การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-Aminobutyric Acid (GABA)

Production of Fermented Beverage from Phom-nang Seaweed (*Gracilaria fisheri*) Using γ-Aminobutyric Acid (GABA) Producing Lactic Acid Bacterium

อนุสรา รัตนบุรี

Anussara Ratanaburee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-Aminobutyric Acid (GABA)

ผู้เขียน นางสาวอนุสรา รัตนบุรี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

....

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

....กรรมการ

(ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-Aminobutyric Acid (GABA)
ผู้เขียน	นางสาวอนุสรา รัตนบุรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิต γ-aminobutyric acid หรือกาบาได้สูงเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยแยกแบคทีเรียแลกติกมาจากอาหารหมักชนิดต่างๆ 58 ชนิดได้จำนวน 317 ไอโซเลท รวมทั้งแบคทีเรียแลกติกจากงานวิจัยที่ผ่านมาจำนวน 22 ไอโซเลทที่แยกจากน้ำหมักชีวภาพจากพืช และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR047 รวมทั้งหมด 340 ไอโซเลท พบว่ามี แบคทีเรียแลกติก จำนวน 124 ไอโซเลทที่เจริญได้ดีมากในอาหาร MRS (OD_{660nm} >1.0) และจากการตรวจสอบโดย Thin-Layer Chromatography (TLC) มีเพียง 64 ไอโซเลท (51.61%) สามารถผลิตกาบาได้ และมีเพียง 10 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกาบาได้ดีทั้งในอาหาร MRS และอาหาร GYP ที่ผสม 2% MSG (Monosodium glutamate) และเมื่อนำไปหาปริมาณกาบาด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าไอโซเลท DW12 สามารถผลิตกาบาได้มากที่สุด (4,156.10 มิลลิกรัม/ลิตร) และปลดปล่อยกาบาออกมามากที่สุดในช่วง early log phase (ชั่วโมงที่ 7) และเมื่อเทียบเคียงชนิดโดยใช้วิธีการดั้งเดิมร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CHL และ 16S rDNA sequence analysis พบว่าคือ *Lactobacillus plantarum* DW12

ในการใช้ Response Surface Methodology (RSM) โดยกำหนดจุดการทดลองแบบ CCD (Central Composite Design) เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาของเชื้อ *L. plantarum* DW12 ในอาหาร MRS โดยพิจารณาที่ปริมาณน้ำตาลทราย MSG และค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมัก พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับผลิตกาบาคือ ปริมาณน้ำตาลทราย 6% MSG 1% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 6 จากนั้นได้ออกแบบกระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง 3 ชุดการทดลองคือ ชุด A สูตรดั้งเดิม (สาหร่ายผมนาง: น้ำตาลทราย: น้ำสะอาด (3: 1: 10 (w/w/v)) ไม่เติมกล้าเชื้อ พีเอชเริ่มต้น 6.0 (ชุดควบคุม) ชุด B สูตรดั้งเดิม เติมกล้าเชื้อ 5% พีเอชเริ่มต้น 6.0 (ดั้งเดิม-กล้าเชื้อ) และชุด C สูตรดัดแปลง (แตกต่างกันที่ปริมาณน้ำตาลทราย 6% และเติม MSG 1% เท่านั้น) เติมกล้าเชื้อ 5% (ดัดแปลง-กล้าเชื้อ) เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงโดยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A,

ชุด B และชุด C มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเหลือเท่ากับ 4.32, 4.18 และ 6.23 log CFU/ml ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่มากกว่าชุดไม่เติมกล้าเชื้อ โดยชุด B และชุด C มีแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 3.49 และ 5.97 log CFU/ml ขณะที่ชุด A มีแบคทีเรียแลกติกเหลือ 2.65 log CFU/ml และปริมาณยีสต์ที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C เท่ากับ 2.60, 2.50 และ 3.57 log CFU/ml ตามลำดับ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B มีน้ำตาลเหลือ 0.78 และ 0.81% ตามลำดับ ส่วนชุด C พบว่ามีน้ำตาลเหลือ 0.55% พีเอชในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A เท่ากับ 3.32 ขณะที่ชุด B และชุด C มีพีเอชเท่ากับ 3.17 และ 3.80 ตามลำดับ พบว่าการเติมกล้าเชื้อทำให้ค่าความเป็นกรดทั้งหมดมากกว่าไม่เติมกล้าเชื้ อ โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 2.06 กรัม/100 มิลลิลิตร ขณะที่ชุด A และ B ที่มีค่าความเป็นกรด 1.05 กรัม/100 มิลลิลิตร และ 1.15 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.26-0.33 กรัม/100 มิลลิลิตร ส่วนปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 0.52-0.92 กรัม/100 มิลลิลิตร ตรวจไม่พบเมทานอลตลอดการหมักในทุกชุดการทดลอง ขณะที่ ปริมาณเอทานอลที่พบในชุด A คือ 3.66 กรัม/ลิตร รองลงมาคือชุด B (2.30 กรัม/ลิตร) และปริมาณต่ำสุดพบในชุด C คือ 1.65 กรัม/ลิตร ส่วนค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีค่า EC สูงกว่าชุด A และชุด B มาก โดยมีค่า EC เท่ากับ 1.66 mS/cm และพบว่าปริมาณโซเดียม, โพแทสเซียม, ทองแดง และสังกะสี อยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับดื่ม ยกเว้นธาตุเหล็กที่มีปริมาณสูงกว่าที่กำหนด (ค่าสูงสุด 28.87 มิลลิกรัม/ลิตร ในชุด B) ทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบสารหนู แต่พบตะกั่วซึ่งยังอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยสำหรับดื่ม

น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่เติมกล้าเชื้อสามารถผลิตกาบาได้ดีที่สุดและมีค่าสูงสุดเมื่อมีอายุการหมัก 45 วัน (3,998.20 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ชุด A และชุด B มีปริมาณกาบาสูงสุด 339.42 และ 730.29 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำหมักสาหร่ายผมนางแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระ DPPH ได้ในช่วง 3.59-19.85% และต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ในช่วง 8.37-24.95% โดยพบว่าตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อนุมูลอิสระ DPPH และ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีที่สุดเมื่อมีอายุการหมัก 30 วัน ในทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบ total coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* แต่น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลอง มีปริมาณยีสต์ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช.481/2547) ซึ่งกำหนดปริมาณยีสต์ต่ำกว่า 2 log CFU/ml (100 เซลล์/มิลลิลิตร) และสำหรับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายอายุการหมัก 120 วัน พบว่าน้ำหมักสาหร่ายชุด B ได้รับคะแนนยอมรับในด้านต่างๆ ไม่แตกต่างกันกับชุด A (P>0.05) โดยชุด B ได้รับคะแนนสูงสุดในปัจจัยกลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวม ส่วนชุด A ได้รับคะแนนสูงสุด

ในปัจจัยสีและความใส โดยทั้งสองชุดได้รับคะแนนเฉลี่ยมากกว่า 3.0 ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ในระดับปานกลาง แต่สำหรับชุด C ได้คะแนนน้อยกว่า 3.0 จัดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ในระดับน้อย เนื่องจากการเติม MSG ส่งผลให้การยอมรับในแต่ละปัจจัยต่ำกว่าที่ไม่เติม MSG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Thesis Title	Production of Fermented Beverage from Phom-nang Seaweed (*Gracilaria fisheri*) Using γ-Aminobutyric Acid (GABA) Producing Lactic Acid Bacterium
Author	Miss Anussara Ratanaburee
Major Program	Microbiology
Academic Year	2009

ABSTRACT

In order to use lactic acid bacterium (LAB) with a high ability to produce γ-aminobutyric acid (GABA) as a starter culture for producing fermented seaweed (*Gracilaria fisheri*) beverage, isolation and selection of LAB were carried out. A total of 317 LAB strains were isolated from 58 samples of fermented foods and then 340 LAB strains (all isolated LAB, 22 LAB strains from our previous studies and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR047) were selected for their rapid growth in MRS medium (OD_{660nm} >1.0). Only 124 LAB strains were selected for further investigation their ability to produce GABA that detected by thin layer chromatography (TLC) and only 64 strains (51.61%) produced GABA. However, among them only 10 strains clearly showed ability of GABA production in both media (MRS or GYP) that contained 2% monosodium glutamate (MSG). Based on amount of GABA detecting by high performance liquid chromatography (HPLC), the strain DW12 gave the highest amount of GABA (4,156.10 mg/l) and the most releasing of GABA was found in the early log phase (7 hrs). This bacterium was identified using traditional method, commercial test kit (API 50 CHL) and 16S rDNA sequence analysis as *Lactobacillus plantarum* DW12.

The Response Surface Methodology (RSM) fitted to the experimental data of CCD (Central Composite Design) was applied to optimize the ratio of the three independent variables (sucrose, MSG and initial pH) on GABA accumulation in the MRS medium. The results showed that when the ratio mixing of 6% sucrose, 1% MSG and initial pH 6.0 provided optimal conditions to produce GABA of starter culture, *L. plantarum* DW12. Three different treatments were designed for producing fermented seaweed beverage (FSB) as follows: a traditional formula (seaweed: sucrose: potable water = 3: 1: 10; w/w/v) without inoculation, initial pH 6 as a control (treatment A), 5% starter culture in the traditional formula (treatment B) and a modified formula

(6% sucrose and 1% MSG) with 5% starter culture (treatment C). At the end of fermentation of 60 days the total bacterial count was in order of treatments C > A > B (6.23, 4.32 and 4.18 log CFU/ml). However, amount of lactic acid bacteria in sets of inoculation (B and C) (3.49 and 5.97 log CFU/ml) was higher than that found in the control set (2.65 log CFU/ml). Amount of yeasts in treatments A, B, and C were 2.60, 2.50 and 3.57 log CFU/ml, respectively. Amount of total sugar remained in the treatments A and B were 0.78 and 0.81%, whereas in the treatment C was 0.55%. The final pH value in the treatment C (3.80) was higher than that found in the treatments A and B (pH 3.32, 3.17). The total acidity was in the degree of treatments C > B > A (2.06, 1.15 and 1.05 g/100 ml). The amount of acetic acid was found in a range of 0.26-0.33 g/100 ml, while amount of lactic acid was between 0.52-0.92 g/100 ml. No methanol was found in any treatments although ethanol was found in all treatments and the highest was observed in the treatment A (3.66 g/l) followed by the treatment B (2.30 g/l) and the treatment C (1.65 g/l). Level of electrical conductivity (EC) was highest in the treatment C (1.66 mS/cm) and levels of following elements; Na, K, Cu, and Zn in all treatments were below the recommended safety levels, except Fe (maximum 28.87 mg/l in treatment B). In all treatments no detections of As was found but Pb was detected. However, Pb levels were in a safety limit for drinking.

