



## ใบรับรองปัญหาพิเศษ

### เรื่อง

ผลของกระเทียมต่อการเจริญและการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสาย  
พันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแหนม  
Effect of garlic on growth and bacteriocin production of bacteria N190 and  
TISTR 536 in Nham Model Broth

### จัดทำโดย

นางสาวนันทินี พันดุง รหัสนักศึกษา 44040756  
นางสาวอรรณ วะขิงเงิน รหัสนักศึกษา 44040780

### ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

  
.....

4 / พ.ย. / 2547 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

( นศ. (๐๓๗๘ โสจตวิรัชก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของกระเทียมต่อการเจริญและการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์  
 N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแหนม  
 Effect of garlic on growth and bacteriocin production of lactic acid bacteria N190 and TISTR 536  
 in Nham Model Broth



T096523

นางสาวนันท์นิตี พันธุ์ รหัสนักศึกษา 44040756  
 นางสาวอรรณว วะซังเงิน รหัสนักศึกษา 44040780

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
 ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 พ.ศ.2547

ป.พ.

๙๖4๒๘ ๗

๒๕๔๗

รชพญ.....

เลขทะเบียน.....

๙๖๕๒๓

วันเดือนปี.....

สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวนันทินี พันคง และนางสาวอรรณณ วะชังเงิน. : ผลของกระเทียมต่อการเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอซิน จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม (Effect of garlic on growth and bacteriocin production of lactic acid bacteria N190 and TISTR 536 in Nham Model Broth). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์

#### บทคัดย่อ

การทดลองนี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม (Nham Model Broth) ที่มีการเติมกระเทียมและไม่มีการเติมกระเทียมเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาหมักชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกและตรวจวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* พบว่าทั้งตัวอย่างที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ที่มีการเติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น 2 log cycle และ 1 log cycle ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ที่ไม่มีการเติมกระเทียมมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่ำกว่า โดยเพิ่มขึ้น 1 log cycle และไม่ถึง 1 log cycle เมื่อระยะเวลาหมักครบ 48 ชั่วโมง การผลิตแบคทีเรียโอซิน พบว่าตัวอย่างที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ที่มีการเติมกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* จากการศึกษาพบว่า NMB ที่มีกระเทียม (ตารางภาคผนวกที่ ข3 ) เชื้อ N190 จะเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินให้เห็นเมื่อหมัก NMB ไปได้ 12 ชั่วโมง ขณะที่ NMB ที่ไม่มีกระเทียมแบคทีเรียโอซินจะมีมากพอจนเห็นเด่นชัดเมื่อหมัก NMB ไป 18 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ TISTR 536 ( ตารางภาคผนวกที่ ค 3) จะเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินให้เห็นเมื่อหมัก NMB ไปได้ 12 ชั่วโมง ขณะที่ NMB ที่ไม่มีกระเทียมแบคทีเรียโอซินจะมีมากพอจนเห็นเด่นชัดเมื่อหมัก NMB ไป 18 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อทั้งสองมีการมีแนวโน้มในการผลิตแบคทีเรียโอซินใน NMB ที่มีกระเทียมมากกว่า NMB ที่ไม่มีกระเทียม ตั้งแต่ 12-48 ชั่วโมง

สรุปได้ว่า กระเทียมมีผลเร่งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ TISTR 536 และการสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยสายพันธุ์ N190 จะมีปริมาณการเจริญของเชื้อมากกว่าสายพันธุ์ TISTR 536 เพียงเล็กน้อย แต่สายพันธุ์ TISTR 536 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินในปริมาณที่มากและเร็วกว่าตัวอย่างที่เติมเชื้อ N190 ในช่วงแรกของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ในระดับ titer สูงสุดได้เท่ากัน

..... นันทินี พันคง .....

..... อรรณณ วะชังเงิน .....

ลายมือชื่อนักศึกษา

..... Crine .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

..... 4/11/47 .....

วัน/เดือน/ปี

### กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชา  
อุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร  
ลาดกระบัง พ.ศ.2547 โดยมี อ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับคำแนะนำคำปรึกษาและการแก้ไขปัญหา  
ต่างๆจากอาจารย์ที่ปรึกษา ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ให้กำลังใจเสมอมา นอกจากนี้ต้อง  
ขอขอบพระคุณอาจารย์ศศิวิมล ชื่นอ้อม อาเหม็ด ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าฟังการนำเสนอ  
โครงร่างปัญหาพิเศษ ให้คำแนะนำแก้ไขและเพิ่มเติมข้อมูลให้รายงานฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น  
จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนด้านกำลังใจและกำลังใจที่มีค่ายิ่ง พี่ชาย พี่น้อง  
น้องๆและนางสาววรรณ พายสำโรง ที่ช่วยเหลือทางด้านคอมพิวเตอร์ น้องกิ่งสำหรับกล้องดิจิทัล  
สุดท้ายก็ขอขอบคุณตัวเองและคูปัญหาพิเศษที่รับผิดชอบและช่วยกันทำให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จ  
ลุล่วงไปด้วยดี

นนทินี พันดุง  
อรรวรรณ วัชชิงเงิน  
27 ตุลาคม 2547

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญตารางภาคผนวก	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญภาพ(ต่อ)	ฅ
สารบัญภาพภาคผนวก	ฉ
สารบัญภาพภาคผนวก (ต่อ)	ณ
บทนำ	
1.บทนำ	1
2.วารสารปริทัศน์	2
2.1 กระเทียม	2
2.2 คุณค่าทางอาหารของกระเทียม	3
2.3 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก	6
2.4.1 Homofermentative	
2.4.2 Heterofermentative	
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก	9
2.5 ประโยชน์ของกระเทียมในอาหารหมักประเภทเนื้อ	11
2.6 คุณสมบัติของแบคทีเรียไอซิจินจากแบคทีเรียแลคติกและการจำแนก	12
2.7 กระบวนการผลิตแบคทีเรียไอซิจิน	14
2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียไอซิจินและการต้านทาน	15
2.9 ปัจจัยที่มีผลประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียไอซิจิน	18
2.10 การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียไอซิจินในอุตสาหกรรมอาหาร	19
2.11 กลไกการออกฤทธิ์ของไนซิจินและการต้านทาน	20
2.12 รายงานการใช้กลิ่นเชื้อในการควบคุมคุณภาพ	24
2.13 ผลของกระเทียมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



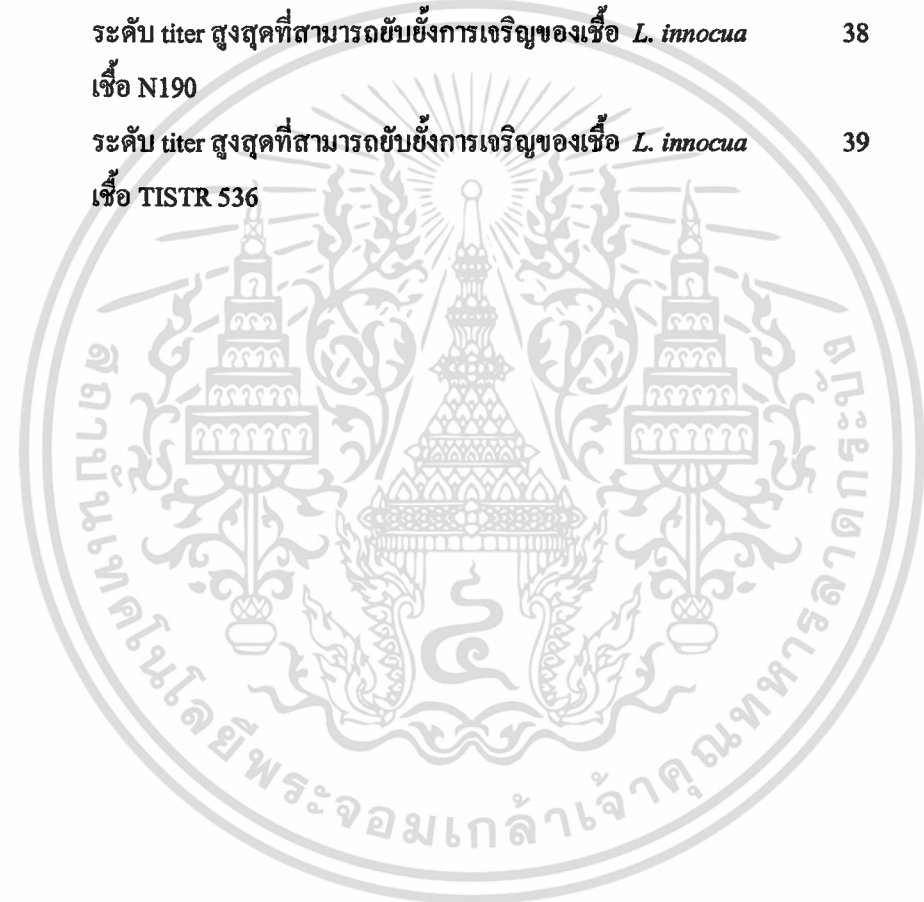
## สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง		หน้า
เอกสารอ้างอิง		42
เอกสารอ้างอิง(ต่อ)		43
ภาคผนวก		44
ภาคผนวก ก	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	44
ภาคผนวก ข	ผลการทดลองการตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักเหวมที่เติมกระเทียมและไม่เติมกระเทียม	46-47
ภาคผนวก ค	ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียโอจีนที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักเหวมที่เติมกระเทียมและไม่เติมกระเทียม	48-49
ภาคผนวก ง	ภาพที่แสดงขั้นตอนที่ทำการทดลองและภาพแสดงผลการทดลอง	50-54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารอาหารในกระเทียมดิบ 100 กรัม	4
2	แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละสกุล	10
3	แสดงการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียไอซอินจากแบคทีเรียกรดแลคติก	14
4	แสดงการออกฤทธิ์ของไนซินส่วนต่างๆต่อเซลล์แบคทีเรีย	21
5	แสดงการใช้แบคทีเรียไอซอินในการถนอมอาหารต่างๆ	23
6	ระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L. innocua</i> เชื้อ N190	38
7	ระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L. innocua</i> เชื้อ TISTR 536	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สารบัญตารางภาคผนวก**

<b>ตารางที่</b>	<b>หน้า</b>
ตารางภาคผนวกที่ ข.1 : ผลการทดลองครั้งที่ 1 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมัก แหนมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่าง ๆ	46
ตารางภาคผนวกที่ ข.2 : ผลการทดลองครั้งที่ 2 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมัก แหนมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่าง ๆ	47
ตารางภาคผนวกที่ ข.3 : ผลการทดลองครั้งที่ 3 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมัก แหนมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่าง ๆ	47
ตารางภาคผนวกที่ ค 1 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 1	48
ตารางภาคผนวกที่ ค 2 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 2	49
ตารางภาคผนวกที่ ค 3 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 3	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงกลไกการหมักของการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ กับกรดแลคติก	7
2	แสดงกลไกการหมักกรดแลคติก	7
3	แสดงกลไกการหมักกลูโคสแบบ Heterofermentative bacteria	8
4	แสดงการสร้างสารประกอบพวกกรดอะมิโน กรดแลคติก และกรดคาร์บอนิก	9
5	แสดงการเกิดแรงเคลื่อนจาก โปรตอน และการสร้างพลังงาน ATP	15
6	แสดงการเกิดโฟรงเมื่อเกิดการยับยั้งจากแบคทีเรียโอซิน	16
7	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน	17
8	Nham model broth (NMB)	28
9	แสดงขั้นตอนการเตรียมกระเทียมปลอดเชื้อ	30
10	ขั้นตอนการใส่กระเทียมปลอดเชื้อ และการเติมเชื้อ N 190 และ TISTR 536 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMB	31
11	แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth โดยวิธีการ spread plate	32
12	การเตรียม double layered agar plate	33
13	แสดงขั้นตอนการทดสอบการสร้าง Bacteriocins จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth โดยใช้เชื้อ <i>Listeria innocua</i> เป็น indicator	34

## สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	แสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเชื้อ N190 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะ การหมักแหมนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	36
15	แสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเชื้อ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะ การหมักแหมนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	36
16	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L. innocua</i> ได้ กับระยะเวลาการหมัก	38
17	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L. innocua</i> ได้ กับระยะเวลาการหมัก	39

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพที่	หน้า
ภาพผนวกที่ ง 1 :	50
แสดงลักษณะของอาหารเหลวที่จำลองสภาพการหมักแหมม หรือ Nham Model Broth	
ภาพผนวกที่ ง 2 :	50
แสดงลักษณะของกระเทียม	
ภาพผนวกที่ ง 3 :	50
แสดงการทำกระเทียมปลอดเชื้อ	
ภาพผนวกที่ ง 4 :	51
แสดงลักษณะการบ่มเชื้อที่ spread plate และการทดสอบ Bacteriocin ใน candle jar	
ภาพผนวกที่ ง 5 :	51
แสดงลักษณะของอัตราส่วนระดับ titer ต่างๆ ที่เจือจางในหลอด Eppendorf เพื่อ ทำการตรวจหา Bacteriocin	
ภาพผนวกที่ ง 6 :	51
แสดงลักษณะ โค โคลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ N 190 ในตัวอย่างที่เติม กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	
ภาพผนวกที่ ง 7 :	52
แสดงลักษณะ โค โคลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ N 190 ในตัวอย่างที่ไม่เติม กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	
ภาพผนวกที่ ง 8 :	52
แสดงลักษณะ โค โคลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ TISTR 536 ในตัวอย่างที่เติม กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	
ภาพผนวกที่ ง 9 :	52
แสดงลักษณะ โค โคลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ TISTR 536 ในตัวอย่างที่ไม่เติม กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	
ภาพผนวกที่ ง 10 :	53
แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L.innocua</i> ได้ในตัวอย่างที่เติมกระเทียมของเชื้อ N 190 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	

## สารบัญภาพภาคผนวก(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ภาพผนวกที่ 11:	แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L.innocua</i> ได้ในตัวอย่างที่ไม่เติมกระเทียมของเชื้อ N 190 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	53
ภาพผนวกที่ 12 :	แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L.innocua</i> ได้ในตัวอย่างที่เติมกระเทียมของเชื้อ TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	53
ภาพผนวกที่ 13 :	แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>L.innocua</i> ได้ในตัวอย่างที่ไม่เติมกระเทียมของเชื้อ TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	54

## บทที่ 1

### บทนำ

กระเทียมเป็นเครื่องเทศสำคัญที่ใช้ในการประกอบอาหาร รวมทั้งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเพิ่มรสชาติให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่างๆ นอกจากนี้กระเทียมยังมีส่วนสำคัญต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ (Luecke,1985 ; Kyung,Park and Kim ; Sawetwivathana , และคณะ,1999) กระเทียมช่วยในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ ที่มีส่วนสำคัญในการทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Mantis et ., 1978 , 1979 ; Dababneh and Al-Delaimy , 1984 ; Saleem and Al-Delaimy , 1982 ; Srivastava และคณะ ,1982 ; Park and Kim , 1996) โดยเฉพาะในแฮมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทยที่การผลิตส่วนใหญ่อาศัยการหมักโดยวิธีทางธรรมชาติ คืออาศัยเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการหมักทำให้เกิดสารที่ให้กลิ่นรส เช่น กรดแลคติก เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอีกด้วย เช่น สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* (TISTR 536) เป็นต้น (อดิศร,2542)

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของกระเทียมในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม (Nham Model Broth , NMB) เนื่องจากกระเทียมอาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งช่วยให้แฮมมีความปลอดภัยต่อการบริโภคมากขึ้น ทำการทดลองโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* (TISTR 536) และ *Lactbacillus lactis* (N 190) เป็นเชื้อตั้งต้นที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักและใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็น indicator เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญและการผลิตสาร แบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮมที่มีกระเทียมและไม่มีกระเทียม โดยใช้สารอาหารทดแทนส่วนประกอบต่างๆ ของการทำแฮม ทำให้อาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม มีสภาพการหมักเหมือนกับการหมักแฮมจริง ซึ่งช่วยให้การหมักแฮมมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้สามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ดีกว่าทำการทดลองในแฮมจริง

#### วัตถุประสงค์

- 1.เพื่อศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญและผลิตสารแบคเทอริโอซินจากการ ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม
- 2.เพื่อเปรียบเทียบว่าความสามารถในการเจริญและการผลิตสารแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแฮม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วารสารปริทัศน์

