สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เกมศูนย์การกระจายสินค้า

นายนนทพงศ์ วงศ์เกียรติรัตน์
นายพรรณรัศม์ พรมชาติ
นายยศธร วงศ์ปฏิมากร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....65593
วัน,เดือน,ปี.....20 ต.ค. 2549

b.11656529
i.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาสถิติประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distribution Center Game

Mr.Nontapong Wongsekiarttirat

Mr.Pannarat Promachat

Mr.Yotsatorn Wongpatimakorn

A Special Problem Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Statistics

Faculty of Science

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัญหาพิเศษเรื่อง เกมศูนย์การกระจายสินค้า

นักศึกษา นายนนทพงศ์ วงศ์เกียรติรัตน์

นายพรรณรัศม์ พรมชาติ

นายยศธร วงศ์ปฏิมากร

ภาควิชา สถิติประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วลัยลักษณ์ อัตธีรวงศ์

ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ			ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.วลัยลักษณ์	อัตธีรวงศ์	
กรรมการ	ดร. สมศรี	บัญฑิตวิไล	
กรรมการ	อ.กนกกรรณ์	ลี้โรจนาประภา	

.....

(ผศ.ดร.มนัส ไพฑูรย์เจริญลาภ)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากปลา

นักศึกษา นางสาววรากุล อ่อนน้อม
นางสาวศุภลักษณ์ อดทน

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากปลาสด คือ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้โดย *L. lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ขณะที่ *L. curvatus* สามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* และ *V. parahaemolyticus* โดยพบว่า *L. lactis* สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด ส่วน *L. curvatus* สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด จากนั้นได้ศึกษาผลของเกลือ (ร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5) และสารสกัดกระเทียม (ร้อยละ 0, 1, 3 และ 5) ต่อการเจริญของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ในระหว่างการหมักในอาหาร Pla-Jom Model broth (PMB) ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าการมีเกลือร้อยละ 0 - 1.5 ในอาหาร PMB ที่เติมเชื้อ *L. lactis* หรือ *L. curvatus* มีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารที่ใช้หมักลดลงได้เร็วที่สุด และทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดี ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *L. lactis* มีการเจริญและการหมักได้ดีในอาหาร PMB ที่เติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 โดยทำให้ค่าพีเอชลดลงถึงน้อยกว่า 4.5 ภายใน 1 วัน ส่วน *L. curvatus* จะมีการเจริญดีในอาหาร PMB ที่มีการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 เช่นเดียวกัน แต่ถ้ามีสารสกัดกระเทียมร้อยละ 3 จะมีผลทำให้มีการหมักได้เร็วที่สุด โดยมีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหาร PMB ลดลงถึงน้อยกว่า 4.5 ภายใน 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Spoject Title	Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from fish
Name	Miss Waragul Onnom Miss Supalak Odthon
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Suree Nanasombat

Abstract

Charaterization of two lactic acid bacterial strains isolated from fish, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus curvatus*, was studied. These two bacterial strains were able to produce inhibitory substances against spoilage and pathogenic bacteria. The inhibitory substances produced by *L. lactis* were found to inhibit the growth of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* , *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* and *Vibrio parahaemolyticus*, while those produced by *L. curvatus* inhibited the growth of *B. cereus*, *E. coli*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* and *V. parahaemolyticus*. *L. lactis* exhibited the greatest inhibitory action to the growth of *B. cereus*, and *L. curvatus* showed the highest inhibition to the growth of *B. cereus* and *E. coli*. The effect of NaCl (0%, 1%, 1.5%, 2% and 2.5%) and garlic extract (0%, 1%, 3% and 5%) on growth of *L. lactis* and *L. curvatus* in Pla-Jom model broth (PMB) at temperature 25, 30 and 35°C was investigated. The concentration of NaCl of 0-1.5% in PMB inoculated with *L. lactis* or *L. curvatus* affected the most rapid decrease of pH of fermentation medium and also resulted in good growth of lactic acid bacteria. Optimum temperature for growth and fermentation of these two lactic acid bacteria was 30 °C. *L. lactis* exhibited good growth and fermentation in PMB added with 1% garlic extract, showing rapid decrease of pH to < 4.5 within 1 day. *L. curvatus* was also able to grow well in PMB added with 1% garlic extract, but addition of 3% garlic extract resulted in the most rapid fermentation by decreasing the pH of PMB to < 4.5 within 3 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ ผศ. ลินจง สุขลำภู อาจารย์ผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางรวมทั้งแก้ไขปัญหาและเอาใจใส่คณะผู้จัดทำตลอดการดำเนินงานโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความกรุณาช่วยถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ต่างๆ ทั้งในและนอกวิชาเรียนแก่ลูกศิษย์รวมทั้งนักวิทยาศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง และขอบคุณ พี่นิระชา พี่กัญญารัตน์ พี่ปิยมาส และพี่เสาวลักษณ์ ที่ให้คำแนะนำในการทำโครงงานพิเศษ

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ของคณะผู้จัดทำที่ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์มาโดยตลอด ขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนโดยเฉพาะ น.ส. รสรินทร์ รุจนานนท์ และ น.ส. อัญชลี อำนาจสมบูรณ์ ที่มีส่วนร่วมให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นางสาววราภุล อ่อนน้อม
นางสาวศุภลักษณ์ อดทน
มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ปริมาณธาตุอาหารในใบกระเทียมและกลีบกระเทียม	28
2. ผลของ *L. lactis* และ *L.curvatus* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและ แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยวิธี agar diffusion	35
3. จำนวนวันที่ค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ในอาหาร PMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกัน ที่หมักโดย *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C	40
4. ผลของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย	47
5. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 1)	48
6. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 2)	49
7. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 3)	50
8. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่ อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (เฉลี่ย)	51
9. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 1)	52
10. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 2)	53
11. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 3)	54
12. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (เฉลี่ย)	55
13. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25°C	56
14. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 30°C	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ หน้า

15. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ใน อาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 35°C 62

16. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25°C 65

17. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 30°C 68

18. ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 35°C 71

19. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 1) 74

20. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 2) 75

21. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 3) 76

22. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 1) 77

23. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 2) 78

24. ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 3) 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. รูปร่างลักษณะของ *Pediococcus*	5
2. รูปร่างลักษณะของ *Leuconostoc*	6
3. รูปร่างลักษณะของ *Lactobacillus*	7
4. ผลของกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในระหว่างการหมัก ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C	37
5. ผลของกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในระหว่างการหมัก ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

การแปรรูปอาหารโดยวิธีการหมักดองเป็นวิธีการถนอมอาหารชนิดหนึ่งซึ่งใช้จุลินทรีย์ช่วยในกระบวนการหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียประเภทนี้นับว่ามีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการหมักอาหารหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง เนื้อต่างๆ เป็นต้น (จินตลา, 2544) ผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทยที่ใช้สัตว์น้ำเป็นวัตถุดิบมีหลายชนิด ได้แก่ กะปิ กุ้งเจ่า กุ้งจ่อม กุ้งส้ม ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาทูเค็ม น้ำบูดู น้ำปลา จากรายงานผลการวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติประจำปี ค.ศ. 1982 ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติและองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นเมือง 9 ชนิด ได้แก่ ปลาร้า ปลาส้ม ส้มฟัก ปลาจ่อม ปลาเจ่า ปลาแป้งแดง ไตปลา น้ำบูดู และน้ำปลา จำนวนทั้งหมด 1,716 ตัวอย่าง แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็น *Pediococcus, Lactobacillus, Streptococcus* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus* และแบคทีเรียที่ชอบเกลือบางชนิด เช่น *Halococcus* และ *Halobacterium* อีกด้วย (พงษ์เทพ, 2546)

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สปีชีส์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นอยู่กับการเจริญภายใต้สิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และยังมีความสามารถในการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติกที่ช่วยในการถนอมอาหาร (Ringo และ Gatesoupe, 1997) สิ่งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียประเภทนี้ สามารถแบ่งแบคทีเรียพวกนี้ออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่สร้างกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (homofermentative) โดยจะหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วจะสร้างเฉพาะกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และประเภทที่สร้างกรดแลคติกร่วมกับสารอื่น (heterofermentative) โดยจะหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติกออกมารวมทั้งสร้างกรดอื่นๆ เช่น กรดแอซีติก กรดฟอร์มิก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (สุมณฑา, 2545) แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, C. perfringens, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลคติกและกรดแอซีติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและกรดแอซีติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นเช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะซีโตนอิน อะซีตัลดีไฮด์ เบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (พงษ์เทพ, 2546) ซึ่งเป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก (จินตลา, 2544) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารประกอบทุติยภูมิที่เกิดจากการกระทำของแลคโตเพอรอกซิเดสกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และไทโอไซยาเนท (thiocyanate) เช่น ไฮโปไทโอไซยาไนท์ (hypothiocyanite) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Daeschel, 1989) และจากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่แยกได้จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ปลาหมักสามารถสร้างสารยับยั้งที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Lewus และคณะ, 1991; Østerguard และคณะ, 1998) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่แยกได้จากปลาในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

ในผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักของไทยจะมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ เกลือ กระเทียม ข้าว และปลา ซึ่งเกลือและกระเทียมนับว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยในการเพิ่มกลิ่นและรสชาติให้กับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนี้ และยังช่วยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้กระเทียมยังมีส่วนในการเร่งกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เพื่อหาความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมต่อการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตอาหารหมักจากปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่แยกได้จากปลาในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
2. เพื่อศึกษาผลของเกลือและสารสกัดจากกระเทียมต่อการเจริญของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารปลาหมักจำลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลการยับยั้งของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร

1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. ศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่แยกได้จากปลาที่ได้มาจากวิทยานิพนธ์ของ น.ส. นิระชา ศรีวงษ์ เรื่องการคัดเลือกและการพัฒนาเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักโดยใช้เทคนิค agar diffusion ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Vibrio parahaemolyticus* DMST 5665, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Bacillus cereus* DMST 5040 ซึ่ง DMST ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 20076 ซึ่ง TISTR ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. ศึกษาผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารปลาหมักจำลองโดยตรวจหาการเจริญของเซลล์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และวัดค่าพีเอชในช่วงเวลาต่างๆ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลามาใช้ในการถนอมอาหาร และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมัก รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

คำนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria ; LAB) ในอดีตหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรดซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย (Stiles และ Holzapfel, 1997) ปัจจุบันถึงแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจน แต่ยอมรับโดยทั่วไปว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจัดอยู่ใน family Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Tetragenococcus, Streptococcus* และ *Enterococcus* และรูปท่อน ได้แก่ *Lactobacillus, Carnobacterium* และ *Bifidobacterium* แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนอย่างยิ่ง (strictly anaerobe) ในการเจริญ ได้พลังงานจากกระบวนการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแลคโตส มีความต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติก คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะในกลุ่ม *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* มีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอก และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด ซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ (นภา , 2534)

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกจัดจำแนกเป็น 12 สกุล (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

1. *Streptococcus* สกุลนี้เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการสารสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางชนิดสามารถทำให้โรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20-41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 ชนิด มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-36 เปอร์เซ็นต์ (Hardie และ Whiley, 1995)

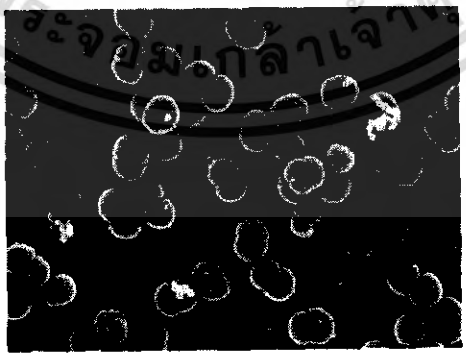
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน streptococci กลุ่ม N และ *V. Salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles และ Holzapfel, 1997)

3. *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *L. lactis* ssp. *lactis, L. lactis* ssp. *cremoris, L. lactis* ssp. *hordniae, L. garvieae, L. plantarum, L. raffinolactis* และ *L. piscium* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์ (Teuber, 1995)

4. *Enterococcus* เซลล์มีรูปร่างไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส ต้องการสารสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางชนิดทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *Enterococcus feacails, E. faecium, E. avium, E. galinarum* และ *E. cecorum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์

5. *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน (รูปที่ 1) โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศทางด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไร้อากาศผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 33-44 เปอร์เซ็นต์ (Simpson และ Tagchi, 1995)



รูปที่ 1 แสดงรูปร่างลักษณะของ *Pediococcus*

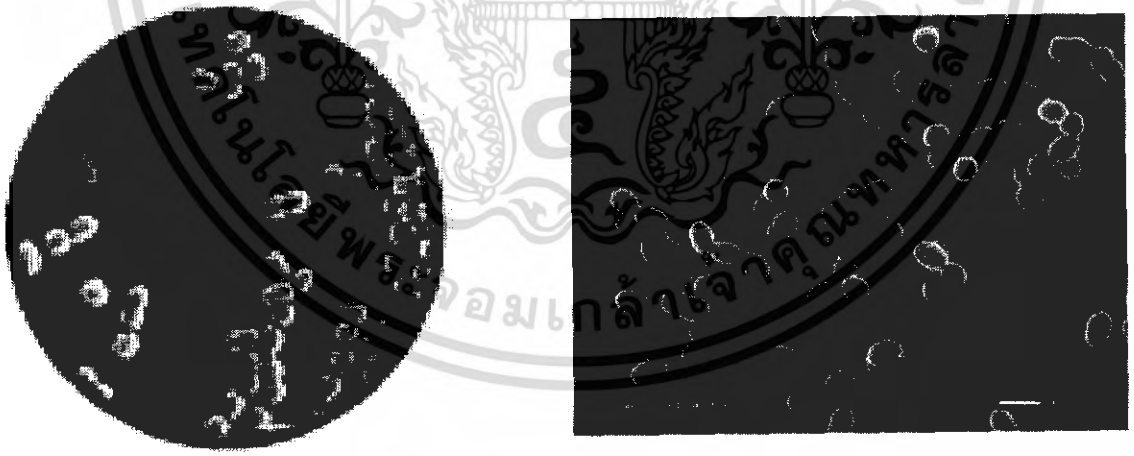
ที่มา: http://www.genomenewsnetwork.org/articles/11_02/keepers_art.shtml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. *Tetragenococcus* มีลักษณะรูปร่างการแบ่งตัวเหมือนสกุล *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Simpson และ Tagchi, 1995)

7. *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaeequi* ตามลำดับโดย *A. viridans* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์ (lobster) เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

8. *Leuconostoc* มีสัณฐานวิทยาขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารซึ่งมีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม (รูปที่ 2) มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นถึงปานกลาง สามารถผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 ชนิด ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides, L. lactis, L. gelidum, L. carnosum, L. pseudomesenteroides, L. citreum, L. argentinum* และ *L. fallax* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ (จินตลา, 2544)



รูปที่ 2 แสดงรูปร่างลักษณะของ *Leuconostoc*

ที่มา: webexhibits.org/ butter/process-steps.html และ

http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/leume/leume.home.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. *Oenococcus* สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *L. oenos* เนื่องจากมีคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากชนิดอื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (จินตลา, 2544)

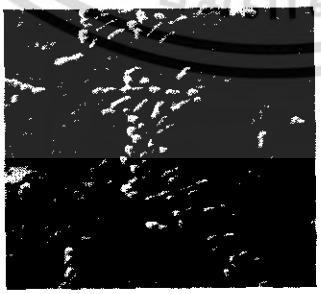
10. *Weissella* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (*Leuconostoc*-like bacteria) เป็นชนิดซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 ชนิด คือ *L. paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*), *Lactobacillis confuses* (*W. confuses*), *L. halotolerans* (*W. halotolerans*), *L. kandleri* (*W. kandleri*), *L. minor* (*W.minor*), *L. viridescens* (*W. viridescens*) และชนิดใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

11. *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ พบในแหล่งต่างๆ เช่นเยื่อเมือกของมนุษย์ พบในสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Adam, 1999) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนกลม (coccobacilli) (รูปที่ 3) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญประกอบด้วย 55 ชนิด ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles และ Holzapfel, 1997) คือ

กลุ่ม obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโตส (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตไม่ได้

กลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส เป็นกรดแลคติกผ่านวิธี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็น แลคเตส เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 3 แสดงรูปร่างลักษณะของ *Lactobacillus*

ที่มา: www.omniscellula.net/ pages/articles/bordons.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว (slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ แอซีเทต และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มีทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Carnobacterium divergens, C. piscicola, C. gallinarum, C.mobile, C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 31.6-37.2 เปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

2.1.2 ลักษณะและวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยดูรูปร่างเซลล์ ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ ดูการเคลื่อนที่ การย้อมสีแกรม ดูการสร้างแคปซูล และแฟลกเจลลา พบว่าสกุล *Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus* และ *Enterococcus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน และสามารถแยกออกจากสกุลอื่นได้ ในขณะที่สกุล *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเชื้อในสกุล *Streptococcus* (*Lactococcus, Enterococcus*) และ *Bifidobacterium* ในทางปฏิบัติพบว่าสภาวะการเจริญและระยะการเจริญของเซลล์ จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะรูปร่างของเซลล์ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.1.2.2 ลักษณะทางสรีระวิทยา

เกี่ยวข้องกับความต้องการออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ และ hydrostatic pressure ระหว่างเชื้อในสกุล *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.5 หรือบนอาหารแข็งแอซีเทต แต่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 9.0 (Hammes และคณะ, 1991) สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยใช้วิธีการทดสอบทางสรีระวิทยาอาจจะไม่เพียงพอ โดยอาจจะต้องใช้การทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.1.2.3 รูปแบบการหมักแหล่งคาร์บอน

เป็นวิธีที่ใช้แยกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารแตกต่างกันมาก เราจึงใช้จำแนกเชื้อได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆ การศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใส่ในธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด การเกิดก๊าซ การเกิดสารบางชนิด เป็นต้น (Bridge และ Sneath, 1982)

2.1.2.4 องค์ประกอบของผนังเซลล์

การจำแนกโดยอาศัยลักษณะนี้เพื่อศึกษาดูว่ามีหรือไม่มีสาร mesodiaminopimelic acid ในผนังเซลล์ ซึ่งสารตัวนี้ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ (key characteristic) ได้โดยใช้วิธี thin-layer chromatography ลักษณะนี้สามารถจำแนกเชื้อจำนวนมากออกมาเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (จินตลา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.5 Electrophoretic Mobility of Lactic Acid Dehydrogenase

วิธี Electrophoretic Mobility of Lactic Acid Dehydrogenase ใน starch gel หรือ polyacrylaminde gel เป็นวิธีพบว่ามีประโยชน์และเชื่อถือได้จำแนกความแตกต่างของชนิดของเชื้อที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น *L. crispatus, L. gallinarum, L. gasseri* และ *L. jihnsonii* (Hensel และคณะ, 1977)

2.1.2.6 SDS-PAGE of Whole Cell Protein

หลักการของวิธีนี้ คือ เชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งทำให้เราสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ออกได้ โดยใช้ sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าวิธีนี้มีความแน่นอนในระดับชนิดและในระดับ subspecies การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อที่มีปัญหาได้ เช่น *Lactococcus* และ *Leuconostoc* การจำแนกเชื้อโดยวิธี SDS-PAGE นี้ จะทำได้ง่าย รวดเร็วและเชื่อถือได้ มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมาก เชื้อที่จำแนกแล้วสามารถนำไปทดสอบยืนยันเพิ่มเติมโดยวิธีทางจีโนไทป์ (genotype) และฟีโนไทป์ (phenotype) ต่อไปได้ (Pot และคณะ, 1993)

2.1.2.7 ซีโรวิทยา (Serology)

เป็นวิธีการที่สำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในสกุล *Streptococcus* โดยได้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม และใช้ตัวอักษรแทนในแต่ละกลุ่มนั้นๆ กลุ่มแอนติเจน (antigen) เฉพาะที่มีโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) อยู่รวมในส่วนของผนังเซลล์ และผนังเซลล์ชั้นใน (group D และ N) การจำแนกโดยวิธีนี้ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง pathogenic β–haemolytic Streptococci จากโรคติดเชื้อของมนุษย์และสัตว์ แต่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ non–haemolytic หรือ α–haemolytic ชนิดต่างๆ (จินตลา, 2544)

2.1.2.8 การศึกษา DNA base composition DNA : DNA hybridization

วิธีนี้มีหลักการ คือ สายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันจะสามารถจับคู่กันได้ โดยดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกันและสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรืออาจใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมา ซึ่งการตรวจสอบจะใช้เครื่องมือที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของ probe

DNA base composition และเปอร์เซ็นต์ของ DNA similarity ภายหลังการเกิด DNA : DNA hybridization ของ type strain ในแบคทีเรียกรดแลคติก จะใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในชนิดต่างๆ เชื้อที่มี DNA base composition ที่เหมือนๆ กัน ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความใกล้กัน (Boehringer, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.9 การศึกษา plasmid profile

แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดจะมีพลาสมิด (plasmid) อยู่ในเซลล์ ซึ่งควบคุมคุณสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อที่อยู่ในชนิดเดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดออกจากเซลล์ แล้วนำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการที่แน่นอน แล้วนำมาทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (gel electrophoresis) จะได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนของพลาสมิด ซึ่งสามารถนำรูปแบบที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกันได้ โดยถ้าเป็นเชื้อที่เป็นชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน ความคลาดเคลื่อนหรือความไม่แน่นอนของคุณสมบัติในการเมแทบอไลท์ และลักษณะทางกายภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทดสอบยืนยันเพิ่มเติมได้โดยการตรวจสอบพลาสมิดที่มีอยู่ในเซลล์ ความหลากหลายของจำนวนและขนาดของพลาสมิดของแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากกันได้ (Josephson และ Nielsen, 1988)

2.1.2.10 การศึกษา DNA:rRNA hybridization

วิธี DNA : rRNA hybridization นี้ ใช้จำแนกเชื้อในระดับชนิด โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) วิธีนี้เริ่มแรกใช้ในการจำแนกเชื้อ *Streptococcus* sp. และใช้เป็นลักษณะสำคัญในการใช้สำหรับการจำแนกเชื้อในสกุล *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus* sp. และ DNA : rRNA hybridization นี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. บางสายพันธุ์ (Garvie, 1976)

2.1.2.11 16S rRNA cataloquing

วิธีนี้ทำได้โดยการตรวจสอบลำดับเบส บนสาย RNA ของไรโบโซมขนาด 16S โดยจะมีบริเวณที่ประกอบด้วยยีน (gene) ที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะพื้นฐานประจำ ซึ่งจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงไปจากบรรพบุรุษ การตรวจสอบลำดับเบสบริเวณนี้จึงสามารถบอกได้ว่าเชื้อเหล่า นั้นเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีนี้จะประสบความสำเร็จอย่างดี แต่ต้องใช้การวิเคราะห์ที่ยุ่งยากและใช้เวลานานมาก (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.1.2.12 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยนำดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) ของเซลล์มาตัดย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน โดยเอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยเชื้อที่อยู่ในชนิดเดียวกันดีเอ็นเอจะถูกตัดได้ขนาดของชิ้นที่เหมือนกัน การตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดนี้ทำได้โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (Hartel และคณะ, 1993)

2.1.2.13 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยจะอาศัยปฏิกิริยา PCR แต่วิธีนี้จะใช้กับ oligonucleotide primer สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนใดยีนหนึ่งบนสาย DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

template เรียกว่า arbitary primer และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสบนสาย DNA template ก่อน โดย primer นี้ จะเข้าไปจับกลุ่มจับกับสาย DNA template ณ ตำแหน่งต่างๆ ที่เบสสามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้นเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน และมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเหมือนกันก็จะถูกสุ่มจับโดย primer นั้นๆ ณ ตำแหน่งเดียวกัน จึงใช้วิธีนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกว่าเป็นสายพันธุ์ใด และยังสามารถใช้ในการตรวจสอบติดตามการถ่ายทอดพันธุกรรมได้อีก

2.2 กระบวนการหมักที่เกิดจากกรดแลคติก

2.2.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) เป็นการหมักที่ได้แลคเตท อย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญ ผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (Emden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway) หรือ EMP pathway เริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (C-6) ถูกเติมฟอสฟอรัสและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นผลให้กลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุล จากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล (เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้กับสับสเตรต 2 แห่ง) ในขั้นสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

2.2.2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทธานอล หรือ อะซีเตทและคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลส จึงเปลี่ยนรูปจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมไปเป็นเพนโตส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยโครงสร้างภายในโมเลกุลมีการออกซิเดชันและดีคาร์บอกซิเลชันร่วมด้วย น้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟต (ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม) และอะซีติลฟอสเฟตโดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) กลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นแลคเตทเช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซีสในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (เนื่องจากการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟมีกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนอนาคตของอะซีติลฟอสเฟตนั้น ขึ้นอยู่กับว่ามีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอน อะซีติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเอง ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทธานอล และได้ NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะซีติลฟอสเฟตมีมากพอสำหรับการเปลี่ยนไปเป็นอะซีเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับสับสเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุล เป็น 2 โมเลกุล จากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆ ด้วย เช่น ฟลุคโตส ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิตอล การระบุว่าเกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟหรือไม่อาศัยการชี้บ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น (สุมณฑา, 2545)

2.3 กล้าแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการหมักอาหารหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีกิจกรรมร่วมกับยีสต์ในการหมักเต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว สุรา และผลิตภัณฑ์แป้งหมัก บทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ การผลิตกรด ทำให้เกิดรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอม และยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์

ถึงแม้ว่ามนุษย์จะรู้จักการแปรรูปอาหารโดยการหมักดอง ซึ่งเป็นผลกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก มาเป็นเวลาไม่น้อยกว่าการหมักที่เกิดจากเชื้อราและยีสต์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้งประเทศตะวันออกและประเทศตะวันตก ต่างก็ไม่มีเทคโนโลยีในการผลิตกล้าเชื้อแบบพื้นบ้าน โดยเฉพาะกล้าที่ไม่ได้อยู่ในรูปเชื้อผสมกับยีสต์ การหมักอาหารที่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียในยุคก่อนที่จะมีการพัฒนาการผลิตกล้าโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ จึงอาศัยเชื้อจากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี สำหรับอาหารหมักบางชนิดการหมักในลักษณะเช่นนี้ยังคงมีอยู่จนถึงปัจจุบัน เช่น การดองผักและการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในหลายๆ ประเทศ ส่วนผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตกันแต่เดิมนั้น ใช้วิธีเก็บบางส่วนจากการหมักในรุ่นก่อนไว้เป็นกล้าสำหรับการหมักรุ่นต่อไป จนประมาณ ค.ศ. 1880 จึงได้มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผลิตเนยแข็งเป็นครั้งแรกในประเทศเดนมาร์ก และได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตกล้าแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มาอย่างต่อเนื่อง จนเกิดเป็นอุตสาหกรรมการผลิตกล้าอย่างเป็นล่ำสัน