The highest GABA content was observed in the treatment C (3,998.20 mg/l) at day 45 whereas treatments A and B had GABA of 339.42 and 730.29 mg/l, respectively. In addition, the FSB exhibited antioxidant activities, such as DPPH and ABTS scavenging and the treatments B gave the higher antioxidant capacities than treatments A and C, particularly at day 30. The DPPH-scavenging activity of the FSB was between 3.59-19.85%, while $\mathrm{ABTS}^{\bullet+}$ scavenging was in a range of 8.37-24.95%. Based on Thai standard for community fermented plant beverage, all treatment sets passed the microbiological quality guidelines for no bacterial indicators (total coliforms and *Escherichia coli*) and foodborne pathogens (*Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens*) were not detected. However, the amount of yeast in all treatments did not meet the standard as it must be less than 100 CFU/ml. Results of the sensory evaluation of FSB over 120 days found that treatments A and B showed no significant differences in the overall acceptance, color, flavor, clearness and odor ($P>0.05$). The characteristics of both FSBs had the clear solution with yellow color, sour

flavor with a little sweet and a little odor of alcohol, and the overall acceptance of both FSBs were moderately acceptable (3.00) but the treatment C gave the lowest acceptable (3.00) because of the salty taste from the addition of MSG.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .ดวงพร คันธโชติ ประธานกรรมการ ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการ ที่ปรึกษา ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ ในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .ประเสริฐ สันตินานาเลิศ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร .ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ กรรมการผู้แทนจากคณะวิทยาศาสตร์ และ ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์ อาจารย์จาก คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทาน แก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเป็นผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistant) ปีการศึกษา 2551 ของคณะวิทยาศาสตร์ และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2552 ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนทุนการศึกษา ขอบคุณพี่และน้อง เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้กำลังใจและคอยให้คำปรึกษาตลอดมา

อนุสรา รัตนบุรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(16)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	40
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	41
อุปกรณ์	43
วิธีการทดลอง	45
3. ผลการทดลอง	59
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	107
5. สรุปผลการทดลอง	123
เอกสารอ้างอิง	125
ภาคผนวก ก	143
ภาคผนวก ข	150
ภาคผนวก ค	166
ภาคผนวก ง	179
ภาคผนวก จ	180
ประวัติผู้เขียน	186

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	คุณสมบัติของ glutamate decarboxylase (GAD) ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. paracasei, L. brevis* และ *L. lactis*	22
1-2	อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง	29
2-1	ตัวแปรและระดับความเข้มข้นของตัวแปรสำหรับการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	51
2-2	จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการวางแผนแบบ Central Composite Design เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	52
3-1	จำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมัก	60
3-2	การเจริญของแบคทีเรียแลกติกอายุ 18 ชั่วโมง ที่คัดแยกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ เลี้ยงในอาหาร MRS broth	61
3-3	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบา (GABA)	64
3-4	การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่ผลิกกาบาได้ดี โดยวิธีการแบบดั้งเดิมตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2	70
3-5	การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่ผลิกกาบาได้ดีโดยใช้ API 50 CHL kit	71
3-6	เปอร์เซ็นต์บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL kit	73
3-7	การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท DW12 โดยใช้ 16S rDNA sequence analysis	74
3-8	การผลิตกาบาของไอโซเลท DW12 ในอาหาร MRS broth ดัดแปลง โดยใช้ Central Composite Design แสดงค่าเป็นจริง (Actual value) และค่าทำนาย (Predicted value)	76

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-9	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาบา	77
3-10	ค่าสัมประสิทธิ์แบบจำลองของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาบา	77
3-11	การวิเคราะห์ค่าที่เหมาะสมในการผลิตกาบาได้ดีที่สุด ในอาหาร MRS broth โดย *L. plantarum* DW12	79
3-12	ปริมาณแร่ธาตุต่างๆที่ตรวจสอบของน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรต่างๆ เมื่อมีอายุหมัก 60 วัน กับเกณฑ์มาตรฐาน	93
3-13	คุณภาพทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรต่างๆ เมื่อมีอายุหมัก 60 วัน กับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547)	103
3-14	ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายที่มีอายุหมัก 120 วัน	106
ค 1	การบ่งชี้ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* DW12 โดยใช้ API 50 CHL kit	178
จ 1	หลักเกณฑ์การให้คะแนนน้ำหมักพืช	183

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1-1	วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ของแบคทีเรียแลกติก กลุ่ม Obligately homofermentative	8
1-2	วิถี phosphoketolase Embden Meyerhof- Parnas (EMP) ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Facultative heterofermenter	9
1-3	วิถี 6-phosphogluconate ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Obligately heterofermentative	10
1-4	การสังเคราะห์กาบาจากกรดกลูตามิกโดยใช้เอนไซม์ Glutamic acid decarboxylase (GAD)	18
3-1	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างกาบาในอาหาร MRS	62
3-2	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างกาบาในอาหาร GYP	63
3-3	การผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติก เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	66
3-4	ปริมาณกาบาที่ผลิตออกมาของแบคทีเรียแลกติก DW12 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และอาหาร GYP ที่เติม 0.5% MSG	67
3-5	การเจริญ ค่าพีเอชและปริมาณกาบาที่ผลิตออกมาของแบคทีเรียแลกติก DW12 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG	68
3-6	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท DW12	74
3-7	ผลของ Sucrose และ MSG ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12	78
3-8	ผลของ Sucrose และ pH ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12	78
3-9	ผลของ MSG และ pH ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12	79
3-10	กระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางในถังหมักพลาสติกขนาด 15 ลิตร	80
3-11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) ในการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	82

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-12	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติก (LAB) ในการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	83
3-13	การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ในการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	84
3-14	การลดลงของน้ำตาลทั้งหมดในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	85
3-15	การลดลงของพีเอชในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	86
3-16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	87
3-17	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	89
3-18	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	90
3-19	การเปลี่ยนแปลงค่า EC ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	91
3-20	การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุที่ตรวจสอบในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	94
3-21	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกาบาในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา	95
3-22	การต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง	97
3-23	การต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง	98
3-24	การต้านออกซิเดชันโดยวิธี Folin-Ciocalteu’s reagent ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง	99
3-25	การต้านออกซิเดชันโดยวิธี Lipid peroxidation assay ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง	101
3-26	ลักษณะของน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส	104

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ข 1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	152
ข 2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสาร TMP กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร	155
ข 3	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน Vitamin C กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร	157
ข 4	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Vitamin C	157
ข 5	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สารมาตรฐาน gallic acid กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร	159
ข 6	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน Trolox กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร	162
ข 7	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox	162
ข 8	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ที่ทดสอบการสร้างกาบา	163
ข 9	กราฟมาตรฐานของกาบา	165
ข 10	Peak ของกาบา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	165
ค 1	การจัดจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี partial 16S rDNA sequencing electropheogram	166
ค 2	ผลของการบ่งชี้ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* DW12 โดยใช้ API 50 CHL kit	178

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

มก/ล	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
CFU	=	Colony forming unit
$^{\circ}C$	=	Degree celcius
EC	=	Electrical conductivity
g	=	Gram
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GC	=	Gas chromatography
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
LAB	=	Lactic Acid Berteria
R_f	=	Retardation factor
TBC	=	Total Bacterial Count
TLC	=	Thin-Layer Chromatography
rpm	=	Revolution Per Minute
mS/cm	=	MilliSiemen per Centimeter
µl	=	Microliter
%	=	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

น้ำหมักชีวภาพ มีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช น้ำไอออนิกพลาสมา เซลล์ฟูดซ์ ซึ่งได้จากการหมักพืช ผัก ผลไม้ สมุนไพร กับสารให้ความหวาน เช่น น้ำตาล น้ำผึ้ง โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกั บกระบวนการหมัก ได้แก่แบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) รวมถึงเชื้อราและยีสต์ ซึ่งเป็นจุลินทรี ย์ที่ติดมากับวั ตถุดิบ ธรรมชาติ (ดวงพร และคณะ, 2548) เกิดเป็นอนุภาคเล็กลงและถูกปลดปล่อยออกมาในรูปของกรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลก ติก และกรดอะซิ ติกที่เกิดจากแบคทีเรียแลกติก มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 (ศศิธร, 2548) *Staphylococcus aureus* PSSCMI 0004, *Salmonella* sp. PSSCMI 0002 และ *Vibrio parahaemolyticus* VP4 (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008a) สำหรับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ จากการศึกษาการหมักสาหร่ายผมนางและลูกยอป่า ของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008a) พบว่าแบคทีเรียแลกติก ที่มีบทบาทในการหมัก ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum, L. plantarum, L. fermentum* และ *L. brevis*

γ-aminobutyric acid (GABA) เป็นกรดอะมิโนที่ผลิตจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดกลูตามิก (glutamic acid) (Cho et al., 2007) กรดอะมิโนนี้มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้กาบายังถือเป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง (inhibitor) โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ ได้รับการกระตุ้น ซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้น ต่อมในสมองส่วนหน้า (anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโต (Human Growth Hormone: HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้ อเกิดความกระชับ และเกิดสาร lipotropic ซึ่งเป็นสารป้องกันไขมัน มีการนำสารกาบามาใช้ในวงการแพทย์ เพื่อการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทต่าง ๆ หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ โรคลมชัก เป็นต้น (Komatsuzaki et al., 2005a) และจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากลุ่ มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาเช่น *Streptococcus*

thermophilus และ *L. delbreukii* คัดแยกจากโยเกิร์ต ส่วน *L. hilgardi, L. sakei, L. brevis, L. reuteri, L. confusus, L. casei, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. plantarum* และ *Leuconostoc mesenteroides* คัดแยกจากกิมจิหรือ Jotgal (Cross, 2004; Han and Kim, 2006; Hayakawa et al., 1997; Jeun, 2004; อ้างโดย Kang, 2006) *L. buchneri* จากกิมจิ (Cho et al., 2007) *L. brevis* จากกิมจิ (Ueno et al., 1997) และสุรากลั่น (Kome shochu kasu) (Yokoyama et al., 2002) *Lactococcus lactis* จากกล้าเชื้อในการหมักชีส และ *L. brevis* OPY-1 ที่ คัดแยกจากกิมจิ (Park et al., 2007

สำหรับวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมักคือ สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสาหร่ายสีแดง มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นเช่น ในประเทศไทยเรียกสาหร่ายผมนาง , สาย แพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งของอ่าวไทยและฝั่งมหาสมุทรอินเดีย ส่วนมากจะขึ้นในบริเวณดินปน ทราย ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายผมนาง มีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันไป มีตั้งแต่สีแดง- ดำ, แดง, น้ำตาล, แดง-น้ำตาล, ชมพู, ม่วงเข้ม, แดง-ม่วง, เทา, เขียว, เหลือง หรือใส เมื่อตากแห้งจะเป็น สีน้ำตาลไหม้ ดำ เทา หรือน้ำตาล (คณิต, 2535) ความสำคัญของสาหร่ายผมนางด้านอาหาร ใช้ เป็นอาหารมนุษย์ คุณค่าทางอาหารที่ได้จากสาหร่ายผมนาง *G. fisheri* ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ โดยเฉพาะธาตุไอโอดีนและวิตามิน (Holum, 1983; Ferner, 2001) ด้าน การแพทย์ นิยมใช้สาหร่ายมาทำยารักษาโรค โดยใช้รักษาโรคกระเพาะ ยาระบาย และยาแก้โรค คอพอกและยังนำวุ้นมาทำเป็นแคปซูลสำหรับหุ้มยา นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะหย่อน ลำไส้ใหญ่อักเสบ ริดสีดวงทวาร ใจสั่น ความดันโลหิตสูง หลอดเลือดแข็ง ข้ออักเสบ โรคอ้วน ต่างๆ ถ้าได้รับประทานสาหร่ายผมนางเป็นประจำ จะช่วยทำให้อาการทุเลาลงได้ ด้านเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมสาหร่ายผมนางใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่มีประโยชน์ เช่น วุ้น ซึ่งสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดงโดยเฉพาะสาหร่ายผมนาง *Gracilaria* มีวุ้นมากที่สุด (สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา)

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ จึงสนใจศึกษาบทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถ ผลิตกาบาและสามารถนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง เพื่อเป็นข้อมูล สำคัญในการผลิตและพัฒนาการ ทำน้ำหมักสาหร่ายผมนาง เพื่อดื่ม เป็นอาหารเสริมสุขภาพและ เพิ่มคุณค่าของ สาหร่ายผมนาง ที่นำมาใช้ เป็นวัตถุดิบในการ หมัก ซึ่งสามารถหาได้ง่ายตาม ชายฝั่งของอ่าวไทยและฝั่งมหาสมุทรอินเดีย และความรู้ที่ได้จาก การศึกษา นี้สามารถนำไป ถ่ายทอดให้แก่ชุมชนได้ เป็นการสร้างความเข้มแข็งให้ชุมชน นำไปสู่การสร้างโอกาส การผลิตที่ สามารถแข่งขันในตลาดสากล สามารถลดการขาดดุลทางการค้าจากการนำเข้าผลิตภัณฑ์ ประเภทเดียวกันจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นประเด็นชัดเจนว่างานวิจัยนี้เป็นทิศทางของการ พึ่งตนเอง

การตรวจเอกสาร

1. น้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ เป็นเครื่องดื่ม ประเภทไม่มี แอลกอฮอล์ (non alcoholic beverage) ที่เกิดจากบทบ าทของแบคทีเรียแลกติก จึงมีรสเปรี้ยวนำและหวานเล็กน้อยตามปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ สีของน้ำหมักถูกกำหนดโดยน้ำตาล และชนิดของพืชที่ใช้ มีคุณค่าทางอาหาร มีลักษณะเป็นของเหลวที่มีสีน้ำตาล ได้จากการหมักอินทรียวัตถุ เช่น พืช ผัก ผลไม้ร่วมกับน้ำตาล และน้ำในอัตราส่วน 3: 1: 10 โดยปริมาตร โดยใช้จุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ (ดวงพร และคณะ, 2548) มีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น น้ำสกัดชีวภาพ น้ำเอนไซม์ น้ำจุลินทรีย์ น้ำหมักพืช น้ำไอออนิกพลาสมา เซลล์ฟูดซ์ ในการผลิตน้ำหมักชีวภาพมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักได้แก่ แบคทีเรียและยีสต์ กระบวนการผลิตที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ มักพบแบคทีเรียแลกติกซึ่งอาศัยอยู่ในธรรมชาติมากมายหลายแหล่งโดยเฉพาะในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดแลกติก, อะซิติก, ฟอร์มิก, โพรพิโอนิก, เบนโซอิก, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ , คาร์บอนไดอ อกไซด์, แอมโมเนีย , เอทานอล , เมทานอล , acetoin, diacetyl, free fatty acids, 2,3-butanediol, acetaldehyde, reuterin, แบคทีริโอซิน และ antibiotics ซึ่งสารที่กล่าวมานี้สามารถทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และ /หรือทำให้อาหารเน่าเสีย (Talarico et al., 1988; Graciela et al., 1995; อ้างโดย Magnusson et al., 2003) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* และยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 (ศศิธร, 2548) *S. aureus* PSSCMI 0004, *Salmonella* sp. PSSCMI 0002 *V. parahaemolyticus* VP4 (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008a) จากการศึกษาน้ำหมักสาหร่ายผมนา งและลูกยอป่าเป็นระยะเวลา 90 วัน ของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008b) ได้เทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลกติกและพบว่าในช่วงต้นการหมัก (1-5 วัน) ของน้ำหมัก เชื้อที่พบคือ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* จากนั้นวันที่ 6-14 พบ *Lactobacillus plantarum* และ *L. fermentum* และเมื่ออายุการหมักได้ 21-45 วัน พบ *L. plantarum* และ *L. brevis* และเมื่อถึงช่วงสุดท้ายการหมัก (60-90 วัน) ในน้ำหมักพบ *L. plantarum* และ *Lactobacillus* sp. เท่านั้น

2. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

จุลินทรีย์ที่มีในน้ำหมักชีวภาพมี หลายประเภทแต่จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย และยีสต์ โดยมีบทบาทสำคัญในการ หมักสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลง บทบาทของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพมีดังนี้

2.1 ยีสต์ (Yeasts)

ยีสต์มีความสำคัญในการหมักเช่นกัน ทั้งในแง่ประโยชน์และทำให้ เกิดความเสียหายต่อการหมัก โดยยีสต์มีบทบาทในการผลิตผลิ ตภัณฑ์อาหารหลายชนิดเช่น ไวน์ เบียร์ ขนมปัง ขณะเดียวกันยีสต์ ก็ทำให้อาหารต่างๆ เช่นน้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำ ผึ้ง แยม ผักดองและอาหารอื่นๆ เกิด การเน่าเสียได้เช่นกัน (Kantachote et al., 2009) ยีสต์ที่ปนเปื้อนในน้ำหมักอาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักหรือในผลิตภัณฑ์ สุดท้าย ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิด แผ่นฟิล์มชีวภาพ (biofilm) และความขุ่นในผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นผลมาจาก carboxylic, fatty acid หรือ off-flavour compound เป็นต้น ซึ่งยีสต์ในกลุ่มนี้อาจจะส่งผลให้กระบวนการหมักล้มเหลว ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ยีสต์ในจีนัส *Brettanomyces, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Endomyces, Filobasidium, Hanseniaspora, Hansenula, Kloeckera, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* (Barszczewski and Robak, 2004) ซึ่งการเกิดขึ้นของยีสต์พวก non-Saccharomyces มีผลอย่างยิ่งในกระบวนการหมัก เนื่องจากยีสต์เหล่านี้จะสร้างสาร secondary metabolites ซึ่งจะส่งผล ต่อการเกิดกลิ่นและรสที่เปลี่ยนไปของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จะมีผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นออกมาในปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ กลีเซอรอล กรดอะซิ ติก กรดอะมิโน purines pyrimidines และ แอลกอฮอล์ (Guillamon et al., 1998)

ยีสต์มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ ทั้งยังต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน เนื่องจากยีสต์มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลได้ดี ดังนั้นในกระบวนกา รหมักผักและผลไม้ร่วมกับกากน้ำตาล (อาจใช้น้ำตาลทรายแดง น้ำตาลอ้อย) ในสภาพที่ไม่มีอากาศยีสต์จะ เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เหลือน้ำตาลสำหรับผลิตกรดแลกติ กของแบคทีเรียแลกติกน้อยลง ส่วนในสภาพที่มีอากาศยีสต์หลายชนิดใช้ประโยช น์จากกรดแลกติกได้ผลผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้พีเอชของผลิตภัณฑ์สูงขึ้น (Kantachote et al., 2009; Boekhout and Robert, 2003) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของยีสต์ในกระบวนการหมักคือปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ คือยีสต์จะมีชีวิตอยู่ และสามารถเพิ่มจำนวน

ได้เมื่อมีออกซิเจนและตายถ้ามีกรดอะซิติกในปริมาณสูง (Kantachote et al., 2009; Thomas et al., 2002)

การผลิตน้ำหมักชีวภาพมักมีปัญหาอยู่เสมอกับการปนเปื้อนของยีสต์และบางครั้งปนเปื้อนด้วยเชื้อรา ส่งผลให้ผู้ผลิตไม่สามารถขอใบทะเบียนอาหารและยาสำ หรับน้ำหมักชีวภาพในรูปเครื่องดื่มได้ แม้ว่าพอมีข้อมูลการตรวจสอบคุณภาพทางจุ ลินทรีย์โดยเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดให้มียีสต์และราไม่เกิน 100 เซลล์ต่อเครื่องดื่ม 1 มิลลิลิตร ยีสต์และราสามารถเจริญได้ดีในสภา วะที่มีพีเอชต่ำ พบ ได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช การปนเปื้อนเชื้อรา จาก วัตถุดิบและกระบวน การหมักที่ไม่สะอาด เป็นสา เหตุหลักของการปนเปื้อน จุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์ น้ำหมักชีวภาพ จากการศึกษาตัวอย่างน้ำ หมักชีวภาพจำนวน 19 ตัวอย่าง ของ ดวงพร และคณะ (2548) พบว่าน้ำหมักชีวภาพ 9 ตัวอย่างมีกลุ่ม จุลินทรีย์ที่ หลงเหลือ อยู่ในน้ำหมัก มากที่สุด คือยีสต์ และพบว่า แบคทีเรียแลกติก หลงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากที่สุดในน้ำหมักชีวภาพ 5 ตัวอย่าง และพบเชื้อราในน้ำหมักชีวภาพ 6 ตัวอย่าง

2.2 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Heterotrophic plate count: HPC หรือ Total bacterial counts: TBC)

จากงานวิจัยของ Prachyakij และคณะ (2008) ที่ได้ทำการหมักสาหร่ายผมนางเติมหรือไม่เติม กล้าเชื้อตามชุดการทดลองที่ออกแบบ ไว้ 4 ชุด คือ ชุดที่ 1 หมักแบบธรรมชาติไม่ใส่กล้าเชื้อเป็นชุดควบคุม ชุดที่ 2 ใส่ *L. plantarum* DW3 5% เป็นกล้าเชื้อ ชุดที่ 3 ใช้ 0.5% Potassium metabisulfite (KMS) ชุดที่ 4 ใช้ 0.5% KMS และใส่กล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 5% พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมักสาหร่ายผมนาง (วันที่ 0-7) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial counts: TBC) และแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลองและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก ยกเว้นชุดที่ หมักแบบธรรมชาติไม่ใส่กล้าเชื้อมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก และพบว่าแบคทีเรียแลกติกเป็น เป็นประชากรส่วนให ญ่ในการหมัก หลังจากวันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 การหมัก จำนวนแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง หลังจากวันที่ 60 พบว่าในน้ำหมักสาหร่ายแต่ละชุดการทดลองมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลืออยู่มากกว่า 4 log CFU/ml ยกเว้นชุดที่ หมักแบบธรรมชาติและใส่ *L. plantarum* DW3 เป็นกล้าเชื้อ มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลืออยู่ 5 log CFU/ml จำนวนแบคทีเรียแลกติกในชุดที่ หมักแบบธรรมชาติเติมกล้าเชื้อ และชุดที่ใช้ 0.5% KMS เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 มีจำนวนแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่ 4 และ 4.73 log CFU/ml ตามลำดับ ชุดที่หมักแบบธรรมชาติไม่ใส่กล้าเชื้อ และชุดที่ใช้ 0.5% KMS ไม่ได้ใส่กล้าเชื้อลงไป มีจำนวนแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่เพียง 2.4 และ