### 2.1 กระเทียม

กระเทียม (*Allium sativum*, L.) เป็นพืชล้มลุกที่มีหัว อยู่ใต้ดิน หัวมีลักษณะเป็นกลีบหลายๆกลีบ เกาะติดกันคล้ายกลีบสั้ม ออกดอกเป็นช่อเล็กๆสีขาวเกาะเป็นกระจุกอยู่ปลายก้านแข็งซึ่งแทงมาจากหัว กระเทียมใช้เป็นอาหารได้ทุกส่วน รสชาติของกระเทียมค่อนข้างเผ็ดร้อน ในกระเทียม มีสารเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเสริมการทำงานของเซลล์ macrophage เซลล์ที-ลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte) และการเสริมสร้างแอนติบอดีที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และรา (โชติมา, 2546) ซึ่งในกระเทียมสดจะมี น้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 0.1-0.36 ของน้ำหนัก มีสารสำคัญหลายชนิด เช่น อัลลิซิน (allicin) , อัลลิล โพรพิล ไดซัลไฟด์ (allylpropyl disulfide) , ไดอัลลิล ไตรซัลไฟด์ (diallyl trisulfide) และน้ำย่อยหลายชนิด เช่น อัลลิเนส (allinase) , เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) อินเวอร์เทส (invertase) และ ไทโรซิเดส (tyroxidase) (กระเทียมยอดสมุนไพร, 2538)

อัลลิซิน เป็นน้ำมันซึ่งไม่มีสี ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ เบนซีน และอีเทอร์ ถ้ากลั่นโดยใช้ความร้อนโดยตรงจะถูกทำลาย ไม่คงตัวในน้ำ แต่จะคงตัวในน้ำเลือดและน้ำย่อยในกระเพาะ ในเซลล์ของกลีบกระเทียมจะมีทั้งอัลลิซินและอัลลิเนสอยู่ด้วยกัน แต่แยกกันอยู่คนละช่อง เมื่อใดที่กระเทียมถูกตัด ถูกทุบ หรือรอยชำ สารทั้งสองนี้ก็จะผสมกัน ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีกลายเป็นสารอัลลิซิน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้กระเทียมมีกลิ่น (ปาริชาติ , 2543) โดยสารต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำมันกระเทียมมีคุณสมบัติเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ ดังนี้

1. ช่วยลดไขมันและสารคอเลสเตอรอลในร่างกาย และถ้ารับประทานประจำจะช่วยรักษาระดับคอเลสเตอรอลให้อยู่ในระดับปกติได้ ป้องกันการแข็งตัวของเส้นเลือดสาเหตุของเส้นเลือดอุดตันในสมองและหัวใจได้

2. ลดความดันโลหิต แก้อาการเวียนศีรษะ ปวดศีรษะ เจ็บหน้าอกและปวดหลัง

3. สารอัลลิซิน ช่วยลดน้ำตาลในเลือดกระตุ้นการหลั่งอินซูลินของกระเพาะอาหาร กระตุ้นการบีบและหดตัวของลำไส้ ทำให้การย่อยอาหารและการขับถ่ายมีประสิทธิภาพดีขึ้น

4. สารอัลลิซินมีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ ทำลายแบคทีเรียและไวรัสบางชนิดได้ กระเทียมจึงเป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น อหิวาตกโรค ไทฟอยด์ บิด กลาก เกลิออน โรคผิวหนังและไข้หวัด

5. กระเทียมมีสารชกนำวิตามินบี1 เข้าสู่ร่างกายได้เท่าตัวโดยรวมกันเป็นสารอัลลิโทอะมินทำให้วิตามินบี1 ออกฤทธิ์ได้ดีถึง 20 เท่าในปี 2524 นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นค้นพบ สารสคออร์ดีนิน ในกระเทียม ซึ่งไม่มีกลิ่นแต่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายประการ คือช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตและลดไขมัน

ในร่างกาย นอกจากนี้ในกระเทียมยังมีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆ หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ทำให้กระเทียมนิยมนำใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพกันมาก

สารอัลลิซิน (Diallyl disulfide oxide) ซึ่งเป็นสารประกอบพวก sulfur ซึ่งเดิม cavallito ให้สูตรว่า Diallyl thiosulfinate ต่อมาได้พิสูจน์ว่าเป็น Diallyl disulfide oxide

Allicin ( S-allylcystein sulphoxide ) เป็นน้ำมันซึ่งไม่มีสี ละลายน้ำ และผสมกันเป็นเนื้อเดียวกับ alcohol , benzene และ ether ถ้ากลั่นโดยใช้ความร้อนโดยตรงจะถูกทำลาย ไม่คงตัวในค้าง แต่จะคงตัวได้ในเลือดและน้ำย่อยในกระเพาะ Allicin ได้มาจากสาร Alliin เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์อัลลิเนส ซึ่งมีอยู่ในกระเทียม จะเกิดเมื่อกระเทียมถูกบดหรือหั่น ดังนั้นการใช้กระเทียม เพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ควรใช้กระเทียมสดๆ ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจะลดลงเมื่อกระเทียมถูกเก็บไว้นาน พบว่าหลังจากเก็บกระเทียมไว้ 6 เดือน ฤทธิ์อัลลิซินในกระเทียมจะลดลง

เอนไซม์อัลลิเนสในกระเทียมจะไม่คงตัว เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรด ดังนั้นเมื่อรับประทานกระเทียมเข้าไป เมื่อกระเทียมอยู่ในกระเพาะอาหาร เอนไซม์อัลลิเนสในกระเทียมจะถูกทำลาย ทำให้สารอัลลิซินเกิดขึ้นได้น้อยทำให้ผลการรักษาต่ำ (ส่วนการวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ชนาครกสิกรไทย, 2533)

## 2.2 คุณค่าทางอาหารของกระเทียม

บทบาทของกระเทียมในการใช้ประกอบอาหารมีมานานไม่น้อยกว่า 2,500 ปี ในปัจจุบัน เราใช้กระเทียมในการปรุงอาหารกันทั่วโลก บางชาติถือว่าการใช้กระเทียมเป็นการปรุงอาหารอย่างหนึ่ง อาหารของชาวจีนและชาวฝรั่งเศสซึ่งถือว่าการมีรสและกลิ่นเป็นเลิศนั้น มีกระเทียมเป็นส่วนประกอบ เพื่อช่วยในการแต่งกลิ่นรส เนื่องจากกระเทียมมีกลิ่นฉุนจัด ดังนั้นการใช้กระเทียมจึงต้องใช้อย่างระมัดระวัง หากใช้กระเทียมเป็นเครื่องปรุงรสอย่างถูกส่วน อาหารก็หอมอร่อยรับประทาน โดยเฉพาะกลิ่นก็จะไม่ไปกลบกลิ่นของส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารนั้น และจากการที่เราใช้กระเทียมปริมาณน้อยในการปรุงอาหาร จึงไม่น่าทำให้สารที่มีคุณค่าทางอาหารได้ในปริมาณที่มากเพียงพอแต่ความต้องการของร่างกายจากข้อมูลในหนังสือคู่มือ คุณค่าทางอาหารของกระทรวงเกษตรสหรัฐกล่าวถึงผลของการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของหัวกระเทียมเฉพาะส่วนที่กินได้ 100 กรัม(ในตารางที่1) และข้อมูลจากการวิจัยในประเทศไทยและต่างประเทศเช่น ผลการวิจัยของ Agricultural Research Institute , New Delhi , India ในประเทศอินเดีย ก็ได้ผลอย่างเดียวกัน แม้ว่าตัวเลขที่ได้จะไม่เท่ากันทุกประการ เนื่องจากปริมาณของวิตามินและเกลือแร่ที่ได้จากอาหารธรรมชาติ มักจะแตกต่างกันไปตามเงื่อนไขของการเพาะปลูก เช่น ดิน สภาพภูมิอากาศ ฤดูเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยว เป็นต้น ซึ่งจากตารางที่ 1 เราจะเห็นได้ว่าที่จริงแล้วกระเทียมไม่ได้อุดมด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในปริมาณมากมายเหมือนกับอาหารประเภทอื่นๆ

ยังไม่มีตารางคุณค่าทางอาหารของกระเทียม จากแหล่งวิจัยใดๆ ที่ระบุว่ากระเทียมมีกำมะถันเป็นองค์ประกอบมากกว่าผักชนิดอื่นๆ เพียงแค่มีการสันนิษฐานว่า กำมะถันในปริมาณสูงของกระเทียมนี้เองที่มีประโยชน์ต่อการบำบัดของโรคต่างๆ ได้ดี

ตารางที่ 1 : ปริมาณสารอาหาร ในกระเทียมดิบ 100 กรัม

สารอาหาร	ปริมาณต่อ 100 กรัม
พลังงาน	136-142 แคลอรี
คาร์โบไฮเดรต	31 กรัม
โปรตีน	6 กรัม
ไขมัน	0.2 กรัม
ความชื้น	61 กรัม
กาก	0.7-0.8 กรัม
น้ำมันหอมระเหย	0.1 มิลลิกรัม
เกลือแร่	
แคลเซียม	29 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	202 มิลลิกรัม
เหล็ก	0.5 มิลลิกรัม
โซเดียม	19 กรัม
โพแทสเซียม	529 มิลลิกรัม
วิตามิน	
วิตามินเอ	น้อยมาก
วิตามินบี 1 (ไทอามีน)	0.25 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน)	0.08 มิลลิกรัม
นิโคตินาไมด์	0.5 มิลลิกรัม
วิตามินซี	15 มิลลิกรัม

ที่มา : ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ธนาคารกสิกรไทย (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากกระเทียมจะมีคุณค่าทางอาหารแล้ว กระเทียมยังมีคุณค่าทางยา ซึ่งสารประกอบพวกซัลเฟอร์ที่มีมากในกระเทียม เป็นสารเคมีที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยสารเคมีที่สำคัญได้แก่

### 1.กลุ่มอัลลิอิน- อัลลิเนส – อัลลิซิน และเอ โจน (Allicin – Alliin – Ajone)

เป็นสารเคมีที่ส่วนประกอบเป็นสารระเหยของกระเทียมซึ่งทำให้กระเทียมมีกลิ่น โดยปกติแล้วกระเทียมเมื่อแรกเก็บแล้วจะไม่มีกลิ่น กลิ่นกระเทียมจะเกิดขึ้นทีหลัง เมื่อเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลีบกระเทียม ซึ่งเกิดขึ้นโดยสารอัลลิอินในกระเทียมซึ่งเป็นสารที่เสถียรภาพ ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และละลายน้ำได้ดี ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อนและด่างแต่ไม่ถูกทำลายโดยการเจือจาง จะถูกเอนไซม์อัลลิเนสเปลี่ยนให้เป็นอัลลิซิน ที่มีลักษณะเป็นน้ำมันเหลว มีกลิ่นฉุนแต่ไม่คงตัว สลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน ในเซลล์ของกลีบกระเทียมตามปกตินี้มีทั้งอัลลิซินและอัลลิเนสอยู่ด้วยกันแต่อยู่ด้วยกันคนละช่อง เมื่อใดที่กระเทียมถูกตัดหรือทำให้ชำ สารทั้งสองนี้จะผสมกันเกิดเป็นสารเคมี ทำให้เกิดอัลลิซินและอัลลิซินนี้เองที่มีบทบาทในการรักษาโรคอย่างกว้างขวางเช่น อหิวาตกโรค บิด กลากเกลื้อน ลดน้ำตาลในเลือด รวมทั้งเป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อโรคได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ



หากทิ้งอัลลิซินไว้เฉยๆ มันก็จะกลายเป็นสารอีกชนิดหนึ่ง คือ เอ โจน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารบำรุงเลือด นอกจากสารอัลลิซินยังเปลี่ยนเป็นสารเอ โจนได้ตามธรรมชาติแล้ว หากใส่อัลลิซินสังเคราะห์ลงในน้ำที่มีตัวทำละลายอย่างอ่อนแล้วให้ความร้อนลงไป กระบวนการที่อัลลิซินจะกลายเป็นเอ โจนจะรวดเร็วมากขึ้น

### 2.อัลลิไทอามีน หรือวิตามินบีหนึ่งชนิดพิเศษ (Allithiamine)

เป็นวิตามินบีหนึ่งที่มีอยู่ในกระเทียม เรียกว่า อัลลิไทอามีน มีคุณสมบัติทำให้การชักนำวิตามินบีหนึ่งเข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้นถึงเท่าตัว และทำให้วิตามินบีหนึ่งออกฤทธิ์และทำงานได้ดีขึ้นอีก 20 เท่าตัว

หน้าที่หลักของอัลลิไทอามีน ก็คือช่วยให้ร่างกายแยกส่วนของคาร์โบไฮเดรตออกเป็นพลังงาน ซึ่งถ้าหากขาดวิตามินบีหนึ่งชนิดนี้แล้วกระบวนการย่อยอาหารของร่างกายจะไม่สมบูรณ์ ทำให้ร่างกายขาดกลูโคส และคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนเป็นไขมัน

### 3.เซเลเนียม (Selenium)

ในกระเทียมมีเซเลเนียมมากกว่าพืชผักชนิดอื่นๆ เซเลเนียมเป็นแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม แต่เราต้องการในปริมาณที่น้อยมากคิดเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมเท่านั้น เพราะเป็นสารอาหารที่ร่างกายขาดไม่ได้เลย เซเรเนียมมีหน้าที่คล้ายวิตามินอีเป็นตัวต้านไม่ให้ออกซิเจนหลุดไปกับเม็ดเลือดแดง ทำให้เลือดของเราบริสุทธิ์และเชื่อกันว่า เซเรเนียมสามารถป้องกันการสะสมของโลหะหนักบางอย่างที่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น ตะกั่ว ปรอท เป็นต้น

#### 4. สคอร์ดินี (Scodinin)

เป็นสารในกระเทียมไม่มีกลิ่น แต่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายอย่าง รวมทั้งให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโต และช่วยลดไขมันในร่างกาย ในญี่ปุ่นจึงมีการเติมสคอร์ดินีลงไปในการเสริมสำหรับบำรุงร่างกาย และพบว่าสารสคอร์ดินี เป็นสารบำรุงตัวเดียวที่พบในโสม มีคุณสมบัติคือ ทำให้หน้าที่คล้ายฮอร์โมนทั้งเพศหญิง และเพศชาย ซึ่งเป็นตัวควบคุมและปรับการทำงานของร่างกายให้เป็นปกติ และนอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกด้วย

#### 5. เยอรมันเนียม (Germanium)

เป็นธาตุที่พบว่ามีอยู่ในกระเทียมค่อนข้างสูง มีคุณสมบัติป้องกันและยับยั้งการเกิดมะเร็ง โรคหัวใจ โรคไต โรคตับอ่อน และอาการท้องผูก

นอกจากสารอาหารและสารเคมีในกระเทียมที่ได้ยกตัวอย่างมาในข้างต้น ในกระเทียมยังมีสารอาหารและสารเคมีอื่นๆ อีกมากที่ไม่สามารถแยกแต่ละตัวออกมาเป็นตัวเดียว เพื่อนำมาทำการพิสูจน์ได้ว่ามีคุณสมบัติอย่างไร เช่นเดียวกับสิ่งที่ได้ตามธรรมชาติโดยทั่วไปประโยชน์ที่ได้รับนั้น เกิดจากสารหลายๆ ตัวผสมรวมกันอยู่จากสารอาหารที่มีในกระเทียมดังได้กล่าวในตารางที่ 1 นี้ มีผู้ศึกษาและรายงานว่าสารอาหารในกระเทียมที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดมีส่วนสำคัญในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมักไส้กรอกหมักในแถบยุโรป ( อดิศร, 2542 ) หรือแม้แต่ผลิตภัณฑ์หมักประเภทเนื้อของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว มั้ม ไส้กรอกอีสาน เป็นต้น ล้วนมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกชนิดในอาหารหมักชนิดนั้นๆ

### 2.3 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นและยาวไม่มีสปอร์ รูปร่างกลม เดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ หรือวางตัวเรียงกันเป็นสายและในบางกรณีอาจมีเชลล์เกาะติดกัน 4 เชลล์ โดยทั่วไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์และไม่มีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เนื่องจากคุณลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรียแลคติกคือทนกรดและต้องการออกซิเจนในปริมาณน้อย (micro-aerophilic bacteria) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในที่ที่มีออกซิเจนได้ดี