2.3.1 คุณสมบัติที่ดีของกล้าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วๆ ไปมีดังนี้

2.3.1.1. ใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบและผลิตกรดได้ในระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นๆ

2.3.1.2. ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้นๆ

2.3.1.3. อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปเป็นกล้าจะสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ดี

2.3.1.4. คุณสมบัติที่สำคัญมากที่สุดข้อหนึ่ง คือ การปลอดจากฟาจก์ (phage) ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ เตรียมกล้าในรูปเชื้อผสม โดยมีเหตุผลว่าในขณะนำไปใช้ หากเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่มีความเฉพาะกับฟาจก์ชนิดนั้นพอที่จะดำเนินกิจกรรมหมักต่อไปได้, ใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกันไป, คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อฟาจก์ เช่น การใช้สายพันธุ์ผ่าเหล่า (phage resistant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mutant) เตรียมกล้าโดยเฉพาะที่เลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของฟาจก์ ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณกล้าก่อนใช้งาน (bulk starter) ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของฟาจก์ (นภา, 2534)

2.3.2 ประโยชน์ของกล้าแบคทีเรียกรดแลคติก

2.3.2.1 ลดระยะเวลาในการหมัก เช่น การใช้กล้าแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักปลาหลายชนิด พบว่าจะลดระยะเวลาการหมักจากที่ใช้อยู่ประมาณ 150 ชั่วโมง เหลือเพียง 32-48 ชั่วโมง สามารถควบคุมการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น (นภา, 2534)

2.3.2.2 ลดการสะสมของไนโตรซามีนอันเป็นสารก่อมะเร็ง คือ การเติมกล้าแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้การผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็ว และมีผลให้ไนไตรต์ที่เกิดจากการรีดิวซ์ไนเตรตหรือไนไตรต์ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์สลายเป็นไนทรัสออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณสะสมของไนไทรต์ลดลง การเกิดไนโทรซามีนจึงลดลงด้วย (จินตลา, 2544)

2.3.2.3 กล้าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด เช่น *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ซูโดแคตาเลส (pseudocatalase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีด ไม่น่ารับประทานและอาจทำให้เกิดกลิ่นหืนของน้ำมันต่างๆ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.3.2.4 ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก โดยใช้เชื้อจากธรรมชาติ จะพบว่ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์ชนิดที่ผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนคาร์บอกซิเลสจะเปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน การเติมกล้าแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้น ฮีสตามีนซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้โดยอาการที่เกิดขึ้นมีหลายระดับ อาจนานหลายนาที จนถึง 3 ชั่วโมงหลังจากบริโภค ขึ้นอยู่กับปริมาณสารและบุคคลที่ได้รับสารพิษ อาการที่พบ เช่น หน้าแดง คอแดง ร้อนวูบวาบ ไม่สบาย ปวดบริเวณหน้าผาก ขมับ หัวใจ เต้นเร็ว วิงเวียนคล้ายจะเป็นลม คันร้อนที่ปากและคอหอย (มัทนา, 2538)

2.4 สารต้านแบคทีเรียที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการถนอมอาหารโดยอาศัยกระบวนการหมักที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีผลที่เกิดขึ้นหลายประการ เช่น ค่าความเป็นกรด-เบส ลดลงเนื่องจากหมักน้ำตาลแล้วให้ผลิตภัณฑ์หลักที่เป็นกรด เพิ่มความเข้มข้นของกรดที่ไม่ละลาย ขณะเดียวกันก็จะลดปริมาณคาร์โบไฮเดรต และมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล รูทีริน และแบคเทอริโอซิน โดยที่สารต่างๆ เหล่านี้สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือ จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารได้ โดยจะมีเป้าหมายที่จำเพาะเจาะจง เช่น เยื่อหุ้มเซลล์หรือเอนไซม์ในเซลล์ เป็นต้น ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์นี้ จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร อุณหภูมิ พีเอช ช่วงเวลาการสัมผัส องค์ประกอบในอาหาร ชนิดและช่วงการเจริญของ จุลินทรีย์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปนเปื้อน (Robinson และคณะ, 2000) ปัจจัยต่างๆ เช่น สารอาหารที่ถูกจำกัด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยเหตุนี้ สารยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงแทรกเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายได้ ปัจจัยอื่นที่อาจเป็นไปได้ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกอาจเพิ่มจำนวนขึ้นเร็วกว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารภายใต้สภาวะจำกัดหรือมีค่า A_w ต่ำหรือสภาวะที่ไร้ออกซิเจน

2.4.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติกซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติก โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (พงษ์เทพ, 2546)

2.4.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาพที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกเนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยในสภาพที่มีอากาศ แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้จาก flovoprotien-containing oxidase ได้แก่ NADH-oxidase และ superoxide dismutase ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสมาทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้ เนื่องจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals (O_2^-) และ hydroxyl radicals (OH^-) (Condon, 1983) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จะผลิตเอนไซม์ flovoprotien peroxidase ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ dioxygen ได้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมาก ก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจนแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มรูปร่างกลม (*Lactococci*) และรูปร่างท่อน (*Lactobacillus*)

ในปี 1992 Earnshaw ได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งสร้างโดย *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cereviseae* และสรุปได้ว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นมานั้นไม่เพียงพอที่จะยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้ แต่จะให้ผลตรงข้ามกันในการหมักที่มีสภาพเป็นอาหารแข็ง (Earnshaw, 1992)

2.4.3 ไดอะซีติล (diacetyl)

ไดอะซีติล 2,3-butanedione เป็นผลิตผลสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* สามารถสังเคราะห์ได้ไดอะซีติลได้ ไดอะซีติลเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซีติลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮ็กโซส (hexose) และบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเทรต (citrate) โดยซิเทรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวต (pyruvate) ไปเป็นสารไดอะซีติล (จินตลา, 2544) และอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์ คือ อะเซโทอีน (acetoin)

การสร้างสารไดอะซีติลจะเกิดขึ้นน้อยในสภาวะที่มีไพรูเวต ซิเทรต หรืออะซิเตท หรือปัจจัยอื่นๆ เช่นการพบแลคเตท (lactate) การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจาก 21 องศาเซลเซียส ไปเป็น 30 องศาเซลเซียส จะลดการสร้างสารไดอะซีติล แต่การสร้างสารไดอะซีติลจะเพิ่มขึ้นถ้าพบไอออนของโลหะโดยเฉพาะอย่างยิ่ง CU^{2+}, Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} การเติมอากาศหรือการเติมไฮโดรเจนและคะตะเลสในน้ำนม ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารไดอะซีติล คือ 4.5–5.5 (Robinson และคณะ, 2000) ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไดอะซีติลได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS:Generally Recognized as Safe) สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารแต่ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้ในปริมาณมาก จึงจะมีผลในถนอมอาหาร และเนื่องจากมีกลิ่นแรง จึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด อย่างไรก็ตามไดอะซีติลอาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ที่สัมผัสกับอาหารได้เพราะระเหยง่าย (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.4.4 รูทีริน (reuterin)

รูทีรินเป็นสารซึ่งไม่ใช่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่ pH เป็นกลาง สร้างได้จากแบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่ประจำในทางเดินอาหารของคนและสัตว์หลายๆ ชนิด โดยจะสร้างสารรูทีรินเมื่อเจริญในสภาพไม่มีอากาศ ในสารผสมของกลูโคสและกลีเซอรอลหรือกลีเซอรอลดีไฮด์ เมื่อเกิดปฏิกิริยากับ dehydration ของกลีเซอรอล จะมีการสร้างสาร 3-hydroxypropanal (reuterin) และต่อมาจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 1,3-propaediol โดยเอนไซม์ $NADH+H^+$ dehydrogenase มีรายงานว่าการเจริญในช่วง log phase จะไม่มีการสร้างสารรูทีรินขึ้นจนกว่าจะมีการรีดิวซ์ขึ้นมา กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคส แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phare จะเริ่มมีการสะสมของสารรูทีริน และเมื่อสัมผัสกับเซลล์เป้าหมายจะกระตุ้นให้มีการสร้างสารรูทีรินเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารรูทีรีนจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเอนไซม์หมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl enzyme) ซึ่งเป็นสับสเตรต (substrate) ในการไปจับกับเอนไซม์ ribonucleotide reductase ดังนั้นจึงเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (จินตลา, 2544)

2.4.5 แบคเทอริโอซิน (bacterocin)

สารต้านแบคทีเรียที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีหลายชนิดรวมทั้งแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคในอาหาร โมเลกุลของแบคเทอริโอซินประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะไฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) (Hamon, 1988)

แบคเทอริโอซิน คือสารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน การเข้ายับยั้งความสามารถในการทำลายแบคทีเรียที่ต่างกัน แบคเทอริโอซิน จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* และเนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ (สุมณฑา, 2545) จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในการถนอมอาหาร (จินตลา, 2544)

2.5 ประวัติความเป็นมาและความหมายของแบคเทอริโอซิน

ในระยะเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ V สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* สายพันธุ์ ø ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงมีการเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีย์ (species) เดียวกันเท่านั้น แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้

1. มีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา
2. การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidial mode of action)
3. มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย
4. ยีนที่ควบคุมการสร้างและต้านทานของเซลล์ต่อแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid)
5. เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินออกนอกเซลล์

แต่พบว่ามีผลการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับคำจำกัดความข้างต้น เช่น leucocin A-UAL 187 และ leucocin S สามารถยับยั้งได้เฉพาะการเพิ่มจำนวนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

แบคทีเรียทดสอบได้เท่านั้น ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lactobacillus lactis* สามารถทำลาย *Straphylococcus aureus* และเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (trancription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น ไนซิน, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B ดังนั้นคำนิยามของแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ สารประกอบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินด้วย นอกจากนี้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายก็ควบคุมโดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เป้าหมายของและสภาวะแวดล้อมต่างๆที่เกี่ยวข้องเช่นกัน

2.6.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง (primary metabolites) โดยเฉพาะที่พบในแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการสร้างแบคเทอริโอซินเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน(complex medium) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินคืออุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่สร้าง เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Carnobacterium piscicola* และ *C. divergens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทีชอบความเย็นมีอัตราการสร้างสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้นของการเจริญในระยะ stationary เมื่อเจริญใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจะสร้างแบคเทอริโอซินสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าการสร้างแบคเทอริโอซินใน *L. monocytogenes* จะสามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ใน *Bacillus megaterium* จะถูกกระตุ้นด้วย mitomycin C ส่วนในแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า *Lactobacillus acidophilus* N2 จะสามารถสร้าง lactacin B ได้ในระยะเวลาเร็วขึ้นเมื่อเจริญใน MRS broth ที่มี *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4749 เจริญร่วมอยู่ด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินอีก เช่น การสูญเสียความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียที่ผลิต การที่เซลล์ผู้ผลิตถูกทำลายด้วย bacteriophage การสร้างแบคเทอริโอซินถูกยับยั้งโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เจริญปะปนอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67313

2.6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (activity) ของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีการผลิตขายในทางการค้าและได้สรุปถึงปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินไว้ ดังนี้

2.6.2.1 จำนวนและชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกันไป เช่น ไนซินจะสามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* และ *Listeria* spp., piscicocin V1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes, L. Innocua* และ *Clostridium tyrobutyricum*

2.6.2.2 สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของกิจกรรมแบคเทอริโอซินซึ่งจะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริโอซิน

2.6.2.3 การรวมตัวกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารที่เติมลงไป โดยพบว่า เกลือ ไนไตรต์ กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซิสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมัน เนย ฟอสโฟลิพิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอล จะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

2.6.2.4 ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินสามารถละลายได้ร้อยละ 12 และ 4 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสจะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2 diplococin มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 โดยสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 ชั่วโมง (พงษ์เทพ, 2546)

2.7 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน

ในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งในทางนิเวศวิทยา ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน แต่คาดว่าเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในช่วงต้นของการหมักอาหารหรืออาหารสัตว์ หรือเพื่อให้สามารถเจริญแข่งกับจุลินทรีย์อื่นในระบบนิเวศ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการหมัก เช่น ระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีจุดสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง หากพิจารณาเฉพาะลำดับกรดอะมิโนแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (จินตลา, 2544) คือ

1. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยแลนไทโอนีน(lanthionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (translation)

2. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั่วไปแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามความคล้ายกันของลำดับกรดอะมิโนที่ด้านปลายเอ็น (N-terminus)

3. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยเพปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกันจึงออกฤทธิ์

2.8 คุณลักษณะของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนซึ่งแบคเทอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน แบคเทอริโอซินไวต่อ proteolytic enzymes การศึกษาโครงสร้างของแบคเทอริโอซินพบว่าในสาย polypeptide ของแบคเทอริโอซิน แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนจะมีหน้าที่ต่างกัน (จินตลา, 2544) คือ

1. Binding peptide ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคเทอริโอซินถูกดูดซึมด้วย receptor บนผิวของแบคทีเรีย

2. Active peptide มีหน้าที่ทำลายแบคทีเรีย โดย active peptide จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ของแบคทีเรีย

3. Immunity protein ทำหน้าที่จับกับ active peptide อย่างจะเพาะ ซึ่งจะป้องกันมิให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein ที่เหมือนกัน

4. Translocation peptide ช่วยให้มีการถ่ายโยกย้ายของสารเชิงซ้อนของแบคเทอริโอซินผ่านเข้าไปใน outer membrane ของแบคทีเรีย

2.9 กระบวนการผลิตแบคเทอริโอซิน

การสร้างแบคเทอริโอซินนี้จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นยีนโครงสร้างและส่วนที่เป็น “repressor gene” โดยปกติเมื่อนำแบคทีเรียที่มียีนควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินมาเพาะเลี้ยงจะพบว่ามีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งไม่ให้มีการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย “repressor gene” ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างแบคเทอริโอซินได้ ก็ต่อเมื่อ มีการกดการทำงานของ repressor gene ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น เกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หรือ carcinogen เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV), รังสีเอ็กซ์ (X-ray), mitomycin C, l-ascorbic acid และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Homon, 1988)

ในขั้นตอนการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินจะสามารถสร้างขึ้นในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ต่อจากนั้นก็จะรวมตัวกับ immunity protien ในอัตราส่วน 1:1 (1 แบคเทอริโอซิน:1 immunity protien) โมเลกุลของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้ จะผ่านเนื้อเยื่อชั้นใน (inner membrane)และสะสมอยู่ในบริเวณ periplasmic space และแผ่ขยายไปถึงบริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งที่บริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรียสารเชิงซ้อนดังกล่าวจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของ outer membrane และท้ายที่สุดสารเชิงซ้อนนี้ จะทำให้เกิด crude bacteiocin และขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (Homon, 1988)

2.10 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ กิจกรรมทางชีววิทยาของแบคเทอริโอซินจะอยู่ในรูป simple proteins ประกอบเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนกับลิปิด หรือคาร์โบไฮเดรต ซึ่งโมเลกุลของแบคเทอริโอซินจะประกอบด้วยโครงสร้างที่ทำหน้าที่หลายอย่างซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละโมเลกุล คือการจดจำของ immunity protein ที่มีความจำเพาะกับ receptor บนแบคทีเรีย หลังจากนั้นจะถูกส่งผ่านเข้าไปใน outer และ inner membrane ภายในเซลล์ ตามลำดับ ทำให้เซลล์ตาย การทำงานของส่วน active peptide ที่มีฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอภายในเซลล์แบคทีเรีย (Jack และคณะ, 1996) ลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินมีดังนี้

1. บางสายพันธุ์ในแบคทีเรียชนิดเดียวกันทนต่อแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน
2. บางเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันทนต่อแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน
3. บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันทนต่อแบคเทอริโอซินที่คล้ายคลึงกันแตกต่างกัน
4. เซลล์ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งอาจไม่ทนต่อแบคเทอริโอซินชนิดอื่น
5. ภายใต้สภาวะปกติแบคทีเรียแกรมลบทนต่อแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก

2.11 ประโยชน์ของแบคเทอริโอซิน

แบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปสามารถพบได้ในอาหารหมัก มีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ต้องการและเพื่อถนอมอาหาร ในอาหารหมักนอกจากกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกยังสร้างสารอื่นอีกหลายชนิด เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีติล (diacetyl) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และสารขั้นทุติยภูมิ (secondary metabolism) อื่นๆ ซึ่งสารดังกล่าวมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบรรดาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ แบคเทอริโอซินที่เรียกว่าไนซิน ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Lactococcus* (Fowler และ Gasson, 1991) มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุดโดยมีการใช้ไนซินในอาหารสด และอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น เนยแข็งสวิส น้ำมะเขือเทศ ซุปข้าวโพด meat slurries เบียร์ ไส้กรอก ปลารมควัน อาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม พบว่าไนซินมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวก และสามารถป้องกันการงอกของสปอร์ *Clostridium botulinum* ที่ทนความร้อนได้สูง การใช้ไนซินจึงช่วยลดความร้อนที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้อและฆ่าสปอร์ *C. botulinum* ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น อาหารกระป๋อง ทำให้รักษาคุณค่าทางโภชนาการและลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารนั้นไว้ ทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง ไนซินได้รับการรับรองโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร และอนุญาตให้ใช้ในประเทศต่างๆ ถึง 47 ประเทศ ไนซินสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella* spp. และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* และ *Bacillus* ได้ (จินตลา, 2544)

2.12 การใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจุบันการถนอมอาหารโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โดยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งบางชนิดออกมา ซึ่งในกลุ่มของสารยับยั้งพบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินเป็นสารที่ได้รับการยอมรับทั้งในด้านความปลอดภัยโดย FDA และ FAO/WHO ซึ่งพบว่าไนซินมีการผลิตขายในทางการค้า รวมทั้งมีการใช้ในประเทศต่างๆ ประมาณ 50 ประเทศ ตามปกติแบคเทอริโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Straphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, Ctyrobutyicum, Bacillus stearothermophilus, C .thermosaccharolyticum, B. licheniformis* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* พบว่าได้ผลไม่ชัดเจนยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุมูลของโลหะ (chelating agent) ที่ยอมให้ใช้ในอาหาร ได้แก่ EDTA, EGTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคเทอริโอซินมากขึ้น โดยแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ (พงษ์เทพ, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน สามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งและอาหารเหลว โดยในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งอาศัยการเกิดบริเวณใสจากการแพร่ของแบคเทอริโอซินไปยับยั้งเชื้อทดสอบ (indicator strain) ส่วนอาหารเหลวการตรวจสอบทำโดยวัดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์เชื้อทดสอบด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

Hoover และ Harlander (1993) สรุปการคัดเลือกการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินดังนี้

2.13.1 การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง

2.13.1.1 วิธีซึ่งคู่เชื้อเจริญพร้อมกัน (simultaneous methods) เทคนิคนี้เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาสั้น เนื่องจากเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินบนผิวอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งที่เกลี่ยเชื้อทดสอบไว้ (spot-on-lawn) วิธีนี้เหมาะสมกับเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินในช่วงต้นของการเจริญและเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้รวดเร็วหรือเข้าสู่ระยะเจริญ (log phase) ได้ก่อนแบคเทอริโอซินแพร่และออกฤทธิ์

2.13.1.2 วิธีซึ่งเชื้อเจริญไม่พร้อมกัน (deferred method) เทคนิคนี้เชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจะเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นจึงเททับด้วยอาหารวุ้นหลอมซึ่งเติมเชื้อทดสอบ แล้วจึงบ่มอีกครั้งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สำหรับเชื้อทดสอบโดยวิธีนี้อาจทำลายเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินก่อนการเททับแต่ต้องระวังผลของวิธีที่ใช้ต่อแบคเทอริโอซิน เทคนิคนี้สามารถประยุกต์เพื่อทดสอบหาเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน จากตัวอย่างซึ่งมีแบคทีเรียกรดแลคติกปะปนกันอยู่ได้

2.13.2 การคัดเลือกด้วยอาหารเหลว

วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมสำหรับใช้คัดเลือก แต่มีข้อดีในการตรวจสอบผลของแบคเทอริโอซินได้ชัดเจนเนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่นๆ ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ เช่น การปรับพีเอชให้เป็นกลางเพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์คะตะเลสเพื่อลดผลจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สารละลายใสที่ผ่านการเตรียมใช้ทดสอบการยับยั้งโดยการหยดบนผิวอาหารเติมในช่องซึ่งเจาะในอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบกระจายอยู่ หรือเติมในอาหารเหลวซึ่งมีเชื้อทดสอบและติดตามการยับยั้งโดยวัดการเจริญด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์หรือนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ

การทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารหรือสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ อาจไม่ใช่สภาวะที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินได้ในแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันสอดคล้องกับ *Lactobacillus acidophilus* ร้อยละ 63 สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ได้ ส่วนร้อยละ 9 ของ *Lactococcus lactic* spp. และ ร้อยละ 7.5 ของ *L. lactis* spp. *cremoris* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ (จินตลา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14 งานวิจัยการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Lewus และคณะ(1991) ได้แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากเนื้อที่ขายปลีก 10 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพวก psychrotrophic รวมทั้ง *Listeria monocytogenes* 4 สายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* 2 สายพันธุ์ และ *S. aureus* 2 สายพันธุ์ การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคนี้เป็นผลมาจากการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นไม่รวมกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ lytic bacteriophage และจากการศึกษาของ Spelhaug และ Harlander (1989) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11454, *Pediococcus pentosaceous* FBB61 และ *P. pentosaceous* FBB63-DG2 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ โดยสามารถสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Listeria* หลายชนิดได้แก่ *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri* และ *L. welshimeri* นอกจากนี้ *L. lactis* สายพันธุ์ 11454 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* AH_2, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* 851 และ *V. parahaemolyticus* A865957. และจุลินทรีย์แกรมลบที่ไม่ถูกยับยั้ง ได้แก่ *Campylobacter jejuni, Salmonella enteriditis, Yersinia* และ *Vibrio*

2.15 เงื่อนไขของแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก

หลักที่สำคัญ คือ ต้องให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้รวดเร็วและสร้างกรดแลคติก ทำให้พีเอชลดลงและเป็นผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ถูกกำจัดออกไป ปัจจัยที่ควรพิจารณาคือ ต้องการคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะในการหมัก เช่น ข้าวสุก ข้าวคั่ว สารอินทรีย์ที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ วิตามิน เกลือแร่ กรดอะมิโนจากเนื้อปลา สภาพไร้อากาศ (Anaerobiosis) อุณหภูมิที่พอเหมาะ ค่อนข้างสูง 20–35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเกลือที่พอเหมาะ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ และค่าพีเอช ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พวกแบคทีเรียกรดแลคติกมีความทนทานดีต่อคาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบอย่างอื่นที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ความเป็นกลางของอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ใส่ลงไปต้องพอเหมาะ ถ้าอยู่ในสภาพเป็นกรด พีเอช 5-6 อาจจะเสียได้ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในตอนเริ่มต้นควรมีปริมาณมาก ปริมาณของแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นคู่แข่งในตอนเริ่มต้นหมักควรมีปริมาณน้อย และปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ส่วนประกอบที่ใช้ในกระบวนการปรุงอาหาร เช่น หอม กระเทียม พริก เป็นต้น (มัทนา, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16 ความสำคัญในด้านโภชนาการและผลของการบำบัดโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถสรุปได้ดังนี้

2.16.1 ช่วยปรับปรุงคุณภาพทางด้านโภชนาการของอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ เช่น การพบไลซีนเพิ่มขึ้นในอาหารหมักพวกธัญพืชที่มีแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่

2.16.2 กระตุ้นกระบวนการเมแทบอลิซึมทั้งหมดของการผลิตวิตามิน เช่น folic acid และเอนไซม์ ได้แก่ แลคเตส

2.16.3 ทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้มีคงทน ทำให้ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคกลุ่ม *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Enteropathogenic ในกลุ่ม *E. coli* โดยเข้ายึดเกาะบริเวณผนังลำไส้และแย่งอาหาร

2.16.4 ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องปัสสาวะโดยการผลิตสารต้านแบคทีเรียและ/หรือกระตุ้นระบบ lactoperoxidase

2.16.5 ลดระดับคลอเรสเทอรอล (cholesterol) ในเลือดโดยการย่อยและดูดซึมคลอเรสเทอรอล hydrolysis bile salt และ/หรือปรับอัตราส่วนของ high density lipoprotein จาก low density lipoprotein

2.16.6 ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่โดยลดพิษจากสารก่อมะเร็งและสารพิษ

2.16.7 ยับยั้งเนื้องอกโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการผลิต macrophage จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกคุณสมบัติหลายอย่างที่น่าสนใจในด้านเศรษฐกิจ ได้แก่ ความสามารถในการใช้ประโยชน์แลคโตส กิจกรรมที่เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน กลไกการป้องกัน bacteriophage การผลิตแบคเทอริโอซิน และระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เป็นต้น (จินตลา, 2544)

2.17 ชนิดของผลิตภัณฑ์และชนิดของปลาที่นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมัก

ชนิดของผลิตภัณฑ์และชนิดของปลาที่นำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมัก ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ปลาน้ำจืดแปรรูป ได้แก่

1. ปลาร้า ปลาที่ใช้ทำ ได้แก่ ปลากระดี่ กระดี่นาง ปลาสร้อย ปลาสร้อยนกเขา ปลาช่อน ปลาตะเพียนขาว ปลาโคก

2. ปลาส้ม นิยมใช้ปลาตะเพียน ปลาโคก ปลาสร้อย

3. ส้มฟัก นิยมใช้ปลาเค้า เค้าดำ ปลาสวาย ปลาเทโพ ปลาเนื้ออ่อน ปลาตะเพียน ปลาสร้อย ปลาชะโด ปลาสลาด