2.6 log CFU/ml ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่เหลืออยู่มากนั้นเนื่องจาก การใช้ 0.5% KMS สามารถช่วยลดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบได้และอาจเป็นกล้าเชื้อที่เหลืออยู่

Kantachote และคณะ (2009) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมัก น้ำหมักลูกยอป่า พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกเป็นประชากรส่วนใหญ่เมื่อหมักน้ำหมักชีวภาพได้ 14 วัน ด้วยเงื่อนไขการหมักที่มีอากาศน้อย แสดงว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นเชื้อดั้งเดิมที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้หมัก และหลังจากวันที่ 21 จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ขณะที่เชื้อราพบเฉพาะเริ่มต้นการหมัก หลังจากนั้นจน สิ้นสุดการหมักไม่พบเชื้อราอีกเป็นเพราะเชื้อราต้องการอากาศในก าร เจริญ แต่ด้วยสภาพการหมักทำให้ออกซิเจนหรืออากาศหมดไปอย่างรวดเร็วจากการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ โดยออกซิเจนถูกนำไปใช้และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น ดังนั้นทำให้แบคทีเรียแลกติ กกลายเป็นประชากรส่วนใหญ่เพรา ะสภาพแวดล้อมเหมาะสมทำให้แบคทีเรียแลกติกเจริญได้เร็ว รองลงมาคือยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ทั้งในสภาวะการหมักที่ใช้ถุงพลาสติกปิดทับด้านบนเป็นการจำกัดปริมาณอากาศตั้งแต่เริ่มต้นหมัก สามารถป้องกันการเจริญของฟิล์มยีสต์ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008a)

2.3 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB)

เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในกระบวนการหมัก พบอยู่ทั่วไปตามชิ้นส่วนของพืช โดยพบจำนวนประชากรของแบคทีเรียแลกติกประมาณ 0.15-1.5% ของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมด (Buckenhuskes, 1997) ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรี ยแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้น หรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (Axelsson, 2004) ส่วนใหญ่ต้องการอากาศน้อยๆ ในการเจริญ บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (Cintas et al, 2001) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาล คือ ก รดแลกติก อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 $^{\circ}$C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 $^{\circ}$C ส่วนช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ พีเอช $\leq$ 5 อัตราการเจริญลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

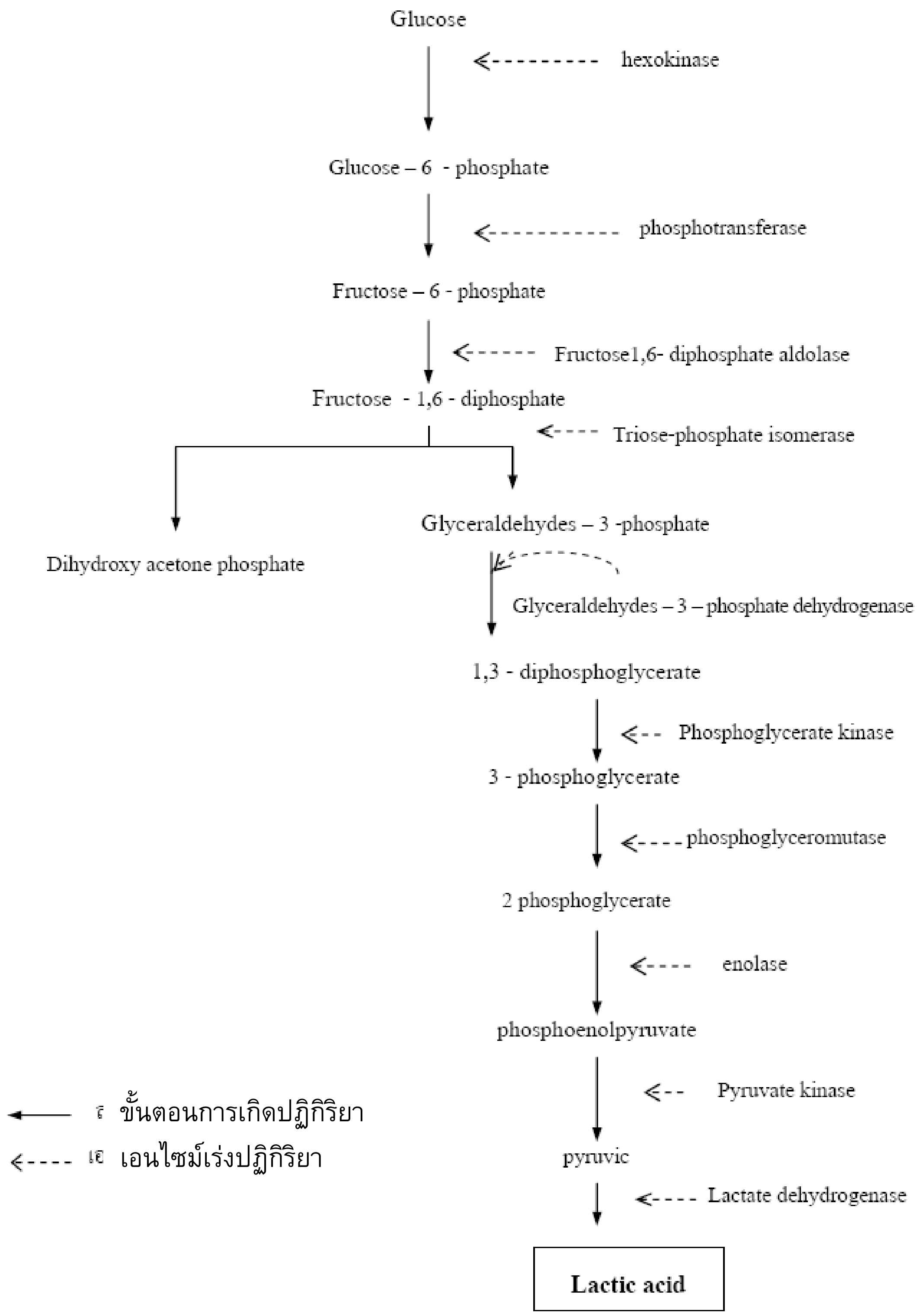
2.3.1 การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก

เมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลของ แบคทีเรียแลกติก สามารถจะจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (Salminen et al., 1998; Axelsson, 2004) คือ

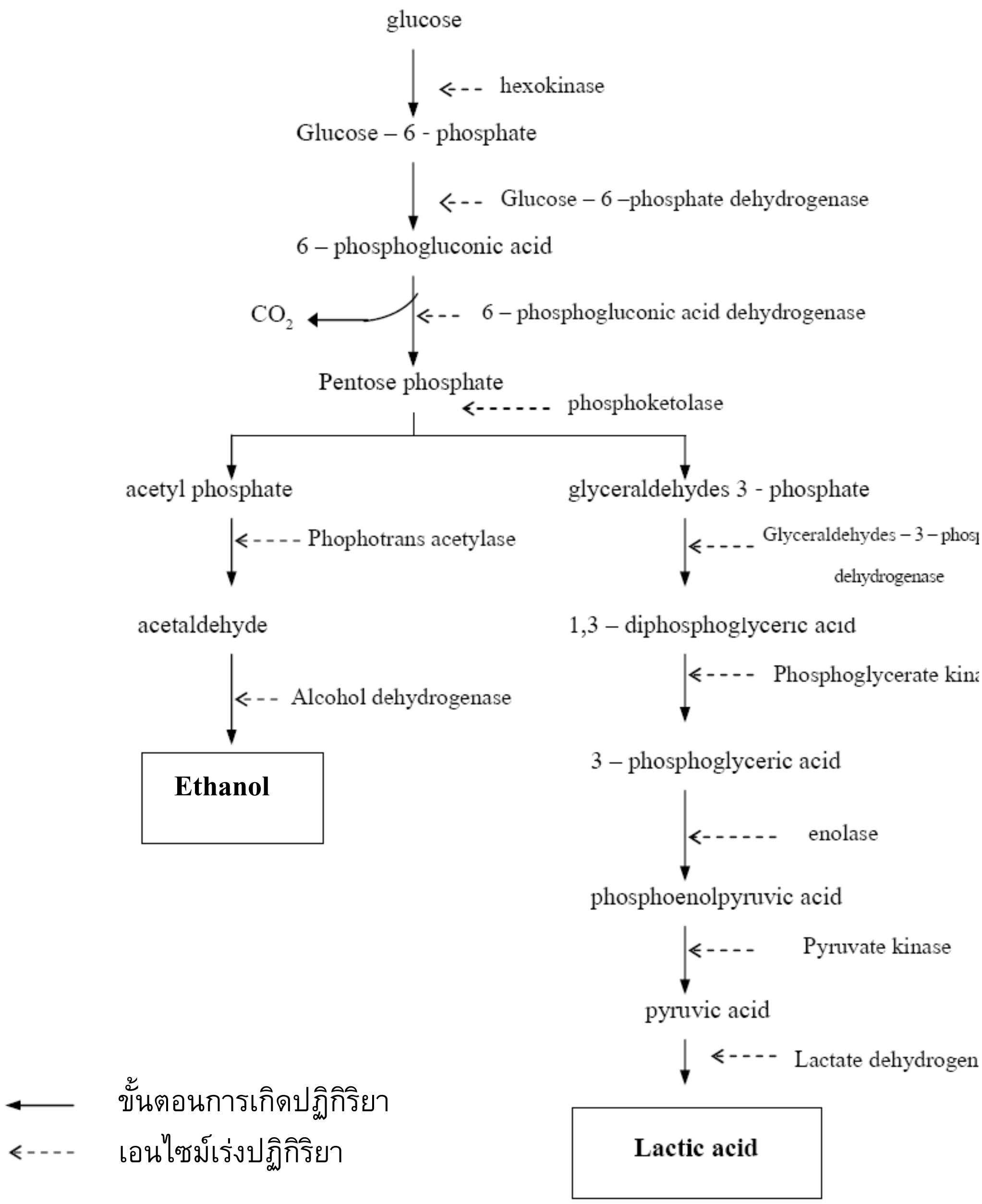
2.3.1.1 Obligative homofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักแล้วได้ผลผลิตเป็น กรดแลกติก เพียงอย่างเดียว (1 โมลของกลูโคสสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2 โมล) ผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (ดูรูปที่ 1-1) โดยใช้เอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *Pediococcus damnosus* และ *L. ruminis* เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแล กติกได้มากกว่า 85% จากน้ำตาล hexose (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 6 อะตอม หรือ C_6 sugar) เช่น กลูโคส แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาล pentose (น้ำตาลที่มีคาร์บอนอยู่ 5 อะตอม หรือ C_5 sugar) เช่น xylose ได้