เท่ากับสภาวะไร้อากาศ ด้วยเหตุนี้เองแบคทีเรียแลคติกจึงถูกจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และทนต่อออกซิเจน (Brock และคณะ,1984,Ingram,1975)

Lactic acid bacteria สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

Homofermentative

Heterofermentative

### 2.3.1 Homofermentative

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดแลคติกได้ประมาณ 90% เช่น *Lactobacillus casei* , *Lb.bulgalicus* , *Lb.plantarum* , *Pediococcus spp.* , *Streptococcus sp.*

Homofermentative bacteria มักจะให้เห็นว่าขั้นตอนเริ่มต้นในการหมักของกรดแลคติกมีลักษณะเหมือนกันกับการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ ฟอสเฟตที่ใส่ในข้าวหมักผสมน้ำร้อนเพื่อให้เป็นเบียร์จะเร่งการหมักให้เร็วขึ้น การขจัดโคเอนไซม์จาก *L.delbrueckii* มีความสามารถเปลี่ยน hexosediphosphate เป็น methylglyoxol เช่นเดียวกับปริมาณ methylglyoxol เป็น racemic lactic acid (ภูริวัฒน์,2539)

กรดแลคติกอาจเพิ่มขึ้นทันทีที่ผ่าน methylglyoxol โดยกลไกที่คล้ายคลึงกันนั้นของการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ ดังสมการ



ภาพที่ 1 : แสดงกลไกการหมักของการหมักเอทิลแอลกอฮอล์กับกรดแลคติก

ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงแสดงดังสมการนี้



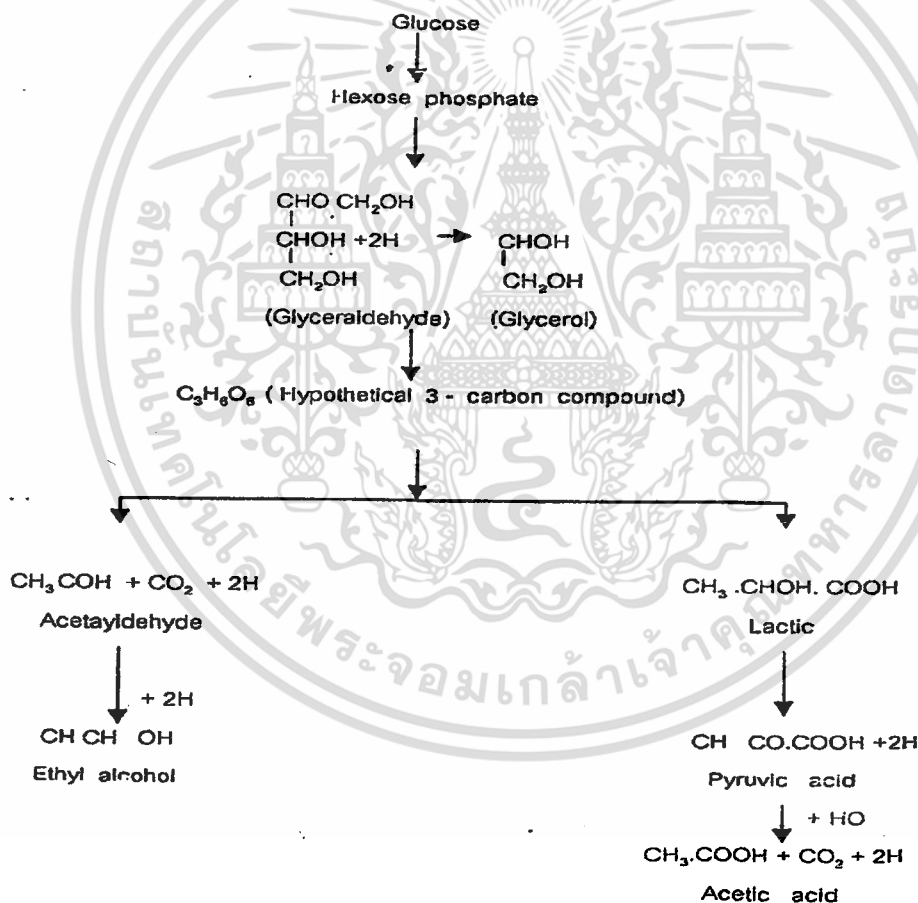
ภาพที่ 2 : แสดงกลไกการหมักกรดแลคติก

ที่มา:วรรณวิไลและสรินที (2544)

### 2.3.2 Heterofermentative

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณต่ำและมีสารประกอบอื่นๆ เกิดขึ้นด้วย ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก แบคทีเรียที่มีอยู่ในประเภทนี้ เช่น *Lactobacillus vaccinosterus*, *Lb.brevis*, *Leuconostoc* sp. ในการกำหนด dissimulation จะใช้สารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria โดยใช้ Glucose 2%, peptone 1 %, yeast extract 0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6%, pH=6.2 ทำการสเตอริไลส์โดยใช้เวลา 20 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 20 ปอนด์ ก่อนการเติมหัวเชื้อลงไป ซึ่ง mesh ถูกบ่มภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน ในโตรเจนอิสระที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับช่วงเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์

Nelson และ Werkman (1984) เสนอแนะแผนการทดลองสำหรับการ dissimulation จากกลูโคส โดยพวก Heterofermentative bacteria ดังขั้นตอนดังนี้ (Nelson, และ Werkman., 1984)



ภาพที่ 3 : แสดงกลไกการหมักกลูโคสแบบ Heterofermentative bacteria

ที่มา : กุลธิดา (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 2 : แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละสกุล

สกุล	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)
<i>Lactobacillus</i> spp	-
<i>Thermobacterium</i>	37-45
<i>Atreptobacterium</i>	28-32
<i>Betabacterium</i>	28-40
<i>Pediococcus</i> spp	25-33
<i>Streptococcus</i> spp	30-37
<i>Leuconostoc</i> spp	20-25

ที่มา : ภูริวัฒน์(2539)

#### 2.4.3. ระดับพีเอช

ถึงแม้แบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ที่ระดับ พีเอช ในช่วงค่อนข้างกว้าง 4-7.5 แต่ค่าพีเอช ที่เหมาะสมโดยทั่วไปอยู่ในช่วงประมาณ 6-6.5 และเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเมทาบอลิท์ น้ำตาลเป็นกรดแลคติก ทำให้พีเอช ของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ต้องคอยปรับค่าพีเอช ให้สูงขึ้นการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดนั้น นอกจากการเจริญจะช้าลงแล้ว ยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในขณะเก็บ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดมากๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินการหมักได้ทันที

การปรับค่าพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจำเป็นจะต้องทราบชนิดของด่างให้เหมาะสมซึ่งมีรายงานว่าในการเลี้ยง *Streptococcus* spp. นั้นการปรับค่าพีเอชด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์แต่ถ้าเชื้อที่ผลิตได้จะดำเนินการหมัก ได้ช้ากว่าถ้าที่ผลิตดัดการปรับค่าพีเอช ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เนื่องจากเชื้อมีประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสต่ำลง แต่ข้อเสียนี้จะไม่ส่งผลต่อกว่าชนิดที่ต้องนำไปเพิ่มจำนวนก่อนใช้งาน เนื่องจากในระหว่างการเตรียม bulk starter เชื้อจะปรับตัวสร้างโปรติเอสได้ตามเดิม อย่างไรก็ตามการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ปรับค่าพีเอชจะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในขณะแช่แข็ง นานกว่าถ้าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในการปรับค่า pH ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สำหรับการเลี้ยง *Lactobacillus acidophilus* นั้น เมื่อพบว่าการปรับค่าพีเอช ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต เชื้อจะเจริญได้ดีกว่า เนื่องจากมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์อย่างช้าๆ ซึ่งก๊าซนี้จะทำให้เกิดบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

#### 2.4.4. ออกซิเจน

แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เรียกว่า ไมโครแอโรไฟล์(microaerophile)ซึ่งเมตาบอไลต์สารอาหารด้วยกระบวนการหมักในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงต้องพ่นอากาศ แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้องมีการรบกวน ซึ่งมีผลให้อากาศลงไปให้อาหารได้ และทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะเช่นนี้เชื้อจะเจริญช้าลง ซึ่งการแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสหรือสารรีดิวซ์ตัวอื่นๆ เช่น พวกรูบ्रोเวทหรือเฟอร์รัสซัลเฟต นอกจากการเติมสารดังกล่าวแล้ว การพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในถังเลี้ยงเชื้อเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

#### 2.5 ประโยชน์ของกระเทียมในอาหารหมักประเภทเนื้อ

กระเทียมสับในการหมักอาหารประเภทเนื้อนอกจากจะช่วยส่งเสริมการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแลคติกแล้ว การที่อาหารหมักสามารถเก็บรักษาได้นานมิใช่เพียงกรดแลคติกทำให้พีเอชของอาหารลดลงเท่านั้น แต่สารยับยั้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ไดอะเซทิล (diacetyl) และแบคทีริโอซิน (Bacteriocin)

##### 2.5.1. กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมัก จะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถทนกรด เช่น *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp เป็นต้น กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้และแตกตัวเป็นไอออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดต่างภายในเซลล์ของแบคทีเรียน้อยลง หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น

##### 2.5.2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เพราะแบคทีเรียแลคติกไม่มีเอนไซม์จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ กลายเป็นสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไทโอไซยานต โดยมีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส เป็นตัวเร่ง ได้ผลผลิตที่เป็นตัวยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

### 2.5.3. ไดอะเซทิล (Diacyty)

ไดอะเซทิลมีชื่อทางเคมีว่า 2,3-butanediol เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแลคติกซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวท ที่เป็นสารตัวกลาง ไดอะเซทิลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนย เพราะเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก ไดอะเซทิลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ จะมีความไวต่อไดอะเซทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

### 2.5.4. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน คือสาร โปรตีน โมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว เป็นสารต่อต้านจุลชีพ (Antimicrobial substance) มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะและ มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะ แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแง่ของการทำลายกลไกทางการทำงานและสมบัติที่แตกต่างกัน

แบคเทอริโอซิน ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus* เป็นต้น ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* ดังนั้น แบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคเทอริโอซินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แบบที่ 1 มีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน เช่น กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์แลคติกและกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เป็นต้น

แบบที่ 2 มีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่กว้างกว่าโดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น (Daeschel, 1989)

## 2.6 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกและการจัดจำแนก

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีจุดสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง เมื่อพิจารณาสมบัติอื่นๆประกอบ ได้แก่ โครงสร้างปฐม

ภูมิ มวลโมเลกุลและความเสถียรต่อความร้อน สามารถแบ่งแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น 4 กลุ่มคือ

#### 1. แลนทิไบโอติก (Lantibiotic)

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดดีไฮโดรไทโอเอเทอร์ (dehydrothioether) แลนไทโอนิน และ 3-เมทิลแลนไทโอนิน สร้างขึ้นโดยดัดแปลงกรดอะมิโนปกติในสารเปปไทด์หลังกระบวนการแปลรหัส แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ของแบคทีเรียเป็นชนิด A มี โครงสร้างคล้ายเกลียวที่ขี้ออก (ชนิด B โครงสร้างเป็นก้อนกลม) ได้แก่ carnocin UI49 , cytosin L1, cytolysin L2 , lacticin 481 , lactocin S , lactococin , mutacin , nisin A , nisin Z , salivaricin A , streptococin a-FF22

2. แบคทีเรียโอซินที่เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนอุณหภูมิตั้งแต่ 100 – 121 องศาเซลเซียส แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่มย่อย a.

เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Listeria spp.* ได้ดี กลุ่มย่อยนี้มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกัน (38-55เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะที่ด้านปลายเอ็นมีรูปแบบของกรดอะมิโนเป็น Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Gys บางครั้งเรียกกลุ่มนี้ว่า แบคทีเรียโอซินในตระกูล Pediocin พบในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด เช่น Pediocin PA-1 ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 , Sakacin A ผลิตโดย *Lactobacillus sake* 706 และ Enterococcus

กลุ่มย่อย b.

เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยสายเปปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกัน จึงจะมีประสิทธิภาพ ลักษณะคล้ายแบคทีเรียโอซิน เป็นองค์ประกอบร่วม ได้แก่ Lactococin G , Lactacin F , LaLactococin M

กลุ่มย่อย c.

เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยหมู่ไทออล

#### 3. แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) รวมทั้งเอนไซม์ เช่น ฮีโมไลซิน (hemolysins) และ มิวรามิเดส (muramirase) แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ไม่ทนความร้อนแยกได้จากสกุล *Lactobacillus* เท่านั้น เช่น Acidophilucin A , Caseicin 80

4. แบคทีเรียโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วมสำหรับการออกฤทธิ์ ไม่ได้รับการยอมรับนัก เพราะอาจเกิดจากการทำให้แบคทีเรียโอซิน บิรสุทธิไม่ดีพอ ลักษณะโดยสรุปของแบคทีเรียโอซินทั้ง 4 กลุ่ม แสดงได้ดังตาราง

ตารางที่ 3: แสดงการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่ม (class)	กลุ่มย่อย	ลักษณะ
I		แลนติไบโอติก
II		แบคทีเรียโอซินขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนความร้อน 100-121 องศาเซลเซียส
	IIa	ออกฤทธิ์ต่อ <i>Listeria</i> ประกอบด้วย -Y-G-N-G-V-X-C- บริเวณใกล้เคียง ปลายด้านเอ็น
	IIb	การออกฤทธิ์ต้องการ โปรตีนชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบร่วม
	IIc	การออกฤทธิ์ต้องการหมู่-ไทออล
III		แบคทีเรียโอซินขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตันไม่ทนความร้อน
IV		แบคทีเรียโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือและไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

ที่มา : Ouweland (1998)

## 2.7 กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซิน

การสร้างแบคทีเรียโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นยีนโครงสร้างและส่วนที่เป็น repressor gene โดยปกติเมื่อนำแบคทีเรียที่มียีนควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินมาเพาะเลี้ยง พบว่ามีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการผลิตแบคทีเรียโอซินโดย repressor gene ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างแบคทีเรียโอซินได้เมื่อเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

ในขั้นตอนการสร้างแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียโอซิน จะสร้างขึ้นในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ต่อจากนั้นก็รวมตัวกับ immunity protein ในอัตราส่วน 1: 1 โมเลกุลของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้ จะผ่านเนื้อเยื่อชั้นในและสะสมอยู่ในบริเวณ periplasmic space และแผ่ขยายไปถึงบริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งที่บริเวณพื้นผิวหน้าแบคทีเรียสารเชิงซ้อนดังกล่าวจะจับกับ Polysaccharides หรือ O-antigen ของ couter membrane และท้ายที่สุดสารเชิงซ้อนนี้จะทำให้เกิด crude bacteriocin และขับออกสู่ภายนอกเซลล์

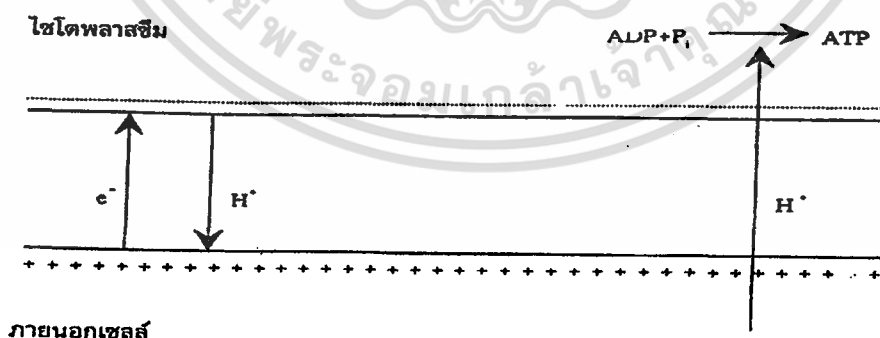
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียไอซอินและการต้านทาน