4. ปลาจ่อม นิยมใช้ปลาน้ำจืด เช่น ปลาตะเพียน ปลาเทโพ ปลาสวาย ปลาเนื้ออ่อน

5. ปลาแป้งแดง นิยมใช้ปลาทะเล เช่น ปลาตะเพียนน้ำเค็ม หรือปลาทะเลชนิดอื่นๆ ที่นำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก ได้แก่ ปลาใน Family Engraulidae เช่น ปลาแมว ปลาหางไก่ ปลาไส้ตัน และปลาใน Family Clupeidae เช่น ปลาหลังเขียว เป็นต้น (มัทนา, 2538)จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรีย ได้แก่ *Pediococcus halophilus, P. cerevisiae, Staphylococcus epidermidis, S. aureus, Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. laterosporus, Lactobacillus brevis, Micrococcus* sp., *Proteus* sp., *Sarcinae bacteria, Coryneform bacteria, Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Halococcus, Halobacterium* (วิเชียร, 2537)

2.18 การเน่าเสียของปลา

ปลาเป็นอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ให้คุณค่าทางโปรตีนค่อนข้างสูง ย่อยสลายได้ง่าย จึงเป็นที่นิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวาง โดยในเนื้อปลาที่ยังสดจะมีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นเบส (ประมาณ 7.05-7.35) แต่ในเนื้อปลาที่ตายจะมีพีเอชลดลงเหลือ 6.2-6.5 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย นอกจากนี้ในเนื้อปลายังประกอบด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด วิตามินที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินบีหนึ่ง บีสองและบีสิบสอง ไพริดอกซิน ไนอะซิน กรดแพนโทธีนิค กรดโฟลิคและโคลีน ส่วนแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ กำมะถัน คลอรีน โซเดียม โปตัสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก ทองแดง ไอโอดีน และฟลูออรีน โดยที่วิตามินบีและแร่ธาตุเหล่านี้จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ด้วยเหตุที่เนื้อปลามีสารอาหารและพีเอช ที่เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย จึงทำให้แบคทีเรียเจริญได้เป็นอย่างดี เป็นผลให้เกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็ว ตามปกติในสัตว์ที่ตายจะเกิดระยะที่เรียกว่า rigor mortis ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการเกร็งของกล้ามเนื้อทำให้เนื้อสัตว์มีความแข็งแรงและเหนียวจึงเกิดการย่อยสลายตัวเองหรือการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ได้ยากมาก ดังนั้นในเนื้อสัตว์ที่มีระยะ rigor mortis ยาว จะเน่าเสียช้ากว่าเนื้อสัตว์ที่มีระยะ rigor mortis สั้นกว่า เช่น เนื้อปลามีระยะ rigor mortis สั้นกว่าเนื้อวัวและควาย จึงเน่าเสียได้รวดเร็วกว่า

การเน่าเสียของปลาด้วยจุลินทรีย์เป็นปัญหาที่สำคัญมากในการเก็บรักษาปลาและผลิตภัณฑ์ ปลาในเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในของปลาที่ไม่เป็นโรคจะปราศจากจุลินทรีย์ ส่วนเมือกตามตัว เหงือกและลำไส้จะมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก เช่น บริเวณพื้นที่ผิวตัวปลา 1 ตารางเซนติเมตรหรือเนื้อเยื่อเหงือก 1 กรัม หรือของเหลวจากลำไส้ 1 มิลลิลิตร ในแต่ละตัวอย่างเหล่านี้จะมีแบคทีเรียประมาณ 10 ล้านเซลล์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในปลาเป็นแบคทีเรียซึ่งสกุลที่พบมาก ได้แก่ *Achromobacter, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus* และ *Pseudomonas* ส่วนสกุลที่พบน้อยได้แก่ *Aeromonas, Alcaligenes, Bacillus, Escherichia, Proteus, Serratia* และ *Vibrio* นอกจากนี้ยังพบว่า Selhaug และ Harlandee (1989) ได้ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ปลาและพวก crustacean จะประกอบด้วย *Clostridium botulinum* (type E, nonproteolytic B และ F) และ *Vibrio* sp. ส่วนแบคทีเรียอื่นๆที่ก่อให้เกิดโรคประกอบด้วย *L. monocytogenes, C. perfringens,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Erysipelothrix rhusiopathiae, *Edwardsiella tardu*, *Salmonella* sp., *Shigella*, และ *S. aureus* สำหรับชนิดและจำนวนแบคทีเรียในปลาจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่อาศัยเป็นสำคัญ เช่น ปลาที่ได้จากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์จากชุมชนหรือโรงงานอุตสาหกรรมจะมีแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปลาจำนวนมากด้วย

ลักษณะการเน่าเสียของปลา

เมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่เนื้อเยื่อปลาจะใช้สารอาหารต่างๆ ในเนื้อเยื่อ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น เพื่อการเจริญและทวีจำนวนและให้สารหลายชนิดที่มีกลิ่นหรือรสผิดปกติไปจากธรรมชาติ ได้แก่

1. แอมโมเนีย เป็นสารที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของยูเรียและสารประกอบที่มีไนโตรเจนของแบคทีเรียพวก *Achromobacter thalassius, A. Butyri, A. delicatulum, Pseudomonus geniculata, Flavobacteriu funcatum* และ *Micrococcus* ทำให้เกิดกลิ่นฉุนในเนื้อปลา

2. Histamine เกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโนฮีสทิดีน โดย *Achromobacter histameneum* ทำให้เกิดกลิ่นฉุนในเนื้อปลา

3. Trimethylamine เป็นสารที่เปลี่ยนแปลงจาก trimethylamine oxide โดย *Micrococcus* และ *Achromobacter* สารนี้พบมากในปลาที่เน่า จึงใช้เป็นดัชนีแสดงการเน่าเสียของปลา

4. กรดอินทรีย์ต่างๆ กรดอินทรีย์ในปลาที่เน่าเสียมีหลายชนิดที่พบมากได้แก่ formic acid, citric acid, butyric acid, propionic acid และ valeric acid กรดเหล่านี้เป็นผลผลิตจากการย่อยสลายเนื้อปลาของ *Pseudomonas* ทำให้เนื้อปลามีกลิ่นและรสแตกต่างกันไป (บัญญัติ, ม.ป.ป.)

2.19 ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมัก

ในประเทศไทยอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงและได้รับความนิยมบริโภคกันโดยทั่วไป ได้แก่ ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักตามแหล่งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการหมักออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักโดยใช้เอนไซม์จากเนื้อปลา และจากอวัยวะภายในของปลา การหมักแบบนี้จะเติมเกลือเพื่อป้องกันการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ เช่น น้ำปลา กะปิ

2. การหมักโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ร่วมกับเอนไซม์จากปลา การหมักแบบนี้จะเติมเกลือและคาร์โบไฮเดรตลงไปด้วย เช่น ปลาร้า ปลาเจ่า

3. การหมักโดยใช้กรดเป็นตัวช่วยในการย่อยสลาย เช่น fish silage, fish soluble

นอกจากนี้สามารถแบ่งผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ผ่านกระบวนการหมักตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ผลิตภัณฑ์ที่ยังคงลักษณะของวัตถุดิบไว้ หรือยังมีลักษณะเป็นชิ้นอยู่ เช่น ปลาทูเค็ม ปลาร้า ปลาแป้งแดง

2. ผลิตภัณฑ์ที่วัตถุดิบเปลี่ยนลักษณะไปเป็นชิ้นละเอียดๆ หรือเป็น paste เช่น กะปิ

3. ผลิตภัณฑ์ที่วัตถุดิบถูกย่อยเป็นของเหลว เช่น น้ำปลา น้ำบูดู

2.20 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ว่าประกอบด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้

2.20.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักสัตว์น้ำ ได้แก่

2.20.1.1. ปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ โดยขนาดของสัตว์น้ำมีผลต่อระยะการหมักและปริมาณของเกลือที่ต้องใช้ นอกจากนี้ชนิดของปลาจะมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ซึ่งลักษณะเนื้อปลาแต่ละชนิดซึ่งต่างกัน ทำให้เหมาะแก่การทำผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

2.20.1.2. เกลือ ใช้เพื่อควบคุมชนิดและการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ การเติมเกลือในจำนวนเล็กน้อยจะช่วยในการถนอมอาหารและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณของเกลือที่ใช้เติมลงไปในอาหารเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์แต่ถ้าใช้ปริมาณมาก (สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 16.54, a_w 0.90) และจะทำให้รสชาติของอาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการใช้เกลือร่วมกับการถนอมอาหารแบบเทคนิคอื่น

การเติมเกลือที่ความเข้มข้นพอเหมาะในการผลิตอาหารหมักจะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ แต่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Staphylococcus* และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Ravishankar และ Juneia, 2000)

2.20.1.3. กระเทียม มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Alium Sativum* L. เป็นทั้งเครื่องเทศและสมุนไพร กลีบกระเทียม (cloves of garlic) ใช้แต่งกลิ่น (วิไลกุล, 2544) ในกระเทียมประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิดได้แก่ น้ำร้อยละ 88 โปรตีนร้อยละ 22 ไขมันร้อยละ 0.32 ส่วนสกัดได้ที่ปราศจากไนโตรเจนร้อยละ 7.27 เส้นใยร้อยละ 1.17 และเถ้าร้อยละ 1.03 กลิ่นของกระเทียมมาจากน้ำมันหอมระเหยซึ่งประกอบด้วย allyldisulfide (ร้อยละ60) trisulfide (ร้อยละ20) และ propyldisulfide ระดับต่ำๆ นักวิจัยบางรายได้ศึกษาลึกลงไปถึงสารระเหยของกระเทียม ได้แก่ allicin, allylpropyldisulfide, di-allyldisulfide และ di-allyltrisulfide สารระเหยอื่นๆในน้ำมัน ได้แก่ citral, geraniol, linalool, α-phelandrene และ β-phelandrene สารที่เป็นตัวให้กลิ่นสำคัญได้แก่ allicin ($C_6H_{10}OS_2$) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านแบคทีเรีย สารนี้เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ allienase ต่อสารระเหย allien ความร้อนทำให้ allicin สลายตัวอย่างรวดเร็ว และละลายในน้ำได้เล็กน้อยแต่ละลายได้มากในตัวทำละลายอื่น เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ สาร allicin ใช้ทางการแพทย์ได้มากมาย นอกจากนี้กระเทียมยังเป็นแหล่งของแร่ธาตุ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม และฟอสฟอรัส ใบกระเทียมมีวิตามินเอ และซี และมีโปรตีนอยู่บ้าง คุณค่าทางโภชนาการของหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเทียมต่อน้ำหนัก 100 กรัม ของส่วนที่สามารถรับประทานได้ของใบและกลีบกระเทียมแสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งได้มาจาก the Philippine Nutrition Research Center (Magda, 2000)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารอาหารในกลีบกระเทียมและใบกระเทียม

สารอาหาร	กลีบกระเทียม	ใบกระเทียม
ส่วนที่กินได้ตามสภาพที่เก็บเกี่ยว (%)	85.00	87.00
ความชื้น (%)	66.20	87.30
พลังงาน (แคลอรี่)	122.00	12.00
โปรตีน (กรัม)	7.00	2.10
ไขมัน (กรัม)	0.30	0.50
CHO รวม (กรัม)	24.90	9.00
เส้นใย (กรัม)	1.10	1.50
เถ้า (กรัม)	1.60	1.10
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	26.00	116.00
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	109.00	56.00
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.20	0.40
โซเดียม (มิลลิกรัม)	13.00	4.00
โพแทสเซียม A (i.n.)	หาไม่พบ	1140.00
ไทอะมีน (มิลลิกรัม)	0.23	0.08
ไรโบเฟลวิน (มิลลิกรัม)	0.08	0.16
ไนอะซีน (มิลลิกรัม)	0.40	0.70
กรดแอสคอร์บิค (มิลลิกรัม)	7.00	38.00

ที่มา: Magda (2000)

กระเทียมมีผลต่อจุลินทรีย์ 2 ประการด้วยกัน คือ ประการแรก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมลบ เนื่องจากในกระเทียมมีสาร allicin ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ประการที่สองกระเทียมช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก (Zaika และ Kissinger, 1984; Al-Delaimy และ Ali, 1971) รายงานว่าสารสกัดกระเทียมร้อยละ 4 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *Shigella dysenteriae, Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่ง *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดกระเทียมน้อยกว่า *E. coli* และมีการรายงานว่าสารสกัดกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้และสารสกัดกระเทียมความเข้มข้นร้อยละ 2-5 สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Karaioannoglou และคณะ, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.20.1.4. คาร์โบไฮเดรต นิยมใช้แหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

2.20.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักโดยปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในสัตว์น้ำมักมีชนิดและจำนวนแตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 10^6-10^9 เซลล์ต่อกรัม กลุ่มที่พบมากในการหมักสัตว์น้ำ คือ พวกที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ในสกุล *Pediococcus, Staphylococcus* และ *Micrococcus* โดยในช่วงแรกของการหมักจะพบพวกแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมื่อการหมักดำเนินไปและมีกรดเกิดขึ้น หรือเมื่อใช้ปริมาณเกลือสูงๆแบคทีเรียพวกนี้จะลดจำนวนลง บางครั้งอาจพบพวก *Bacillus* ซึ่งจะพบมากขึ้นหลังจากมีการเติมคาร์โบไฮเดรตลงไป

2.20.3 ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการหมัก

2.20.3.1. ความเป็นกรด-เบส การควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสจะช่วยควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์

2.20.3.2. สารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารต่างกัน นอกจากนี้ปริมาตรสารอาหารสามารถใช้เป็นตัวควบคุมชนิดของการหมักได้

2.20.3.3. ปริมาณออกซิเจน การหมักสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่เรียกว่า microaerophilic fermentation คือต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย

2.20.3.4. อุณหภูมิ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญหรือในการสร้างเอนไซม์แตกต่างกัน นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อลักษณะของเซลล์ด้วย

2.20.3.5. ปริมาณเกลือ ปริมาณเกลือมีผลในการเลือกชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในกระบวนการหมัก รวมถึงเป็นตัวกำหนดลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย (พงษ์เทพ, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ 13IS3 และ *Lactobacillus curvatus* สายพันธุ์ 13IS4 ได้จากวิทยานิพนธ์ของ น.ส. นิระชา ศรีวงษ์ เรื่อง การคัดเลือกและการพัฒนาเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

3.1.1.2 แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและก่อให้เกิดโรค จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Vibrio parahaemolyticus* DMST 5665, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Bacillus cereus* DMST 5040 ซึ่ง DMST ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 20076 ซึ่ง TISTR ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ Nutrient Broth / Nutrient Agar (NB / NA, pH 6.8±0.2, Difco Laboratories) deMan Rogosa Sharpe Medium (MRS Broth / MRS Agar, pH 6.5±0.2, Difco) Mueller Hinton Broth / Agar, (MHB / MHA, pH 7.3±0.1, Difco) Brain Heart Infusion (BHI, pH 7.4±0.2, Difco) และ Pla-Jom Model broth (PMB, pH 6.66±0.0) ซึ่งประกอบด้วย meat extract 10 กรัม, tryptone 10 กรัม, sodium ascrobate 0.5 กรัม, sodium tri-polyphosphate 3 กรัม, glucose 10 กรัม, sodium nitrite 0.1 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร, เกลือ NaCl และสารสกัดกระเทียมที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 สารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (What man International Ltd.) ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) เครื่องชั่ง เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ตู้บ่มเชื้อ เครื่อง vortex ไมโครเวฟ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) (iEMS Reader MF Labsystems) เครื่องตีป่น (stomacher) เครื่องวัด พีเอช และ เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. lactis* สายพันธุ์ 13IS3 และ *L. curvatus* สายพันธุ์ 13IS4 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียทั้งหมด 11 ชนิด ด้วยวิธี agar diffusion (Piddock, 1990)

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. lactis* สายพันธุ์ 13IS3 และ *L. curvatus* สายพันธุ์ 13IS4 ลงในอาหาร MRS Broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยในการล้างแต่ละครั้งจะปิเปตสารละลายเปปโตนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งไป หลังจากล้างเซลล์แล้วทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นำสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดมาทำการปรับความขุ่นให้เท่ากัน โดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์แต่ละชนิดประมาณ 10^7-10^8 CFUต่อมิลลิลิตร

3.2.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Vibrio parahaemolyticus* DMST 5665, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Bacillus cereus* DMST 5040, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 20076 ลงในอาหาร BHI Broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง และทำให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตน สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 นำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงจนกระทั่งได้สารแขวนลอยของเซลล์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้อาหาร MRS Broth พร้อมทั้งปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดให้เท่ากัน โดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายประมาณ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร

3.2.1.3 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวของอาหาร MRS Agar สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นหยดลงผิวของอาหาร MHA จากนั้นเกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นวางแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ปราศจากเชื้อแล้วหยดสารแขวนลอยของ *L. lactis* หรือ *L. curvatus* ที่แยกได้จากปลาลงบนแผ่นกระดาษกรองนั้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากแบคทีเรีย *L. lactis* และ *L. curvatus* สร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้จะเกิดโซนใสหรือโซนการยับยั้ง (inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษกรอง ทำการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสนั้น

3.2.2 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ในอาหาร Pla-Jom Model Broth

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการเตรียมเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ 13IS3 และ *L. curvatus* สายพันธุ์ 13IS4 ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 เมื่อได้สารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดแล้วนำมาตรวจนับปริมาณเชื้อเริ่มต้นด้วยเทคนิค pour plateในอาหาร MRS

3.2.2.2 การเตรียมสารสกัดกระเทียม

นำกระเทียมสดทั้งหัว ซึ่งซื้อจากตลาดมาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปอกเปลือกในตู้เขี่ยเชื้อ แล้วนำไปตีป่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง stomacher โดยอัตราส่วนของกระเทียมต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเช่นเดียวกับข้างต้น นำส่วนใสที่ได้ไปผสมกับอาหารเหลว PMB ให้ได้ปริมาณกระเทียมสกัดตามต้องการในอาหาร PMB ต่อไป โดยที่ส่วนใสของสารสกัดกระเทียมที่ได้ 3 มิลลิลิตร มาจากกระเทียม 1 กรัม ระยะเวลาของการเตรียมสารสกัดกระเทียมหลังจากตีป่นจนกระทั่งผสมในอาหาร PMB และเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 60-90 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.3 ศึกษาการเจริญและการหมักของ *L .lactis* และ *L. curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส

ทำการเตรียมอาหาร PMB ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 0, 1, 3 และ 5 โดยปริมาตร ซึ่งเตรียมอาหาร PMB ที่มีเกลือและสารสกัดกระเทียมความเข้มข้นต่างๆ ทั้งหมด 20 ชุด (ชุดที่ 1 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 0 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, ชุดที่ 2 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 0 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 1, ชุดที่ 3 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 0 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 3, ชุดที่ 4 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 0 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 5, ชุดที่ 5 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, ชุดที่ 6 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 1, ชุดที่ 7 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 3, ชุดที่ 8 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 5, ชุดที่ 9 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, ชุดที่ 10 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 1, ชุดที่ 11 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 3, ชุดที่ 12 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 1.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 5, ชุดที่ 13 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, ชุดที่ 14 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 1, ชุดที่ 15 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 3, ชุดที่ 16 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 5, ชุดที่ 17 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, ชุดที่ 18 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 1, ชุดที่ 19 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 3, ชุดที่ 20 : PMB ที่เติมเกลือร้อยละ 2.5 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 5) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่างๆ ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รวมทั้งหมด 60 ทรีตเมนต์) ตรวจผลที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน โดยตรวจหาการเจริญของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และวัดค่าพีเอช ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance และ Duncan Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการยับยั้งของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่แยกได้จากปลา

จากการศึกษาผลการยับยั้งของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียปรากฏว่า *L. lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Pediococcus pentosoceus* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยสามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ดีที่สุด ซึ่งสังเกตจากโซนใสที่เกิดขึ้นมีขนาดกว้างที่สุด (9.67 มิลลิเมตร) ส่วน *L. curvatus* สามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *L. plantarum*, *P.pentosoceus* และ *V. parahaemolyticus* โดยพบว่าสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถวัดโซนใสที่เกิดขึ้นได้ 8 มิลลิเมตร เท่ากัน (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่า *L. lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากชนิดกว่า *L. curvatus*

ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Østergaard และคณะ (1998) ซึ่งได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาจำนวน 44 สายพันธุ์ สามารถสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ได้ และเช่นเดียวกับ Noonpakdee และคณะ (2003) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในแหนมพบว่า *L. lactis* สายพันธุ์ WNC 20 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินทางอาหาร ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับ Rattanachaikunsopon และ Phumkhachorn (2000) ซึ่งพบว่า *L. lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง *L. mesenteriodes* ได้

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้ อาจเป็นเพราะสารยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น จากการศึกษาของ Daeschel (1989) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งได้หลายชนิด เช่น organic acid, hydrogen peroxide, diacetyl, bacteriocin และสารประกอบทุติยภูมิที่เกิดจากการกระทำของ lactoperoxidase กับ hydrogenperoxide และ thiocyanate เช่น hypothiocyanite ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ผลของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยวิธี agar diffusion

ชนิดของแบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มม.)[a] ± SD	
	Lactococcus lactis	*Lactobacillus curvatus*
Bacillus cereus	9.67 ± 0.58	8.00 ± 1.00
Escherichia coli	7.00 ± 0.00	8.00 ± 1.73
Lactobacillus plantarum	7.00 ± 0.87	7.17 ± 0.76
Leuconostoc mesenteroides	7.00 ± 0.00	-[b]
Listeria monocytogenes	-	-
Pediococcus pentosaceus	7.17 ± 0.76	7.33 ± 0.58
Pseudomonas fluorescens	-	-
Salmonella Rissen	-	-
Staphylococcus aureus	-	-
Vibrio parahaemolyticus	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00
Yersinia enterocolitica	-	-

[a] ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

[b] ไม่พบการยับยั้ง (เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone < 6 มิลลิเมตร)

4.2 ผลของความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดจากกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส

4.2.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่นของเซลล์ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB

จากการศึกษาผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *L. lactis* ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากหมักนาน 3 - 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อาหาร PMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 1.5 ในสภาพที่มีสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 และ 3 เซลล์จะมีการเจริญสูงที่สุด (รูปที่ 4.1A - 4.1C) โดยสามารถวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 1.03 - 1.17 ซึ่งพบว่ามีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมในระดับอื่นๆ สำหรับการหมักในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 2 (รูปที่ 4.2A - 4.2D) และมีการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และ 1 พบว่าเซลล์จะมีการเจริญได้ดีที่สุด โดยสังเกตจากค่าความขุ่นของเซลล์จะสูงที่สุด คือ 1.02 - 1.26 และมีการเจริญได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 4 ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าในอาหาร PMB ที่มี

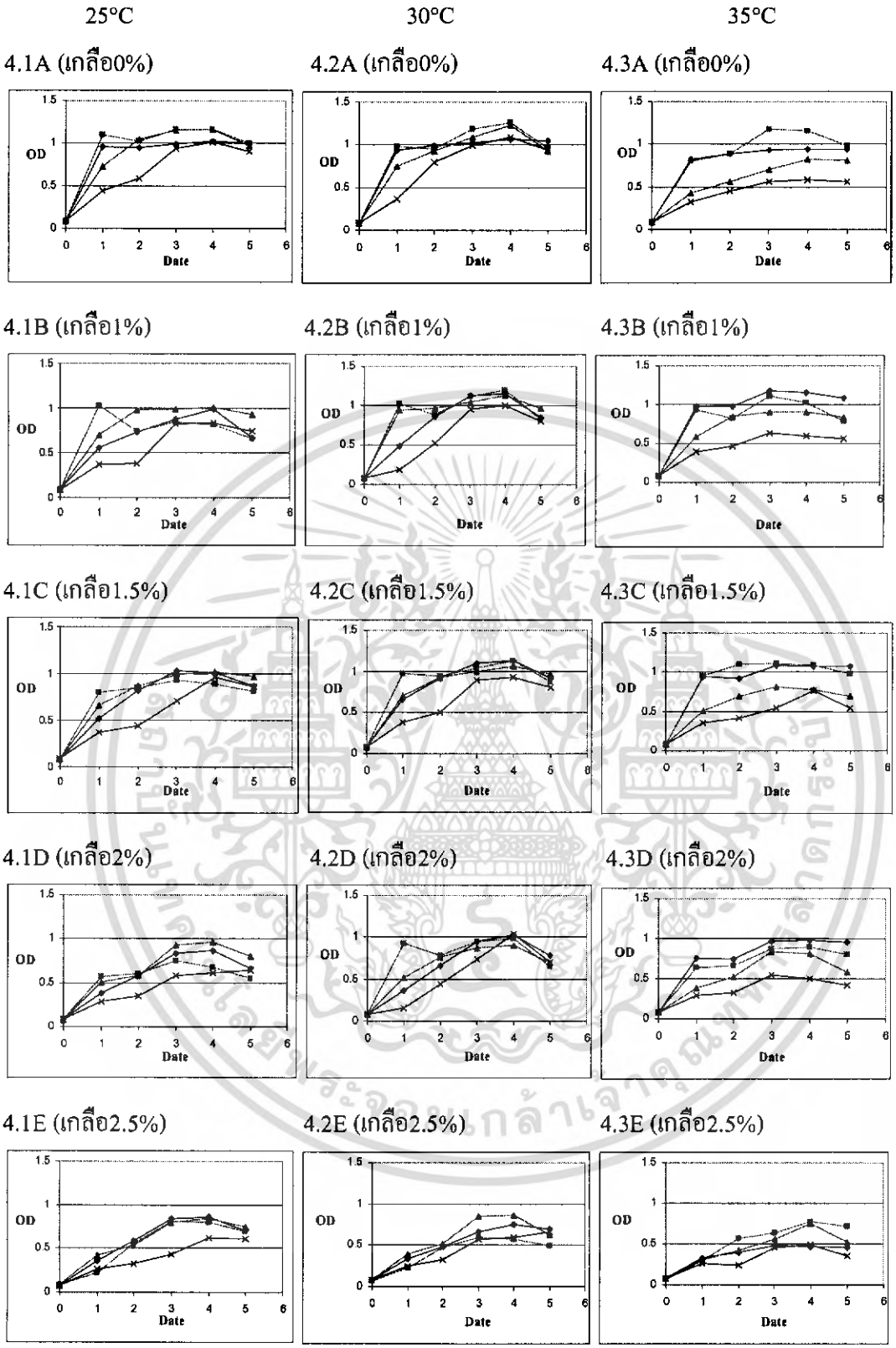
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 1.5 (รูปที่ 4.2A - 4.2C) และมีการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 จะทำให้เซลล์มีการเจริญได้ดีและสามารถวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 1.11 - 1.18 เมื่อเปรียบเทียบการหมักโดยใช้ *L. lactis* ในอาหาร PMB พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1 จะเหมาะสมต่อการหมักมากที่สุด ส่วนสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 จะทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดีที่สุด

สำหรับผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *L. curvatus* ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 1.5 การเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และ 1 มีผลทำให้เชื้อเจริญได้ดี โดยสังเกตจากค่าความขุ่นของเซลล์จะสูงที่สุด โดยเฉพาะในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 1.5 ที่มีการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และ 1 เชื้อมีการเจริญได้ดีที่สุด โดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 5.1C) จะมีค่ามากที่สุด คือ 1.07 และ 1.09 ตามลำดับ และมีการเจริญได้ดีที่สุดในช่วงวันที่ 3 ส่วนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 2.5 (รูปที่ 5.2A - 5.2E) การเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และ 1 จะให้ผลดีเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะในอาหาร PMB ที่ไม่เติมกระเทียมจะให้ผลดีที่สุด และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 1 - 2.5 (รูปที่ 5.3B - 5.3E) ปริมาณสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมคือร้อยละ 0 และ 1 ส่วนในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 พบว่าการไม่เติมสารสกัดกระเทียมจะทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดีกว่าที่เติมสารสกัดกระเทียม เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 อุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้ คือ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมคือร้อยละ 1.5 และปริมาณสารสกัดกระเทียมที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 1

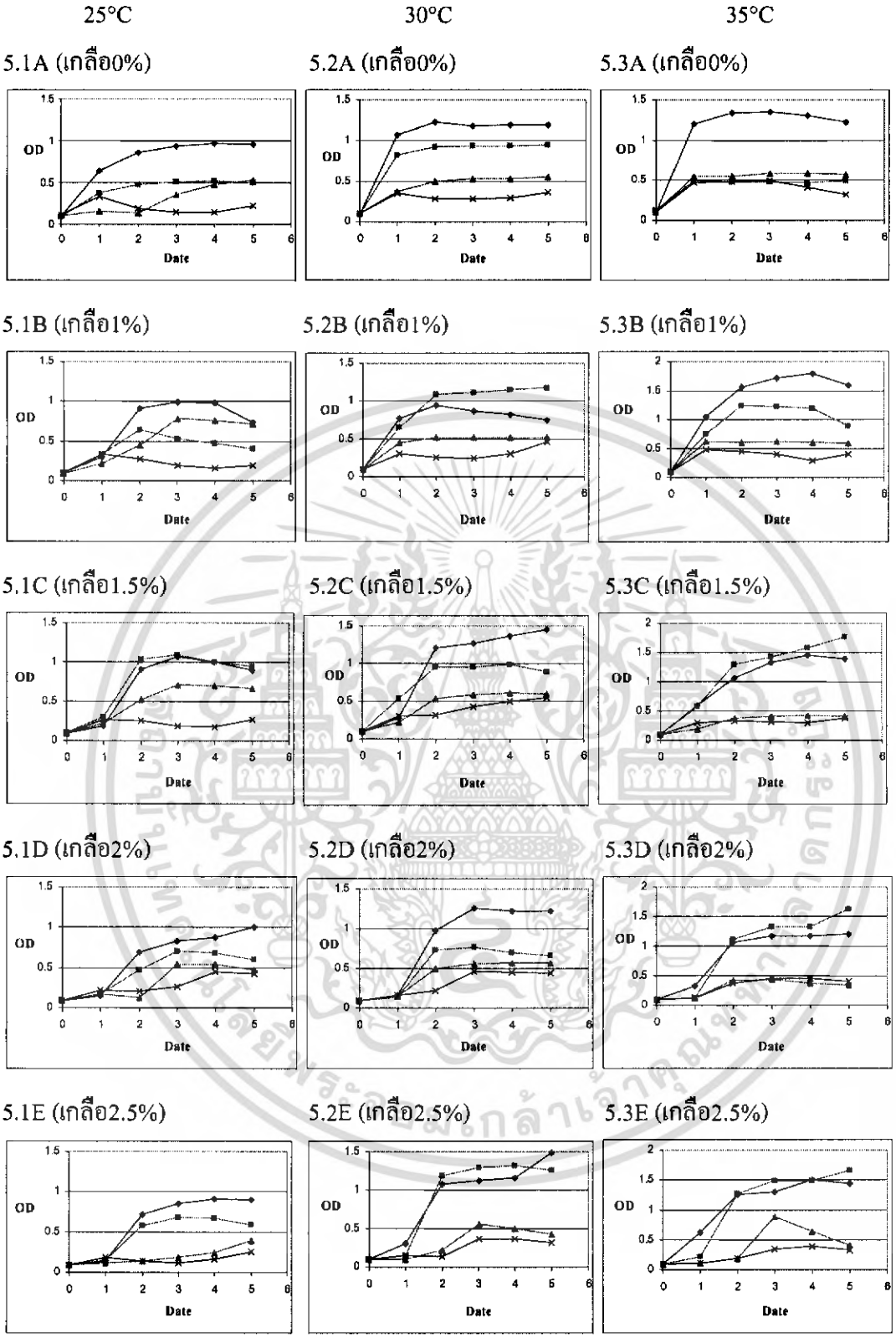
จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของ *L. lactis* ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 2.5 และสารสกัดกระเทียม ร้อยละ 0 - 5 ส่วนใหญ่ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 2.5 และสารสกัดกระเทียม ร้อยละ 0, 1 และ 3 ส่วนใหญ่ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P<0.05$) แต่ในอาหาร PMB ที่มีสารสกัดกระเทียม ร้อยละ 5 ส่วนใหญ่จะให้ผลแตกต่างกับทรีตเมนต์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สำหรับ *L. curvatus* พบว่าที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียสในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 2.5 และสารสกัดกระเทียม ร้อยละ 0 - 5 ส่วนใหญ่ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 ผลของกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (รูปที่4.1A - 4.3E); —◆— กระเทียม ร้อยละ 0; —■— กระเทียม ร้อยละ 1; —▲— กระเทียม ร้อยละ 3; —✱— กระเทียม ร้อยละ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ผลของกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในระหว่างการหมักในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (รูปที่5.1A - 5.3E); —◆— กระเทียม ร้อยละ 0; —■— กระเทียม ร้อยละ 1; —▲— กระเทียม ร้อยละ 3; —✕— กระเทียม ร้อยละ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการหมักในอาหาร PMB

เมื่อสังเกตการลดค่าพีเอชของเชื้อ *L. lactis* ในอาหาร PMB ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่างกัน ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการลดลงของค่าพีเอชเหลือน้อยกว่า 4.5 เร็วที่สุด รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 35 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 และความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 1.5 ทำให้พีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ภายในเวลา 1 วัน ซึ่งลดลงเร็วกว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0, 3 และ 5 ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และ 1 และที่ระดับความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 1.5 ในอาหาร PMB มีผลทำให้ค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ได้เร็วกว่า เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมอีก 2 ระดับ คือ ร้อยละ 3 และ 5 ตามลำดับ ส่วนการหมักด้วยเชื้อ *L. curvatus* พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการลดลงของพีเอชน้อยกว่า 4.5 เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 3 และความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 - 1.5 มีค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ได้เร็วที่สุดคือ ภายใน 3 วัน จะเห็นได้ว่าในอาหาร PMB ที่หมักด้วย *L. curvatus* ที่มีการเติมสารสกัดกระเทียมจะมีการหมักได้เร็วกว่าไม่เติมสารสกัดกระเทียม และเมื่อเปรียบเทียบการหมักระหว่าง *L. lactis* และ *L. curvatus* พบว่า *L. lactis* มีการหมักได้เร็วกว่าเพราะค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ภายใน 1 วัน

จากการทดลองนี้พบว่ากระเทียมมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยเมื่อเติมเชื้อ *L. lactis* ลงในอาหาร PMB พบว่าเชื้อ *L. lactis* จะมีการเจริญและการหมักได้ดีที่ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 ส่วนที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ จะมีการเจริญได้ไม่ค่อยดี อาจเป็นเพราะ allicin ในกระเทียมสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Cayallite และ Bailey, 1994) และในอาหาร PMB ที่เติมเชื้อ *L. curvatus* พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 มีผลทำให้เชื้อ *L. curvatus* เจริญได้ดีกว่าสารสกัดกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ เช่นกัน แต่ที่ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมร้อยละ 3 มีผลทำให้เชื้อนี้มีการหมักได้ดีกว่าชุดที่ไม่เติมสารสกัดกระเทียมและชุดที่ความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมสูงสุด แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารสกัดกระเทียมที่พอเหมาะ (ร้อยละ 3) มีผลกระตุ้นการเจริญของ *L. curvatus* ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Zaika และ Kissinger (1979) พบว่าเครื่องเทศหลายชนิดมีผลกระตุ้นการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ นอกจากนี้กระเทียมยังมีสารที่จำเป็นต่อการเจริญและสร้างกรดแลคติก เช่น แมงกานีส เป็นต้น (อดิศร, 2542) เช่นเดียวกับการทดลองของ Christin และคณะ (1999) ได้ศึกษาการหมักส้มฟักโดยมีการเติมกระเทียมและไม่เติมกระเทียม พบว่าส้มฟักที่ไม่เติมกระเทียมค่าพีเอชจะมากกว่า 4.8 หลังจาก 3 วัน ส่วนส้มฟักที่เติมกระเทียมพบว่าค่าพีเอชจะลดลงถึง 4.5 ภายในเวลา 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 จำนวนวันที่ค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 ในอาหาร PMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกัน ที่หมักโดย *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C

ความเข้มข้นของ Nacl (%)	จำนวนวันที่ pH น้อยกว่า 4.5											
	25°C				30°C				35°C			
	กระเทียม 0 %	กระเทียม 1 %	กระเทียม 3 %	กระเทียม 5 %	กระเทียม 0 %	กระเทียม 1 %	กระเทียม 3 %	กระเทียม 5 %	กระเทียม 0 %	กระเทียม 1 %	กระเทียม 3 %	กระเทียม 5 %
Lactococcus lactis												
0	1	1	2	3	1	1	2	5	1	1	4	4
1	2	2	2	4	2	1	2	4	1	1	2	4
1.5	2	1	2	4	2	1	2	4	1	1	2	4
2	3	1	2	3	2	2	2	4	2	2	3	5
2.5	3	3	3	>5	3	2	3	5	2	2	4	>5
Lactobacillus curvatus												
0	>5	4	4	>5	>5	4	3	4	>5	>5	5	>5
1	>5	4	4	5	4	3	3	4	>5	4	3	3
1.5	>5	4	4	5	>5	4	3	4	>5	4	3	4
2	>5	>5	5	>5	>5	4	4	4	>5	4	4	4
2.5	>5	>5	>5	>5	4	5	4	4	>5	>5	5	4

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียพบว่า *L. lactis* มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้มากชนิดกว่า *L. curvatus* โดย *L. lactis* สามารถยับยั้ง *Bacilluus cereus* ได้ดีที่สุด ส่วน *L. curvatus* สามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *Escherichia coli* ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญและการหมักของ *L. lactis* และ *L. curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ และในอาหาร PMB ที่มีเกลือร้อยละ 0 - 1.5 มีผลทำให้เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญและการหมักได้ดีที่สุด ส่วนการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 ลงในอาหาร PMB จะทำให้ *L. lactis* มีการเจริญและการหมักได้ดี ส่วน *L. curvatus* พบว่าการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 มีผลทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดีเช่นกัน แต่ในอาหาร PMB ที่มีการเติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 3 จะมีการหมักได้เร็วกว่า

จากการศึกษานี้แสดงแนวโน้มให้เห็นว่า การเติมเกลือและสารสกัดกระเทียมในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักร่วมกับการเติม *L. lactis* และ *L. curvatus* จะช่วยส่งเสริมการเจริญและการหมักของเชื้อได้ดี นอกจากนี้ *L. lactis* และ *L. curvatus* ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรทดสอบการเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียลงไปในอาหารจำลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักสำหรับใช้ในการถนอมอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จินตลา ลิ้มภักดี. 2546. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินชีพจากผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งแปรรูปโดยกระบวนการหมักและการนำไปใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. [ม.ป.ป.]. จุลชีววิทยาทั่วไป. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2538. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2537. โปรซิดิวส์ LAB ในอุตสาหกรรมอาหารไทยครั้งที่ 2 วันที่ 28-29 ตุลาคม 2537 ณ อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิไลกุล ระตินัย. 2544. สมุนไพรในอาหารไทย. ฉลาดบริโภค. ปีที่ 26. Vol.46 ม.ค.-ธ.ค.44.44.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adam, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. J. of Biotechnol. 68 : 171-178

Al-Delaimy, K.S., and Barakat, M.M.F., 1971. Antimicrobial and preservative activity of garlic on fresh ground camel meat. 1. Effect of fresh ground garlic segments. J. Sci. Food Agric. 22:96-98.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I., 2005. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat-scale facility:2-Behaviour of pathogenic and spoliage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria, Food Contr. Xxx, xxx-xxx.

Beoehringer, M., 1995. Nucleic acid labeling and detection. Biochemical Catalog. Inchcape House, Singapore. pp. 42-77.

Bridge, P.D. and Sneath P. H. A.,1982. *Streptococcus gallinum* sp. nov. and *Streptococcus oralis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 32 : 410-415.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cavallito, C.J. and Bailey, J.H., 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. (i) isolation, physical properties and antibacterial action. J. Am. Chem. Soc. 66, 1950-1951.

Condon, S., 1983. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. J. Food Sci. Technol. 11(1) : 265-266.

Daesche, M.A., 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. January, 164-167.

De Vuyst, L. and Vandarmme, E. J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. *In* De Vuyst, L. and Vandarmme, E. J. (eds.). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, New York.

Earnshaw, R. G., 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria : Natural Food Preservation System, pp. 211-225. *In* Wood, B. J. B. (ed.). The Lactic Acid Bacteria. Vol 1 : The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Elsevier Applied Science, London.

Fowler, G. C. and Gasson, M. J., 1991. Antibiotics-nisin, pp. 135-152. *In* N. J. Russell, N. J. and Gould, G. W. (eds.). Food Preservatives Blackie and Son Ltd., Glasgow, UK.

Garvie, E. I., 1976. Hybridization between deoxyribonucleic acid of some strain of heterofermentative lactic acid bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 26 : 116-122.

Hammes, W. P., Weiss, N. and Holzapfel, W. P., 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, pp. 1535-1594. *In* Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. (eds.). The prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation Identification, Applications. Spinger, New York.

Hamon, Y., 1988. Bacteriocin, pp. 331-369. *In* Hardegree, Anthony, T. T. (eds.). Handbook of Natural Toxins Volume 4. Marcel Dekker, New York.

Hardie, J.M. and Whiley, R. A., 1995. The genus *Streptococcu,* pp, 75-124. *In* , B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and hall, Glasgow.

Helander, I.M., Von Wright, A.and Mattila-Sand holm, T-M., 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Sci. & Technol. 81, 146-150.

Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B.,Kersters, K. and Schleifer, K. H., 1993 Differentiation of Lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. Syst. Appl. Microbiol. 16 : 463-467.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K. O. and Kandler, O., 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria 1. Purification and kenetics of the alsosteric L-lactic acid dehydrogenases from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbio. 112 : 81-93.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R., 1993. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Academic Press Inc., Sandiego. pp. 275 .

Hoover, D. G. and Harlander, S. K., 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity , 23-29. *In* Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Academic Press Inc., London.

Jack, R.W., Wan, J., Godon, J., Harmark, K., Davidson, B. E., Hillier, A. J., Wettenhall, R. E. H., Hickey, M. W. and Conventry, M. J., 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicola 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 2897-2903.

Johnson, A. E., 1991. Microbiological safety of fermented foods, pp. 136-149. *In* : Zeikus, G.J., Johnson, A.E. Mixed Cultures in Biotechnology. Mc Graw-Hill, Inc, USA.

Josephson, J. and Nielsen., 1988. Plasmid profiles and bacteriophage sensitive of bacteria of cheddar starter used for five years without rotation, pp. 219-223. *In* Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Karl-Heinz (eds.). Taxonomy of lactic acid bacteria : Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology, Genetics and Application. Blackie Academic & Professional, New York.

Karaioannoglou, P.G., Mantis, A.J., and Panetsos, A.G., 1977. The effect of garlic extract on lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in culture medium. Lebensm. Wiss. Technol. 10:148.

Kissinger, J.C. and Zaika, L.L., 1978. Effect of major spices in Lebanon bologna on acid production by starter culture organisms. J. Food Prot. 41, 429-431.

Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J., 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1683-1688.

Magda, R.R., 2000, The mighty taste and smell of garlic. International Food Marketing, Technology Vol. 14 No.1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nuonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S., 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. Int. J. Food Microbiol. 81, 137-145.

Pot, B., Hartel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K. and Schleifer, K. H., 1993. Identification of *Lactobacilluc acidophilus, L. gasseri* and *L. johnsonii* strain by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotides probe hybridization. J. Gen. Microbiol. 139 : 513-517.

Paludan-Müller, C., Huss, H.H. and Gram, L., 1999. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and role of garlic as substrate for fermentation. Int. J. Food Microbiol. 46, 219-229.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn,P., 2000. A bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis isolated from Thai fermented foods. ScienceAsia. 26, 195-200.

Ravishankar, S. and Juneja, V.K., 2000. Sodium Chloride, pp. 705-724. *In* : Naidu,A.S. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, USA.

Ringo, E., Gatesoupe, F. J., 1998. Lactic acid bacteria in fish : a review. Aquaculture 160 : 177-203.

Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel, P. H., 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Vol 3. Academic Press, San Dieo.

Østerguard, A., Embarek, P.K.B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H. and Gram, L., 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. Food Microbiol. 15, 223-233.

Saleem, Z.M. and Al-Delaimy, K.S., 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. J. Food Prot. 45, 1007-1009.

Schillinger, U., Lucke, F.-K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55(8), 1901-1906.

Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K., 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceaus*. J. Food Prot. 52, 856-862.

Simpson, W. J. and Taguchi, H., 1995. The genus *Pediococcus,* with notes on the genera *Tetragenococcusi* and *Aerococcus*, 125-172. *In* Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). The genera of lactic acid bacteria. Chapman and hall, Glasgow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. Food Microbiol. 36 : 1-29.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactobacillus,* pp. 173-174. *In* Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. (eds.). The genera of lactic acid bacteria. Chapman and hall, Glasgow

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Evalution of meat born lactic bacteria as protective cultures for the biopreserevation of cooked meat products. Int. J. Food Microbiol. 96, 149-164.

Woolford, M. K., 1975. Microbiological screening of the straighy chain fatty acid (C_1-C_{12}) as potential silage additive. J. Sci. Food Agri. 22 : 219-228.

Yamada,Y. and Azuma, K.,1977. Evalution of *in vitro* antifungal activity of allicin. Aitmicrob. Agents & Chematherapy. 11(4), 743-749.

Zaika, L.L. and Kissinger, J.C., 1979. Effects of some spices on acid production by starter cultures. J. Food Prot. 42, 572-576.

Zaika, L.L. and Kissinger, J.C., 1984. Fermentation enhancement by spices : identification of active component. J. Food Sci. 49, 5-9.

http://www.genomenewsnetwork.org/articles/11_02/keepers_art.shtml

webexhibits.org/ butter/process-steps.html

http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/leume/leume.home.html

www.omniscellula.net/ pages/articles/bordons.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางที่ 4 ผลของ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus curvatus* ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

ชนิดของแบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มม.)[a]							
	Lactococcus lactis				*Lactobacillus curvatus*			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
Bacillus cereus	10	10	9	9.67	9	8	7	8
Escherichia coli	7	7	7	7	10	7	7	8
Lactobacillus plantarum	8	6.5	6.5	7	8	6.5	7	7.17
Leuconostoc mesenteroides	7	7	7	7	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	-	-	-	-	-	-	-	-
Pediococcus pentosoceus	8	7	6.5	7.17	8	7	7	7.33
Pseudomonas fluorescens	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella Rissen	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	-	-
Vibrio parahaemolyticus	7	7	7	7	7	7	7	7
Yersinia enterocolitioa	-	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0780	0.0815	0.0825	0.0855	1.0900	1.2175	0.3780	0.2185	1.0940	1.1100	0.9760	0.1555	1.1610	1.1845	1.0730	0.9270	1.218	1.2315	1.1395	1.084	1.1605	1.1025	1.0105	0.9585
1	0.0910	0.1025	0.0960	0.0815	0.5735	1.000	0.2210	0.2005	0.6490	0.5990	0.9595	0.0950	0.6040	0.6285	0.8835	0.6905	1.0225	0.8560	0.9640	0.8790	0.5765	0.5285	0.9210	0.7390
1.5	0.0775	0.0765	0.0770	0.0830	0.5345	0.4100	0.2030	0.1475	1.2180	0.9635	0.5790	0.0915	1.3205	0.9380	0.7605	0.2230	1.3275	0.9715	0.8280	0.9205	1.3175	0.9850	0.7015	0.7720
2	0.0790	0.0775	0.0750	0.0790	0.2795	0.2835	0.1405	0.1570	0.6865	0.7125	0.1115	0.0845	0.9175	0.7175	0.7990	0.0830	1.0155	0.7180	0.9260	0.1570	0.7840	0.6575	0.6720	0.3645
2.5	0.0705	0.0775	0.0810	0.0740	0.2100	0.1925	0.1655	0.1685	0.6330	0.1910	0.0965	0.0860	1.0975	0.8240	0.7315	0.0885	1.1930	0.8120	0.8855	0.1660	0.9680	0.7860	0.6625	0.4080
30°C																								
0	0.0775	0.0760	0.0835	0.0805	1.0170	0.8890	0.8100	0.2095	1.0600	0.9265	0.9525	0.9185	1.0955	0.9715	1.0570	1.0075	1.2245	1.1700	1.3155	1.1815	1.1660	1.0470	0.9995	1.0150
1	0.0725	0.0750	0.0775	0.0805	1.1190	0.9650	0.2260	0.1630	0.9595	0.7355	0.8310	0.1240	1.3180	0.8975	0.8535	1.0035	1.4215	1.1205	0.9975	1.1205	1.1190	0.7780	0.8540	0.7840
1.5	0.0715	0.0730	0.0740	0.0795	1.0055	0.8340	0.1765	0.1765	1.2985	0.7985	0.7810	0.0960	1.3735	0.8885	0.7110	0.9010	1.3995	1.0955	0.8310	0.9510	1.4275	0.8775	0.7180	0.7585
2	0.0735	0.0750	0.0740	0.0710	0.7890	0.3330	0.1595	0.1450	0.7545	0.7775	0.5860	0.0905	1.1490	0.7810	0.6305	0.2300	1.2770	0.8445	0.6640	1.1695	1.0875	0.6065	0.5125	0.5170
2.5	0.0730	0.0670	0.0685	0.0730	0.1930	0.1395	0.1235	0.1445	0.3755	0.1110	0.1455	0.0925	0.6165	0.3080	0.7845	0.1895	0.7685	0.3200	0.8725	0.1930	0.8010	0.3230	0.5310	0.7990
35°C																								
0	0.0740	0.0750	0.0825	0.0855	1.2435	0.7410	0.2760	0.1965	1.2910	0.9670	0.4355	0.1205	1.3735	1.1735	0.6540	0.3365	1.3865	1.2330	0.8950	0.3730	1.3680	1.1730	0.9385	0.3930
1	0.0650	0.0765	0.0750	0.0795	1.2480	0.933	0.2320	0.1960	1.0240	0.8750	0.8490	0.0960	1.3970	1.0590	0.8345	0.3040	1.4165	1.0525	0.8930	0.3265	1.4240	0.9055	0.8635	0.2820
1.5	0.0705	0.0715	0.0735	0.0760	1.0695	0.9775	0.2080	0.2205	0.8275	1.2845	0.3735	0.0960	1.2370	1.2935	0.5395	0.2860	1.2980	1.3300	0.5985	1.0315	1.3745	1.3450	0.4865	0.5210
2	0.0725	0.0755	0.0830	0.0735	0.7785	0.2145	0.1910	0.1525	0.6240	0.5290	0.2185	0.0925	1.0750	0.7895	0.8945	0.2170	1.1850	1.0655	0.9605	0.2470	1.2750	1.1235	0.4840	0.2565
2.5	0.0760	0.0745	0.0760	0.0760	0.1755	0.1585	0.1395	0.1700	0.0955	0.9150	0.0875	0.0935	0.1805	0.1560	0.2750	0.1960	0.1770	0.5830	0.9335	0.1835	0.1880	0.5410	0.4260	0.0920

ตารางที่ 7 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 3)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0970	0.0940	0.0915	0.0950	0.8925	0.9075	0.8285	0.3385	0.8665	0.4755	0.7145	0.5870	0.9035	0.9555	1.0540	0.7020	0.9415	0.9570	1.0645	0.7450	0.8825	0.5050	0.5550	0.5210
1	0.0905	0.0840	0.0900	0.0895	0.4495	1.0310	0.8775	0.2690	0.4190	0.4360	0.7185	0.2080	0.9285	0.7680	0.8775	0.8750	0.8785	0.7175	0.8520	0.6895	0.3955	0.4200	0.5635	0.4820
1.5	0.0860	0.0860	0.0860	0.0890	0.4300	1.0095	0.6840	0.2695	0.3705	0.6410	0.8630	0.2390	0.8205	0.8630	0.9330	0.8655	0.7815	0.7415	0.9440	0.8645	0.3475	0.4345	0.8850	0.7670
2	0.0840	0.0825	0.0830	0.0855	0.3985	0.8165	0.4750	0.2630	0.3085	0.3945	0.5935	0.1615	0.7410	0.7720	0.8320	0.7715	0.7300	0.5300	0.8055	0.7415	0.3085	0.3270	0.5185	0.5655
2.5	0.0810	0.0810	0.0820	0.0825	0.3930	0.2665	0.3010	0.2310	0.4245	0.6115	0.6260	0.1325	0.6245	0.7570	0.7520	0.3340	0.6025	0.7280	0.7015	0.7705	0.3085	0.4450	0.5795	0.4910
30°C																								
0	0.0940	0.0970	0.0910	0.0920	0.8420	0.8930	0.6115	0.2615	0.8580	0.6190	0.7550	0.5370	0.9165	1.1995	1.1245	0.7975	0.9165	1.1915	1.129	0.8335	0.9105	0.5425	0.5855	0.5645
1	0.0840	0.0860	0.0890	0.0895	0.4845	1.0210	0.9565	0.1875	0.6445	0.7120	0.9335	0.4680	0.9980	1.2230	1.1320	0.7980	0.9960	1.1915	1.3400	0.7580	0.4250	0.4525	0.8935	0.5545
1.5	0.0845	0.0860	0.0825	0.0860	0.4020	1.015	0.8815	0.2635	0.6075	0.9540	0.9600	0.6025	1.0265	1.1310	1.0600	0.8815	1.0585	1.1185	1.0910	0.8810	0.4590	0.6460	0.9180	0.7050
2	0.0825	0.0815	0.0815	0.0825	0.3685	0.9355	0.6085	0.1630	0.4710	0.6385	0.6195	0.3125	0.8635	1.0960	0.8825	0.9855	0.9215	1.0615	0.8410	0.8760	0.4655	0.3705	0.4475	0.5615
2.5	0.0805	0.0805	0.0805	0.0810	0.3785	0.2940	0.2155	0.1305	0.4275	0.6970	0.5420	0.1500	0.6405	0.8500	0.8375	0.7450	0.6800	0.7625	0.7400	0.7565	0.5725	0.4965	0.4570	0.3880
35°C																								
0	0.0950	0.0935	0.0905	0.093	0.4245	0.5795	0.5180	0.2395	0.4655	0.4815	0.544	0.4305	0.5060	1.1110	0.6625	0.5130	0.5135	0.9440	0.6990	0.5310	0.5205	0.4865	0.5100	0.4750
1	0.0880	0.0835	0.0910	0.8800	0.7430	0.8080	0.7825	0.1905	0.8210	0.4650	0.7215	0.4350	1.0635	1.1565	0.7980	0.6585	0.9720	0.9275	0.7440	0.5135	0.8020	0.4115	0.5720	0.4280
1.5	0.0875	0.0850	0.0870	0.0860	0.9205	0.9670	0.5430	0.3280	0.9445	0.9705	0.8555	0.5430	1.0080	1.0830	0.9425	0.6925	0.9590	0.8835	0.7770	0.6130	0.9180	0.5915	0.6420	0.4750
2	0.0815	0.0875	0.0825	0.0855	0.7170	0.7905	0.1945	0.1660	0.7415	0.4610	0.4835	0.2110	0.9165	0.8305	0.6680	0.7080	0.8710	0.6450	0.5260	0.5205	0.7450	0.3105	0.3165	0.3025
2.5	0.0825	0.0835	0.0860	0.0845	0.3895	0.4125	0.1990	0.1350	0.5620	0.5365	0.5140	0.1410	0.6650	0.5965	0.7110	0.5645	0.6325	0.5685	0.6085	0.5440	0.6030	0.4735	0.4545	0.2950