2.3.1.2 Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแล กติกได้ 50% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 25% และกรดอะซิติ กหรือเอ ทานอล 25% ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ได้แก่ *L. plantarum*, *L. pentosus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* และ *Enterococcus faecium* แบคทีเรียกลุ่ม นี้สามารถผลิตกรดแล กติก ผ่านวิถี phosphoketolase (ดูรูปที่ 1-2) กลุ่มนี้มีทั้งเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase สามารถผลิตกรดแลกติ กจากน้ำตาล hexose ได้ และสามารถใช้น้ำตาล pentose เช่น arabinose ribose และ xylose ได้เล็กน้อย การที่เอนไซม์ใดจะทำหน้าที่ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมในแง่สับสเตรท โดยเอนไซม์ phosphoketolase ถูกยับยั้งในที่มีกลูโคสและขึ้นกับค่า oxidation reduction potential (ORP) ด้วยในกรณีการเกิดเป็นกรดอะซิติกหรือเอทานอล

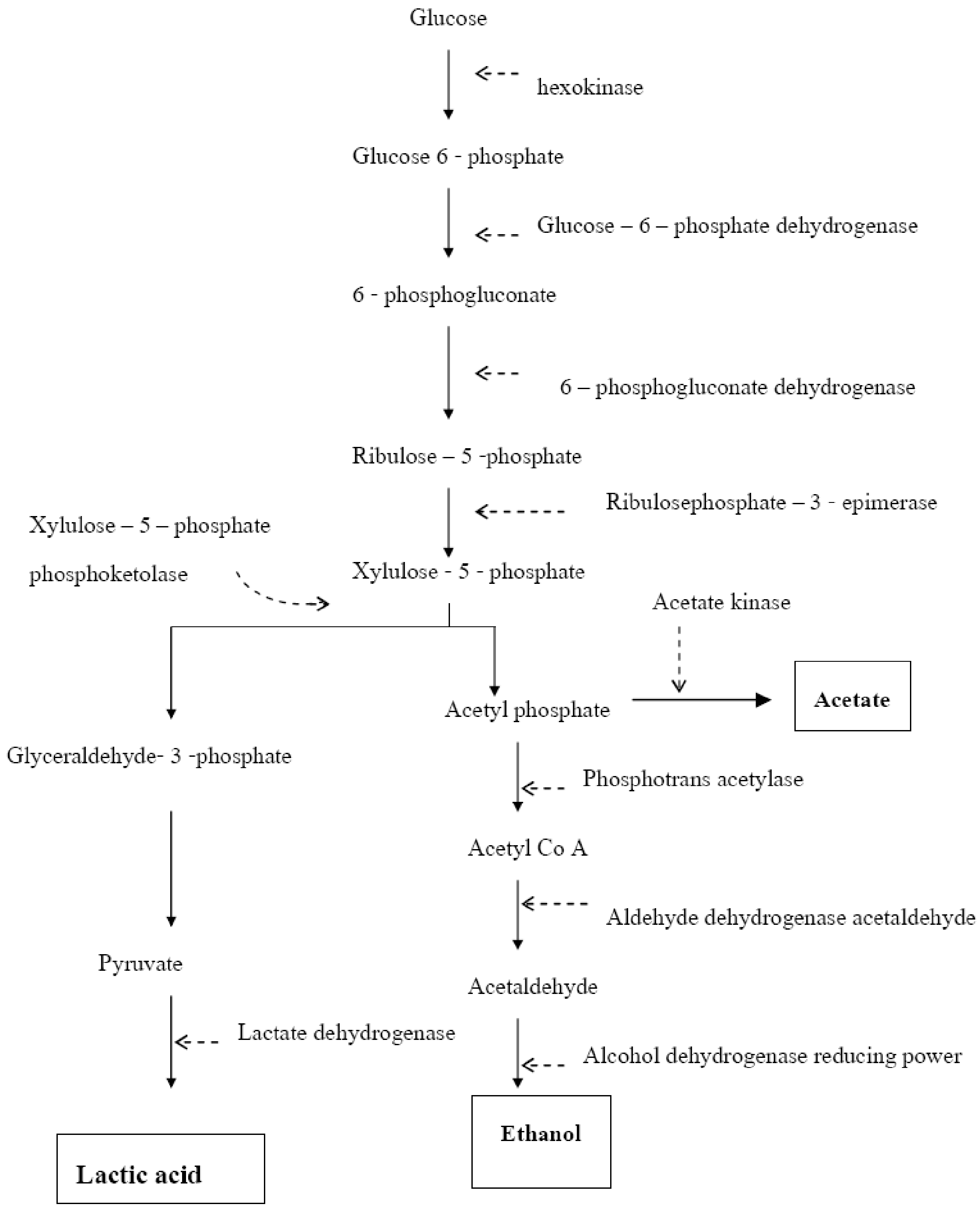
2.3.1.3 Obligative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาล 1 โมลแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติ ก 1 โมล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล และกรดอะซิติ กหรือเอ ทานอล 1 โมล ได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน โดยใช้น้ำตาลผ่านวิถี 6 phosphogluconate/ phosphoketolase (ดูรูปที่ 1-3) โดยไม่มีเอนไซม์ aldolase จึงไม่สามารถใช้น้ำตาลผ่านวิถี EMP ได้ ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ แก่ กลุ่มของ *Leuconostoc* และกลุ่มของ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. brevis* และ *L. buchneri* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสามารถใช้น้ำตาล hexose และ pentose ได้ดี



รูปที่ 1-1 วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Obligately homofermentative (Salminen et al., 1998)



รูปที่ 1-2 วิถี phosphoketolase ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Facultative heterofermenter (Aarnikunnas, 2006 ดัดแปลงจาก Axelsson, 2004)



รูปที่ 1-3 วิถี 6-phosphogluconate ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Obligately heterofermentative (Aarnikunnas, 2006 ดัดแปลงจาก Axelsson, 2004)

ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกใหม่ เป็น 20 สกุล เช่น *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weisella* เป็นสกุลหลัก นอกจากนี้ก็มี *Alloiococcus, Bifidobacterium, Dolosigranulum, Globicatella* และ *Lactosphaera* สกุล *Lactobacillus* เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดมีประมาณ 80 species (Axelsson, 2004)

2.3.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ สารที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น (Dasechel and Klaenhammer, 1989) มีดังนี้

2.3.2.1 กรดอินทรีย์ (organic acids)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติกจะได้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลก ติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดโพรไพโอนิก ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของ พีเอช ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรด โดยปกติกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีพีเอชต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 5.0 กรดอินทรีย์เป็นกรดอ่อนจะออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าสภาวะที่เป็นกลาง โดยกรดอะซิติกสามารถยับยั้ง แบคทีเรียบางชนิด ได้ดีกว่ากรดแลกติก เนื่องจากมีค่า pKa สูงกว่า (ค่า pKa ของกรดแลกติก = 3.08, กรดอะซิติก = 4.75, กรดโพรไพโอนิก = 4.87) และสามารถแตกตัวได้ น้อยกว่ากรดแลกติกเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเท่ากัน กรดอะซิติกสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ได้ดีกว่ากรดแลกติ กและกรดซิตริก (Ahmad and Marth, 1989; Wong and Chen, 1988) กรดอินทรีย์สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย กลไกการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์เกิดจากกรดอ่อนที่ไม่แตกตัวแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนใน ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดและกระจายไปทั่วเซลล์ มีผลยับยั้งกระบวนการ เมแทบอลิซึม (metabolism) ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ส่งผลทำลายเซลล์หรือยับยั้งจุลินทรีย์นั้นๆ ได้ (Fuller, 1989) นอกจากนี้ Bearso และคณะ (1997) มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้ง คือกรดอินทรีย์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่า พีเอชในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรี ย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด (Salminen and Wright, 1998)

2.3.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)

ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียแล กติกจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ของเอนไซม์ oxidase, NADH oxidases และ superoxide dismutase ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็ก แบคทีเรียแลกติกจะไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ที่ใช้กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ระบบอื่นซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพน้อยกว่าการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเหตุให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม Foentaine และคณะ (1996) กล่าวว่าในสิ่งมีชีวิตไม่มีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกสลายโดยเอนไซม์ peroxidases, pseudocatalase และ flavoproteins ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิได ซ์ที่รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดซ์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ sulfhydryl ได้แก่ โปรตีนในเซลล์ และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขับออกซิเจนออก ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ (Ouwehand and Vesterlund, 2004) สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2.3.2.3 Diacetyl (2, 3 -butanediol)

ไดอะซิติลชนิด 2,3-butanedione เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนย และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ ไดอะซิติลเป็นผลิตผลสุดท้ายที่ ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในการใช้น้ำตาลเฮกโซสของแบคทีเรียแล กติก อาทิเช่น *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิติลได้ สารไดอะซิติลมีประสิทธิภาพมากที่พีเอชน้อยกว่า 7.0 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก สารไดอะซิติลจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จับกับอาร์จินีน (arginine) ของแบคทีเรียแกรมลบ รบกวนการนำกรดอะมิโนชนิดนี้ไปใช้ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

2.3.2.4 Reuterin

รูทีริน เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อ *L. reuteri* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์หลายชนิด รูทีรินเป็นสารซึ่งไม่ใช่โปรตีน มีมวลโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง เชื้อจะสร้างรูทีรินขึ้นเมื่อเจริญในสารผสมของกลูโคส กลีเซอรอล และกลีเซอรอลดีไฮด์ในสภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อเกิด dehydration ของกลีเซอรอล *L. reuteri* จะสร้าง 3-hydroxypropanal (reuterin) ขึ้นมา จากนั้นจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 1,3-propanediol โดย

NADH+H^+-dehydrogenase ในช่วง log phase จะยังไม่มีการสร้างรูทีริน แต่จะเริ่มมีการสะสมรูทีรินในช่วงที่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) รูทีรินมีช่วงการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัสได้ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

2.3.2.5 Microgard

สามารถ ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas, Salmonella* และ *Yersinia* ยีสต์และรา ยกเว้นแบคทีเรียแกรมบวก microgard ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลกติก แบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิต microgard เช่น *Propionibacterium shermanii* (Staszewski and Jagus, 2008)

2.3.2.6 แบคทีริโอซิน (Bacteriocins)