แบคทีเรียไอซอินแต่ละกลุ่ม มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแตกต่างกัน แต่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่เหมือนกันคือ การยึดเกาะกับผิวเซลล์ และการสร้างโพรง (pore) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียไอซอินแต่ละชนิด มีผลต่อแบคทีเรียไม่เท่ากัน เช่น mycobacteria ทนต่อไอซอินสูงกว่า staphylococci , streptococci , bacilli และ clostridia ประมาณ 100 เท่า บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือ บางเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันทนต่อแบคทีเรียไอซอินแตกต่างกัน เซลล์ที่สามารถผลิตแบคทีเรียไอซอินชนิดหนึ่งอาจไม่ทนต่อแบคทีเรียไอซอินชนิดอื่นและภายใต้สภาวะปกติแบคทีเรียแกรมลบทนต่อแบคทีเรียไอซอินจากแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียไอซอินกลุ่มที่ 3 และ 4 ไม่เป็นที่รู้จักกันดีแต่แบคทีเรียไอซอินส่วนใหญ่ ยกเว้น lactococcin 972 สามารถทำให้แบคทีเรียตายหรือหยุดการเจริญ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงแบคทีเรียไอซอินกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีกลไกการออกฤทธิ์ดังนี้

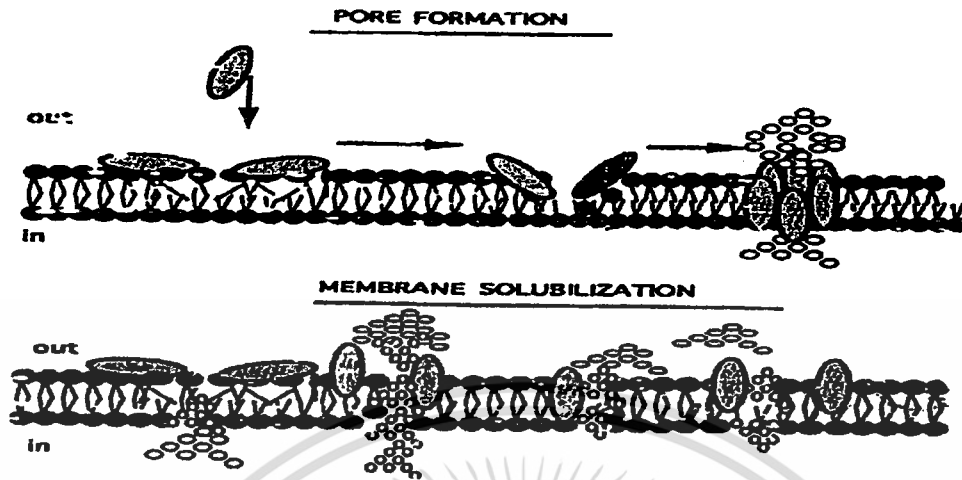
### 1. แลนติไบโอติก

แบคทีเรียไอซอินกลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย (energized membrane) เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดโพรง และสูญเสียแรงเคลื่อนโปรตอน (proton motive force ; PMF) เนื่องจากตามปกติระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ อิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์พร้อมกับ การเคลื่อนออกของโปรตอน จึงเกิดความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อโปรตอนเคลื่อนกลับเข้าสู่เซลล์อีกครั้ง จะเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์พลังงานในรูป ATP ดังภาพที่ 2 ดังนั้นเมื่อเกิดโพรงที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีการเคลื่อนย้ายของ ไอออนอย่างอิสระ ทำให้ความต่างศักย์ลดลง ไม่มีการสร้างพลังงานขึ้น เซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่น้ำสามารถไหลเข้าพร้อมกับการไหลออกของสารโมเลกุลขนาดเล็ก ทำให้เซลล์เกิดการแตกจากแรงดันออสโมติก



ภาพที่ 5 : แสดงการเกิดแรงเคลื่อนจากโปรตอนและการสร้างพลังงาน ATP

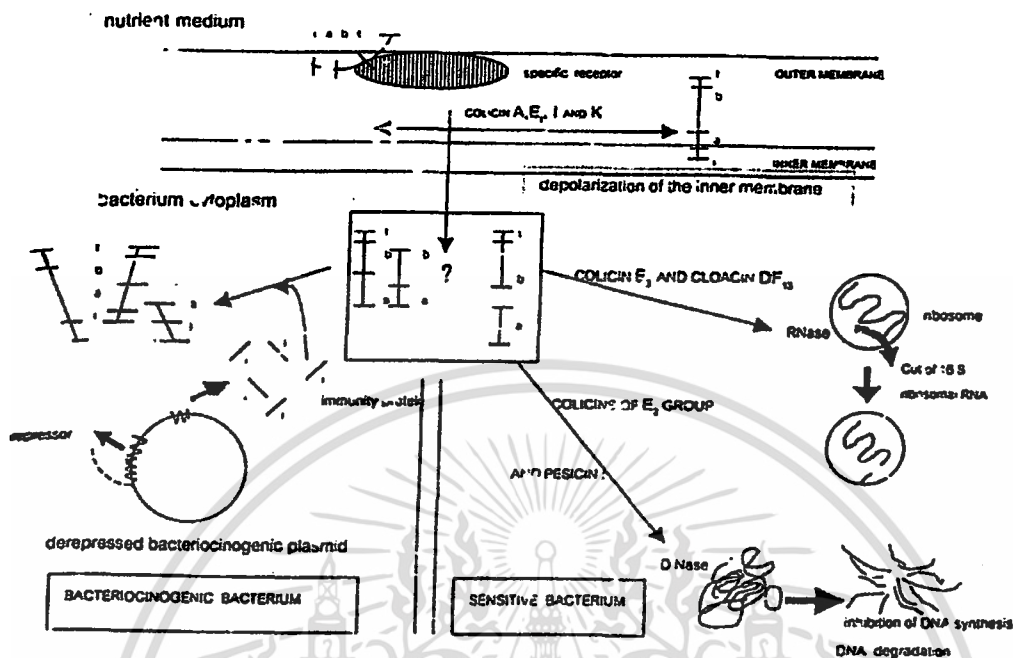
ที่มา : ดัดแปลงจาก Dykes



ภาพที่ 6 : แสดงการเกิด โพร่งเมื่อเกิดการยับยั้งจากแบคทีเรียโอซิน

ที่มา : Michael และคณะ

2. แบคทีเรียโอซินขนาดเล็กซึ่งทนความร้อนกลุ่มนี้ ต้องการตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (energy-independent) โพร่งที่เกิดขึ้นมีผลต่อเซลล์คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 1 คือเกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร เกิดการสูญเสียแรงเคลื่อนจากโปรตอน และเกิดการหยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA)อาร์เอ็นเอ (RNA)และโปรตีน เซลล์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินมีการสร้างภูมิคุ้มกันในรูปแบบของโปรตีนขึ้นพร้อมกัน เนื่องจากมักมีขึ้นที่เกี่ยวกับการต้านทานในตำแหน่งถัดลงมา(down stream)จากยีน โครงสร้างของการผลิตแบคทีเรียโอซิน โปรตีนคุ้มกัน (immunity protein) มีขนาดค่อนข้างเล็ก คือ มีกรดอะมิโนระหว่าง 51-150 หน่วย และมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิด เช่น โปรตีนคุ้มกันของ sakacin A และ curvacin A ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่มีลักษณะคล้ายกันกลับมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 90 และ 51 หน่วยตามลำดับกลไกการทำงานของโปรตีนภูมิคุ้มกันยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาโปรตีนภูมิคุ้มกันขนาด 11 กิโลดาลตันของ lactococcin A (Lci A)พบว่า โปรตีนนี้อยู่อย่างอิสระในไซโทพลาสซึม(50-90 เปอร์เซ็นต์)และติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยแทรกส่วนที่เป็นเกลียวไว้ด้านในและหันส่วนด้านปลายออกด้านนอกเซลล์ การป้องกันเซลล์ โปรตีนภูมิคุ้มกันจะจับกับโปรตีนซึ่ง lactococcin A ใช้เพื่อดูดซับผิวเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสร้างโพร่งในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ได้



ภาพที่ 7 : แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีริโอซิน  
ที่มา : กุลธิดา (2547)

สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหาร อาจจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ หรือทำลายจุลินทรีย์ ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพอาจแบ่งได้เป็น การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (Permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เสียความสามารถในการทำงาน เช่น ความสามารถในการต่อต้านของสารจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะจำกัดการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพนี้ สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ ในชั้น lipopolysaccharide ได้ง่ายทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้ทำให้สารพันธุกรรมเสีรูปร่างหรือหน้าที่ผิดไปจากเดิม อย่างไรก็ตามได้มีความสนใจนำแบคทีเรียไปใช้ในอาหารสำหรับมนุษย์มากกว่าแบคทีริโอซินชนิดอื่นๆ ได้มีการนำสาร โมเลกุลใหญ่ดังกล่าวไปใช้ในวิทยาศาสตร์และการถนอมอาหาร และกระบวนการทางเป้าหมายของส่วนแบ่งทางเศรษฐกิจ และเป็นทางเลือกใหม่แทนสารเคมีถนอมอาหาร

## 2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่ ทำการศึกษาภายในไนซิน ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินทางการค้าที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถสรุปปัจจัยต่างๆ ได้ดังนี้

1. ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sakei* และ *Listeria sp.* ส่วน Piscicocin V1 และ Divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L.monocytogenese*, *L.innocua* และ *C.tyrobutyricum*

2. สภาพที่ก่อให้เกิดการเสียดสภาพทางชีววิทยาของแบคทีเรียโอซินนั้น จะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิเอนไซม์ย่อยสลาย โปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การกลีขาคของแบคทีเรียโอซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ a-chymotrypsin และ nisinase , lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K

3. การรวมตัวกันของแบคทีเรียโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารที่เติมลงไป พบว่า เกลือไนเตรด กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมันเนย ฟอสฟอลิปิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอลจะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

4. ค่าพีเอชของสารละลายหรือตัวกลาง จะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินสามารถละลายได้ 12% และ 4% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาพที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินยังสามารถทนความร้อนได้ดี โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100°C ได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121°C จะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน Lacticin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าพีเอช 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่พีเอชเท่ากับ 2 นอกจากนี้ Diplococin จะมีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5 โดยสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ได้นาน 1 ชั่วโมง (กุลธิดา, 2547)

## 2.10 การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารด้วยการใช้แบคทีเรียแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (general recognized as safe : GRAS) โดยแบคทีเรียแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ด้วยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหารรวมทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดออกมา ซึ่งในกลุ่มของสารดังกล่าว พบว่า แบคทีเรียโอซิน โดยเฉพาะไนซินที่มีการผลิตขายภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin เป็นแบคทีเรียโอซิน เพียงชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับในทางด้านความปลอดภัย จาก FDA และ FAO/WHO

ไนซินบริสุทธิ์สามารถแยกได้จาก *Lactobacillus lactis* ทำการแยกเป็นครั้งแรกโดย Mattick และ Hirsch ในปี ค.ศ.1947 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้คาดว่าจะมีความเข้มข้นของไนซินเพียง 2-4 % ไนซินบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อมามีความเข้มข้นสูงชันและมีรูปแบบต่างๆปะปนกัน ได้แก่ ไนซินเอ ไนซินบี ไนซินซี ไนซินดี และไนซินอี โดยไนซินเอมีสัดส่วนมากที่สุดและมีการศึกษามากที่สุด ไนซินเหล่านี้มีสมบัติต่างกันโดยไนซินเอ และบี ออกฤทธิ์ต่อ *Streptococcus agalactiae* สูงกว่าไนซินซีและไนซินดี 5 เท่า ไนซินบี ไนซินซี และไนซินอี ย่อยสลายด้วยไนซินเนส (nisinase) จาก *Bacillus aureus* แต่ไนซินดี เสถียรต่อเอนไซม์ดังกล่าว ไนซินเป็นสารที่เป็นสารที่ไม่มีพิษต่อคน ทนความร้อน ถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ไม่ทำให้อาหารมีกลิ่นรสที่ผิดปกติไป นอกจากนี้ไนซินจะไม่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ ปัจจุบันพบว่ามีการใช้ไนซินในอุตสาหกรรมแปรรูปและการถนอมอาหารชนิดต่างๆในมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก โดยอุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้ไนซินกันมาก ได้แก่

- 1.อุตสาหกรรมผลิตเนย การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 3.75-12.50 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดบิวไทริก เช่น และ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนยและผลิตภัณฑ์มีกลิ่นและรสผิดปกติ
- 2.อุตสาหกรรมผลิตนมพร้อมดื่ม การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่า F<sub>0</sub> สำหรับการฆ่าเชื้อ *C.botulinum* ในผลิตภัณฑ์นมช็อคโกแลต จาก 11 นาที ลงมาเหลือ 3 นาที
- 3.อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ การใช้ไนซินที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-500 ยูนิตต่อกรัมของอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญของ *L.monocytogenese*, *S.aureus*, และแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ได้นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *C.botulinum*, *C.sporogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทดแทนการใช้สารไนเตรต เพื่อป้องกันหรือลดการเกิดสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

4.อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (low acid canned food) การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม ในถั่วบรรจุกระป๋องสามารถลดความร้อนในการฆ่าเชื้อลงได้ 60 % ส่วนในอาหารที่เป็นกรด (acid food) การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 100-200 ยูนิต์ต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *C.pasteurium*, *C.butyricum*, *B.thermoacidurans*, *B.coagulans* และ *B.macerans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียได้

5.อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 100-1,000 ยูนิต์ต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc oenos* และ *Pediococcus damnosus* ซึ่งสร้างสาร ในกลุ่ม malolactic , glycerol , butyleneglycol และ tartaric acid ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ไวน์ทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไนซินไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมักแต่อย่างไร(กุลธิดา , 2547)

## 2.11 กลไกการออกฤทธิ์ของไนซินและการต้านทาน

ไนซินมีการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับแบคทีริโอซินกลุ่มที่ 1 (แลนทิไบโอติก) คือ ไม่มีตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การจับเซลล์เป้าหมายเกิดจากแรงทางไฟฟ้าสถิตย์หรือแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) และกรดไลโปไทโคอิก (lipotrichoic acid) ในผนังเซลล์ โดยไนซินออกฤทธิ์ต่อเซลล์ระยะเจริญได้ดีกว่าระยะเจริญคงที่ และต้องการพลังงานและความต่างศักย์ที่เหมาะสม(80-100 มิลลิโวลต์) จากเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายในการออกฤทธิ์แต่ละส่วนของไนซิน มีผลต่อการออกฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น ดีไฮโดรอะลาโนในตำแหน่งที่ 5 ของโมเลกุล (Dha) ไม่มีความสำคัญต่อการทำลายเซลล์แบคทีเรียแต่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ เมื่อนำมาทำการศึกษาไนซินโดยการขจัดกรดอะมิโนบางหน่วยหรือทำลายพันธะเปปไทด์ เพื่อให้ได้ไนซินขนาดและลักษณะแตกต่างกัน ดังนี้

ตารางที่ 4 :แสดงการออกฤทธิ์ของโนซินส่วนต่างๆต่อเซลล์แบคทีเรีย

โนซิน	ขนาดโมเลกุล	ความเข้มข้นต่ำสุดของการออกฤทธิ์ (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม)	
		Lc.lactis	M.luteus
โนซินปกติ	3354.8	0.08	0.07
<sup>b</sup> [Ser <sup>33</sup> ]-โนซิน	3373.6	0.12	0.08
<sup>c</sup> โนซิน <sup>1-32</sup> เอไมด์	3157.0	0.04	0.05
<sup>d</sup> โนซิน <sup>1-31</sup>	3060.9	0.70	nd <sup>a</sup>
<sup>e</sup> โนซิน <sup>1-29</sup>	2808.0	1.28	0.79
<sup>f</sup> โนซิน <sup>1-20</sup>	1881.2	9.21	3.5
<sup>g</sup> [Ala <sup>15</sup> -OH , H-Leu <sup>15</sup> ] โนซิน <sup>1-29</sup> 2828.1 >400 ~10	2828.1	>400	~100
<sup>h</sup> [des-Leu <sup>16</sup> ,Ala15-CH <sub>3</sub> ,H-Met <sup>17</sup> ]โนซิน <sup>1-29</sup>	2715.8	>400	~200
<sup>i</sup> โนซิน <sup>1-12</sup>	1151.7	>200	16.5
<sup>j</sup> [des-Dha <sup>5</sup> ]โนซิน <sup>1-32</sup> เอไมด์	nd <sup>a</sup>	>200	4.48

