลผลิตน้ำมันจากน้ำกะทิ(%)	ประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน(%)
pH 4.0	10.79 ± 0.99	$31.36^d \pm 4.89$
pH 5.0	24.15 ± 0.16	$70.17^c \pm 0.46$
pH 6.0	33.03 ± 1.68	$95.94^a \pm 2.89$
ชุดควบคุม (pH 6.2)	27.93 ± 0.43	$81.14^b \pm 1.25$

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b, c และ d ในสคริปต์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.2.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักสกัด

ผลการหมักสกัดที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ $45^\circ C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการควบคุมอุณหภูมิในการหมักสกัดที่ดำเนินไป ($20^\circ C$) มีผลทำให้น้ำมันไม่เกิดการแยกชั้นทำให้ไม่สามารถกรองแยกน้ำมันออกมาได้ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการหมักให้สูงขึ้นเป็น 25 30 และ $35^\circ C$ การแยกชั้นของน้ำมันก็จะดีขึ้น ผลการหมักที่อุณหภูมิห้องและ $30^\circ C$ ให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดน้ำมันสูงสุดเท่ากับ 97.20 และ 96.93% ตามลำดับโดยได้ปริมาณผลผลิตสูงสุด 336

กรัมต่อลิตรของน้ำกะทิสด แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิพบว่าผลิตภัณฑ์น้ำมันที่เก็บเกี่ยวได้จะมีลักษณะสีขุ่นและประสิทธิภาพการสกัดน้ำมันก็มีแนวโน้มลดต่ำลงเหลือเพียง $90.85 \pm 1.09\%$ ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิสูงเป็น $45^\circ C$ มีผลต่อการเร่งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายไขมันทำให้เกิดกรดไขมันอิสระจึงมีผลทำให้น้ำมันมีลักษณะขุ่น

ตารางที่ 3 ผลการหมักสกัดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus* sp.(BCC 38040) ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (องศาเซลเซียส)	ปริมาณผลผลิตน้ำมันจากน้ำกะทิ (%)	ประสิทธิภาพการสกัดน้ำมัน (%)
อุณหภูมิห้อง (28)	33.63 ± 0.42	97.20 ^a ± 1.17
20	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
25	31.69 ± 0.18	91.64 ^c ± 0.53
30	33.52 ± 0.10	96.93 ^a ± 0.28
35	32.37 ± 0.21	93.62 ^b ± 0.61
45	31.42 ± 0.37	90.85 ^c ± 1.09

หมายเหตุ : เครื่องหมาย a, b และ c ในสัณคม์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.2.3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการหมักสกัด

ผลการหมักสกัดที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นก็เริ่มสังเกตเห็นการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ดัง

ภาพที่ 1 การหมักที่ใช้ระยะเวลานานมีแนวโน้มทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเปรี้ยวและกลิ่นหืน ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติกจะเริ่มสร้างกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ นอกจากนี้อาจเริ่มสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยสลายไขมันได้เป็นกรดไขมันอิสระซึ่งทำให้น้ำมันมีกลิ่นหืนได้ง่าย

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำมันมะพร้าว

คุณสมบัติ	ค่ามาตรฐาน	ตัวอย่างทดลอง
น้ำและสิ่งที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส(%)	ต้องไม่เกิน 0.2% (มผช.670/2547)	0.11 ± 0.01
ค่าเพอร์ออกไซด์ (มิลลิกรัมสมมูลเพอร์ออกไซด์ออกซิเจนต่อกิโลกรัม)	ต้องไม่เกิน 10 (มผช.670/2547)	1.68 ± 0.38
ค่ากรด (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม)	ต้องไม่เกิน 4 (มผช.670/2547)	1.19 ± 0.05
เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระในรูปกรดลอริก(%)	0.5-1.5% สังเกตการหืนได้	0.42 ± 0.02
ค่าซาฟอนิฟิเคชัน (มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1 กรัม)	248 ถึง 265 (มาตรฐาน อย.)	258 ± 5

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำของตัวอย่างน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผ่านการหมักโดยการเสริม เชื้อ *Lactobacillus* sp.1.0% พีเอช6.0 อุณหภูมิ 30°C และ เวลา 24 ชั่วโมง

4. ผลการวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันมะพร้าว

ค่าคุณภาพของน้ำมันที่สกัดได้ ได้แก่ ปริมาณน้ำและสิ่งที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ค่าเปอร์ออกไซด์ ค่ากรดไขมันอิสระและค่าซาฟอนิฟิ-เคชัน มีค่าเท่ากับ $0.11 \pm 0.01\%$, 1.68 ± 0.38 meq/kg, $0.42 \pm 0.02\%$ และ 258 ± 5 ตามลำดับ ซึ่งมีคุณภาพดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเกณฑ์มาตรฐานของ มพช.670/2547 และเกณฑ์มาตรฐานองค์การอาหารและยา ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ.2524) เรื่อง น้ำมันมะพร้าว ดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าการสกัดน้ำมันด้วยวิธีนี้สามารถลดค่าพารามิเตอร์ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเสื่อมคุณภาพของน้ำมันได้ดี