ตารางที่ 8 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0875	0.0877	0.0870	0.0902	0.9540	1.0943	0.7292	0.4508	0.9500	1.0246	1.0420	0.5820	0.9863	1.1632	1.1526	0.9375	1.0255	1.1667	1.1678	1.0148	0.9958	1.003	0.9667	0.8998
1	0.0907	0.0932	0.0930	0.0855	0.5555	1.0303	0.6975	0.3653	0.7318	0.7366	0.9794	0.3794	0.8763	0.8448	0.9863	0.8217	0.9815	0.8160	1.0025	0.8363	0.6682	0.6566	0.9223	0.7418
1.5	0.0817	0.0812	0.0815	0.0860	0.5187	0.8032	0.6598	0.3710	0.8198	0.8460	0.8732	0.4385	1.0317	0.9303	0.9870	0.7147	1.0102	0.8866	1.0195	0.9558	0.8673	0.8147	0.9722	0.8637
2	0.0815	0.0800	0.0790	0.0822	0.3843	0.5697	0.5075	0.2878	0.5792	0.6065	0.5858	0.3510	0.8370	0.7512	0.9247	0.5842	0.8692	0.6768	0.9603	0.6165	0.6632	0.5508	0.8075	0.6457
2.5	0.0757	0.0792	0.0815	0.0782	0.3527	0.2238	0.4170	0.2600	0.5858	0.5515	0.5377	0.3285	0.8390	0.8033	0.8023	0.4295	0.8615	0.7942	0.8385	0.6177	0.7002	0.6975	0.7427	0.6128
30°C																								
0	0.0838	0.0840	0.0862	0.0860	0.9398	0.9797	0.7517	0.3727	0.9860	0.9493	0.9260	0.7985	1.0235	1.1837	1.0895	0.9917	1.0675	1.2572	1.2308	1.0827	1.0447	0.9558	0.9185	0.9318
1	0.0765	0.0782	0.0812	0.0833	0.4840	1.0200	0.9410	0.1830	0.8642	0.8808	0.9603	0.5268	1.1332	1.1172	1.0472	0.9483	1.1470	1.1957	1.1282	1.0028	0.8542	0.8198	0.9670	0.808
1.5	0.0758	0.0782	0.0773	0.0805	0.6613	0.9720	0.7055	0.3818	0.9178	0.9453	0.9263	0.5060	1.1025	1.0463	0.9998	0.8965	1.1302	1.1283	1.0620	0.9277	0.9145	0.8775	0.9648	0.8112
2	0.0758	0.0766	0.0773	0.0758	0.3640	0.9240	0.5140	0.156	0.6626	0.7867	0.7610	0.4413	0.9513	0.949	0.8748	0.7338	1.0213	0.9785	0.9063	1.0327	0.7810	0.6512	0.6958	0.7060
2.5	0.0735	0.0688	0.0740	0.0762	0.3308	0.2217	0.3877	0.2515	0.4792	0.4738	0.5157	0.3273	0.6620	0.5938	0.8473	0.5702	0.7475	0.5737	0.8635	0.5915	0.6937	0.4912	0.6308	0.6637
35°C																								
0	0.0850	0.0856	0.0862	0.0888	0.8202	0.7970	0.4323	0.3227	0.8835	0.8797	0.5582	0.4527	0.9320	1.1767	0.7005	0.566	0.9413	1.1517	0.8247	0.5873	0.9347	0.9832	0.8147	0.5648
1	0.0795	0.0806	0.0818	0.0835	0.9770	0.9290	0.5870	0.3930	0.9742	0.8180	0.8472	0.4668	1.1830	1.1095	0.9035	0.6285	1.1497	1.0242	0.9015	0.5998	1.0777	0.7877	0.8360	0.5562
1.5	0.0778	0.0795	0.0803	0.0815	0.9430	0.9613	0.5072	0.3547	0.9192	1.0968	0.7022	0.4077	1.0815	1.1142	0.8138	0.5391	1.0742	1.0825	0.7817	0.7628	1.0702	0.9805	0.6922	0.5427
2	0.0767	0.0830	0.0813	0.0777	0.7512	0.6363	0.3887	0.2873	0.7475	0.6623	0.5180	0.3287	0.9612	0.8772	0.8328	0.544	0.9797	0.8997	0.8147	0.5017	0.9585	0.7983	0.5801	0.4243
2.5	0.0778	0.0728	0.0788	0.0790	0.3265	0.2987	0.3083	0.2653	0.3980	0.5692	0.4207	0.2442	0.4797	0.6385	0.5622	0.4547	0.4647	0.7717	0.7460	0.4850	0.4513	0.7158	0.5268	0.3478

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

Lactobacillus curvatus

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0945	0.8800	0.1060	0.1050	0.5440	0.0349	0.1465	0.3015	0.7460	0.4495	0.1350	0.1785	0.8250	0.4865	0.3500	0.1405	0.9125	0.5060	0.4765	0.1560	0.9165	0.4735	0.5340	0.2830
1	0.1030	0.1045	0.0975	0.0970	0.2980	0.3445	0.2405	0.3115	0.8670	0.5925	0.4450	0.2725	0.9785	0.4985	0.7490	0.1900	0.9795	0.4305	0.7080	0.1545	0.7975	0.3850	0.6550	0.1410
1.5	0.0930	0.0940	0.0950	0.0950	0.1770	0.2985	0.2115	0.2390	0.8295	0.9940	0.2370	0.2630	0.9025	1.0450	0.6645	0.1860	0.8255	0.9210	0.6490	0.1605	0.7945	0.8715	0.5975	0.2190
2	0.0935	0.0930	0.0910	0.0915	0.1680	0.1695	0.1700	0.2400	0.9000	0.4610	0.1320	0.2205	0.9160	0.6660	0.5000	0.2295	0.9740	0.5990	0.4640	0.3970	0.9820	0.5525	0.3670	0.3870
2.5	0.0930	0.0935	0.0940	0.1000	0.1470	0.1440	0.1295	0.2125	0.3680	0.5070	0.1335	0.1300	0.4732	0.6935	0.1830	0.1195	0.7160	0.6445	0.3030	0.1145	0.5850	0.5655	0.3700	0.2185
30°C																								
0	0.0960	0.0915	0.1405	0.1070	1.0115	0.6275	0.3825	0.3705	1.1315	0.7290	0.5115	0.2700	1.1275	0.7330	0.5580	0.2845	1.1450	0.7340	0.5675	0.2935	1.1505	0.7320	0.5865	0.4705
1	0.1030	0.0960	0.0970	0.1000	0.7505	0.6020	0.4820	0.2545	0.8775	1.1275	0.5090	0.2030	0.7815	1.1385	0.5115	0.2070	0.7190	1.1570	0.5175	0.2740	0.6090	1.1585	0.5150	0.4620
1.5	0.0955	0.0955	0.0970	0.0980	0.3130	0.4580	0.2100	0.3045	1.1310	0.9805	0.4980	0.2970	1.3505	0.9210	0.4825	0.3215	1.5560	0.9035	0.4775	0.3870	1.8995	0.6205	0.4635	0.4725
2	0.0930	0.0925	0.0950	0.0950	0.1345	0.1265	0.1525	0.1480	0.7985	0.8400	0.4515	0.1720	1.2835	0.9140	0.4985	0.4160	1.1855	0.7885	0.5065	0.3900	1.1830	0.7460	0.4955	0.3765
2.5	0.0955	0.0965	0.0965	0.0995	0.1905	0.1210	0.1000	0.1420	1.1190	1.1870	0.1935	0.1205	1.2025	1.0365	0.4820	0.3330	1.1960	1.3160	0.4455	0.3430	1.2130	1.2920	0.4270	0.3240
35°C																								
0	0.0940	0.0890	0.1030	0.1065	1.1460	0.4770	0.5355	0.4775	1.3310	0.4780	0.5430	0.4965	1.3265	0.4740	0.5640	0.4860	1.2655	0.4670	0.5785	0.3765	1.2550	0.4695	0.5585	0.3245
1	0.0985	0.0960	0.0965	0.1005	1.1680	0.7655	0.6440	0.4645	1.2610	1.2290	0.6315	0.4385	1.4015	1.2305	0.6435	0.3880	1.4895	1.0980	0.6365	0.2795	1.4865	0.6620	0.6085	0.4005
1.5	0.0945	0.0970	0.0990	0.0985	0.5200	0.5855	0.1450	0.3295	1.1590	1.2450	0.3790	0.3575	1.5045	1.7080	0.4175	0.3545	1.5815	1.4661	0.4070	0.3270	1.6120	1.7380	0.3775	0.3000
2	0.0935	0.0940	0.0990	0.0920	0.2410	0.1235	0.1160	0.1175	1.0695	1.0205	0.4200	0.3315	1.2020	1.2385	0.4320	0.3970	1.2130	1.1645	0.4025	0.3775	1.2220	1.4730	0.3245	0.3610
2.5	0.0930	0.0950	0.0945	0.0970	0.5690	0.2525	0.1040	0.1140	1.1490	1.4655	0.1455	0.1945	1.1825	1.7495	0.8335	0.3515	1.3435	1.7435	0.5010	0.4515	1.2590	1.7415	0.3445	0.3290

ตารางที่ 10 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0940	0.0890	0.1025	0.1030	0.6800	0.3855	0.1490	0.3485	0.9000	0.4785	0.1285	0.1935	0.9980	0.5155	0.3485	0.1455	0.9880	0.5215	0.4730	0.1405	0.9595	0.5085	0.5275	0.1945
1	0.1205	0.0985	0.1005	0.1005	0.3315	0.3425	0.2175	0.3375	0.9630	0.7050	0.5010	0.2780	0.9945	0.5525	0.7585	0.1925	0.9695	0.4855	0.7145	0.1695	0.8380	0.4375	0.6910	0.2795
1.5	0.0940	0.1095	0.0970	0.0975	0.1975	0.3075	0.2280	0.3010	0.9570	1.0725	0.2775	0.2740	1.1890	1.1380	0.7470	0.1960	1.1290	1.0050	0.7280	0.1955	0.9595	0.9100	0.7260	0.3715
2	0.0930	0.0920	0.0915	0.0890	0.1380	0.1815	0.1670	0.2330	0.5690	0.5120	0.1275	0.2260	0.6935	0.7370	0.5385	0.3130	0.6260	0.7135	0.5355	0.4685	1.0545	0.6480	0.4735	0.4555
2.5	0.0940	0.0950	0.0940	0.0960	0.1225	0.1620	0.1130	0.1845	0.8685	0.5210	0.1390	0.1480	0.8595	0.6685	0.1805	0.1195	0.8605	0.6710	0.2080	0.2130	0.8655	0.6310	0.4455	0.3210
30°C																								
0	0.0945	0.0900	0.1040	0.1050	1.1875	0.9920	0.3370	0.3665	1.2960	1.0195	0.5030	0.2860	1.3065	1.0210	0.5335	0.3100	1.3110	1.0285	0.5390	0.3160	1.2950	1.0255	0.555	0.334
1	0.1035	0.0975	0.1000	0.1010	0.8215	0.6570	0.4290	0.3415	1.0855	1.0810	0.4925	0.2870	1.0405	1.1370	0.5175	0.2655	1.0045	1.1545	0.5225	0.2775	0.9285	1.1610	0.5295	0.4635
1.5	0.0940	0.1000	0.0950	0.0985	0.3085	0.6925	0.2495	0.3515	1.3220	1.0435	0.5055	0.3545	1.3545	1.1060	0.5530	0.4535	1.3945	1.1700	0.5560	0.5720	1.3760	1.1625	0.5190	0.5930
2	0.1050	0.0925	0.0925	0.0920	0.2085	0.1575	0.1595	0.1740	1.1270	0.6635	0.5480	0.2355	1.2315	0.6800	0.5970	0.4785	1.2790	0.6350	0.6210	0.4670	1.3220	0.6215	0.6195	0.4555
2.5	0.0925	0.0945	0.0935	0.0975	0.3960	0.1610	0.1000	0.1550	1.1350	1.1655	0.2315	0.1390	1.1770	1.2580	0.6810	0.4030	1.2460	1.3155	0.6085	0.4000	0.8445	1.2990	0.4210	0.3575
35°C																								
0	0.0885	0.1875	0.1030	0.1060	1.1850	0.5260	0.5530	0.5080	0.5712	0.6974	0.5030	0.3654	1.3445	0.5195	0.5945	0.5240	1.3145	0.5115	0.5945	0.4590	1.1960	0.5160	0.5985	0.3445
1	0.1035	0.0965	0.0970	0.1020	1.0280	0.7865	0.5550	0.5100	1.5450	1.2150	0.5385	0.4770	1.9230	1.1955	0.5630	0.4050	1.0135	1.2165	0.5310	0.2820	1.5550	1.1825	0.5515	0.3600
1.5	0.0920	0.0940	0.0975	0.0980	0.6520	0.6920	0.2015	0.2560	0.4904	1.0767	0.4928	0.3750	1.0950	1.3915	0.4335	0.2890	1.2065	1.6860	0.4345	0.2815	1.2460	1.8175	0.4410	0.4695
2	0.0930	0.0915	0.0915	0.0885	0.3555	0.1640	0.1175	0.1245	1.0310	1.3530	0.3950	0.3830	1.1795	1.5770	0.4375	0.4585	1.1195	1.5080	0.4115	0.4885	1.1920	1.5735	0.3800	0.4520
2.5	0.0940	0.0960	0.0955	0.9900	0.6215	0.2455	0.1050	0.1115	1.0035	0.8185	0.4879	0.2833	1.5100	1.2015	0.7620	0.3340	1.6685	1.2185	0.3950	0.3430	1.5055	1.6050	0.4232	0.3240

ตารางที่ 11 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (ซ้ำที่ 3)

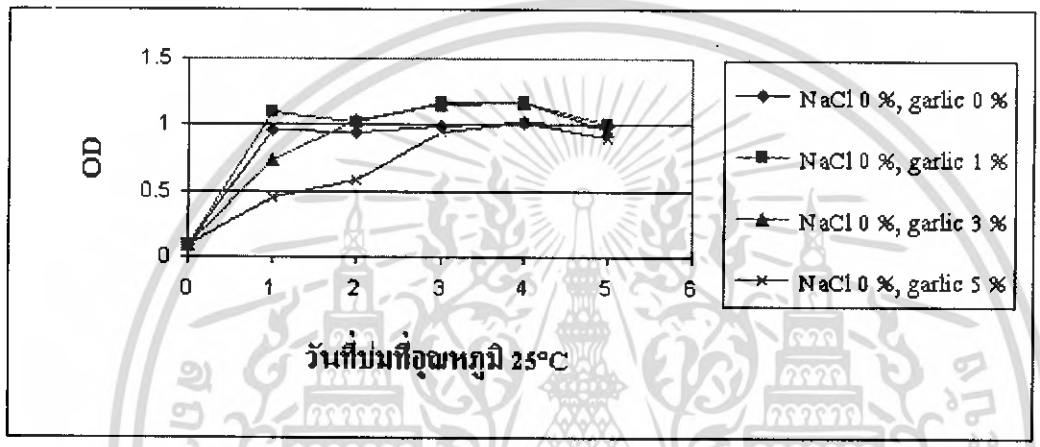
ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ซ้ำที่ 3																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0890	0.0890	0.0965	0.1070	0.6980	0.4030	0.1580	0.3475	0.9220	0.4945	0.1450	0.1925	0.9770	0.5265	0.3570	0.1460	1.0180	0.5440	0.4670	0.1395	0.9965	0.5185	0.5135	0.1985
1	0.1025	0.0980	0.0950	0.1005	0.2725	0.3010	0.2140	0.3655	0.9030	0.6555	0.4100	0.2935	1.0020	0.5500	0.8620	0.1990	0.9765	0.4945	0.8575	0.1640	0.592	0.3915	0.7930	0.1510
1.5	0.0895	0.0955	0.0930	0.0945	0.1780	0.3000	0.2070	0.2640	0.9360	1.0230	0.2700	0.2400	1.1125	1.0910	0.7160	0.1750	1.0470	1.0605	0.7005	0.1560	0.9365	1.0270	0.6610	0.2045
2	0.0955	0.0895	0.0925	0.0880	0.1515	0.1590	0.1800	0.1985	0.6010	0.4475	0.1370	0.1845	0.8980	0.7245	0.5820	0.2490	1.0465	0.7410	0.6385	0.4890	0.9775	0.5950	0.5845	0.4470
2.5	0.0925	0.0940	0.0945	0.0935	0.1440	0.1595	0.1135	0.1740	0.9205	0.6905	0.1440	0.1405	1.2345	0.6845	0.1905	0.1175	1.1625	0.6845	0.2115	0.1740	1.2500	0.5660	0.3705	0.2310
30°C																								
0	0.0885	0.0945	0.1035	0.1030	1.0090	0.8350	0.3940	0.3120	1.2675	1.0170	0.4720	0.2745	1.1180	1.0390	0.5140	0.2670	1.1385	1.0585	0.4970	0.2680	1.1555	1.0845	0.5000	0.2735
1	0.0890	0.0950	0.1010	0.1005	0.7415	0.7080	0.4495	0.3235	0.8525	1.0480	0.5415	0.2720	0.7890	1.0795	0.5270	0.2525	0.7565	1.1300	0.5250	0.3475	0.7295	1.2040	0.5145	0.4715
1.5	0.0945	0.0945	0.1005	0.0970	0.2265	0.4510	0.2040	0.2695	1.1850	0.8385	0.6110	0.3020	1.1075	0.8150	0.7380	0.5160	1.1305	0.8735	0.7795	0.5450	1.0965	0.8835	0.8010	0.5775
2	0.0910	0.0930	0.0965	0.0930	0.1385	0.1245	0.1575	0.1635	1.0005	0.694	0.5005	0.2695	1.2685	0.7055	0.5715	0.5065	1.2010	0.6815	0.5885	0.4945	1.1640	0.6355	0.6085	0.4885
2.5	0.0945	0.0955	0.0960	0.0980	0.3335	0.1375	0.1005	0.1450	0.9690	1.2015	0.2190	0.1335	0.9970	1.3180	0.4915	0.3455	1.0510	1.3230	0.4410	0.3625	0.9730	1.2975	0.3940	0.3320
35°C																								
0	0.0930	0.0895	0.1040	0.1085	1.2835	0.4570	0.5590	0.4305	1.3885	0.4355	0.565	0.4495	1.3765	0.4325	0.5810	0.4510	1.3275	0.4270	0.5945	0.4130	1.2370	0.5085	0.5735	0.2995
1	0.0975	0.0955	0.0985	0.1000	0.9590	0.7040	0.6490	0.4505	1.8780	1.2520	0.6245	0.4165	1.8145	1.2550	0.6495	0.3765	1.8550	1.2520	0.6595	0.3155	1.6970	0.8250	0.5790	0.4140
1.5	0.0955	0.0960	0.0990	0.0980	0.6265	0.4730	0.2035	0.3125	1.0775	1.3275	0.3595	0.3110	1.3740	1.1615	0.3895	0.3140	1.5615	1.3845	0.4020	0.3035	1.3280	1.7345	0.4085	0.3775
2	0.0890	0.0900	0.0950	0.0950	0.3910	0.0950	0.1255	0.1155	1.0790	0.9710	0.4690	0.3955	1.1520	1.2705	0.4645	0.4895	1.1975	1.3115	0.3210	0.5110	1.2055	1.8175	0.3470	0.4195
2.5	0.1115	0.0985	0.0975	0.1020	0.6590	0.1590	0.1030	0.1165	1.2795	1.3450	0.2045	0.1895	1.2020	1.5065	1.0360	0.3340	1.5045	1.5040	1.0335	0.3550	1.5555	1.6255	0.4250	0.3160

ตารางที่ 12 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C (เฉลี่ย)

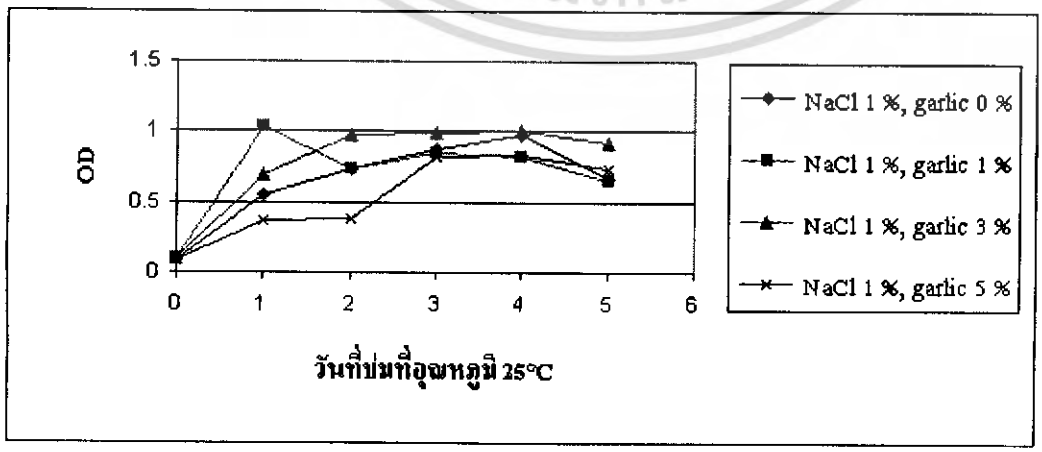
ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	0.0925	0.0887	0.1017	0.1050	0.6407	0.3790	0.1512	0.3325	0.8560	0.4742	0.1362	0.1882	0.9333	0.5095	0.3518	0.1440	0.9728	0.5238	0.4722	0.1453	0.9575	0.5002	0.5250	0.2253
1	0.1027	0.1003	0.0977	0.0993	0.3007	0.3293	0.2240	0.3382	0.9110	0.6510	0.4520	0.2813	0.9917	0.5337	0.7898	0.1938	0.9752	0.4702	0.7600	0.1627	0.7425	0.4047	0.7130	0.1905
1.5	0.0922	0.0997	0.0950	0.0957	0.1842	0.3020	0.2155	0.2680	0.9075	1.0298	0.5215	0.2590	1.0680	1.0913	0.7092	0.1857	1.0005	0.9955	0.6925	0.1707	0.8968	0.9362	0.6615	0.2650
2	0.0940	0.0915	0.0917	0.0895	0.1525	0.1700	0.1723	0.2238	0.6900	0.4735	0.1322	0.2103	0.8358	0.7092	0.5402	0.2638	0.8822	0.6845	0.5460	0.4515	1.0047	0.5985	0.4750	0.4298
2.5	0.0932	0.0942	0.0942	0.0965	0.1378	0.1552	0.1187	0.1903	0.7190	0.5728	0.1388	0.1395	0.8558	0.6822	0.1847	0.1188	0.9130	0.6667	0.2408	0.1672	0.9002	0.5875	0.3953	0.2568
30°C																								
0	0.0905	0.0865	0.1010	0.1023	1.0693	0.8182	0.3712	0.3497	1.2317	0.9218	0.4955	0.2768	1.1840	0.931	0.5352	0.2872	1.1982	0.9403	0.5345	0.2925	1.2003	0.9473	0.5472	0.3593
1	0.0985	0.0962	0.0993	0.1005	0.7712	0.6557	0.4535	0.3065	0.9385	1.0855	0.5143	0.2540	0.8703	1.1183	0.5187	0.2417	0.8267	1.1472	0.5217	0.2997	0.7557	1.1745	0.5197	0.4657
1.5	0.0912	0.0930	0.0928	0.0942	0.2827	0.5338	0.2212	0.3085	1.2127	0.9542	0.5382	0.3178	1.2708	0.9473	0.5912	0.4303	1.3603	0.9823	0.6043	0.5013	1.4573	0.8888	0.5945	0.5477
2	0.0963	0.0927	0.0947	0.0933	0.1605	0.1362	0.1565	0.1618	0.9753	0.7325	0.5000	0.2257	1.2612	0.7665	0.5557	0.4670	1.2218	0.7017	0.5720	0.4505	1.2230	0.6677	0.5745	0.4402
2.5	0.0942	0.0955	0.0953	0.0983	0.3067	0.1398	0.1002	0.1473	1.0743	1.1847	0.2147	0.1310	1.1255	1.2942	0.5515	0.3607	1.1643	1.3182	0.4983	0.3685	1.4820	1.2570	0.4240	0.3200
35°C																								
0	0.0918	0.1220	0.1033	0.1070	1.2048	0.4867	0.5492	0.4720	1.3422	0.4778	0.5538	0.4863	1.3492	0.4753	0.5798	0.4870	1.3025	0.4685	0.5892	0.4162	1.2293	0.498	0.5768	0.3228
1	0.0998	0.0960	0.0973	0.1008	1.0517	0.7520	0.6160	0.4750	1.5613	1.2320	0.5982	0.4440	1.7130	1.2270	0.6187	0.3898	1.7860	1.1888	0.609	0.2923	1.5795	0.8898	0.5797	0.3915
1.5	0.0940	0.0957	0.0985	0.0983	0.5995	0.5835	0.1833	0.2993	1.0665	1.3007	0.3763	0.3265	1.3245	1.4203	0.4135	0.3192	1.4498	1.5772	0.4145	0.3040	1.3953	1.7633	0.4090	0.3823
2	0.0918	0.0918	0.0952	0.0918	0.3292	0.1275	0.1197	0.1192	1.0598	1.1148	0.4280	0.3700	1.1778	1.3260	0.4447	0.4483	1.1767	1.3280	0.3783	0.4590	1.2065	1.6213	0.3505	0.4108
2.5	0.0995	0.0965	0.0958	0.0993	0.6165	0.2190	0.1040	0.1140	1.2503	1.2643	0.1812	0.1875	1.2982	1.4858	0.8772	0.3398	1.5055	1.4887	0.6432	0.3832	1.4400	1.6573	0.3977	0.3230