## หมายเหตุ

- <sup>a</sup> : ไม่มีการระบุ  
<sup>b</sup> : โนซินซึ่งแทนที่ Dha<sup>33</sup> ด้วยกรดอะมิโนซีรีน  
<sup>c</sup> : โนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1-32  
<sup>d</sup> : โนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1-31  
<sup>e</sup> : โนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1-29  
<sup>f</sup> : โนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1-20  
<sup>g</sup> : โนซินที่มีการทำลายพันธะระหว่าง Ala<sup>15</sup> และ Leu<sup>16</sup> ของโนซิน  
<sup>h</sup> : โนซินที่มีการทำลายพันธะระหว่าง Ala<sup>15</sup> และ Leu<sup>16</sup> ของโนซิน<sup>1-29</sup>  
<sup>i</sup> : โนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 1-12  
<sup>j</sup> : โนซินที่มีการขจัด ของโนซิน<sup>1-32</sup>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Chan และคณะ ,1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

จากการศึกษาพบว่า การกำจัดดีไฮโดรอะลานีนตำแหน่งที่ 35 ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของไนซิง การกำจัดปลายด้านซี (C-terminal) ออกจากโมเลกุล ทำให้ไนซิงออกฤทธิ์ลดลงเล็กน้อย การกำจัดกรดอะมิโนวาเลอีน(valine) ตำแหน่งที่ 32 ทำให้ไนซิงออกฤทธิ์ลดลงเท่ากับ การทำลายพันธะเปปไทด์ระหว่างวงแหวนดีและอี ทำให้ไนซิงออกฤทธิ์ต่อ *Lactobacillus lactis* และ *Micrococcus luteus* ลดลง 100 และ 50 เท่า ตามลำดับ การกำจัดดีไฮโดรอะลานีนตำแหน่งที่ 5 ในวงแหวนเอ การทำลายพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) ตำแหน่งที่ 15 และลิวซีน(leucine) ตำแหน่งที่ 16 การกำจัดกรดอะมิโนลิวซีนตำแหน่งที่ 16 และการกำจัดวงแหวนซี ทำให้ไนซิงสูญเสียการออกฤทธิ์ จึงสรุปได้ว่า ส่วนต่างๆ ในโมเลกุลไนซิง ได้แก่ วงแหวนเอ, ซี, ดี, อี และกรดอะมิโนวาเลอีนตำแหน่งที่ 32 มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของไนซิงสูง ด้านปลายซีมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของไนซิงเล็กน้อย และ ดีไฮโดรอะลานีนตำแหน่งที่ 33 ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของไนซิง

การสร้างโปรตีนชั้นเยื่อหุ้มเซลล์โดยไนซิงมีรูปแบบคล้ายสติกซ์จัดประตุ คือ ปลายด้านเอ็น (วงแหวนเอ, บี และซี) ทำหน้าที่ยึดโมโนเมอร์หรือโอลิโกเมอร์ของไนซิงกับเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งความแข็งแรงของการยึดจับขึ้นกับประจุของชั้นฟอสโฟไลปิด ขณะที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 20-22 ทำหน้าที่เป็นข้อพับให้ความยืดหยุ่นกับปลายด้านซีในการแทรก เพื่อสร้างโพรงชั้นไฮโดรโฟบิก โดยระดับความลึกของการแทรกอยู่ระหว่าง 0.36-0.52 นาโนเมตร ขึ้นกับชนิดของไขมัน นอกจากนี้ยังพบว่าไนซิงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารต่างๆ ที่สำคัญคือ *L.monocytogenes* ที่ก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส ซึ่งจุลินทรีย์นี้มักพบในผลิตภัณฑ์นม

การประยุกต์การใช้แบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารสามารถดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะ คือ

- 1.การเติมแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก
- 2.การเติมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร
- 3.การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน ลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหารซึ่งทดลองประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ ในการถนอมอาหารดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5: แสดงการใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรียโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	แบคทีเรียที่ต้องการควบคุม / ผลที่ได้รับ
Enterocin 4	ใช้ <i>Enterococcus faecalis</i> INIA 4 ซึ่งผลิต Enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	<i>Listeria monocytogenes</i>
Nisin A	ใช้เติมลงในกระบวนการผลิตเนย	Ohio
Leucocin A	ใช้ <i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187 ซึ่งผลิต Leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ <i>Lactobacillus sakei</i> ได้นาน 8 สัปดาห์
Lactocin 705	ใช้ในการผลิตเนยอบ	<i>Listeria monocytogenes</i>
Pediocin AcH	ใช้ <i>Pediococcus acidilactici</i> ซึ่งผลิต Pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้กรอกไก่แบบเปรี้ยวและใช้เติมลงในไก่สด	<i>Listeria monocytogenes</i>
Enterocin	เติมลงในแฮม เนื้อ ไก่ และไส้กรอก	<i>Listeria monocytogenes</i>
Pediocin	ถ่ายทอดยีสที่ควบคุมการสร้าง Pediocin ไปสู่ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์

ที่มา: กุลธิดา (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.12 รายงานการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการควบคุมคุณภาพของการหมักแหมม

อดิศร(2533)ได้ทำการทดลองนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมของ *Lactobacillus* spp. (L1) และ *Pediococcus* spp.(P55) เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหมมที่มีการเติมเชื้อในกลุ่มซาลโมเนลลา 3 สายพันธุ์ *Samonella derby*, *S.anatum* และ *S.newport* เทียบกับแหมมที่หมักโดยธรรมชาติ ที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลคติก แต่เติมปริมาณการปนเปื้อนของซาลโมเนลลา 3 สายพันธุ์ ดังกล่าวในปริมาณที่เท่ากัน พบว่า การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมของ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp มีผลในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อซาลโมเนลลาให้หมดไปในระหว่างการหมักแหมมได้เร็วกว่า แหมมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก นอกจากนี้ แหมมที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังมีรสชาติเป็นที่ยอมรับในด้านรสชาติ รสสัมผัส และลักษณะปรากฏ ทางด้านสีของผลิตภัณฑ์จากผู้ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักแหมมเพื่อการควบคุมคุณภาพความปลอดภัยในระหว่างการหมักจึงน่าจะเป็นไปได้สูง

การศึกษาผลของกระเทียมในการหมักแหมมเมื่อใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus curvatus* ,*L.sake* และ *Pediococcus acidilactici* เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหมม ซึ่งกระเทียมมีส่วนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกและการสร้างกรดแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับหมักแหมมที่หมักโดยธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อเริ่มต้นพบว่า การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและกระเทียมในการหมักแหมม จะช่วยให้ผลิตกรดแลคติกได้มากขึ้น ในขณะที่ผลิตกรดอะซิติกได้น้อยลง เป็นผลให้แหมมมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาทั้งกล้าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *L.sake* ผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด และช่วยให้แหมมที่ได้มีค่าพีเอชลดลงเร็วที่สุดในการใช้อาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแหมม มีสภาพการหมักเหมือนกับการหมักแหมมจริง ซึ่งกล้าเชื้อแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ใช้จะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมไม่แตกต่างไปจากการหมักแหมมจริง พบว่า การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยในการพัฒนาคุณภาพของแหมม

ในช่วงทศวรรษการใช้กล้าเชื้อแลคติกได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการหมักอีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับในด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ ทางด้านสีของผลิตภัณฑ์ และเป็นการพัฒนาให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคมากขึ้น สายพันธุ์แรกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. , *Pediococcus* sp. และ *Micrococcus* sp.หรือ *Staphylococcus* sp. ซึ่ง *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. สามารถผลิตกรดแลคติกได้จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยกรดแลคติกที่สร้างขึ้นจะช่วยให้ค่าพีเอชลดลงและช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการให้เจริญในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์อีกทั้งยังช่วยในด้านกลิ่น

รส *Micrococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. จะช่วยลดปริมาณไนเตรตที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์โดยจะเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรท์และช่วยให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงตัว

จากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติก (*L.curvatus*, *L.sake* และ *P.acidilactici*) ในแฮมเปรียบเทียบกับการหมักแฮมตามธรรมชาติพบว่า ภายหลังจากการหมักแฮม 3 วัน จะมีค่าออกเตอร์แอกทิวิตีไม่ต่างกัน แต่การหมักแฮมที่มีการใช้กลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติกจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า ซึ่งการผลิตกรดแลคติกที่มากกว่าจะทำให้ค่าพีเอชลดลงได้มากกว่าการหมักแฮมตามธรรมชาติ โดยการใส่กลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติก ร่วมกับการใส่กระเทียม ในการหมักแฮมจะช่วยสร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าการหมักแฮมที่ใช้กลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติกเพียงอย่างเดียวที่ไม่มีการใส่กระเทียม ซึ่งกรดแอซิดิกที่ผลิตขึ้นจะมีปริมาณน้อยกว่า 0.10% การที่ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมากจะส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักลงโดยผลของการผลิตกรดแอซิดิกได้น้อยลงและยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เพราะกรดแอซิดิกที่ผลิตขึ้นในปริมาณมากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ โดย *L.sake* ผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุด และ *P.acidilactici* ผลิตน้อยที่สุด

สำหรับการหมักแฮมนั้น Swetwathana และ Lotong (1999) ได้เริ่มทำการคัดแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซิน เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นกลูต้ามิโนแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักแฮม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์แฮมให้หมดไปอย่างรวดเร็วในระหว่างการหมักและจากงานวิจัยได้พบว่าได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารยับยั้งที่ชื่อว่าแบคทีเรียโอซินหลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่เป็นที่น่าสนใจ เป็นสายพันธุ์ที่เก็บเชื้อไว้กับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ที่มีรหัส TISTR536 ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวได้ทำการวินิจฉัยชนิดสายพันธุ์ในภายหลัง พบว่าเป็นเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1 ซึ่งสาร pediocin PA-1 ของเชื้อนี้ไม่สามารถยับยั้งในกลุ่ม *Staphylococcus carnosus* ที่เป็นกลูต้ามิโนแบคทีเรียที่สำคัญในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อของยุโรปหลายชนิด เช่น ซาลามี่ โดยเชื้อที่ *S. carnosus* นี้ได้มีการตรวจพบว่าเป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์เนื้อและเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ที่มีผลทางอ้อมกับการคงสีชมพูแดงของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีการเติมไนเตรทไนไตรท์ให้คงตง ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาดังกล่าวถึงประสิทธิภาพในนำเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR536 ในการหมักแฮมเทียบกับแฮมที่หมักโดยธรรมชาติไม่มีการเติมกลูต้ามิโนแบคทีเรียและแฮมที่หมักด้วยเชื้อ *P.pentosaceus* JCMS890 ที่ไม่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซิน รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. anatum* ควบคู่ไปด้วยการทดลอง (Swetwathana และ คณะ , 2001a และ 2001b) ซึ่งการทดลองพบว่า การใช้ *P.pentosaceus* TISTR536 เป็นกลูต้ามิโนแบคทีเรียในการหมักแฮมนั้นจะทำให้แฮมที่ได้มีค่าพีเอชลดลงเร็วกว่าแฮมที่หมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกลูต้ามิโนแบคทีเรีย แต่ค่าพีเอชเมื่อเทียบกับแฮมที่

เดิมเชื้อ JCM 5890 จะให้ผลไม่แตกต่างกันมาก แต่ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.anatum* ของแฮมที่หมักด้วย TISTR536 นั้นจะให้ผลดีกว่าแฮมที่หมักด้วย *P.pentosaceus* JCM 5890 และแฮมที่หมักแบบธรรมชาติที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้ยิ่งเชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P.pentosaceus* TISTR536 น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแฮมเพื่อช่วยในการพัฒนาคุณภาพแฮมให้คงอยู่ในด้านรสชาติและลักษณะสัมผัสของผลิตภัณฑ์รวมถึงความเชื่อมั่นในด้านความปลอดภัยจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *S.anatum* และการศึกษาดังกล่าวน่าจะเป็นรูปแบบของการนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก รวมถึงอาหารหมักพื้นเมืองของไทยอีกหลายชนิดในอนาคต

### 2.13 ผลของกระเทียมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

อาหารเหลวที่จำลองสภาพการหมักแฮม NMB ซึ่งเป็นอาหารที่จำลองสภาพการหมักแฮมให้เหมือนกับการหมักแฮมจริง ข้อดีของการใช้ แฮมโมเดลบรอทจะทำให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันและสภาพการหมักปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยให้เราสามารถศึกษาว่ากระเทียมมีผลต่อการเจริญและการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักแฮมซึ่งกรดที่สร้างขึ้นมาจากกล้าเชื้อที่ใช้ในการศึกษา ไม่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้ทำแฮม เช่น โคลิฟอร์ม และยังช่วยในการติดตามผลการหมักของกล้าเชื้อที่ใช้ในการศึกษาได้ง่าย

จากการศึกษาพบว่าสเฟ็ดในกระเทียม จะเร่งกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ แล้วยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกและการผลิตกรดโดยการทำการทดลองศึกษาคุณสมบัติของกระเทียมต่ออาหารหมักประเภทเนื้อ (แฮม) โดยใช้เชื้อตั้งต้นสามชนิด คือ *Lactobacillus curvatus* L.sake และ *Pediococcus acidilactici* ทำการศึกษาจาก (Nham Model Broth , NMB) เป็นการจำลองสภาวะจากแฮมจริงภายใต้สภาวะการปลอดเชื้อ และสภาพการหมักไร้อากาศในห้องทดลองปฏิบัติการมีการเติมเชื้อตั้งต้นดังกล่าวลงไป โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากันมีการเติมและไม่เติมกระเทียมลงไป ผลปรากฏว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน คือ วันแรก วันที่สอง และวันที่สาม จำนวนเชื้อที่เติมกระเทียมจะมีปริมาณสูงกว่าที่ไม่เติมกระเทียมอย่างชัดเจนและในทำนองเดียวกันเมื่อปริมาณเชื้อสูงขึ้น เชื้อจะมีการผลิตกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมกระเทียมอย่างชัดเจน (Swetwivathana และคณะ,1999) และเมื่อได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการแล้ว ได้มีการนำมาทดลองกับผลิตภัณฑ์จริงพบว่าจากแฮมที่ไม่มีการเติมกระเทียมลงจะมีปริมาณเชื้อน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับการเติมกระเทียม ทั้งนี้รวมถึงการผลิตกรดแลคติกจะผลิตน้อยกว่าถึง 0.10 % ในระยะเวลาการหมักที่เท่ากันและรสชาติยังเป็นที่ยอมรับของผู้ทำการทดสอบชิมไม่แตกต่างจากแฮมทั่วไป

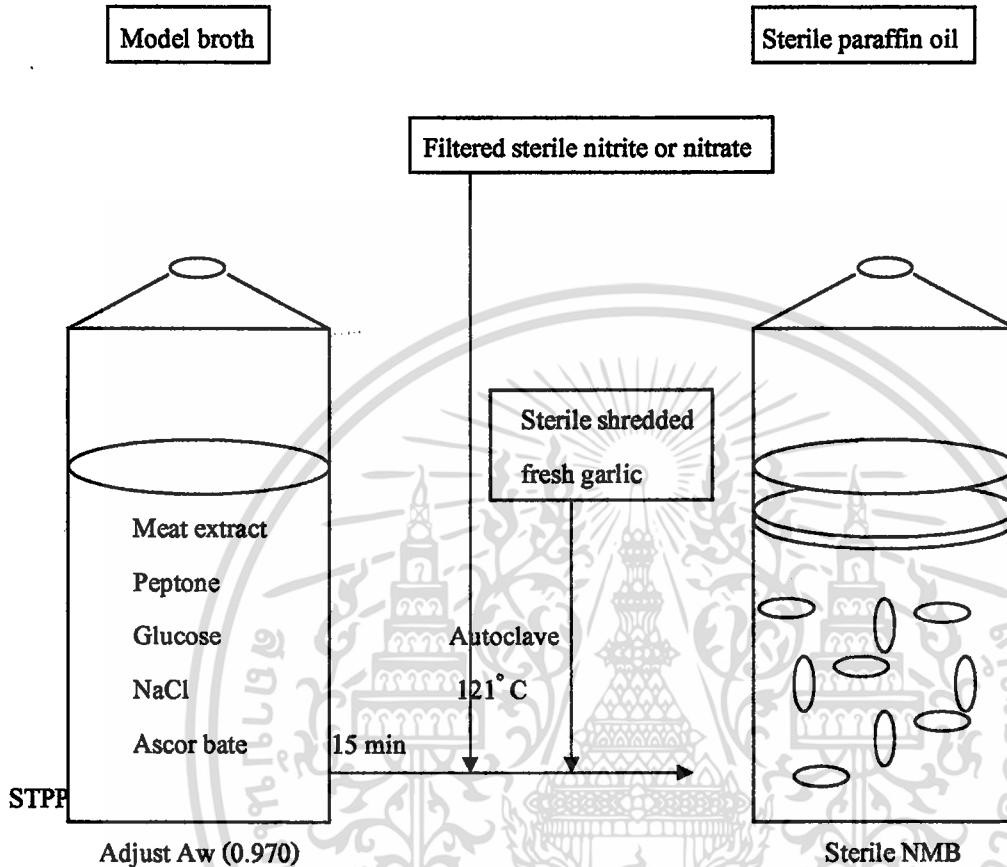
จากการศึกษาข้างต้นพบว่า กระทบส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติก อย่างชัดเจน อันเนื่องมาจากปริมาณธาตุแมกนีเซียมที่มีในกระเทียม ดังนั้นไม่ว่าจะในห้องปฏิบัติการหรือผลิตภัณฑ์จริง ข้อดีของการเติมกระเทียมคือช่วยร่นระยะเวลาการหมักลงมากเมื่อเทียบกับการโดยใช้วิธีทางธรรมชาติ และปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โรคอาหารเป็นพิษบางชนิดได้ ทำให้อาหารหมักมีความปลอดภัยต่อการบริโภคมากขึ้น (อดิศร,2542)