เป็นสารประกอบโปรตีน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไวต่อ สารดังกล่าว ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรีย ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียง กัน แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) มีการนำแบคทีริโอซินมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากมีผล งานวิจัย ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *S. aureus, Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, C. tyrobutyricum, C. thermosaccharolyticum, B. sterothermophilus* (Davidson and Hoover, 1993; Schillinger et al., 1996) ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ผลที่ไม่ชัดเจน ยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุมูลอิสระของโลหะ (chelating agent) เช่น EDTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคที ริโอซินมากขึ้น หรือกรณีที่เซลล์แบคทีเรียแกรมลบนั้นมีความผิดปกติที่เยื่อหุ้มเซลล์ แบคที ริโอซินจะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากขึ้น (Pongtep, 2003)

2.3.2.7 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide, CO_2)

ส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ heterofermentative นอกจากนี้วิถีเมแทบอลิซึมอื่นๆ ก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอ นไดออกไซด์มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียสองแบบคือ หนึ่งทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน และสองทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียสมบัติในการซึมผ่านของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญของ

จุลินทรีย์บางชนิดได้ แต่ความเข้มข้นสูงจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

2.3.3 ผลิตภัณฑ์ที่อาศัยบทบาทของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผล ผลิตทางการเกษตร เป็นผลิตภัณฑ์หมักต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่นนมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์ผักและผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง เช่น ผักกาดดอง และใช้ในผลิ ตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม และยังใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ด้วย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนี้มีการทำหญ้าหมัก เพื่อให้ได้คุณภาพดี มีคุณค่าทาง อาหารสูง เหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ในระดับอุตสาหกรรม มีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อเพื่อเติมลงไปในอาหาร มีผลต่อกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส ของอาหาร ตัวอย่างอาหารหมักดองที่ใช้แบคทีเรียแลกติก

2.3.3.1 ผลิตภัณฑ์นม

ผลิตภัณฑ์นมหมักเตรียมได้จากนมหลายชนิด นำมาผ่านการโฮโมจี ไนซ์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลง แล้วนำมาฆ่าเชื้อด้วยกา รพาสเจอร์ไรซ์ หมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ในการหมักนมเกิดได้ 2 แบบ คือ เป็นการหมักที่ให้กรดเพียงอย่างเดียวกับคีเฟอร์ (kifir) เป็นการหมักที่ให้กรด ก๊าซและแอลกอฮอล์เกิดขึ้นเล็กน้อย บทบาทของแบคทีเรียแลกติ ก ในการหมักก็คือ การสร้างกรดแลกติ กของกล้าเชื้อ ทำให้มีพีเอชลดลงและทำให้เกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็น curd ได้รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น อย่างเช่นนมเปรี้ยว โยเกิร์ต เชื้อแบคทีเรียที่ เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* การผลิตโยเกิร์ตจะมีการหมักเกิดขึ้นภายในเวลา 4 ชั่วโมง โดยเชื้อจะเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อค่า พีเอชลดลงจาก 6.3-6.5 เป็น 5.5 การเจริญของ Streptococci จะลดลงและ Lactobacilli จะเจริญมากขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์มีประมาณ 0.90-0.95 % นอกจากนี้ยังมีการหมักที่ทำให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย คือ นมหมักที่เรียกว่า คีเฟอร์ ซึ่งเกิดจากการหมักนมกับ กล้า เชื้อจุลินทรีย์ ที่ประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรียแลกติกทำหน้าที่ในการหมักนมให้เป็นสารประกอบหลายอย่าง ได้แก่ กรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลเล็กน้อย และน อกจากนี้ยังได้สารที่มีกลิ่นหอม (Guzel-seydim et al., 2000; Beshkova et al., 2002)

2.3.3.2 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว

การทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้บริโภคได้นาน โดยการนำมาแปรรูปและยังรวมไปถึงการนำผลไม้มาดองด้วย ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ผักที่นิยมนำมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลี หอม แตง กวา หน่อไม้ เป็นต้น ปัจจุบันการดองเป็นอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1995) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่เป็นผักสดและผลไม้คือแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศ (Gram negative aerobic bacteria) และยีสต์ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกพบเป็นอันดับรองลงมา (Mundt et al., 1967; Mundt and Hammer, 1968; Schneider, 1988 อ้างโดย Wood, 1998) แต่ถ้าวัตถุดิบอยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีความชื้น ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิที่เหมาะสม แบคทีเรียแลกติกจะมีบทบาทหลักในการหมัก ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่เกิดขึ้นในการหมักขึ้นอยู่กับลักษณะทางเคมีของพืช ความเข้มข้นของเกลือและ ค่าพีเอช รวมทั้งชนิดของพืชและอุณหภูมิในการหมัก และในระหว่างการหมักเมื่อสภาวะในการหมักเปลี่ยนแปลงไปก็จะเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียแลกติกด้วย

2.3.3.3 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

เป็นการหมักเนื้อที่ใช้แบคทีเรียแลกติก เช่น แหนม ไส้กรอก ในระหว่างการหมักมีกรดแลกติกเกิดขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง (Adam and Moos, 1995) นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากสารที่ผลิตของกล้าเชื้อหรือแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่น กรดอินทรีย์ รวมถึงสาร ในกลุ่มแบคทีริโอซิน จุลินทรีย์ที่ใช้เป็น กล้าเชื้อนี้จะทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นา นขึ้น แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. เป็นเชื้อที่ใช้ในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นอกจากนี้บางผลิตภัณฑ์ยังใช้ *Micrococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเทรตซึ่งมีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนยิ่งขึ้น (Swetwiwathana et al., 2003)

2.3.3.4 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ น้ำปลา บูดู ปลาร้า ปลาส้ม แบคทีเรีย แลกติก ที่พบในอาหารหมักของปลา เช่น *L. farcimnis, L. pentosus, L. plantarum* และ *Leuconostoc* sp. จุลินทรีย์ที่ดีต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อเกลือได้ดี และเจริญได้ ดีในระหว่างการหมัก จึงมี ส่วน ช่วยเสริมรสชาติของการหมักได้เป็นอย่างดี (Tanasupawat et al., 1998)

2.3.3.5 ผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพ

การผลิตน้ำหมักชีวภาพ จากพืช เช่น สะระแหน่ เสาวรส ว่านหางจระเข้ กล้วยน้ำว้า ลูกยอ เปลือกมังคุด บัวบก ตะไคร้ ข้าวกล้อง ใช้อัตราส่วนพืช ผัก ผลไม้ ร่วมกับน้ำตาลและน้ำในอัตราส่วน 3: 1: 10 โดยปริมาตร มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา (ดวงพรและคณะ, 2548) กระบวนการผลิตที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ มักพบแบคทีเรียแลกติกซึ่งอาศัยอยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพ าะในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างกรดแลกติก , อะซิติก, ฟอร์มิก, คาร์บอนไดออกไซด์, แอมโมเนีย, เอทานอล, เมทานอล, แบคทีริโอซิน และ antibiotics ซึ่งสารที่กล่าวมานี้สามารถทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคหรือทำให้อาหารเน่าเสีย (Magnusson et al., 2003) แบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. plantarum, L. fermentum* และ *L. brevis* (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008a)

2.3.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลกติกทีมีต่ออาหารหมัก

2.3.4.1 ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

ในกลุ่มของธัญพืชพบคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นมาจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตโดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น เป็นการเพิ่มคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหาร นอกจากนี้ยังพบวิตามินได้ในระหว่างการหมัก เพราะจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น ในโยเกิร์ตมีโปรตีนเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนคุณภาพสูง และมีสารที่จำเป็นซึ่งร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามินเอ วิตามินบี แร่ธาตุสำคัญๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส และมีเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ช่วยย่อยน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็นกรด ช่วยให้ระบบทางเดินอาหารทำงานเป็นปกติ สามารถป้องกันอาการท้องอืด อาหารไม่ย่อยหรือท้องเดินเมื่อดื่มนม ซึ่งเกิดจากการขาดน้ำย่อยแลกเตส (Lactase) ที่ใช้ในการย่อยน้ำตาลแลกโตสที่อยู่ในนมสด (Sarkar, 2008)

2.3.4.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

บทบาทของแบคทีเรียแลกติกและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนมีการเก็บรักษาได้นาน โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง คือ การสร้างกรดอินทรีย์และการลดลงของ ค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแลกติกได้แก่ กรดแลกติ ก และกรดอ ะซิติก นอกจากนี้เชื้อยังผลิตสารอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีริโอซิน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการ เรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสา ยยาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน และแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์จะให้สมบัติของแบคที ริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้ง คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น (Hiller and Davision, 1991; Stiles and Hastings, 1991; Klaenhammer, 1998)

2.3.4.3 แบคทีเรียแลกติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด

การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยในการยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนี้อาจมีผลในการลดน้ำหนักได้ โดยแต่ละสัปดาห์จะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ในโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารที่ไปยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *L. acidophilus* ซึ่งจะช่วยให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง ใน กรณีที่บริโภคคีเฟอร์ ซึ่งเป็ นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เพราะมี คุณค่าทางโภชนาการหลายอย่างและยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ทำให้ระบบการ ย่อย อาหารดีขึ้นโดยเฉพาะการย่อยแลกโตส (Hertzler and Clancy, 2003)

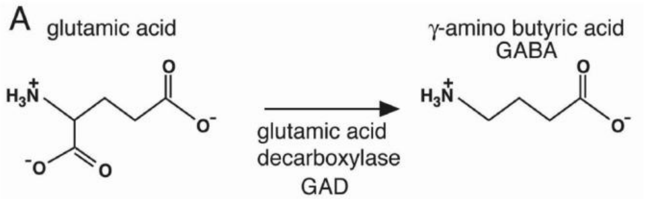
2.3.4.4 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย แลกติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อ macrophage lymphocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต γ-interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อโรค และยังมีสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *L. acidophilus* (Adam and Moss, 1995) มีการศึกษาพบว่านมถั่วเหลืองที่ผ่านการหมั กด้วยแบคทีเรียแล กติกที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถเจริญในนมถั่วเหลืองได้ สามารถเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดฟาโกไซท์ (phagocytic index) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) ในหนูทดลองได้ นอกจากนี้นมถั่วเหลืองหมักที่ผ่านความร้อนแล้ว

ก็ก่อให้เกิดผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกันแต่ไม่มีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลงเหมือนน้ำนมถั่วเหลืองหมักที่ไม่ผ่านความร้อน (Leblanc et al., 2004)

3. การผลิต γ -aminobutyric acid (GABA)