ตารางที่ 13 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25°C

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0875±0.01A[a]	0.9540±0.12A	0.9500±0.13A	0.9863±0.01A	1.0255±0.17A	0.9958±0.15A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.0877±0.01A	1.0943±0.16A	1.0246±0.40A	1.1632±0.19A	1.1667±0.14A	1.0030±0.46A
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.0870±0.00A	0.7292±0.31AB	1.0420±0.26A	1.1526±0.15A	1.1678±0.12A	0.9667±0.37A
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.0902±0.01A	0.4508±0.30B	0.5820±0.42A	0.9375±0.24A	1.0148±0.24A	0.8998±0.35A

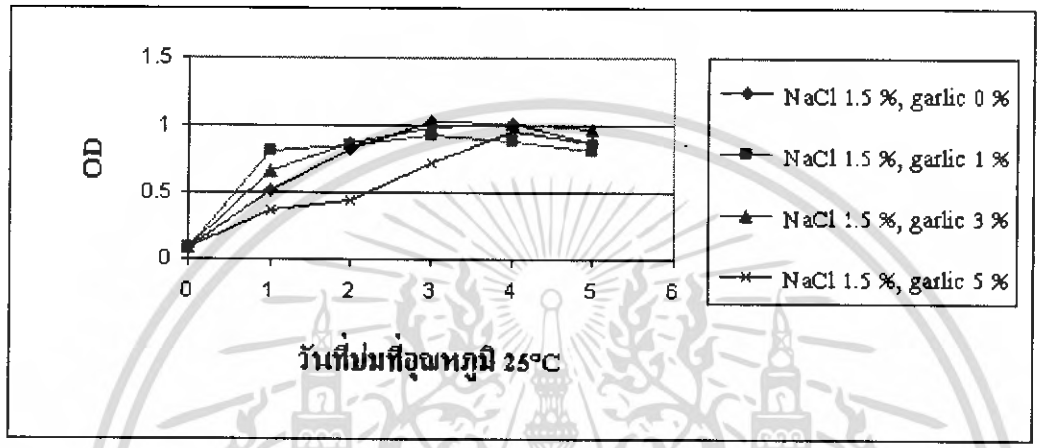


ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.0907±0.01A	0.5555±0.10AB	0.7318±0.29A	0.8763±0.25A	0.9815±0.09A	0.6682±0.33A
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.0932±0.01A	1.0303±0.03A	0.7366±0.31A	0.8448±0.26A	0.8160±0.08A	0.6566±0.32A
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0930±0.01A	0.6975±0.42AB	0.9794±0.21A	0.9863±0.18A	1.0025±0.17A	0.9223±0.36A
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.0855±0.00A	0.3653±0.22B	0.3794±0.35A	0.8217±0.11A	0.8363±0.13A	0.7418±0.26A

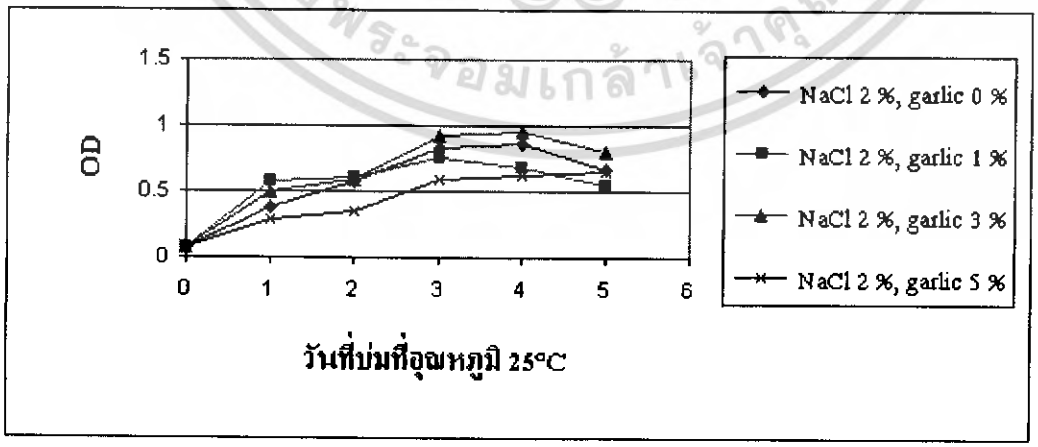


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0817±0.00A	0.5187±0.08A	0.8198±0.43A	1.0317±0.26A	1.0102±0.28A	0.8673±0.49A
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.0812±0.01A	0.8032±0.34A	0.8460±0.18A	0.9303±0.06A	0.8866±0.13A	0.8147±0.33A
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0815±0.01A	0.6598±0.44A	0.8732±0.29A	0.9870±0.26A	1.0195±0.24A	0.9722±0.32A
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0860±0.01A	0.3710±0.29A	0.4385±0.48A	0.7147±0.44A	0.9558±0.11A	0.8637±0.16A



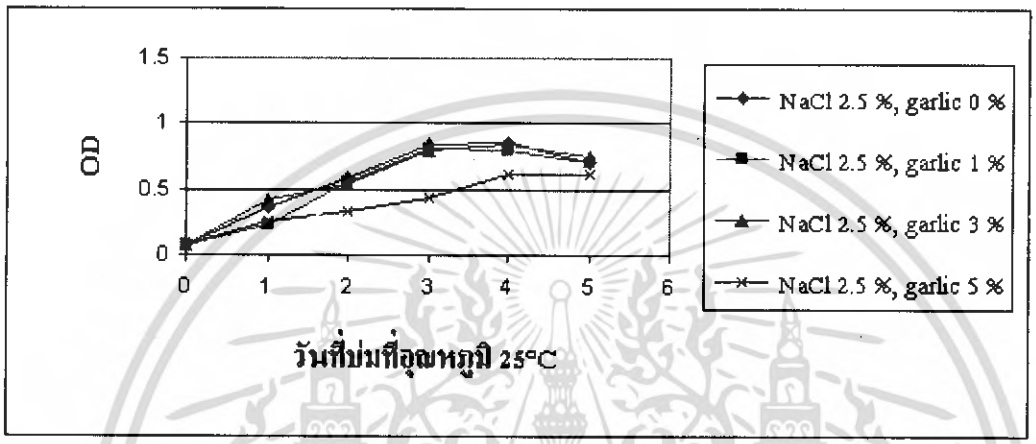
ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0815±0.00A	0.3843±0.10A	0.5792±0.24A	0.8370±0.09A	0.8692±0.14A	0.6632±0.31A
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0800±0.00A	0.5697±0.27A	0.6065±0.18A	0.7512±0.03A	0.6768±0.13A	0.5508±0.19A
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0790±0.00A	0.5075±0.38A	0.5858±0.47A	0.9247±0.19A	0.9603±0.17A	0.8075±0.37A
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0822±0.01A	0.2878±0.14A	0.3510±0.40A	0.5842±0.44A	0.6165±0.41A	0.6457±0.33A



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0757±0.01A	0.3527±0.13A	0.5858±0.14A	0.8390±0.24A	0.8615±0.25A	0.7002±0.35A
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0792±0.01A	0.2238±0.04A	0.5515±0.33A	0.8033±0.04A	0.7942±0.17A	0.6975±0.29A
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0815±0.00A	0.4170±0.32A	0.5377±0.10A	0.8023±0.10A	0.8385±0.06A	0.7427±0.24A
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.0782±0.00A	0.2600±0.11A	0.3285±0.38A	0.4295±0.42A	0.6177±0.39A	0.6128±0.27A

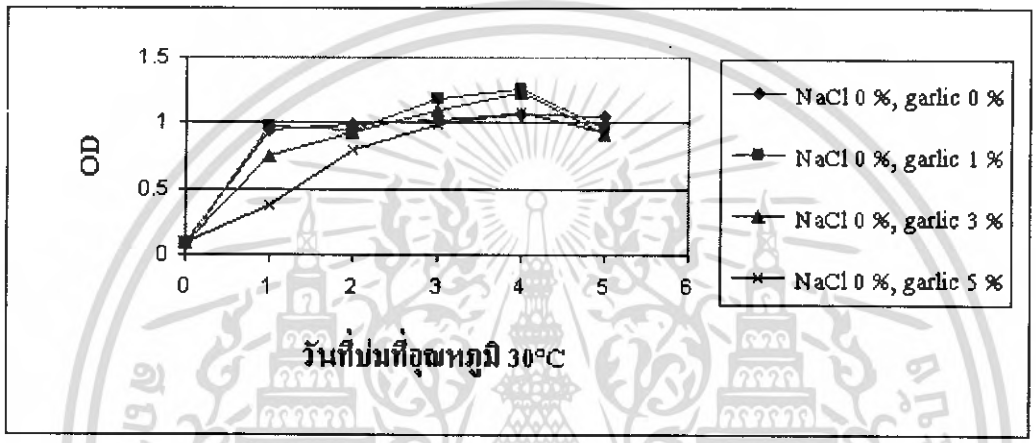
" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



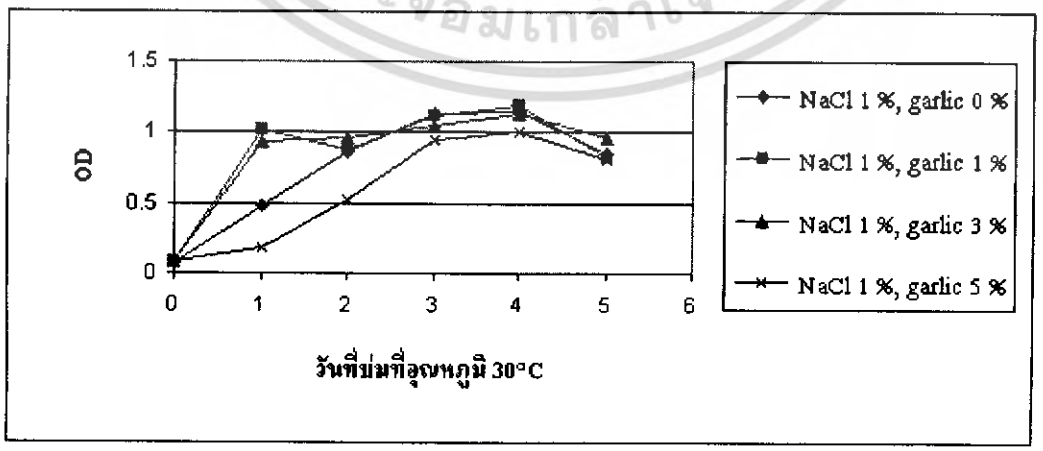
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 30°C

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0838±0.01A[a]	0.9398±0.09A	0.9860±0.11A	1.0235±0.09A	1.0675±0.15A	1.0447±0.12A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.0840±0.01A	0.9797±0.15A	0.9493±0.34A	1.1837±0.20A	1.2572±0.13A	0.9558±0.38A
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.0862±0.00A	0.7517±0.12A	0.9260±0.16A	1.0895±0.03A	1.2308±0.09A	0.9185±0.30A
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.0860±0.01A	0.3727±0.24B	0.7985±0.23A	0.9917±0.19A	1.0827±0.22A	0.9318±0.33A

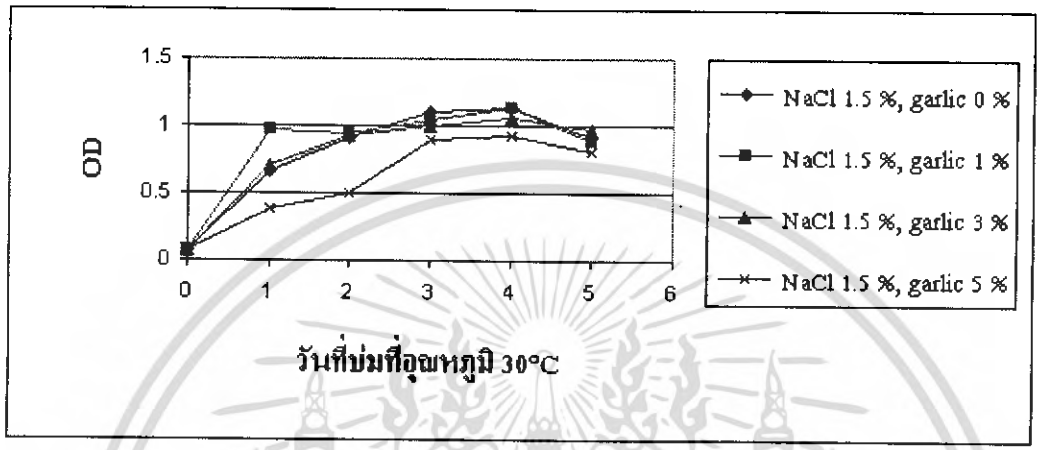


ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.0765±0.01A	0.4840±0.32A	0.8642±0.19A	1.1332±0.17A	1.147±0.24A	0.8542±0.37A
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.0782±0.01A	1.0200±0.12A	0.8808±0.27A	1.1172±0.19A	1.1957±0.08A	0.8198±0.39A
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0812±0.40A	0.9410±0.47A	0.9603±0.11A	1.0472±0.17A	1.1282±0.18A	0.9670±0.16A
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.0833±0.00A	0.1830±0.44A	0.5268±0.43A	0.9483±0.14A	1.0028±0.21A	0.8080 ±0.27A

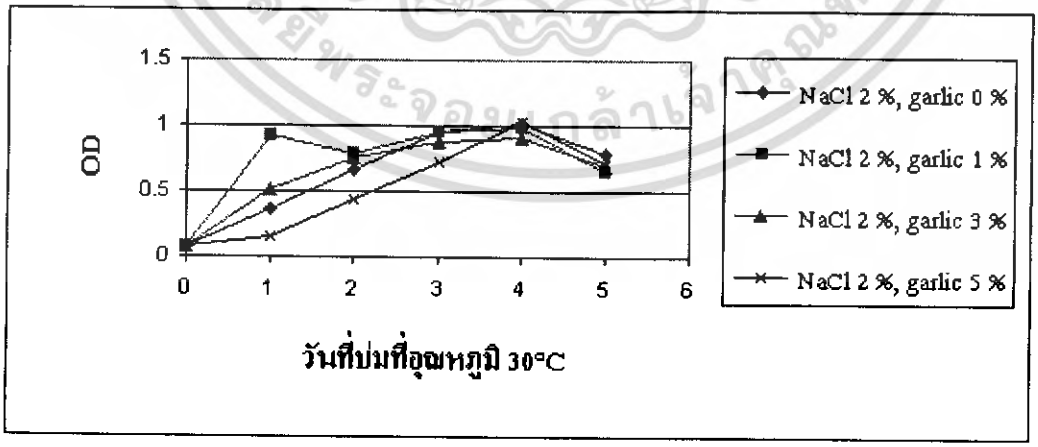


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0758±0.01A	0.6613±0.31A	0.9178±0.35A	1.1025±0.24A	1.1302±0.24A	0.9145±0.49A
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.0782±0.01A	0.9720±0.12A	0.9453±0.14A	1.0463±0.14A	1.1283±0.04A	0.8775±0.23A
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0773±0.00A	0.7055±0.47A	0.9263±0.18A	0.9998±0.26A	1.0620±0.22A	0.9648±0.27A
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0805±0.00A	0.3818±0.28A	0.5060±0.37A	0.8965±0.01A	0.9277±0.04A	0.8112±0.14A



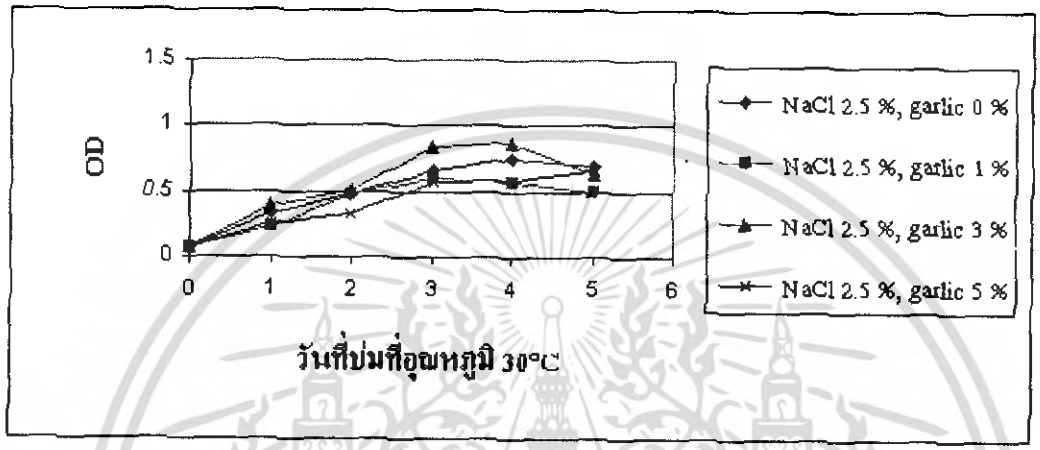
ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0758±0.00A	0.3640±0.22A	0.6626±0.19A	0.9513±0.26A	1.0213±0.22A	0.7810±0.31A
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0766±0.00A	0.9240±0.38A	0.7867±0.12A	0.9490±0.09A	0.9785±0.11A	0.6512±0.31A
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0773±0.00A	0.5140±0.50A	0.7610±0.30A	0.8748±0.24A	0.9063±0.28A	0.6958±0.37A
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0758±0.00A	0.1560±0.34A	0.4413±0.46A	0.7338±0.44A	1.0327±0.15A	0.7060±0.29A



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของกลือ	วันที่					
และสารสกัดกระเทียม	0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0735±0.01A	0.3308 0.12A	0.4792±0.14A	0.6620±0.06A	0.7475±0.06A	0.6937±0.11A
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0688±0.01A	0.2217±0.08A	0.4738±0.31A	0.5938±0.27A	0.5737±0.23A	0.4912±0.16A
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0740±0.01A	0.3877±0.38A	0.5157±0.36A	0.8473±0.07A	0.8635±0.12A	0.6308±0.24A
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.0762±0.00A	0.2515±0.20A	0.3273±0.30A	0.5702±0.33A	0.5915±0.35A	0.6637±0.24A

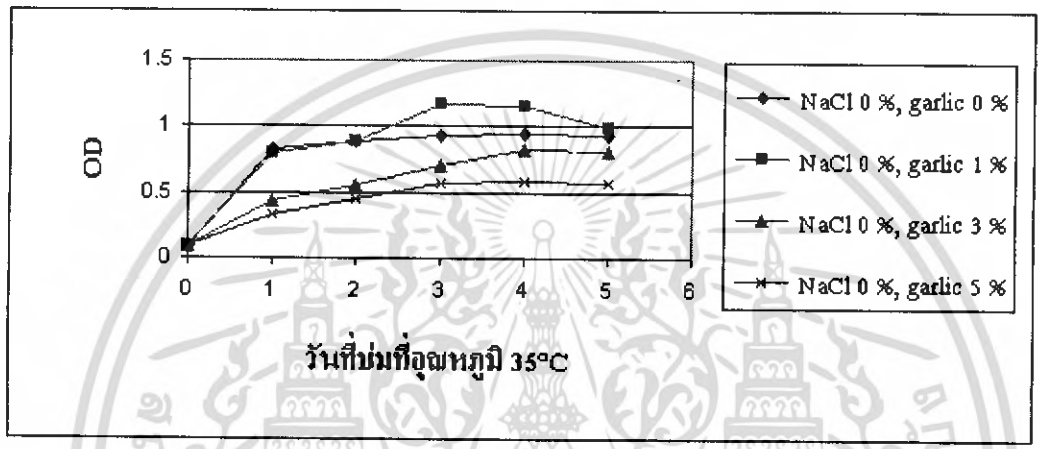
" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



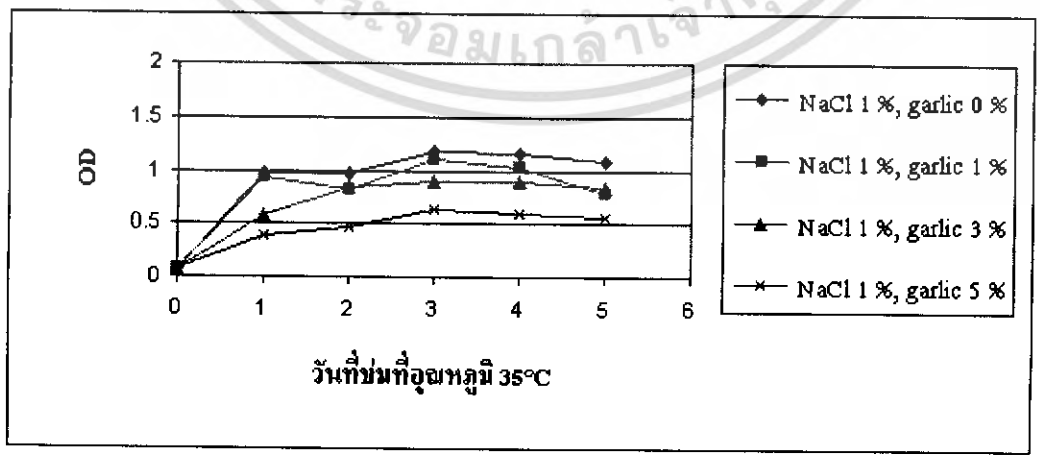
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 35°C

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0850±0.01A	0.8202±0.41A	0.8835±0.41A	0.9320±0.43AB	0.9413±0.44AB	0.9347±0.42A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.0856±0.01A	0.7970±0.25A	0.8797±0.36A	1.1767±0.07A	1.1517±0.18A	0.9832±0.43A
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.0862 0.00A	0.4323±0.14A	0.5582±0.13A	0.7005±0.07AB	0.8247±0.11AB	0.8147±0.26A
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.0888±0.00A	0.3227±0.18A	0.4527±0.35A	0.5660±0.26B	0.5873±0.25B	0.5648±0.23A

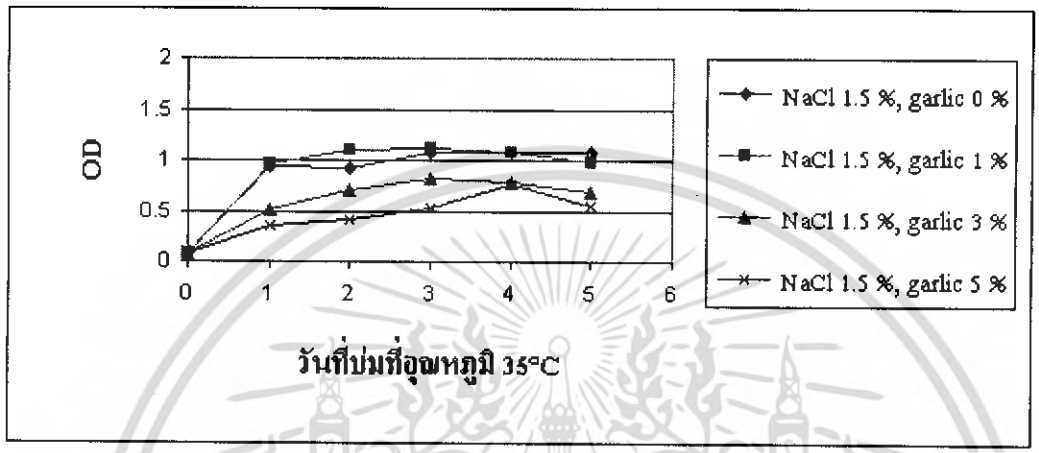


ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.0795±0.01A	0.9770±0.25A	0.9742±0.13A	1.183±0.19A	1.1497±0.23A	1.0777±0.32A
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.0806±0.00A	0.9290±0.11A	0.818±0.33A	1.1095±0.05A	1.0242±0.09AB	0.7877±0.33A
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0818±0.01A	0.5870±0.31AB	0.8472±0.12A	0.9035±0.15AB	0.9015±0.16AB	0.8360±0.25A
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.0835±0.46A	0.3930±0.34B	0.4668±0.38A	0.6285±0.31B	0.5998±0.32B	0.5562±0.36A

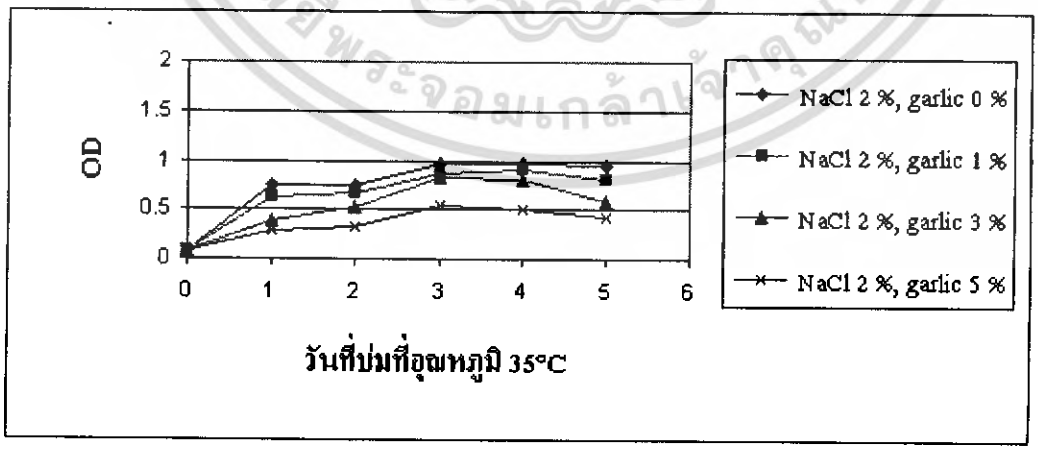


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0778±0.01A	0.943±0.11B	0.9192±0.08A	1.0815±0.13A	1.0742±0.19A	1.0702±0.26A
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.0795±0.01A	0.9613±0.02B	1.0968±0.17A	1.1142±0.13A	1.0825±0.23A	0.9805±0.38AB
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0803±0.01A	0.5072±0.28A	0.7022±0.28AB	0.8138±0.24AB	0.7817±0.18A	0.6922±0.23AB
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0815±0.00A	0.3547±0.15A	0.4077±0.27B	0.5391±0.22B	0.7628±0.23A	0.5427±0.08B