NMB สามารถทำได้โดยการใช้สารอาหารมาทดแทนส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำแฮม แล้วปรับสภาพการหมักแฮมให้เหมือนกับกรหมักแฮมจริง ดังนี้

1. หมูเนื้อแดงบด	650 กรัม	→	Meat extract ,Peptone
2. หนังหมู	350 กรัม	→	ไม่ใช่ปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ
3. ข้าวหุงสุก	60 กรัม	→	กลูโคส
4. กระเทียมสับ	50 กรัม	→	กระเทียมปลอดเชื้อหั่น
5. เกลือ	25 กรัม	→	NaCl
6. ไนไตรท์ / ไนเตรท	125/500 ppm	→	ละลายน้ำแล้วกรองผ่าน filter membrane ในปริมาณที่เท่ากัน
7. Ascorbic acid , STPP	0.5,0.3 กรัม	→	ใส่ในปริมาณที่เท่ากัน

ที่มา : Swetwivathana และ คณะ , 2001a และ 2001b

### Nham model broth (NMB)



ภาพที่ 8 : Nham model broth (NMB)

ที่มา : Swetwivathana และ คณะ , 2001a และ 2001b

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า กระเทียมส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติกอย่างชัดเจน โดยการเติมกระเทียมลงในแฮมปริมาณ 5% จะมีการเกิดสาร allucin อยู่ในความเข้มข้นต่ำ จึงทำให้กลิ่นที่สามสามารถเจริญในระหว่างการหมักแฮมได้ อันสืบเนื่องมาจากปริมาณธาตุแมงกานีสกับแมกนีเซียมที่มีในกระเทียม ดังนั้นไม่ว่าจะในห้องปฏิบัติการหรือผลิตภัณฑ์จริง ข้อดีของการเติมกระเทียมคือช่วยร่นระยะเวลาการหมักลงมากเมื่อเทียบกับการหมักโดยใช้วิธีทางธรรมชาติ และปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษบางชนิดได้ ทำให้อาหารหมักมีความปลอดภัยต่อการบริโภคมากขึ้น (อดิศร, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุดิบ

กระเทียม

#### 3.2 อุปกรณ์

1. ขวด-ฝาปิด
2. จานเพาะเชื้อ
3. ตู้บ่มตัวอย่างที่ 35-37 องศาเซลเซียส
4. หม้อน้ำความดัน...
5. Auto pipette
6. Vortex mixer
7. หลอด Eppendorf

#### 3.3 สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth (NMB)
2. Paraffin oil
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ  $MRS+0.5\%CaCO_3+1.2\%Agar$
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ LACTOBACILLI AGAR AOAC (LAA)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticate soy broth + agar + yeast extract (TSAYE)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticate soy broth + yeast extract (TSBYE)
8. ปราศจากเชื้อ
9. น้ำกรอง
10. 0.1% peptone
11. 95%alcohol
12. 70%alcohol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 เชื้อจุลินทรีย์

1. *Pediococcus pentosaceas* (TISTR 536) (เชื้อตั้งต้น)
2. *Lactococcus lactis* (N 190) (เชื้อตั้งต้น)
3. *Listeria innocua* (เชื้อ indicator)

### 3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

#### ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมแบบจำลองแฮม (Nham Model Broth)

##### 1.1 การเตรียมกระเทียมปลอดเชื้อ

- 1.1.1 ปอกกระเทียมให้จ้าน้อยที่สุด แล้วจึงแบ่งใส่ขวดขวดละ 5 กรัม
- 1.1.2 แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 60 นาที
- 1.1.3 ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบกระเทียมวางลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ ล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง
- 1.1.4 ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบกระเทียมวางลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงใช้มีดที่ปลอดเชื้อหั่นกระเทียมให้เป็นชิ้นเล็กๆ (ดังแสดงในภาพที่ 8)



ภาพที่ 9 : แสดงขั้นตอนการเตรียมกระเทียมปลอดเชื้อ

## 1.2 การใส่กระเทียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth (NMB)

1.2.1 นำ NMB 4 ขวด มากำหนดหมายเลข 1-4

1.2.2 ที่ 1,3 เติมกระเทียมขวดละ 5 กรัม

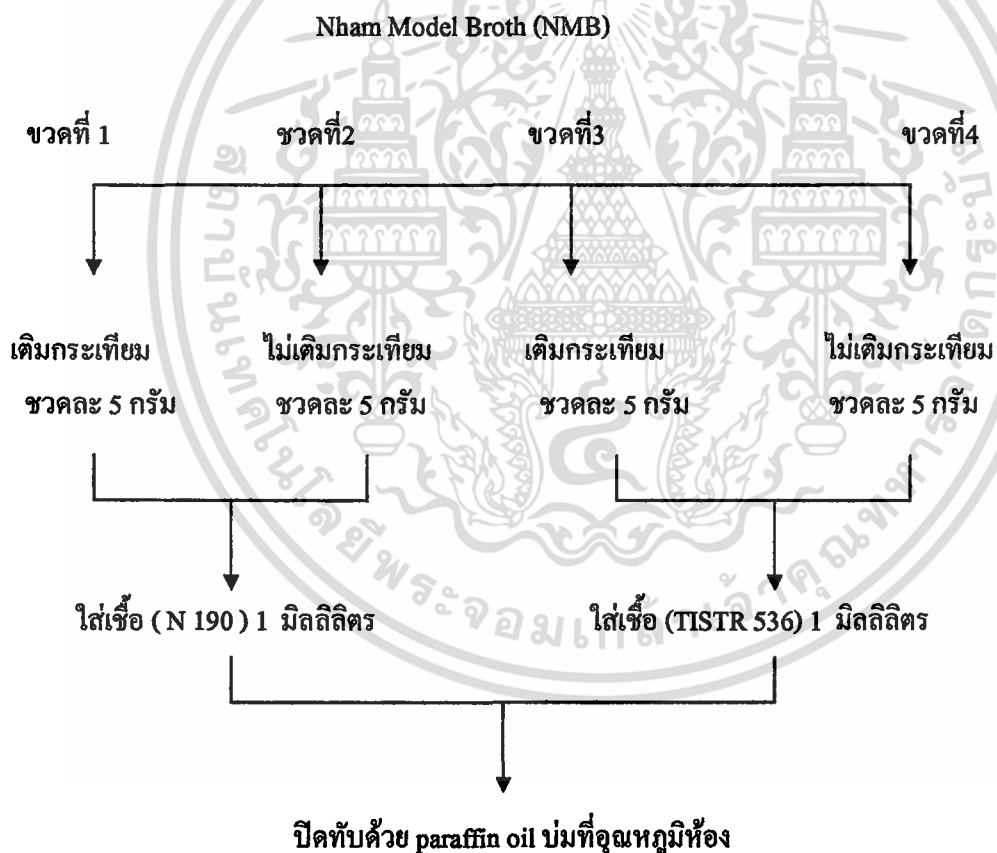
ขวดที่ 2,4 ไม่เติมกระเทียม

1.2.3 ใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* (N 190) ที่บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมนลงในขวดที่ 1,2 ขวด ละ 1 มิลลิลิตร

1.2.4 ใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* (TISTR 536) ที่บ่มใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมนลงในขวดที่ 3,4 ขวดละ 1 มิลลิลิตร ปิดทับด้วย paraffin oil เพื่อช่วยปรับสภาพการหมัก แบบ microaerobe โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อสัมผัสกับ อากาศน้อยที่สุด แล้วนำตัวอย่างทั้ง 4 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ดังแสดงในภาพที่ 9)



ภาพที่ 10 : ขั้นตอนการใส่กระเทียมปลอดเชื้อและเชื้อ(N 190) และ (TISTR 536) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NMB

**ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536**

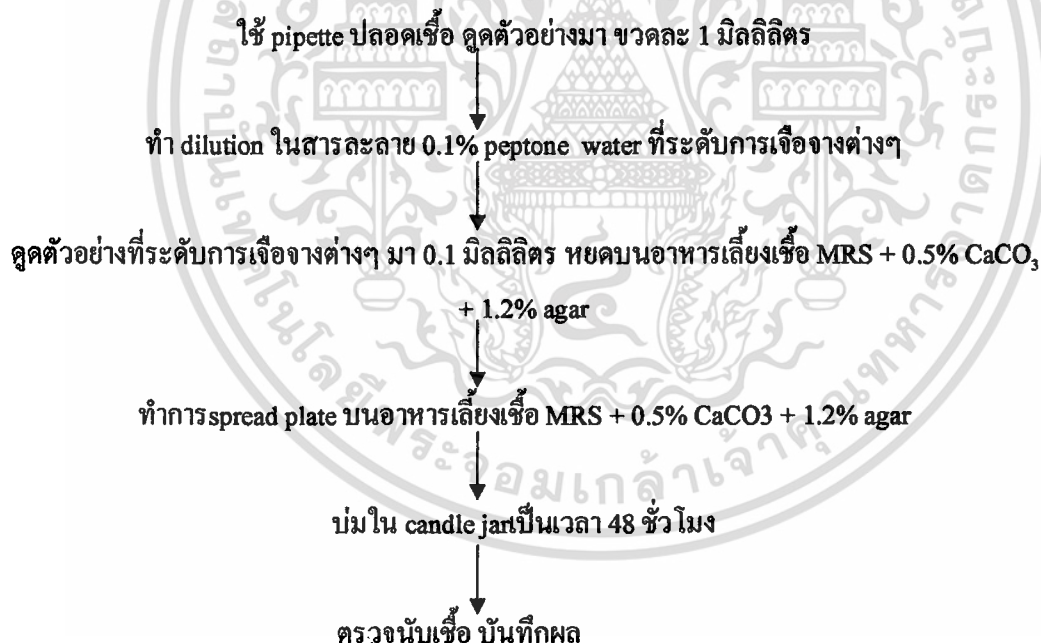
2.1 นำตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง และที่ผ่านการหมักที่ระยะเวลา 6,12,18,24,30,36,42 และ 48 ชั่วโมง มาทำการตรวจนับเชื้อ โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + 0.5% CaCO<sub>3</sub> + 1.2 % agar

2.1.1 ตูดตัวอย่างจากขวดที่ 1-4 ขวดละ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการ dilution ใน สารละลาย 0.1% peptone water ที่ระดับการเจือจางต่างๆ  $1:10^{-1}$ ,  $1:10^{-2}$ ,  $1:10^{-3}$ ,  $1:10^{-4}$ ,  $1:10^{-5}$ ,  $1:10^{-6}$ ,  $1:10^{-7}$  ตูดตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง  $1:10^{-5}$ ,  $1:10^{-6}$ ,  $1:10^{-7}$  มาระดับเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + 0.5% CaCO<sub>3</sub> + 1.2% agar โดยวิธีการ spread plate ป่มใน candle jar ซึ่งเป็นสภาพการป่มที่ไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดังแสดงในภาพที่ 10)

2.2 การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ (N 190) และ (TISTR 536)

2.2.1 นับจำนวนโคโลนีในงานเพาะเชื้อแต่ละ dilution ซึ่งลักษณะ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 จะมี clear zone รอบๆ โคโลนี

2.2.2 บันทึกผล



ภาพที่ 11: แสดงขั้นตอนการศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth โดยวิธีการ spread plate

### ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาผลของกระเทียมต่อการผลิตสาร Bacteriocin ของเชื้อ แบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536

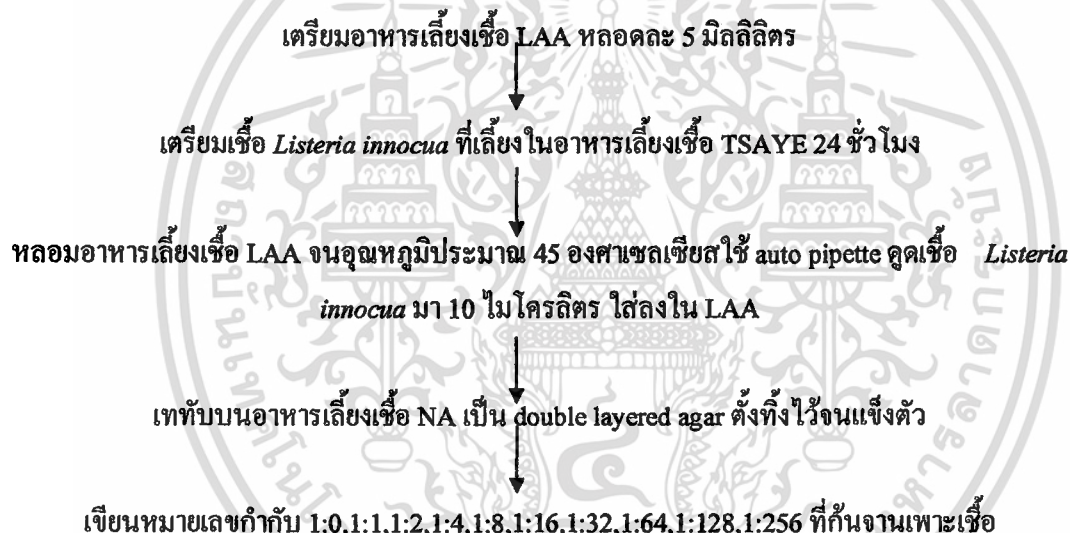
#### 3.1 การเตรียม double layered agar plate

3.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LAA โดยชั่ง LAA 48 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไฟให้เดือด 2-3 นาที หรือจนกว่า agar จะละลายแล้ว Autoclave ที่ 121 องศา เวลา 15 นาที

3.1.2 ปลูกเชื้อ *Listeria innocua* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE เป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LAA ที่หลอมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3.1.3 เททับอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ในจานเพาะเชื้อเป็น double layered agar ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง

3.1.4 เขียนหมายเลขแต่ละระดับ titer ไว้ที่ก้นจานเพาะเชื้อ



ภาพที่ 12 : การเตรียม double layered agar plate

### 3.2 การทดสอบการผลิตสาร Bacteriocin ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536

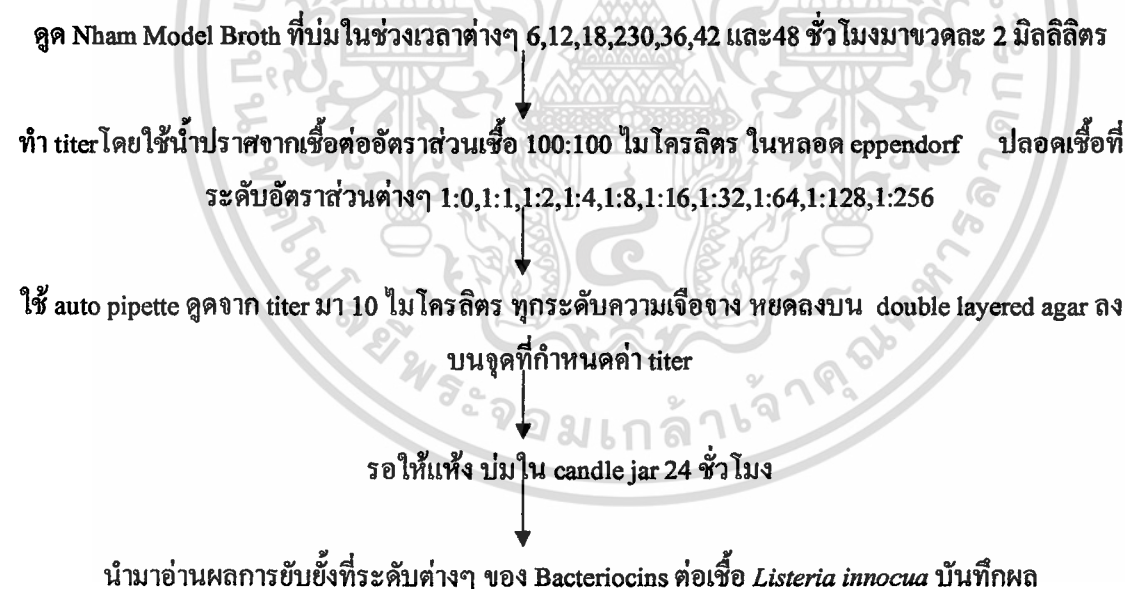
3.2.1 คูดตัวอย่างจากข้อ 2.2 ที่เวลา 0 ชั่วโมง และที่ระยะเวลาหมักที่ 6,12,18,24,30,36,42 และ 48 ชั่วโมง ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร

3.2.2 ต้มบน hot plate ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยเริ่มจับเวลาเมื่อน้ำเดือด

3.2.3 ทำ titer โดยการนำตัวอย่างที่ผ่านการต้ม มาเจือจางกับน้ำปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 100:100 ไมโครลิตร ในหลอด eppendorf ปลอดเชื้อ ที่ระดับอัตราส่วน titer ต่างๆ ได้แก่ 1:0,1:1,1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128,1:256

3.2.4 คูดตัวอย่างแต่ละอัตราส่วน titer ปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน double layered agar plate แต่ละจุดที่กำหนดระดับอัตราส่วน titer

3.2.5 อ่านผลการยับยั้งที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้ในระดับอัตราส่วน titer เท่าไรบันทึกผล



ภาพที่ 13 : แสดงขั้นตอนการทดสอบการสร้าง Bacteriocins จากเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ (N 190) และ (TISTR 536) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็น indicator

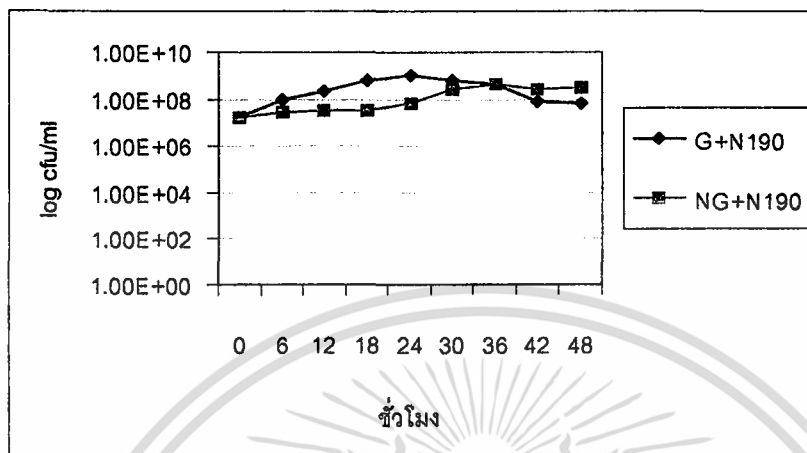
## บทที่ 4

### ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแหมน

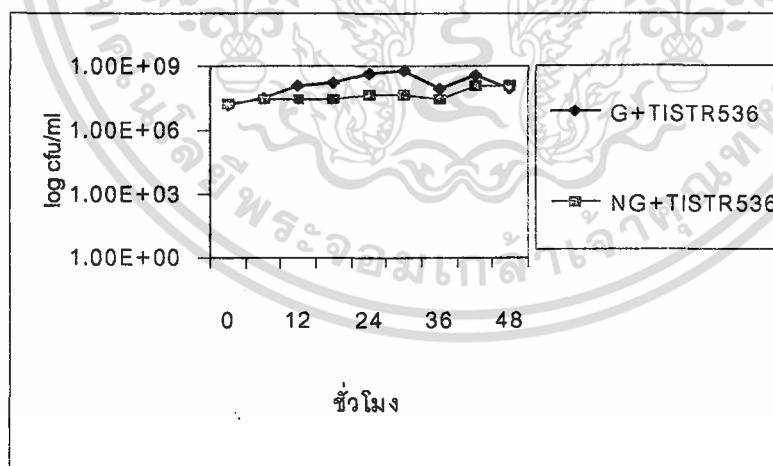
จากการศึกษาของกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแหมน(NMB)เทียบกันระหว่าง NMB ที่เติมกระเทียมและไม่เติมกระเทียม (ภาพที่ 14 และ 15) พบว่า เชื้อทั้งสองมีแนวโน้มที่จะเจริญได้มากและเร็วในหลอด NMB ที่มีกระเทียมกล่าวคือจะมีการเจริญเพิ่มมากขึ้นของเชื้อทั้งสองหลังจากหมักได้ 6 ชั่วโมงและเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้น 1 log cycle เมื่อหมัก NMB ไปได้ 24 ชั่วโมง ขณะที่หลอด NMB ที่ไม่เติมกระเทียมเชื้อทั้งสองจะค่อยๆ เจริญและเริ่มเจริญเพิ่มขึ้นมากกว่าเชื้อตั้งต้น 1 log cycle เมื่อทำการหมัก NMB ไปได้ 36 ชั่วโมงซึ่งการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ อติสร (2542) พบว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกทางการค้าสามสายพันธุ์ที่มีกระเทียมจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการสร้างกรด โดยที่การเพิ่มขึ้นของเชื้อใน NMB ที่มีกระเทียมมากกว่าและเร็วกว่า NMB ที่ไม่กระเทียม เนื่องจากว่าในกระเทียมมีสารพวกแมงกานีสที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติก จึงทำให้แบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นกว่า NMB ที่ไม่เติมกระเทียม

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการหมัก(ชั่วโมง)และปริมาณเชื้อ(cfu/ml)ของเชื้อ N190



ภาพที่ 14 : แสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเชื้อ N190 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแห้งหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการหมัก(ชั่วโมง)และปริมาณเชื้อ(cfu/ml)ของเชื้อ TISTR 536



ภาพที่ 15 : แสดงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเชื้อ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักแห้งหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2 ผลการทดสอบการสร้างสาร Bacteriocin ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็นเชื้อ indicator

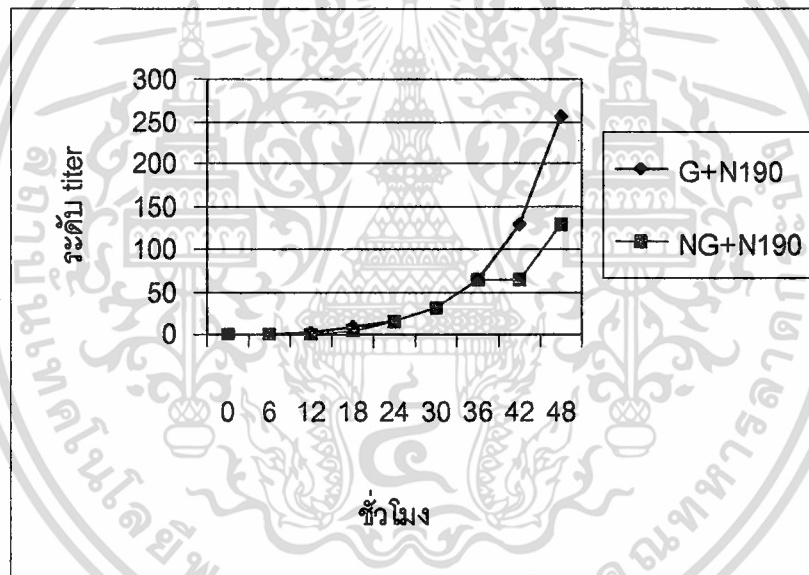
จากการทดสอบการสร้างสาร Bacteriocin ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในแต่ละตัวอย่าง โดยนำมาเจือจางที่ระดับอัตราส่วน titer ต่างๆ จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้สูงสุด ที่ระดับ titer หนึ่ง ลักษณะของระดับ titer ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้นั้นจะมีลักษณะเป็นวงใส ซึ่งหมายความว่าในพื้นที่ที่หยดตัวอย่างซึ่งเจือจางที่ระดับอัตราส่วน titer ต่างๆ แล้ว เชื้อ *Listeria innocua* ไม่สามารถเจริญได้ ทำให้เห็นลักษณะของ titer เป็นวงใส ในขณะที่พื้นที่ภายนอกมีการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* โดยระดับ titer จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์พบว่า NMB ที่มีกระเทียมเชื้อ N190 จะเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินให้เห็นเมื่อหมัก NMB ไปได้ 12 ชั่วโมง ขณะที่ NMB ที่ไม่มีกระเทียมแบคทีเรียโอซินจะมีมากพอจนเห็นเด่นชัดเมื่อหมัก NMB ไป 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 16) เช่นเดียวกับ TISTR 536 จะเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินให้เห็นเมื่อหมัก NMB ไปได้ 12 ชั่วโมง ขณะที่ NMB ที่ไม่มีกระเทียมแบคทีเรียโอซินจะมีมากพอจนเห็นเด่นชัดเมื่อหมัก NMB ไป 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 7 และภาพที่ 17) ซึ่งเชื้อทั้งสองมีการมีแนวโน้มในการผลิตแบคทีเรียโอซินใน NMB ที่มีกระเทียมมากกว่า NMB ที่ไม่มีกระเทียม ตั้งแต่ 12-48 ชั่วโมงของการหมักโดยที่ TISTR 536 จะมีแนวโน้มในการผลิตแบคทีเรียโอซินมากกว่า N190 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียโอซินใน NMB ที่มีกระเทียมนี้เนื่องจาก กระเทียมมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติกและการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกนั้นผลิตขึ้น ในระหว่างการเจริญจึงทำให้ NMB ที่มีกระเทียมมีการผลิตสารแบคทีเรียโอซินมากกว่า

ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่ากระเทียมที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตหมักมีผลในการเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียแลคติกผลิตได้มานี้ อาจมีผลทำให้เกิดความปลอดภัยต่อการผลิตหมัก เนื่องจากแบคทีเรียโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่ปนเปื้อนในระหว่างการหมักหมักและเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์มีแนวโน้ม ในการใช้เป็นก้ำเชื้อเริ่มต้นสำหรับการผลิตหมักที่ปลอดภัยจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอนาคต

ตารางที่ 6 :ระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. innocua* เชื้อ N190

เวลาที่ใช้หมัก	0ชม.	6ชม.	12ชม.	18ชม.	24ชม.	30ชม.	36	42	48
ตัวอย่าง									
กระเทียม +N190	1:0	1:0	1:2	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
ไม่กระเทียม + N190	1:0	1:0	1:0	1:4	1:16	1:32	1:64	1:64	1:128

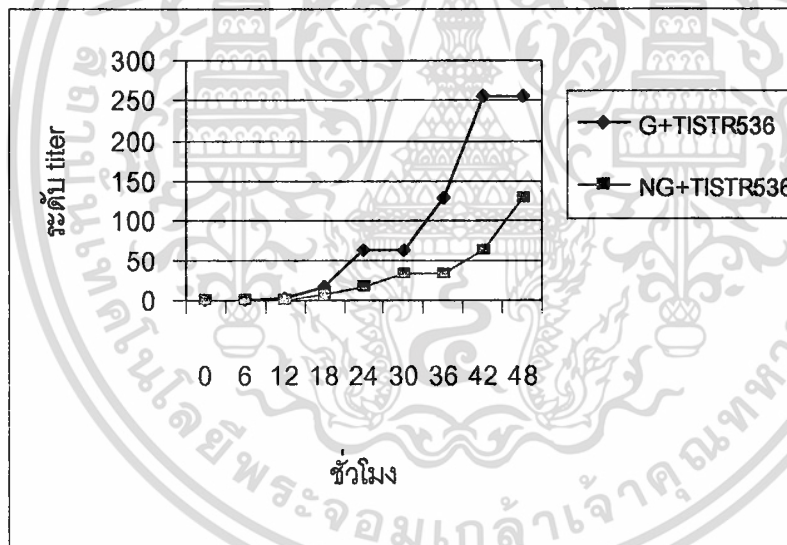


ภาพที่ 16 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. innocua* ได้กับระยะเวลาการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 :ระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. innocua* เชื้อ TISTR 536

เวลาที่ใช้หมัก ตัวอย่าง	0ชม.	6ชม.	12ชม.	18ชม.	24ชม.	30ชม.	36ชม.	42ชม.	48ชม.
กระเทียม +TISTR 536	1:0	1:0	1:2	1:16	1:64	1:64	1:128	1:256	1:256
ไม่กระเทียม + TISTR536	1:0	1:0	1:0	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64	1:128



ภาพที่ 17 : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. innocua* ได้กับระยะเวลาการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 สรุปได้ว่า กระเทียมมีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งเห็นได้จากตัวอย่างที่เดิมที่เดิมเชื้อ N190 และกระเทียมจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 2 log cycle ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เดิมกระเทียมมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นได้เพียง 1 log cycle และตัวอย่างที่เดิมที่เดิมเชื้อ TISTR 536 และกระเทียมจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 1 log cycle ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เดิมกระเทียมมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นไม่ถึง 1 log cycle จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 จะมีปริมาณการเจริญของเชื้อมากกว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ TISTR 536 เพียงเล็กน้อย

จากการทดลองเรื่องผลของกระเทียมต่อการสร้างสารแบคทีริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 สรุปได้ว่า NMB ที่มีกระเทียมส่งผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งเห็นได้จากตัวอย่างที่เดิมกระเทียมจะมีระดับ titer สูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* สูงกว่าระดับ titer สูงสุดของกระเทียม และเมื่อเปรียบเทียบการสร้างสารแบคทีริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 และ TISTR 536 พบว่าสายพันธุ์ TISTR 536 สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินในปริมาณที่มากกว่าและสร้างได้เร็วกว่าตัวอย่างที่เดิมเชื้อ N190 ในช่วงแรกของการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินได้ในระดับ titer สูงสุดได้เท่ากัน

ดังนั้นกระเทียมที่เดิมในผลิตภัณฑ์หมักส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีทำให้ช่วยลดระยะเวลาการหมักให้น้อยลงและยังส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกผลิตสารแบคทีริโอซินได้เร็วและเพิ่มขึ้น ทำให้มีผลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้เร็วขึ้นด้วย จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น ซึ่งการศึกษานี้บ่งบอกว่า TISTR 536 ซึ่งผลิต Pediocin PA-1 มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการหมักหมนม เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เชื้อดังกล่าวเป็นกล้ำเชื้อมีความปลอดภัยจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น เชื้อในกลุ่ม *Listeria monocytogenase* รวมถึงเชื้อโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ ในระหว่างการหมักหมนม

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1.ในการทดลองควรปอกกระเทียมควรปอกกระเทียมให้บอบช้ำน้อยที่สุดเพราะในการทำกระเทียมปลอดเชื้อโดยการแช่ใน 70 % alcohol อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสารสำคัญในกระเทียมที่อาจส่งผลต่อความไม่แน่นอนของผลการทดลอง

2.ในการคัมตัวอย่างเพื่อตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ควรคัมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียไอซอิน มีความถูกต้อง เนื่องจากสารแบคทีเรียไอซอิน อาจเกิดการสูญเสียคุณสมบัติหากคัมนานเกินไป

3.ควรทำการทดลองโดยเติมกลีเซอรอลที่เร็วแลคติกและกระเทียมลงในผลิตภัณฑ์แทน เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยกับผู้บริโภคมากขึ้น

4.ควรทำการทดลองโดยเติมสารแมกนีเซียมและแมงกานีสในตัวอย่างทดแทนกระเทียมเพื่อศึกษาว่าสารแมกนีเซียมและแมงกานีสที่มีอยู่ในกระเทียม อาจส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดี

### เอกสารอ้างอิง

- กฤษติกา กุลสิงห์.2547. “สารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารจากแบคทีเรียแลคติก” สัมมนา ภาควิชาอุตสาหกรรม  
เกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร  
ลาดกระบัง.12-24
- ปาริชาติ สักกะทำนุ.2543. “กระเทียมสมุนไพรเสริมสุขภาพ”.พิมพ์ครั้งที่ 9.สำนักพิมพ์รวมธรรมส์,  
กรุงเทพฯ. 95
- โชติมา ไชยสวัสดิ์ .2546. “ กระเทียมสมุนไพรสารพัดประโยชน์. สำนักพิมพ์ธรรมการพิมพ์, กรุงเทพฯ.  
9-11
- ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญู. “กรดแลคติกในอุตสาหกรรม” ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะ  
เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
วรรณวิไลและสรินทิ.2544. “ผลของกระเทียมต่อการเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอจินจากเชื้อแบคทีเรีย  
แลคติกสายพันธุ์ TISTR 536 ในแบบจำลองแฮม” ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.9-17
- สุพจน์ อศวพันธุ์ชนกุล ภ.บ. “กระเทียมยอดสมุนไพรในครัวเรือน” โครงการสมุนไพรพึ่งตนเอง จุลสาร  
อันดับ 6 มีนาคม.1-3
- ส่วนวิจัยเกษตรกรรม ฝ่ายวิชาการ ธนาคารกสิกรไทย.2533. “อาหารเสริมสุขภาพ”เอกสารวิชาการปีที่  
11(1):270-282
- อดิศร เสวตวิวัฒน์ . 2542. ผลของน้ำกระเทียมสกัดต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับ  
ผลิตกัมมันต์เนื้อ และ โรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแฮมม(ในหลอดทดลอง)อาหาร.  
29(2):109-115
- Barefoot,S.F.,and Klaenhammer ,T.R.1983.Detection and activity of lactacin B ,a bacteriocin produced  
by *Lactobacillus acidophilus*.Appl.Env.Microbiol.45:1808-1815
- Daeschel,M.A.1989.Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservative.  
Foodtechnology.43:164
- Gross,E.,and Morell,J.L.1970.Nisin.The Assignment of sulfide bridges of methyllanthionine to a novel  
by bicyclic structure of identical ring size.J.Am.Chem.Soc.92:2913
- Linnett,P.E.,and Strominger,J.L.1973.Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan  
synthesis.Antimicrob.Agents Chemother.4:231
- Luecke,F.K.1985.Fermented sausage.In:Wood,B.J.B.(ed.).Microbiology of fermented foods.Vlume2.41-  
43pp.Elsevier Applied Science Publishers,London and New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- Mattict,A.T.S.,and Hirsch.,A.1974.Ferther observation on an inhibitor(nisin) form lactic streptococci.Lancet.2 :5
- McClintock,M.,L.,Marzolf , J.J.,Hirsch, .A., andMocquot , G. 1952 . Action inhibitrice des sterptocoques producteurs de nisine sur le developpement des sporules anaerobies dans le fromage de Gruyere fondu.J.Dairy 19:187
- Motlagh,A.M.,Johnson,M.C.,and Ray,B.1991.Viality loss of foodborne patrogens by starter culture metabolies.J.food prot.54:873-878
- Muriana,P.m.,and Klaenhammer,T.R.1991.Purification and partial characterization of lactacin F,a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088.Appl.Env.Microbiol.57:114-121.
- Orberg,P.K.,and Sandine,W.E.1984.Common occurrence of Plasmid DNA and Vancomycin resistance in *Leucunostoc spp*.App.Env.Microbial.48:1129
- Ramseier,H.R.1960.The action of nisin on *Clostridiumbutyricum*.Arch.Mikrobiol.37:57-94
- Swetwivathana,A., Leutz ,U.,and Fischer,A.1999. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. Fleischwirtschaft International. 1/99 : 26-29
- Swetwivathana ,A.,Lotong,N.,Fischer,A.,and Sonomoto,K.2001. Potential of using pediocin PA-1 producer strain of *Pediococcus pentosaceas* TISTR 536 to control the growth of *Samolnella anatum* in Nham (An in-vitro study). Proceeding of the 47th International Congress of Meat Science and Technology. Krakrow,Poland. September.Vol II : 18-19
- Brock,T.D.,Smith,D.W.,and Madigan,M.T.1984.Biological of microorganism.4<sup>th</sup> ed.New Jersey:Prentice-Hall,Inc.847pp.

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

## 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham Model Broth (NMB)

ส่วนผสมของ Nham Model Broth มีดังนี้

Meat extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium ascorbate	10	กรัม
Sodium-tri-polyphosphate	3	กรัม
Glucose	10	กรัม
Sodium chloride	25	กรัม
Glycerol	0.4	%

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที บรรจุในขวด ขวดละ 100 ml

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS+0.5%CaCO<sub>3</sub> +1.2%Agar

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS 52 g และ Agar 12 g ผสมกับน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที จากนั้นจึงเทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

## 1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS 52 g ผสมกับน้ำกรองปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จากนั้นเทใส่หลอดทดลอง 5 ml นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อใช้สำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

## 1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LAA

ชั่งสารอาหารเลี้ยงเชื้อ LAA 48 g ผสมกับน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย จากนั้นจึงเทใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

## 1.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE

ชั่งสารอาหาร Trypticate soy broth 30 g, Yeast extract 6 g ผสมกับน้ำกรองให้มีปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย จากนั้นจึงเทใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

## 1.6 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE

ซังสารอาหาร Trypticase soy broth 30 g, Yeast extract 6 g, Agar 12 g ผสมกับน้ำกรองให้ได้ ปริมาตร 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย จากนั้นจึงเทใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml นำไปฆ่า เชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

#### 1.7 การเตรียมสารละลาย Peptone water สำหรับเชื้อจางตัวอย่าง

ซัง Peptone 1 กรัม ผสมกับน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นจึงเทใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 ml นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

#### 1.8 การเตรียมน้ำปราศจากเชื้อ

ใช้น้ำกรองเทใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

ผลการทดลองการตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมักหมมที่เติม  
กระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียม

ตารางภาคผนวกที่ ข1 : ผลการทดลองครั้งที่ 1 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลว  
จำลองสภาวะการหมักหมมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ หมัก ตัวอย่าง	0 ชม. (cfu/ml)	6 ชม. (cfu/ml)	12ชม. (cfu/ml)	18ชม. (cfu/ml)	24ชม. (cfu/ml)	30ชม. (cfu/ml)	36ชม. (cfu/ml)	42ชม. (cfu/ml)	48ชม. (cfu/ml)
กระเทียม + N190	$1.58 \times 10^7$	$9.3 \times 10^7$	$2.01 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	$1.05 \times 10^9$	$5.3 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	$6.7 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$
กระเทียม + TISTR536	$1.36 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$1.07 \times 10^7$	$1.76 \times 10^7$	$3.9 \times 10^7$	$5.1 \times 10^8$	$8.1 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8$
ไม่กระเทียม + N190	$1.63 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	$6.3 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$
ไม่กระเทียม + TISTR536	$1.59 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$3.1 \times 10^8$	$5.8 \times 10^9$	$5.1 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$	$1.45 \times 10^7$	$1.61 \times 10^7$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข2 : ผลการทดลองครั้งที่ 2 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลว  
จำลองสภาวะการหมักเหวมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลาที่ใช้ หมัก ตัวอย่าง	0 ชม (cfu/ml)	6 ชม. (cfu/ml)	12ชม. (cfu/ml)	18ชม. (cfu/ml)	24ชม. (cfu/ml)	30ชม. (cfu/ml)	36ชม. (cfu/ml)	42ชม. (cfu/ml)	48ชม. (cfu/ml)
กระเทียม + N190	$1.64 \times 10^7$	$8.5 \times 10^7$	$2.11 \times 10^8$	$5.1 \times 10^8$	$1.19 \times 10^9$	$6.2 \times 10^8$	$4.7 \times 10^8$	$6.9 \times 10^7$	$5.9 \times 10^7$
กระเทียม + TISTR536	$1.45 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$	$1.25 \times 10^7$	$1.56 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$5.9 \times 10^8$	$9.1 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$
ไม่กระเทียม + N190	$1.72 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$	$6.2 \times 10^7$	$4.5 \times 10^8$	$6.2 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8$
ไม่กระเทียม + TISTR536	$1.25 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$3.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	$7.1 \times 10^9$	$6.5 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	$1.24 \times 10^7$	$1.58 \times 10^7$

ตารางภาคผนวกที่ ข3 : ผลการทดลองครั้งที่ 3 การตรวจนับเชื้อ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลว  
จำลองสภาวะการหมักเหวมที่เติมกระเทียมและที่ไม่เติมกระเทียมที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลาที่ใช้ หมัก ตัวอย่าง	0 ชม (cfu/ml)	6 ชม. (cfu/ml)	12ชม. (cfu/ml)	18ชม. (cfu/ml)	24ชม. (cfu/ml)	30ชม. (cfu/ml)	36ชม. (cfu/ml)	42ชม. (cfu/ml)	48ชม. (cfu/ml)
กระเทียม + N190	$1.79 \times 10^7$	$9.4 \times 10^7$	$2.23 \times 10^8$	$6.3 \times 10^8$	$1.14 \times 10^9$	$6.3 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$	$7.4 \times 10^7$	$6.6 \times 10^7$
กระเทียม + TISTR536	$1.59 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$	$1.22 \times 10^8$	$1.82 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$	$3.9 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$
ไม่กระเทียม + N190	$1.56 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$6.4 \times 10^7$	$2.5 \times 10^8$	$4.8 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	$3.3 \times 10^8$
ไม่กระเทียม+ TISTR 536	$1.74 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	$5.1 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$1.34 \times 10^8$	$1.25 \times 10^8$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมักแบบที่เติมกระเทียม และไม่เติมกระเทียม

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 1

เวลาที่ใช้หมัก ตัวอย่าง	0ชม.	6ชม.	12ชม.	18ชม.	24ชม.	30ชม.	36ชม.	42ชม.	48ชม.
กระเทียม+ N190	1:0	1:0	1:2	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:128
กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:2	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64	1:128
ไม่กระเทียม +N190	1:0	1:0	1:0	1:2	1:8	1:16	1:32	1:64	1:64
ไม่กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:0	1:4	1:8	1:16	1:16	1:32	1:64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 2

เวลาที่ใช้ หมัก ตัวอย่าง	0ชม.	6ชม.	12ชม.	18ชม.	24ชม.	30ชม.	36ชม.	42ชม.	48ชม.
กระเทียม+ N190	1:0	1:0	1:2	1:8	1:16	1:32	1:32	1:128	1:256
กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:2	1:4	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
ไม่กระเทียม +N190	1:0	1:0	1:0	1:4	1:16	1:32	1:64	1:64	1:128
ไม่กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:0	1:4	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64

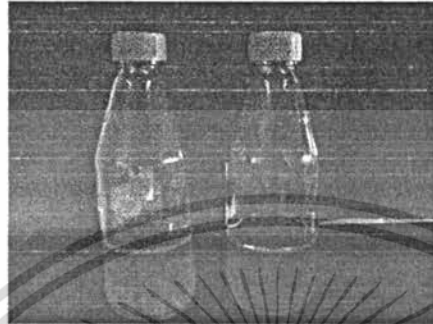
ตารางภาคผนวกที่ ค 3 : ผลการทดลองการตรวจหาสารแบคทีเรียไอซอิน ครั้งที่ 3

เวลาที่ใช้ หมัก ตัวอย่าง	0ชม.	6ชม.	12ชม.	18ชม.	24ชม.	30ชม.	36ชม.	42ชม.	48ชม.
กระเทียม+ N190	1:0	1:0	1:2	1:4	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:2	1:8	1:32	1:64	1:128	1:256	1:256
ไม่กระเทียม +N190	1:0	1:0	1:0	1:4	1:8	1:16	1:64	1:64	1:128
ไม่กระเทียม + TISTR 536	1:0	1:0	1:0	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64	1:128

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ภาคผนวก ง

#### ภาพแสดงวิธีการทดลองและภาพแสดงผลการทดลอง



ภาพผนวกที่ ง 1: แสดงลักษณะของอาหารเหลวจำต้องสภาพการหมักแหมม หรือ Nham Model Broth

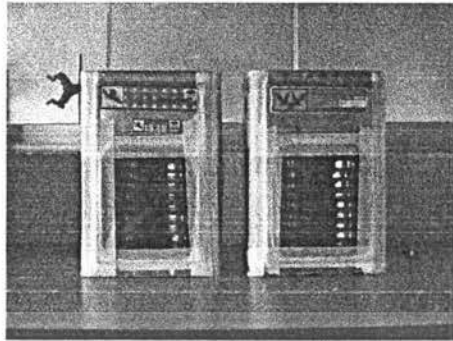


ภาพผนวกที่ ง 2 : แสดงลักษณะของกระเทียม



ภาพผนวกที่ ง 3: แสดงการทำกระเทียมปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ง 4 : แสดงลักษณะการบ่มเชื้อที่ spread plate และการทดสอบ Bacteriocin ใน candle jar

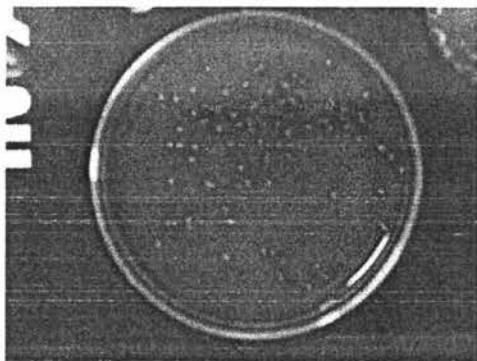


ภาพผนวกที่ ง 5 : แสดงลักษณะของอัตราส่วนระดับ titer ต่างๆ ที่เจือจางในหลอด Eppendroff เพื่อทำการตรวจหา Bacteriocin



ภาพผนวกที่ ง 6 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 ในตัวอย่างที่เติมกระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมงในระดับความเจือจาง  $10^{-6}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ง 7 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N 190 ในตัวอย่างที่ไม่เติม  
กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมงในระดับความเจือจาง  $10^{-6}$

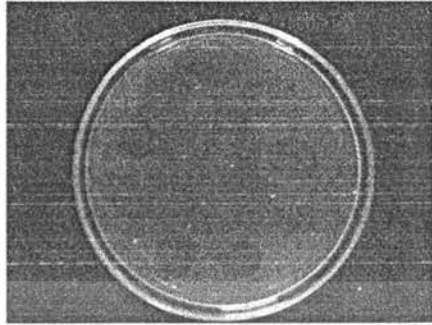


ภาพผนวกที่ ง 8 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ TISTR 536 ในตัวอย่างที่เติม  
กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมงในระดับความเจือจาง  $10^{-6}$



ภาพผนวกที่ ง 9: แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ TISTR 536 ในตัวอย่างที่ไม่เติม  
กระเทียม ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมงในระดับความเจือจาง  $10^{-6}$

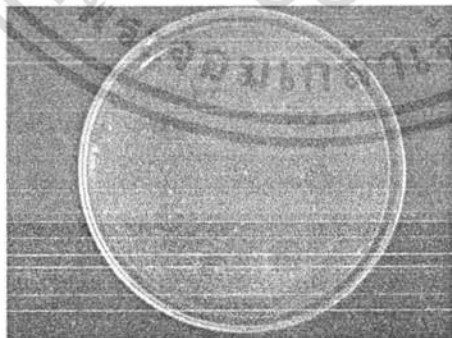
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ง 10 : แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L.innocua* ได้ในตัวอย่างที่เติมกระเทียมของเชื้อ N 190 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

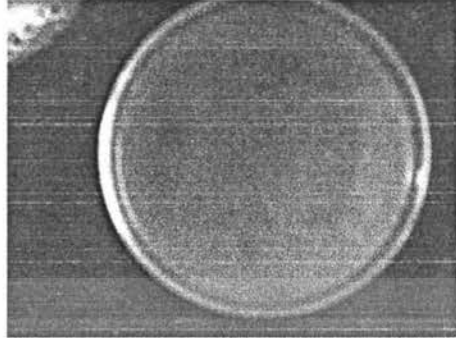


ภาพผนวกที่ ง11:แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L.innocua* ได้ในตัวอย่างที่ไม่เติมกระเทียมของเชื้อ N 190 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ ง 12 : แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L.innocua* ได้ในตัวอย่างที่เติมกระเทียมของเชื้อ TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ง 13 : แสดงลักษณะของระดับ titer สูงสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Linnocua* ได้ในตัวอย่างที่ไม่เติมกระเทียมของเชื้อ TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้