γ-aminobutyric acid (GABA) จัดเป็นกรดอะมิโนและอนุพันธ์ที่ไม่เป็ น องค์ประกอบของโปรตีนมีอยู่ในธรรมชาติ (Manyam et al., 1981) ผลิตจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดกลูตามิก (glutamic acid) (Varanyanond et al., 2005) (รูปที่ 1-4) มีการใช้กาบาในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทหลายโรค เช่น โรควิตกกังวล นอนไม่หลับ โรคลมชัก ก าบามี คุณสมบัติในการช่วยลดความดันโลหิตและคลายกังวล (antianxiety) (Komatsuzaki et al., 2005) หน้าที่ของกาบา เช่น เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง ชักนำ ให้ความดันเลือดต่ำที่ผิดปกติลดลง (hypotensive), ลดอาการปัสสาวะมากผิดปกติ (diuretic effects), และมีฤทธิ์คล้ายยากล่อมประสาท (Jakobs et al., 1993; Guin Ting Wong et al., 2003) การศึกษาของ Adeghate และ Ponery (2002) แสดงให้เห็นว่ากาบามีอิทธิพลต่อการหลั่งของ insulin จากตับอ่อน และมีผลในการป้องกันโรคเบาหวาน (Hagiwara et al., 2004) สารกาบายังมีผลกระตุ้นฮอร์โมนทำให้ระดับฮอร์โมนมีสม่ำเสมอ ช่วยชะลอความแก่ และขับเอนไซม์ขจัดสารพิษออกจากร่าง กาย ควบคุมระดับน้ำตาลและพลาสมาคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ทำให้เลือดไหลหมุนเวียนดีและลดความดันเลือดลง กระตุ้นการขับถ่ายน้ำดีสู่ลำไส้เพื่อสลายไขมัน ป้องกันโรคมะเร็งลำ ไส้และช่วยขับสารแห่งความสุข (นก, 2551) นอกจากนี้ยังมีการนำกาบาไปเสริมในอุตสาหกรรมยาและอาหาร (Jun et al., 2007)



รูปที่ 1-4 การสังเคราะห์กาบาจากกรดกลูตามิกโดยใช้เอนไซม์ Glutamic acid decarboxylase (GAD) (Jorgensen, 2005)

การเพิ่มคุณค่า ของอาหารโดยมี กาบาเป็นส่วนประกอบ ประสบผลความสำเร็จ เช่น ในชาที่มีการบ่มแบบไร้อากาศ (Gabaron tea) (Sawai et al.,1999; Tsushida and Murai, 1987) ข้าวเริ่มงอก (rice germ by soaking in water) (Saikusa et al., 1994) โยเกิร์ต (GABA soya yogurt) (Park et al., 2007) ชีส (cheese) (Nomura et al. 1998) Gammalone และ Shochu (Jun et al., 2007) เทมเป้ (tempeh) (Aoki et al., 2003) และผลิตภัณฑ์นม (Park and

Oh, 2007; Nomura et al.,1998) มีการศึกษาการผลิตกาบาโดยจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย (Smith et al., 1992; Maras et al., 1992) รา (Kono and Himeno, 2000) และยีสต์ (Hao and Schmit, 1993) โดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติกที่มีความสำคัญเป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เช่น ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและปลาหมัก (Komatsuzaki et al., 2008) กลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาเช่น *Streptococcus thermophilus* และ *L. delbreukii* คัดแยกจากโยเกิร์ตและ *L. hilgardi, L. sakei, L. brevis, L. reuteri, L. confusus, L. casei, L. acidophilus, L. bulgaricus*, *L. plantarum, Leuconostoc mesenteroides* คัดแยกจากกิมจิหรืออาหารทะเลหมักเกลือของเกาหลี (Jotgal) (Cross, 2004; Han and Kim, 2006; Hayakawa et al., 1997; Jeun, 2004; Kang, 2006) *L. buchneri* จากกิมจิ (Cho et al., 2007) *L. brevis* จากกิมจิ (Ueno et al., 1997) และสุรากลั่น (Kome shochu kasu) (Yokoyama et al., 2002) *Lactococcus lactis* จากกล้าเชื้อในการหมักชีส ผลิตกาบาได้ 69.60 มิลลิกรัม/ลิตร (Nomura et al., 1998) *L. brevis* OPY-1 ที่คัดแยกจากกิมจิผลิตกาบาได้ 424.67 มิลลิกรัม/ลิตร ในโยเกิร์ตถั่วเหลือง (GABA soya yogurt) (Park et al., 2007) และ *L. brevis* OPK-3 ที่คัดแยกได้จากกิมจิสามารถผลิตกาบา ได้ 84.29 มิลลิกรัม/ลิตร (Park and Oh, 2005)

มีการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกชนิดต่างๆ ที่ผลิตกาบาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียแลกติกแต่ละ ชนิดจะมีความสามารถผลิตกรดและกลิ่นในอาหาร (Kato et al., 2001; Gran et al., 2003) Siragusa และคณะ (2007) สามารถคัดแยก แบคทีเรียแลกติกที่สร้างกาบาได้จากชีส เช่น *L. paracasei* PF6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, *L. lactis* PU1, *L. plantarum* C48 และ *L. brevis* PM17 แบคทีเรียแลกติกที่ใช้เป็น กล้าเชื้อเริ่มต้นสังเคราะห์กาบาได้เช่น *L. lactis*, *S. thermophilus*, และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Nomura et al., 1999) รวมถึงแบคทีเรียแลกติกอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็น กล้าเชื้อ เช่น *L. plantarum*, *L. paracasei* แยกได้จากชีสของอิตาลี (Leroy et al., 2004; Park et al., 2007) ส่วน Komatsuzaki และคณะ (2005) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 3 สายพันธุ์ที่สังเคราะห์กาบาจากอาหารหมักแบบดั้งเดิมของญี่ปุ่น ผลิตกาบามีความเข้มข้นมากกว่า 185.60 มิลลิกรัม/ลิตร คือ *L. paracasei* NFRI 7415 แยกจาก Funa-sushi, *L. plantarum* NFRI 7313 และ *L. brevis* NFRI 7340 (IFO 3960) ในญี่ปุ่นกาบาได้รับการอนุ ญาตให้เติมลงในอาหารหรืออาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เช่นในเครื่องดื่ม นม คุกกี้ มายองเนส โจ๊ก เค้ก ข้าว นมหมัก ข้าวกล้อง เต้าหู้ natto (ถั่วหมักเหนียว) และนมถั่วเหลือง (Suk, 2002)

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต GABA

L. buchneri ที่คัดแยกได้จากกิมจิ สามารถผลิตกาบาได้ 25,880 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร MRS broth ที่ผสม 5% monosodium glutamate (MSG), 1% NaCl และ 1% glucose พีเอช 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C 36 ชั่วโมง (Cho et al., 2007)

L. brevis ที่คัดแยกได้จากกิมจิ ผลิตกาบาได้ 5,090 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYP) medium ที่ผสม 1% MSG บ่มที่อุณหภูมิ 30°C 24 ชั่วโมง (Ueno et al., 1997)

Ja Young Kim และคณะ (2009) คัดแยก *L. brevis* GABA 100 จากกิมจิ นำไปเป็นกล้าเชื้อในน้ำหมักราสเบอร์รี่สีดำ (black raspberry) สามารถผลิตกาบาได้สูงสุ ด 21,500 มิลลิกรัม/ลิตร ในวันที่ 12 ของการหมัก ภายใต้สภาวะ 30°C พีเอช 5.0

Ji Won Shin และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียแลกติก 3 สายพันธุ์ที่ผลิตกาบาได้ปริมาณสูงคือ *L. brevis* AML15, *L. brevis* AML45-1, *L. brevis* AML72 จากกิมจิและปลาหมักเกลือ (Salted fish) *L. brevis* AML15 สามารถผลิตกาบาสูงสุด 1,086 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร MRS broth ที่ผสม 5% (w/v) MSG และ 10 M pyridoxal phosphate (PLP) ปรับพีเอช 5.0

Ueno และคณะ (2007) คัดแยก *Lactobacillus* sp. LI3 จาก Senmaizuke (ผักดองแบบดั้งเดิมของเมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น) ผลิตกาบาได้ 67,730 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเติม 800 mM MSG ลงในอาหาร ปรับพีเอช 5.0

Huang และคณะ เลี้ยง *L. brevis* CGMCC NO.1306 แบบ fed-batch fermentation เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.0 ผลิตกาบาได้ 40,730 มิลลิกรัม/ลิตร และพบว่าเมื่อเติม (L-MSG) ลงไปสามารถผลิตกาบาได้ 76,360 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง

Xiaoxue Lu และคณะ (2008) คัดแยก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B จากกิมจิ สามารถผลิตกาบา 3,680 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร MRS broth ที่ผสม 1% MSG ภายใต้สภาวะ 30°C 24 ชั่วโมง

Siragusa และคณะ (2007) สามารถคัดแยก เชื้อจากชีสของอิตาลี ได้แก่ *L. paracasei* PF6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, *L. lactis* PU1, *L. plantarum* C48,

และ *L. brevis* PM17 ซึ่งสามารถสังเคราะห์กาบาได้ 99.9, 63.0, 36.0, 16.0, และ 15.0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับภายใต้สภาวะ 30°C 24 ชั่วโมง พีเอช 4.7

L. brevis OPY-1 ที่คัดแยกได้จากกิมจิสามารถผลิตกาบาได้ 424.67 มิลลิกรัม/ลิตร ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต (GABA soya yogurt) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ผสม 1% (w/v) MSG บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่า 150 rpm นาน 24 ชั่วโมง (Park et al., 2007)

Park และ Oh (2005) คัดแยก *L. brevis* OPK-3 ได้จากกิมจิ สามารถผลิตกาบาได้ 84.29 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหารที่ผสม 1% (w/v) MSG เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *L. brevis* KCTC 41029 (1.89 มิลลิกรัม/ลิตร), *L. acidophilus* KCTC3171 (0.02 มิลลิกรัม/ลิตร) และ *L. sakei* KCTC3603 (0.02 มิลลิกรัม/ลิตร)

L. brevis OPK-3 สามารถผลิตกาบาได้ถึง 2,023 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ผสม 1% (w/v) MSG บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง (Park and Oh, 2007)

Komatsuzaki และคณะ (2005) สามารถคัดเลือกเชื้อ *L. paracasei* NFRI 7415 จาก Funa-sushi ผลิตกาบาได้ 581.85 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร MRS ที่ผสม 50 mM MSG ภายใน 144 ชั่วโมง (6 วัน) ขณะที่ Komatsuzaki และคณะ (2008) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาบาของเชื้อ 3 สายพันธุ์คือ *L. paracasei,* *L. brevis* และ *L. lactis* และคุณสมบัติของ glutamate decarboxylase (GAD) ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. paracasei, L. brevis* และ *L. lactis* ดังแสดงในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 คุณสมบัติของ Glutamate decarboxylase (GAD) ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. paracasei, L. brevis* และ *L. lactis*

Property	*L. paracasei*[a]	*L. brevis*[b]	*L. lactis*[c]
Molecular weight (kDa)			
SDS-PAGE	57	60	54
Gel filtration	110	120	ND
Optimum pH	5.0	4.2	4.7
Optimum temperature	50°C	30°C	ND
Km value (mM)	5.0	9.3	0.51
10 mM NaCl	-	-	ND
10 mM $(NH_4)_2SO_4$	+	+	ND
10 mM $CaCl_2$	+	ND	ND
GABA (มิลลิกรัม/ลิตร)	6180[100[x]]	5090[100[x]]	69.6[0[y]]
[glutamate (mM)[d]]	950[10[x]]	ND	54.6[20[z]]