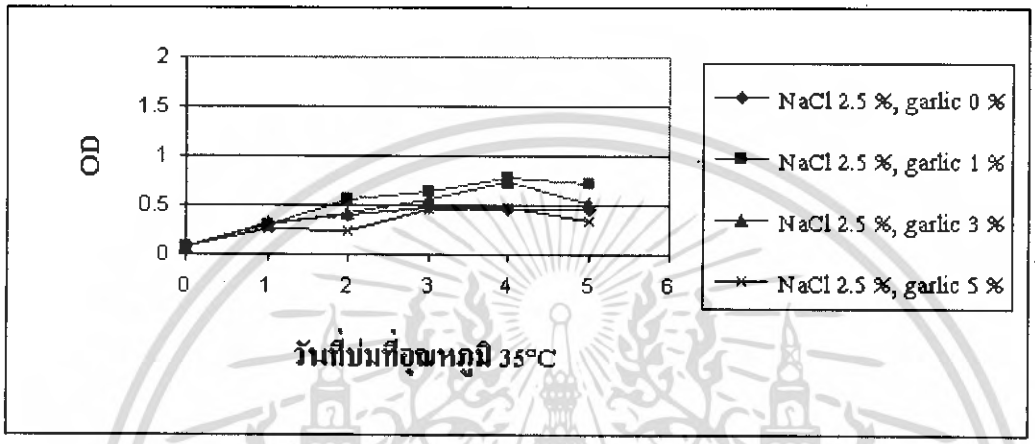
ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0767±0.00A	0.7512±0.03B	0.7475±0.12A	0.9612±0.10A	0.9797±0.18A	0.9585±0.28A
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0830±0.01A	0.6363±0.37B	0.6623±0.29A	0.8772±0.12A	0.8997±0.22A	0.7983±0.43AB
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0813±0.00A	0.3887±0.34A	0.5180±0.32AB	0.8328±0.14AB	0.8147±0.25A	0.5801±0.32AB
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0777±0.01A	0.2873±0.22A	0.3287±0.31B	0.5440±0.28B	0.5017±0.24A	0.4243±0.25B



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ	วันที่					
และสารสกัดกระเทียม	0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0778±0.00A	0.3265±0.13A	0.398±0.26A	0.4797±0.26A	0.4647±0.25A	0.4513±0.23A
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0728±0.01A	0.2987±0.13A	0.5692±0.49A	0.6385±0.50A	0.7717±0.34A	0.7158±0.36A
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0788±0.01A	0.3083±0.24A	0.4207±0.30A	0.5622±0.25A	0.746±0.17A	0.5268±0.15A
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.079±0.00A	0.2653±0.20A	0.2442±0.22A	0.4547±0.22A	0.485±0.28A	0.3478±0.29A

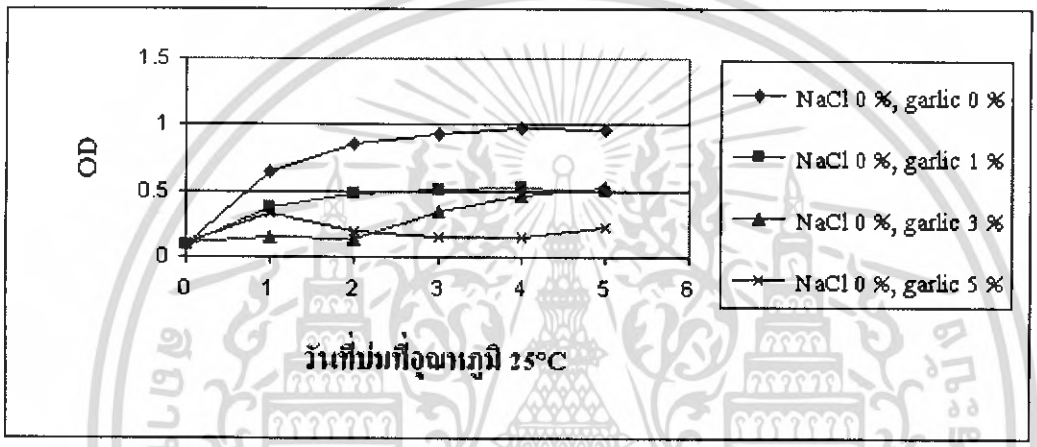
" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



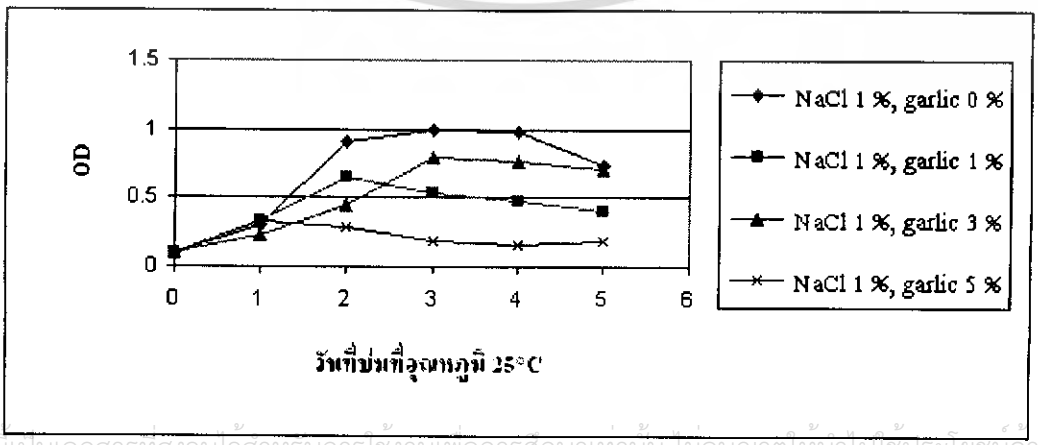
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 25°C

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0925±0.00A[a]	0.6407±0.08A	0.8560±0.10A	0.9333±0.09A	0.9728±0.05A	0.9575±0.04A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.0887±0.46A	0.3790±0.21B	0.4742±0.23B	0.5095±0.02B	0.5238±0.02B	0.5002±0.02B
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.1017±0.00A	0.1512±0.01B	0.1362±0.01C	0.3518±0.00C	0.4722±0.00B	0.5250±0.01B
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.1050±0.00A	0.3325±0.03B	0.1882±0.01C	0.1440±0.00D	0.1453±0.01C	0.2253±0.05C

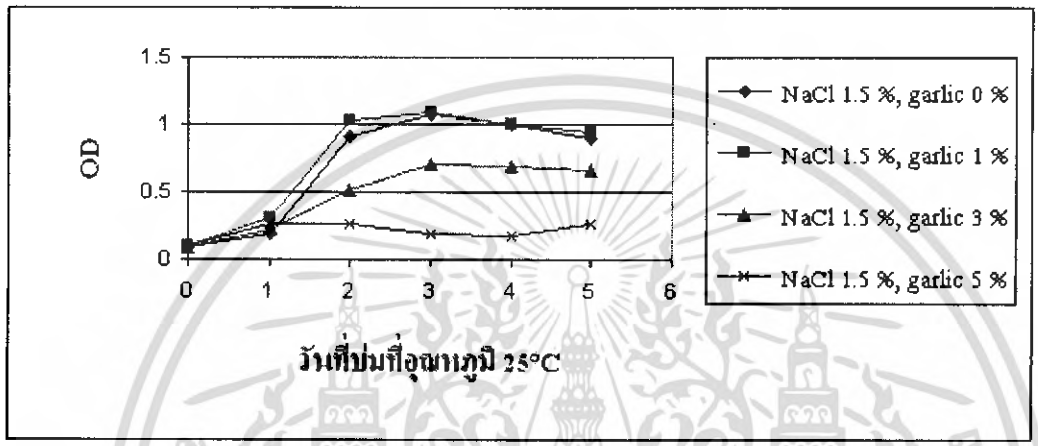


ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.1027±0.01A	0.3007±0.03A	0.9110±0.05A	0.9917±0.01A	0.9752±0.00A	0.7425±0.13A
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.1003±0.00A	0.3293±0.02A	0.6510±0.06B	0.5337±0.03B	0.4702±0.03B	0.4047±0.03B
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0977±0.00A	0.2240±0.01B	0.4520±0.04C	0.7898±0.06C	0.7600±0.08B	0.7130±0.07B
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.0993±0.00A	0.3382±0.03A	0.2813±0.01C	0.1938±0.00D	0.1627±0.01C	0.1905±0.08C

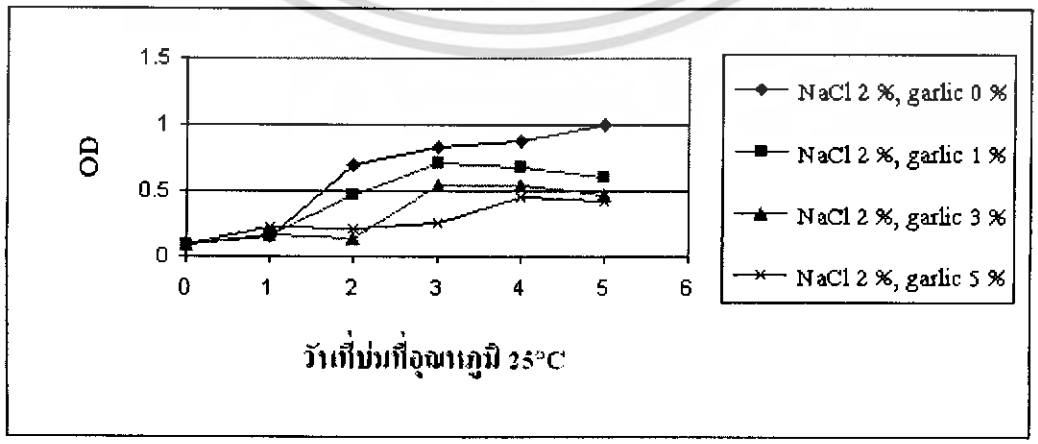


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0922±0.00A	0.1842±0.01C	0.9075±0.07A	1.0608±0.15A	1.0005±0.15A	0.8968±0.09A
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.0997±0.01A	0.3020±0.00A	1.0298±0.54AB	1.0913±0.04A	0.9955±0.07A	0.9362±0.08A
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0950±0.00A	0.2155±0.01C	0.5215±0.02B	0.7092±0.04B	0.6925±0.04B	0.6615±0.06B
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0957±0.00A	0.2680±0.03B	0.2590±0.02B	0.1857±0.01C	0.1707±0.02C	0.2650±0.09C



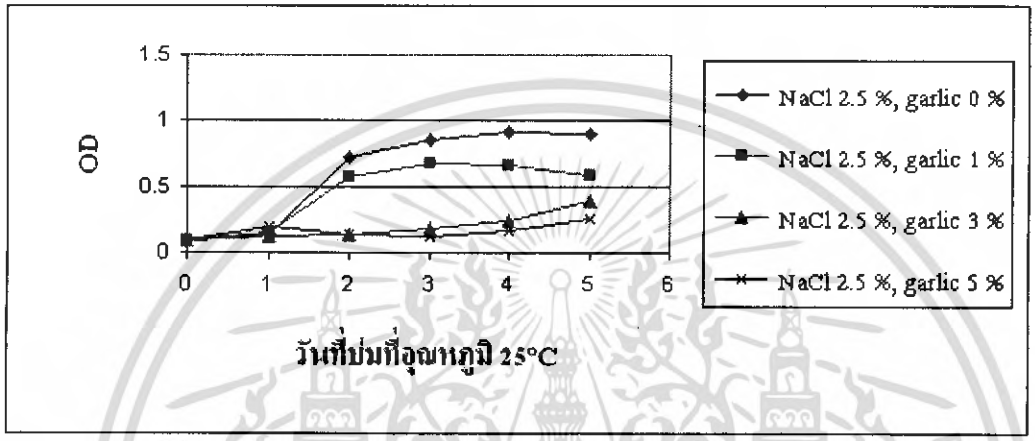
ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0940±0.00A	0.1525±0.01B	0.6900±0.08A	0.8358±0.12A	0.8822±0.00A	1.0047±0.04A
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0915±0.00AB	0.1700±0.01B	0.4735±0.03B	0.7092±0.04A	0.6845±0.07AB	0.5985±0.05B
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0917±0.00AB	0.1723±0.01B	0.1322±0.00C	0.5402±0.04B	0.5460±0.09B	0.4750±0.11BC
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0895±0.00B	0.2238±0.02A	0.2103±0.02C	0.2638±0.04C	0.4515±0.05B	0.4298±0.04C



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0932±0.00A	0.1378±0.02B	0.7190±0.30A	0.8558±0.38A	0.9130±0.23A	0.9002±0.33A
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0942±0.00A	0.1552±0.01BC	0.5728±0.10A	0.6822±0.01A	0.6667±0.02B	0.5875±0.04AB
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0942±0.00A	0.1187±0.01C	0.1388±0.00B	0.1847±0.00B	0.2408±0.05C	0.3953±0.04B
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.0965±0.00A	0.1903±0.02A	0.1395±0.01B	0.1188±0.00B	0.1672±0.05C	0.2568±0.05B

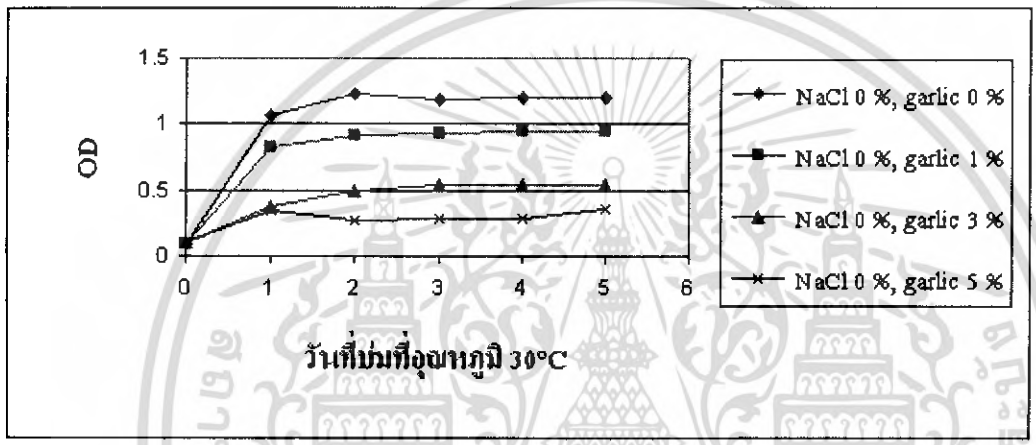
" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



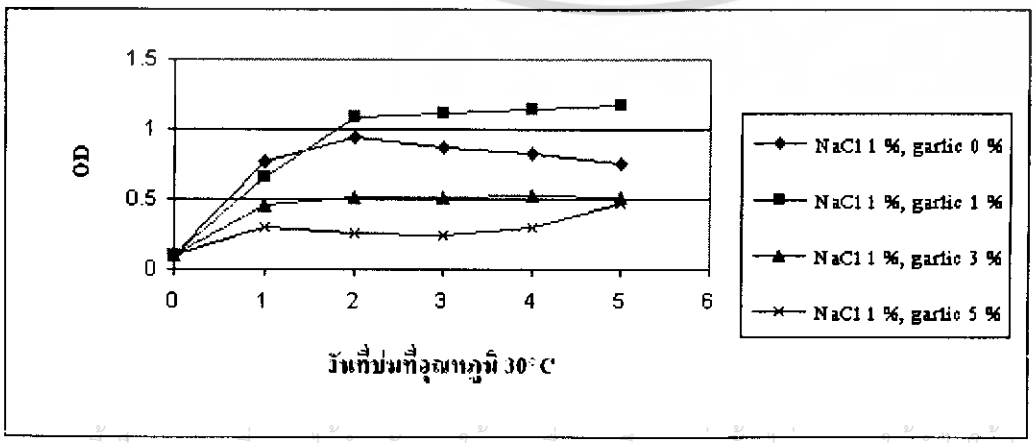
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 30°C

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0905±0.00B[a]	1.0693±0.10A	1.2317±0.09A	1.1840±0.11A	1.1982±0.09A	1.2003±0.08A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.0865±0.00B	0.8182±0.18B	0.9218±0.17B	0.9310±0.17B	0.9403±0.18B	0.9473±0.19B
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.1010±0.02AB	0.3712±0.03C	0.4955±0.02C	0.5352±0.02C	0.5345±0.03C	0.5472±0.04C
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.1023±0.00A	0.3497±0.03C	0.2768±0.01D	0.2872±0.02D	0.2925±0.02D	0.3593±0.36C

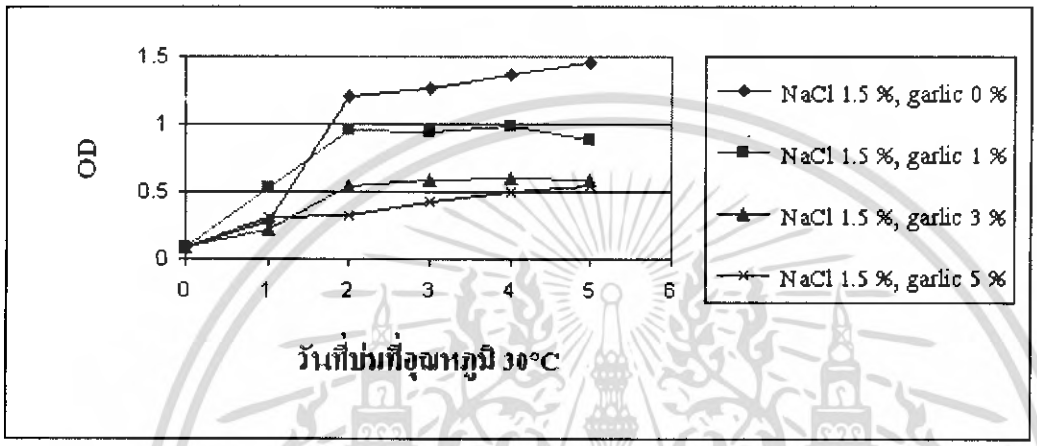


ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.0985±0.01A	0.7712±0.04A	0.9385±0.13B	0.8703±0.15B	0.8267±0.15B	0.7557±0.16B
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.0962±0.00A	0.6557±0.05B	1.0855±0.04A	1.1183±0.03A	1.1472±0.01A	1.1745±0.03A
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0993±0.00A	0.4535±0.03C	0.5143±0.02C	0.5187±0.01C	0.5217±0.00C	0.5197±0.01C
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.1005±0.00A	0.3065±0.04D	0.2540±0.00D	0.2417±0.03D	0.2997±0.04D	0.4657±0.00C

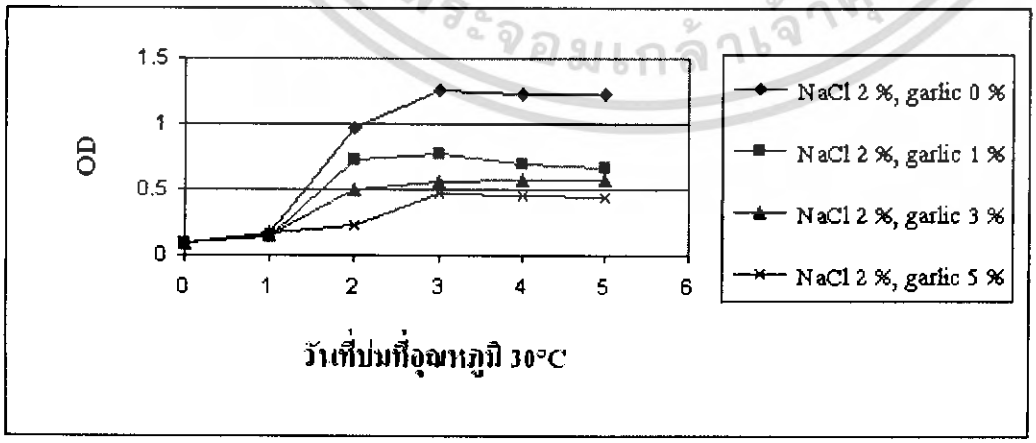


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0912±0.00A	0.2827±0.05B	1.2127±0.10A	1.2708±0.14A	1.3603±0.21A	1.4573±0.41A
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.093±0.00A	0.5338±0.14A	0.9542±0.10B	0.9473±0.14B	0.9823±0.16B	0.8888±0.27B
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0928±0.00A	0.2212±0.02B	0.5382±0.06C	0.5912±0.13C	0.6043±0.16C	0.5945±0.18B
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0942±0.00A	0.3085±0.04B	0.3178±0.03B	0.4303±0.10C	0.5013±0.10C	0.5477±0.07B



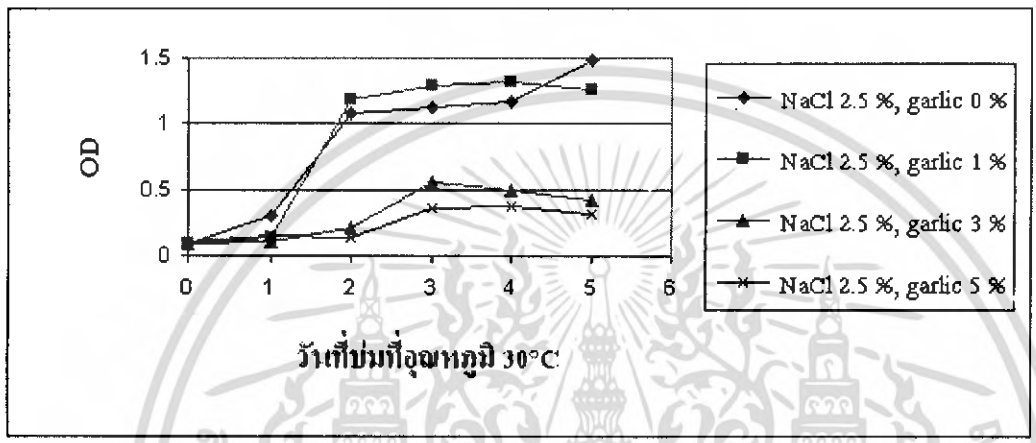
ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0963±0.01A	0.1605±0.04A	0.9753±0.17A	1.2612±0.03A	1.2218±0.05A	1.223±0.09A
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0927±0.00A	0.1362±0.02A	0.7325±0.09B	0.7665±0.13B	0.7017±0.08B	0.6677±0.07B
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0947±0.00A	0.1565±0.00A	0.5±0.05C	0.5557±0.05C	0.572±0.06C	0.5745±0.07B
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0933±0.00A	0.1618±0.01A	0.2257±0.05D	0.467±0.05C	0.4505±0.05D	0.4402±0.06C



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0942±0.00A	0.3067±0.11A	1.0743±0.09A	1.1255±0.11A	1.1643±0.10B	1.4820±0.19B
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0955±0.00A	0.1398±0.02B	1.1847±0.02A	1.2942±0.15A	1.3182±0.00A	1.2570±0.00A
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0953±0.00A	0.1002±0.00B	0.2147±0.02B	0.5515±0.11B	0.4983±0.10C	0.4240±0.02C
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.0983±0.00B	0.1473±0.01B	0.1310±0.12B	0.3607±0.04B	0.3685±0.03C	0.3200±0.02C

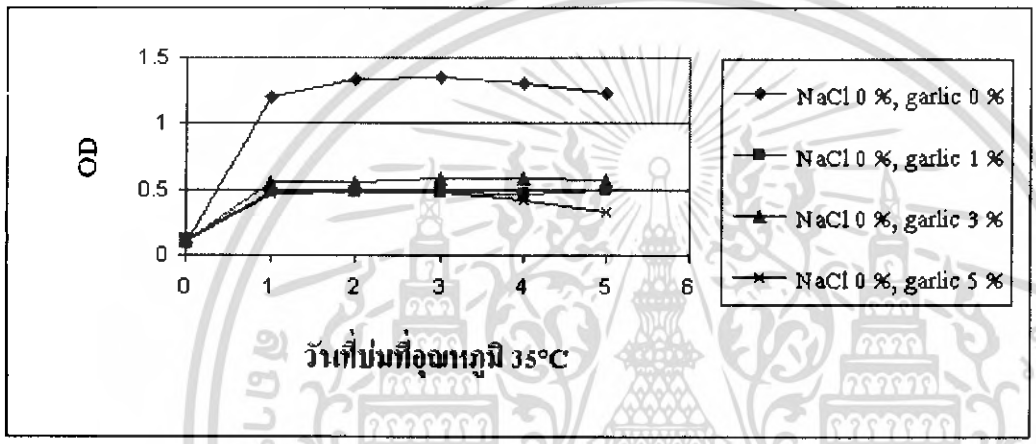
" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



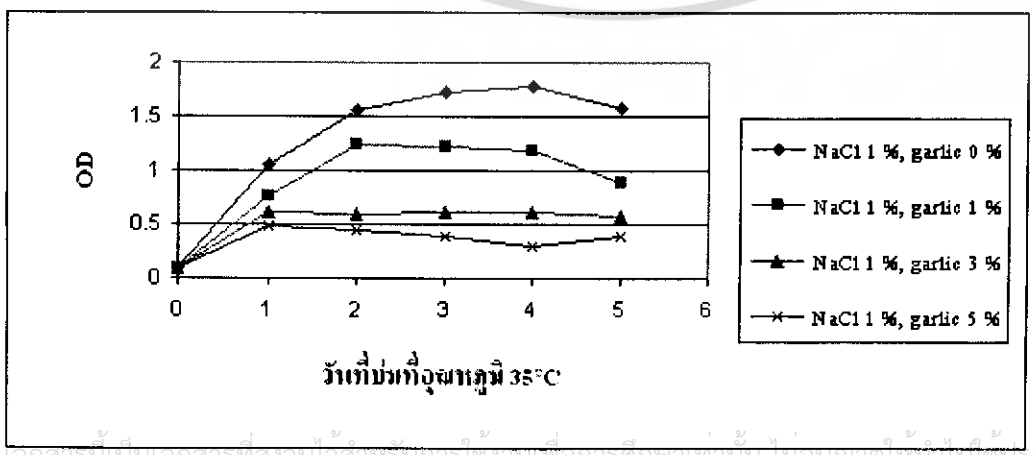
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของ *Lactococcus curvatus* ในอาหาร PMB ที่อุณหภูมิ 35°C