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการคัดเลือกแหล่งกล้าเชื้อจุลินทรีย์และปรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักสกัดน้ำมันมะพร้าวเพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณผลผลิต พบว่าผลการเสริมด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp.(BCC 38040) ปริมาณ 1.0% พร้อมกับการปรับค่าพีเอชของครีมเป็น 6.0 หมักสกัดที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จะให้ประสิทธิภาพในการหมักสกัดน้ำมันเท่ากับ 96.93% หรือคิดเป็นปริมาณผลผลิตเท่ากับ 335 กรัมต่อลิตรของน้ำกะทิสด โดยน้ำมันมีคุณภาพสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ของ มพช.670/2547 และมาตรฐานองค์การอาหารและยา

ควรจะมีการศึกษาพัฒนาน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ให้มีความหลากหลายเพื่อจะได้เพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตในท้องถิ่น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราชที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยในโครงการเบญจวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2555



เอกสารอ้างอิง

- ฉัตรชัย สังข์ผุด. (2551). **จุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology)**. นครศรีธรรมราช: มหาวิทยาลัยราชภัฏ นครศรีธรรมราช.
- น้ำมันมะพร้าว. (2524). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 57 (พ.ศ.2524)**.
- สำนักงานการค้าภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์. (2552). **สถิติราคามะพร้าวผลใหญ่**. ค้นเมื่อ 13 มิถุนายน 2554, จาก <http://www.dit.go.th/prachuapkhirikhan/index.asp?deptid=70>.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2547). **มผช.670/2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน : น้ำมันมะพร้าว**.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2556). **ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร**. ค้นเมื่อ 10 เมษายน, 2557 จาก http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=9749.
- AOAC.(2000). **Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists**. (17th Volume 1). MD, USA: Gaithersburg.
- Che Man, Y.B., Abdul Karim, M.I.B. & Teng, C.T. (1997). Extraction of Coconut oil with *Lactobacillus plantarum* 1041 IAM. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 74(9), 1115-1119.
- Che Man, Y.B., Suhardiyono, A.B. Asbi, Azudin, M.N. & Wei, L.S. (1996). Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 73, 683-686.
- Che Man, Y.B., Suhardiyono, A.B. Asbi, & Azudin, M.N. (1992). Acetic acid treatment of coconut cream in coconut oil extraction. **ASEAN Food Journal**, 7, 38-42.
- Fuangworawong, P., Tripetchkul, S., Koonsrisuk, S. & Akeprathumchai, S. (2008). Study on availability and utilization of wastes from coconut processing in Prachuapkhirikhan province. **Silpakhon University Journal**, 28(3), 13-31.
- Handayani, R., Sulisty, J. & Rahayu, R.D. (2009). Extraction of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) through fermentation system. **Biodiversitas**, 10(3), 151-157.
- ISO 660: (1996). **Animal and vegetable fats and oils: Determination of acid value and acidity**.
- ISO 662: (1998). **Animal and vegetable fats and oils: Determination of moisture and volatile matter content**.
- IUPAC. (1979). **Standard method for the analysis of oils, fats and derivatives** (1th supplement to the 7th edition) Retrieved 2011, June 22, from <http://www.iupac.org/publications/pac/1979/pdf/5112x2503.pdf>.
- Jay, J.M. (1992). **Modern Food Microbiology** (4th edition). New York: Chapman Hall.
- Marasabessy, A., Moeis, M.R., Sanders, J.P.M. & Weusthuis, R.A. (2010). Coconut oil extraction by the traditional java method: An investigation of its potential application in aqueous jatropha oil extraction. **Biomass & Bioenergy**, 34, 1141-1148.
- McGlone, O.C., Canales, A.L.M. & Carter, J.V. (1986). Coconut oil extraction by a new enzymatic process. **Journal of Food Science**, 51, 695-697.

Rahayu, R.D., Sulisty, J. & Dinoto, A. (2008). Enzymatic properties of microbial solid starters on coconut oil recovery. **Proceeding of the International Seminar on Chemistry**. 679-686.

Soeka, Y.S., Sulisty, J. & Naiola, dan E. (2008). Analisis minyak kelapa hasil ekstraksi secara fermentasi. **Biodiversitas**, 9(2), 91-95.

Suhardiyono. (1992). **Effect of extraction methods on recovery Quality, storage stability and frying characteristic of coconut oil**. M.Sc. Thesis, Faculty of Food Sci. and Biotechnology, Universiti Pertanian Malaysia, pp. 51-68.

USFDA-BAM.(2001). **Bacteriological Analytical Manual Online**. Retrieved 2007, June 22, from <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/>.