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 0 %, garlic 0 %	0.0918±0.00A[a]	1.2048±0.07A	1.3422±0.46A	1.3492±0.03A	1.3025±0.03A	1.2293±0.03A
NaCl 0 %, garlic 1 %	0.1220±0.06A	0.4867±0.04B	0.4778±0.14B	0.4753±0.04C	0.4685±0.04C	0.4980±0.03C
NaCl 0 %, garlic 3 %	0.1033±0.00A	0.5492±0.01B	0.5538±0.03B	0.5798±0.02B	0.5892±0.00B	0.5768±0.02B
NaCl 0 %, garlic 5 %	0.1070±0.00A	0.4720±0.04B	0.4863±0.07B	0.4870±0.04C	0.4162±0.04V	0.3228±0.02D

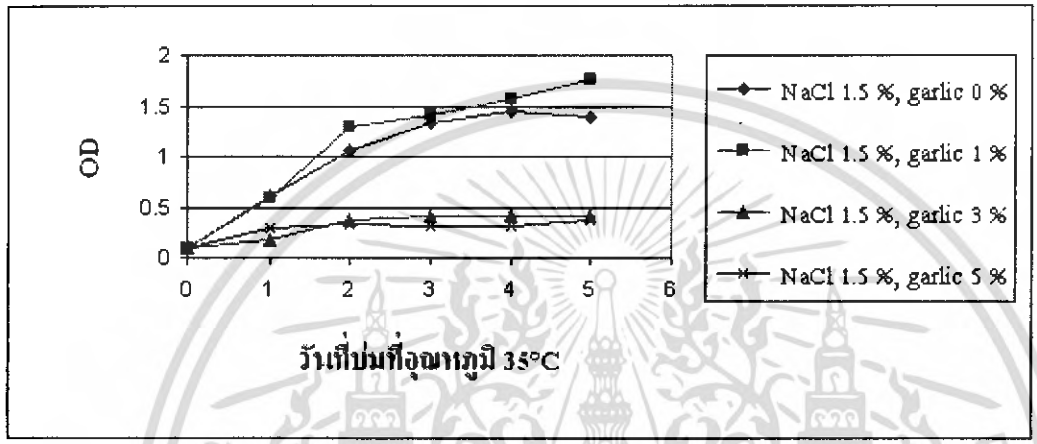


ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 1 %, garlic 0 %	0.0998±0.00A	1.0517±0.11A	1.5613±0.31A	1.7130±0.28A	1.7860±0.42A	1.5795±0.11A
NaCl 1 %, garlic 1 %	0.0960±0.00B	0.7520±0.04B	1.2320±0.02B	1.2270±0.03B	1.1888±0.08A	0.8898±0.27B
NaCl 1 %, garlic 3 %	0.0973±0.00AB	0.6160±0.05C	0.5982±0.05C	0.6187±0.05C	0.6090±0.07B	0.5797±0.03C
NaCl 1 %, garlic 5 %	0.1008±0.00A	0.4750±0.03D	0.4440±0.03C	0.3898±0.01C	0.2923±0.02B	0.3915±0.03C

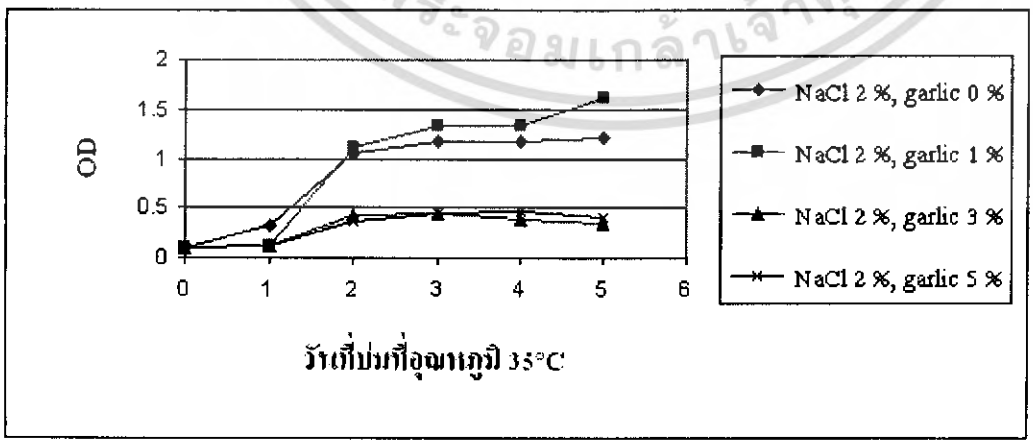


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 1.5 %, garlic 0 %	0.0940±0.00B	0.5995±0.07A	1.0665±0.36A	1.3245±0.21A	1.4498±0.21A	1.3953±0.19B
NaCl 1.5 %, garlic 1 %	0.0957±0.00B	0.5835±0.11A	1.3007±0.13A	1.4203±0.27A	1.5772±0.16A	1.7633±0.05A
NaCl 1.5 %, garlic 3 %	0.0985±0.00A	0.1833±0.03B	0.3763±0.07B	0.4135±0.02B	0.4145±0.02B	0.4090±0.03C
NaCl 1.5 %, garlic 5 %	0.0983±0.00A	0.2993±0.04B	0.3265±0.03B	0.3192±0.03B	0.3040±0.02B	0.3823±0.08C



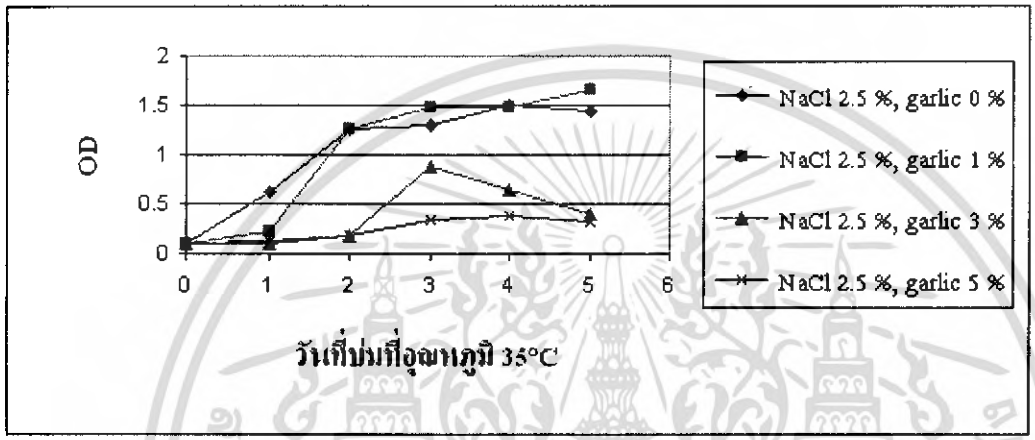
ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียม	วันที่ 0	1	2	3	4	5
NaCl 2 %, garlic 0 %	0.0918±0.00A	0.3292±0.08A	1.0598±0.03A	1.1778±0.03B	1.1767±0.05A	1.2065±0.02B
NaCl 2 %, garlic 1 %	0.0918±0.00A	0.1275±0.03B	1.1148±0.21A	1.3260±0.19A	1.3280±0.17A	1.6213±0.18A
NaCl 2 %, garlic 3 %	0.0952±0.00A	0.1197±0.00B	0.4280±0.05B	0.4447±0.02C	0.3783±0.05B	0.3505±0.03C
NaCl 2 %, garlic 5 %	0.0918±0.00A	0.1192±0.00B	0.3700±0.03B	0.4483±0.05C	0.4590±0.45B	0.4108±0.05C



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของเกลือ และสารสกัดกระเทียม	วันที่					
	0	1	2	3	4	5
NaCl 2.5 %, garlic 0 %	0.0995±0.01A	0.6165±0.05A	1.2503±0.14A	1.2982±0.18A	1.5055±0.16A	1.4400±0.16B
NaCl 2.5 %, garlic 1 %	0.0965±0.00A	0.2190±0.05B	1.2643±0.34A	1.4858±0.27A	1.4887±0.26A	1.6573±0.07A
NaCl 2.5 %, garlic 3 %	0.0958±0.00A	0.1040±0.00C	0.1812±0.18B	0.8772±0.14B	0.6432±0.34B	0.3977±0.05C
NaCl 2.5 %, garlic 5 %	0.0993±0.51A	0.1140±0.00C	0.1875±0.05B	0.3398±0.01C	0.3832±0.06B	0.3230±0.01C

" ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกัน (ที่เวลาของการหมักวันเดียวกัน) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า pH ซ้ำที่ 1																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.56	4.48	6.25	6.63	4.48	<4.5	4.38	6.55	<4.50	<4.50	<4.50	4.69	<4.50	<4.50	<4.50	4.43	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.36	6.41	6.40	6.44	4.66	4.61	6.41	6.41	4.42	4.34	4.32	6.37	<4.50	<4.50	<4.50	6.39	<4.50	<4.50	<4.50	5.23	<4.50	<4.50	<4.50	4.35
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	6.25	6.38	6.37	6.37	4.59	4.48	5.53	6.32	4.45	<4.50	4.22	6.36	<4.50	<4.50	<4.50	6.35	<4.50	<4.50	<4.50	4.76
2	6.34	6.33	6.38	6.42	6.30	6.30	6.32	6.32	4.64	4.40	6.28	6.30	4.45	<4.50	4.45	6.32	<4.50	<4.50	<4.50	6.34	<4.50	<4.50	<4.50	6.36
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	6.32	6.31	6.28	6.34	4.70	6.28	6.27	6.33	4.40	4.66	6.29	6.36	<4.50	4.42	4.45	6.38	<4.50	<4.50	<4.50	6.40
30°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.52	4.40	4.84	6.60	4.58	<4.50	4.37	6.28	4.57	<4.50	<4.50	4.68	4.54	<4.50	<4.50	4.53	4.50	<4.50	<4.50	4.48
1	6.36	6.41	6.40	6.44	4.55	4.50	6.36	6.41	4.41	4.38	4.34	6.41	<4.50	<4.50	<4.50	5.63	<4.50	<4.50	<4.50	4.38	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	4.86	6.15	6.35	6.35	4.43	4.45	4.47	6.36	<4.50	<4.50	<4.50	6.36	<4.50	<4.50	<4.50	4.46	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.34	6.33	6.38	6.42	5.86	6.31	6.29	6.35	4.46	4.47	4.30	6.36	<4.50	<4.50	<4.50	6.38	<4.50	<4.50	<4.50	6.40	<4.50	<4.50	<4.50	5.34
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	6.30	6.35	6.30	6.28	4.71	4.69	6.30	6.29	4.37	4.36	4.43	6.31	<4.50	<4.50	<4.50	6.34	<4.50	<4.50	<4.50	6.29
35°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.52	4.47	5.08	6.61	4.45	<4.50	4.64	6.60	<4.50	<4.50	4.65	6.04	<4.50	<4.50	4.46	4.48	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.36	6.41	6.40	6.44	4.53	4.46	6.36	6.40	4.45	<4.50	4.47	6.41	<4.50	<4.50	<4.50	6.46	<4.50	<4.50	<4.50	4.38	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	4.55	5.01	6.36	6.37	4.50	4.84	4.30	6.37	4.55	4.88	<4.50	6.42	4.56	4.47	<4.50	6.44	4.54	<4.50	<4.50	4.71
2	6.34	6.33	6.38	6.42	4.57	6.31	6.33	6.39	4.44	4.49	6.30	6.37	<4.50	<4.50	4.49	6.42	<4.50	<4.50	<4.50	6.44	<4.50	<4.50	<4.50	5.20
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	4.80	6.24	6.31	6.31	4.40	4.36	6.30	6.27	<4.50	<4.50	6.35	6.34	<4.50	<4.50	4.88	6.33	<4.50	<4.50	4.27	6.33

ตารางที่ 20 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า pH ซ้ำที่ 2																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.38	4.33	4.41	5.08	<4.50	<4.50	<4.50	4.43	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.36	6.41	6.40	6.44	4.45	4.35	4.32	5.22	<4.50	<4.50	<4.50	4.26	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	4.53	4.41	4.32	5.47	4.49	<4.50	<4.50	4.34	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.34	6.33	6.38	6.42	4.69	4.43	4.45	5.74	4.53	<4.50	<4.50	4.60	4.59	<4.50	<4.50	4.36	4.49	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	5.61	6.44	4.69	5.94	4.71	6.25	4.23	4.99	4.57	4.44	<4.50	4.37	4.49	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
30°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.36	4.28	4.51	4.65	<4.50	<4.50	4.40	4.39	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.36	6.41	6.40	6.44	4.44	4.35	4.30	4.54	<4.50	<4.50	<4.50	4.24	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	4.48	4.39	6.45	4.76	<4.50	<4.50	4.31	4.33	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.34	6.33	6.38	6.42	4.60	4.47	4.36	5.35	4.48	<4.50	<4.50	4.86	<4.50	<4.50	<4.50	4.53	<4.50	<4.50	<4.50	4.39	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	5.92	4.77	4.45	5.82	4.58	4.34	<4.50	5.63	4.47	<4.50	<4.50	5.02	<4.50	<4.50	<4.50	4.97	<4.50	<4.50	<4.50	4.29
35°C																								
0	6.66	6.74	6.69	6.69	4.42	4.34	4.59	4.84	<4.50	<4.50	4.48	4.40	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.36	6.41	6.4	6.44	4.28	4.27	4.43	5.41	<4.50	<4.50	<4.50	4.49	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.38	6.44	6.18	6.43	4.35	4.39	4.43	5.84	<4.50	<4.50	<4.50	5.49	<4.50	<4.50	<4.50	5.00	<4.50	<4.50	<4.50	4.46	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.34	6.33	6.38	6.42	4.45	4.36	4.49	5.87	<4.50	<4.50	<4.50	5.42	<4.50	<4.50	<4.50	4.55	<4.50	<4.50	<4.50	4.51	<4.50	<4.50	<4.50	4.36
2.5	6.23	6.36	6.29	6.29	4.67	4.56	4.87	6.08	4.42	4.17	4.60	5.79	<4.50	<4.50	4.54	4.72	<4.50	<4.50	4.49	4.38	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50

ตารางที่ 21 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactococcus lactis* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 3)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า pH ซ้ำที่ 3																							
	Lactococcus lactis																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.64	6.62	6.64	6.64	4.40	4.39	4.77	6.43	<4.50	4.14	4.32	5.26	<4.50	<4.50	<4.50	4.40	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.45	6.45	6.44	6.45	4.53	4.41	4.80	6.28	4.38	4.28	4.23	6.04	<4.50	<4.50	<4.50	4.51	<4.50	<4.50	<4.50	4.21	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.42	6.43	6.44	6.42	4.55	4.45	5.01	6.24	4.37	4.28	4.21	6.04	<4.50	<4.50	<4.50	5.76	<4.50	<4.50	<4.50	4.29	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.40	6.41	6.43	6.40	4.66	5.47	5.74	6.21	4.42	4.33	4.25	6.05	<4.50	<4.50	<4.50	5.93	<4.50	<4.50	<4.50	5.80	<4.50	<4.50	<4.50	4.34
2.5	6.38	6.39	6.39	6.39	5.30	6.21	6.07	6.19	4.42	4.9	4.61	6.05	<4.50	4.37	4.19	6.01	<4.50	<4.50	<4.50	5.89	<4.50	<4.50	<4.50	5.91
30°C																								
0	6.64	6.62	6.64	6.64	4.37	4.35	4.9	6.27	<4.50	4.23	4.61	4.86	<4.50	<4.50	4.52	4.70	<4.50	<4.50	4.46	4.63	<4.50	<4.50	<4.50	4.49
1	6.45	6.45	6.44	6.45	4.51	4.37	4.87	6.21	4.44	4.27	4.35	5.96	<4.50	<4.50	<4.50	4.93	<4.50	<4.50	<4.50	4.38	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.42	6.43	6.44	6.42	4.50	4.37	5.16	6.17	4.44	4.26	4.33	5.94	<4.50	<4.50	<4.50	4.70	<4.50	<4.50	<4.50	4.25	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.40	6.41	6.43	6.40	4.64	4.58	5.83	6.11	4.43	4.32	4.33	5.93	<4.50	<4.50	<4.50	5.50	<4.50	<4.50	<4.50	4.42	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.38	6.39	6.39	6.39	5.88	6.16	6.08	6.20	4.51	4.34	4.53	5.97	4.32	<4.50	4.23	4.99	<4.50	<4.50	<4.50	4.97	<4.50	<4.50	<4.50	4.31
35°C																								
0	6.64	6.62	6.64	6.64	4.36	4.38	5.21	6.42	<4.50	4.32	4.63	6.18	<4.50	<4.50	4.52	6.05	<4.50	<4.50	4.48	4.48	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.45	6.45	6.44	6.45	4.34	4.35	5.21	6.17	4.23	4.23	4.46	6.02	<4.50	<4.50	<4.50	5.75	<4.50	<4.50	4.43	4.37	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.42	6.43	6.44	6.42	4.45	4.41	5.87	6.16	4.26	4.27	4.4	6.02	<4.50	<4.50	<4.50	5.88	<4.50	<4.50	<4.50	4.44	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.40	6.41	6.43	6.40	4.87	4.64	6.06	6.15	4.33	4.31	4.63	6.04	<4.50	<4.50	4.28	5.93	<4.50	<4.50	<4.50	5.91	<4.50	<4.50	<4.50	4.46
2.5	6.38	6.39	6.39	6.39	5.79	6.06	6.09	6.19	4.51	4.29	5.82	6.14	4.37	<4.50	4.85	6.08	<4.50	<4.50	4.30	6.04	<4.50	<4.50	<4.50	6.08

ตารางที่ 22 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า PH ซ้ำที่ 1																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.78	5.91	6.16	6.20	4.74	4.72	5.50	5.92	4.54	4.51	4.57	5.30	4.45	4.49	4.41	4.55	<4.50	<4.50	<4.50	4.49
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.00	5.97	6.00	6.04	4.82	4.84	5.31	5.65	4.53	4.47	4.59	5.39	4.43	<4.50	4.41	4.90	<4.50	<4.50	<4.50	4.53
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.26	6.12	6.02	6.05	5.74	5.03	5.42	5.72	4.75	4.52	4.65	5.30	4.59	4.42	4.49	4.62	4.59	<4.50	<4.50	4.49
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.26	6.24	6.10	6.16	6.07	5.95	5.92	5.98	5.01	4.73	5.44	5.15	4.62	4.59	4.53	4.62	4.56	4.52	4.43	4.49
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.23	6.22	6.22	6.09	6.18	6.08	6.08	5.90	5.88	5.20	5.87	5.76	5.50	4.74	4.88	4.88	5.06	4.59	4.61	4.51
30°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.31	5.29	6.19	6.21	4.62	4.48	4.68	5.40	4.57	<4.50	4.45	4.6	4.61	<4.50	<4.50	4.46	4.62	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.19	5.72	6.03	6.19	4.71	4.53	4.74	5.35	4.46	4.40	4.44	4.54	<4.50	<4.50	<4.50	4.40	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.29	6.11	6.02	6.06	5.57	4.66	4.76	5.44	4.71	4.44	4.45	4.56	4.52	<4.50	<4.50	4.37	4.53	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.23	6.24	6.03	6.08	5.41	5.13	4.84	5.70	5.05	4.53	4.48	4.75	4.69	4.41	<4.50	4.46	4.61	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.2	6.18	6.21	6.07	5.85	5.42	6.05	5.79	5.30	4.69	4.93	4.92	4.86	4.51	4.47	4.50	4.67	4.46	<4.50	4.39
35°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.02	5.10	5.97	6.21	4.63	4.56	4.63	4.90	4.67	4.59	4.49	4.59	4.66	4.60	<4.50	4.52	4.65	4.61	<4.50	4.56
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.00	5.24	5.94	6.14	4.77	4.56	4.61	4.80	4.63	4.50	4.42	4.43	4.55	4.46	<4.50	<4.50	4.55	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.37	6.08	6.32	6.06	5.15	4.64	4.81	5.01	4.69	4.53	4.46	4.57	4.60	4.44	<4.50	4.41	4.59	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.25	6.26	6.22	6.25	5.42	5.03	5.03	5.86	4.69	4.62	4.47	4.53	4.59	4.46	<4.5	4.34	4.58	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.30	6.31	6.23	6.19	6.19	6.18	6.21	6.13	5.36	4.92	5.01	5.15	4.73	4.62	4.49	4.42	4.58	4.52	<4.50	4.30

ตารางที่ 23 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า pH ซ้ำที่ 2																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	6.26	6.15	6.31	6.35	5.15	4.76	5.84	6.03	4.83	4.58	5.70	5.79	4.75	4.52	4.84	4.83	4.67	4.48	4.57	4.57
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.17	6.18	6.16	6.22	5.04	4.82	5.31	5.93	4.68	4.55	4.62	4.84	4.57	4.46	4.48	4.55	4.54	<4.50	<4.50	4.46
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.38	6.36	6.24	6.21	5.93	5.87	5.73	5.95	4.87	4.74	4.68	4.88	4.66	4.57	4.49	4.54	4.58	4.51	<4.50	4.45
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.35	6.35	6.16	6.23	6.19	6.12	6.02	6.04	5.29	4.83	5.28	5.78	4.78	4.57	4.57	4.84	4.67	4.47	4.41	4.53
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.25	6.25	6.28	6.12	6.14	6.09	6.21	5.98	5.29	5.09	5.97	5.74	4.82	4.67	5.28	5.01	4.65	4.53	4.61	4.52
30°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.55	5.12	6.23	6.36	4.67	4.51	4.72	5.57	4.67	4.50	4.49	4.66	4.59	4.49	<4.50	4.45	4.67	<4.50	<4.50	<4.50
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.28	5.96	6.09	6.18	4.85	4.60	4.72	5.34	4.57	4.45	4.46	4.59	4.49	<4.50	<4.50	4.38	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.38	6.36	6.29	6.18	5.30	5.05	5.09	5.34	4.92	4.55	4.51	4.58	4.63	4.4	4.32	4.40	4.68	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.35	6.34	6.21	6.24	5.92	5.38	5.61	5.78	4.84	4.67	4.56	4.61	4.61	4.49	4.39	4.39	4.54	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.25	6.31	6.25	6.25	5.70	6.02	6.03	5.98	5.72	4.76	4.96	4.92	4.45	4.52	4.44	4.49	<4.50	4.44	<4.50	<4.50
35°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.10	5.04	6.04	6.28	4.71	4.58	4.67	5.02	4.75	4.61	4.56	4.71	4.69	4.57	4.53	4.65	4.68	4.57	4.49	4.65
1	6.37	6.37	6.37	6.36	5.10	5.44	5.95	6.11	4.81	4.61	4.63	4.87	4.68	4.55	4.48	4.54	4.61	4.50	<4.50	4.47	4.61	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.39	6.38	6.28	6.20	5.16	4.94	4.78	4.77	4.96	4.59	4.41	4.54	4.76	4.48	<4.50	4.45	4.81	<4.50	4.42	<4.50
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.35	6.27	6.34	6.19	5.45	5.16	6.20	5.41	5.30	4.64	4.72	4.65	5.42	4.42	4.45	4.47	4.85	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.32	6.31	6.31	6.21	6.17	6.07	6.21	6.10	5.94	5.83	5.22	5.20	6.04	5.09	4.96	4.65	6.07	4.63	4.48	4.47

ตารางที่ 24 ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของ *Lactobacillus curvatus* ในอาหาร PMB (ซ้ำที่ 3)

ความเข้มข้นของNaCl (%)	ค่า pH ซ้ำที่ 3																							
	Lactobacillus curvatus																							
	วันที่ 0				วันที่ 1				วันที่ 2				วันที่ 3				วันที่ 4				วันที่ 5			
	กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม				กระเทียม			
	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%	0%	1%	3%	5%
25°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	6.22	6.06	6.34	6.36	5.12	4.67	5.56	6.10	4.80	4.52	4.63	5.71	4.73	4.47	4.48	4.84	4.68	<4.50	<4.50	4.63
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.20	6.08	6.11	6.13	5.10	4.82	5.52	5.83	4.70	4.56	4.66	5.19	4.57	4.45	4.5	4.60	4.56	<4.50	<4.50	4.49
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.35	6.19	6.08	6.10	5.72	4.88	5.57	5.88	4.81	4.55	4.69	5.24	4.63	4.44	4.52	4.61	4.59	<4.50	4.49	4.48
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.27	6.26	6.19	6.13	6.05	5.74	6.08	5.94	5.23	4.75	5.47	5.78	4.75	4.60	4.59	4.81	4.54	4.53	4.48	4.53
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.30	6.30	6.29	6.13	6.23	6.12	6.19	5.96	5.68	5.31	6.01	5.85	4.98	4.77	4.81	5.19	4.76	4.61	4.52	4.56
30°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.50	5.21	6.27	6.34	4.72	4.51	4.74	5.60	4.73	4.50	4.51	4.75	4.69	4.47	4.4	4.51	4.65	<4.50	<4.50	4.42
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.16	5.50	6.03	6.12	4.83	4.63	4.77	5.35	4.60	4.49	4.48	4.62	4.49	<4.5	<4.5	4.4	<4.50	<4.50	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	6.39	6.28	6.16	6.09	5.29	4.86	4.81	5.48	4.70	4.50	4.47	4.61	4.53	4.39	<4.5	4.4	4.48	<4.50	<4.50	<4.50
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.29	6.27	6.19	6.16	5.61	5.28	5.36	5.81	4.78	4.65	4.60	4.69	4.59	4.47	4.41	4.42	4.49	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.25	6.30	6.29	6.13	5.87	5.83	6.21	5.85	4.91	4.80	5.17	5.10	4.59	4.55	4.51	4.50	4.48	4.46	4.35	<4.50
35°C																								
0	6.55	6.54	6.55	6.54	5.14	5.48	6.06	6.26	4.70	4.74	4.16	4.89	4.69	4.61	4.57	4.61	4.71	<4.50	4.53	4.57	4.69	4.59	4.47	4.52
1	6.37	6.37	6.37	6.36	6.02	5.42	5.94	6.18	4.68	4.63	4.65	4.83	4.57	4.58	4.46	4.49	4.52	4.54	<4.50	<4.50	4.48	4.53	<4.50	<4.50
1.5	6.31	6.32	6.30	6.30	5.35	6.36	6.31	6.05	5.17	4.91	4.78	5.24	4.89	4.62	4.51	4.77	4.73	4.54	4.42	4.68	4.69	4.48	<4.50	4.63
2	6.27	6.27	6.28	6.31	6.28	6.29	6.28	5.22	5.38	5.43	5.49	5.02	5.32	4.67	5.02	4.97	5.24	4.50	4.48	4.46	4.80	<4.50	<4.50	<4.50
2.5	6.18	6.19	6.21	6.19	6.30	6.31	6.27	6.20	6.01	6.01	6.21	5.15	5.92	5.83	5.13	4.90	5.81	5.75	4.57	4.46	6.12	6.83	4.40	<4.50