Km value คือ ค่าคงที่ Michaelis constant ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ steady state บอกถึง affinity ของสับสเตรทต่อเอนไซม์

เครื่องหมาย: - = ไม่เติม; + = เติม

ND (Not determined)

[a] ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาของ Komatsuzaki และคณะ (2008)

[b] Ueno et al,1997

[c] Nomura et al, 1999

[d] Glutamate concentrations in the growth medium

[x] Komatsuzaki et al., 2005

[Y] Nomura et al.,1998

[Z] Sanders et al., 1998

4. สาหร่ายผมนาง

สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสาหร่ายสีแดงสกุล *Gracilaria* อยู่ใน Division Rhodophyta Class Rhodophyceae ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตวุ้น *Gracilaria* มีอยู่หลายสายพันธุ์ ซึ่งมีชื่อเรียกแล้วแต่ท้องถิ่น เช่น ในประเทศไทยเรียกสาหร่ายผมนาง, สาย, สาหร่ายข้อ, สาหร่ายเขากวาง หรือสาหร่ายวุ้น แพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งของอ่าวไทยและฝั่งมหาสมุทรอิ นเดีย ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายผมนาง *G. fisheri* มีทัลลัสตั้งตรงเป็นรูปเรียวยาวทรงกระบอกกลมหรือแบน ลักษณะของทัลลัสมีตั้งแต่บอบบาง อ่อนนุ่ม หักง่ายไปจนกระทั่งเหนียวเหมือนผังผืด สามารถเจริญเติบโตได้ 2 ทาง คือการเจริญเติบโตที่เซลล์ปลายยอดและการแตกแขน งด้านข้าง ความยาวของทัลลัสมีตั้งแต่ 4 เซนติเมตร - 3.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.5 - 4.0 มิลลิเมตร สารสีของสาหร่ายผมนาง *G. fisheri* ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ ดี ไฟโคผลิน เช่น อาร์ไฟโคอิริทริน อาร์ไฟโคไซยานิน ซี ออลไฟโคไซยานิน คาร์โรทีนอยด์ เช่น เบต้าคาโรทีน แอนเทอราแซนดิน เป็นต้น

ในประเทศไทยสามารถพบสาหร่ายผมนาง *Gracilaria* ได้ทั่วไปบริเวณน้ำตื้นหรือชายฝั่งที่ลมพัดไม่แรงมากนัก พฤติกรรมของการสืบพันธุ์แบบมีเพศเป็น 3 ลักษณะ ประกอบด้วย gametophyte, sporophyte และ corposporophyte stages โดยสลับกันไป สามารถรวบรวมสปอร์ได้จากการวางวัสดุล่อสปอร์ในแหล่งน้ำที่มีสาหร่ายชุกชุม จากผลการศึกษาทดลองของไพโรจน์และสุชาติ (2532 อ้างโดย คณิต , 2535) พบว่าคาร์โปสปอร์ (carpospore) หรือ สปอร์ของสาหร่ายผมนาง *Gracilaria* ตกและเคลื่อนออกจากกระเปาะหุ้มสปอร์สู่ภายนอกได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม 30 ppt. (Gavino, 1986 อ้างโดย คณิต, 2535) กล่าวว่าสาหร่ายทะเลในสกุล *Gracilaria* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำกร่อยที่มีความเค็ม 15-24 ppt. พบได้ทั่วไปในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ไพโรจน์และสมิง (2533) ได้คาดการณ์ไว้ว่าสาหร่ายผมนางน่าจะมีชุกชุมในบริเวณทะเลสาบสงขลา และอ่าวปัตตานี มากกว่าแหล่งอื่นๆ แต่ในปัจจุบันนี้ผลผ ลิตจากแหล่งดังกล่าวมีปริมาณลดน้อยลงไปเป็นอันมาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป ทั้งโดยธรรมชาติและผลการกระทำของมนุษย์เป็นผลให้แหล่งเกิดสาหร่ายเสื่อมโทรมลงและมีขอบเขตจำกัดลงอันเนื่องจากความตื้นเขิน น้ำมีความขุ่นสูง และกระแสน้ำไหลแรงขึ้น ทำให้เป็นผลกระทบต่อวงจรชีวิตและผลผลิตของสาหร่ายอย่างเห็นได้ชัดเจนชนิด สาหร่ายในสกุล *Gracilaria* ที่พบว่ามีงานวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยได้แก่ *G. fisheri, G. changii, G. verrucosa, G. edulis, G. salicornia* และ *G. tenuistipitata* (ชมรมสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งประเทศไทย, 2543 อ้างโดย วราภรณ์, 2547)

สาหรายมีคุณค าทางอาหารสูงจึงเป นที่นิยมบริโภค โดยเฉพาะอย างยิ่งในประเทศญี่ปุ น จีนและเกาหลี นอกจากนี้ยัง นำมาใช ในอุต สาหกรรมต างๆ เชน อุตสา หกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ใชในการผลิตปุยและไบโอดีเซล จากงานวิจัยสาหรายประกอบดวยคารโบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันจำเปน (ω-3 และ ω-6) เยื่อใย วิตามิน และแรธาตุ ซึ่งมีปริมาณสูงกวาพืชทั่วไป (Burtin, 2003; MacArtain et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีสาร polyphenols, phenolic acid, carotenoids และ mycosporine-like amino acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป นสารต านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสารต้ านการแบ งตัวของเซลล มะเร็ง (antiproliferative) (Yuan and Walsh, 2006) มีรายงานว าสารสกัด ของ สาหร่ายสีแดง *Porphyra* sp. (Ismail and Hong, 2002) และ *Gracilaria edulis* (Devi et al., 2008) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีคุณสมบัติตานอนุมูลอิสระ งานวิจัยของ อรพรรณ และคณะ (2552) รายงานว่าคุณค่าทางอาหาร ของสาหร่าย มีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ า คาร โบไฮเดรต และเยื่อใย (fiber) รอยละ 6.66, 0.11, 23.97, 64.41 และ 4.84 ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการสกัดสาหร ายดวยน้ำรอน 100°C และ 80% เอทานอลที่เวลาการสกัดต างๆ แลววิเคราะห ปริมาณฟนอลิกดวยวิธี Folin-Ciocalteu พบวาการสกัด สาหร่ายดวยน้ำเปนเวลา 60 นาที มีปริมาณฟ นอลิกสูงที่สุดเท่ ากับ 46.49 มิลลิกรัม /100 กรัม แต เมื่อ นำไป วัดประสิทธิภาพในการต านอนุมูล อิสระ ด วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity method พบว่าสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำมีคาการยับยั้งนอยกวาสาหร่ายที่สกัดดวยเอทานอล โดยสารสกัด สาหร่าย ที่สกัดดวยเอทานอลเปนเวลา 36 ชั่วโมง มีคุณสมบัติตานอนุมูลอิสระ DPPH เทากับ 58.70 มิลลิกรัม/100 กรัม แสดงใหเห็นว่า *G. fisheri* เป็นแหลงของสารอาหารและสารตนอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดีเนื่องจากสาหรายมีสารฟนอลิกปริมาณมาก

สำหรับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่ใช้สาหร่ายผมนางเป็นวัตถุดิบในการผลิตก็คืออุตสาหกรรมการผลิตวุ้น สามารถนำสาหร่ายผมนางไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตวุ้น (agar) (วิทยา, 2521) วุ้นที่ได้จากสาหร่ายกลุ่มนี้มีความสำคัญทางด้านการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ด้วยคือ ใช้ใน การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจะใช้สาหร่ายผมนางเป็นอาหารให้แก่เป๋าฮื้อโ ดยปริมาณโปรตีนของ *G. saliconia* มี 16.02% และ *G. fisheri* มี 14.38% ส่วนปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะพบใน *G. fisheri* สูง (เสาวภา, 2541) ในแต่ละปีไทยส่งสาหร่ายผมน าง ตากแห้งไปขายต่างประเทศ แล้วนำเข้าเป็นรูปวุ้นผงเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศปีหนึ่งนับร้อยล้านบาท เนื่องจากสาหร่ายในประเทศยังไม่เพียงพอที่จะทำการสกัดวุ้นในรูปอุตสาหกรรม (สุวัฒน์และสอรัฐ , 2541) คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายผมนางประกอบด้วย โปรตีน 11.38% ไขมัน 0.28% เถ้า 13.24% คาร์โบไฮเดรต 75.00% (เอกสารคู่มือการเลี้ยงหอยทะเลเศรษฐกิจ กรมประมง , 2543 อ้างโดยวราภรณ์, 2547) มีการศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) จากสาหร่ายสีแดงพบว่าสามารถแสดงฤทธิ์

ต้านจุลินทรีย์ต่างๆ ต้านไวรัส ต้านมะเร็งได้ (จงกลนี, 2550) และสำหรับสาหร่ายสีแดง *Plocamium telfairiae* สามารถผลิตสาร halogenated cyclic monoterpenes ที่มีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าแมลง ควบคุมตัวอ่อนของยุงได้ (Watanabe et al., 1990

5. กรรมวิธีในการผลิตน้ำหมักชีวภาพ

การผลิตน้ำหมักชีวภาพเป็นเทคโนโลยีที่ผสมผสานระหว่างภูมิ ปัญญาพื้นบ้านและความรู้ความเข้าใจทางวิทยาศาสตร์ การศึกษาวิจัยน้ำหมักชีวภาพ ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาวิจัยผลของการใช้ในทางเกษตรและสิ่งแวดล้อมแต่ในปัจจุบันได้นำเอาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการดื่มกันอย่างแพร่หลาย เพื่อการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพ ประกอบกับแนวทางในการส่งเสริมโครงการ หนึ่งตำบล หนึ่งผลิตภัณฑ์ ทำให้มีการผลิตและพัฒนาการนำน้ำหมักชีวภาพไปใช้ในด้านต่างๆ อย่างแพร่หลายมากยิ่งขึ้น แต่พบว่ายังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เพียงพอที่จะให้คำตอบ เพื่อยืนยันในแง่ของความปลอดภัยต่อการบริโภค แม้ปัจจุบันมี มาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) แต่ยังขาดข้อมูลสนับสนุนการผลิตให้ได้มาตรฐานต่อการบริโภคอีกด้วย นอกเหนือจากการควบคุมกระบวนการและขั้นตอนการผลิตแล้ว การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบตลอดจนผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการผลิตและในขั้นตอนสุดท้ายก็มีความสำคัญ ไม่ต่างกัน โดยมีตัวแปรในการผลิต ได้แก่ วัตถุดิบ อุปกรณ์ สูตรที่ใช้ในการหมัก ระยะเวลาของการหมัก ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพ การเลือกใช้วัตถุดิบ สูตรในการหมัก ระยะเวลา อุปกรณ์ ตัวแปรเหล่านี้จะมีผลต่อชนิดและปริมาณสารที่เกิดขึ้ นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่นจุลินทรีย์ แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ สารอื่นๆ เช่น วิตามิน แร่ธาตุ สารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและรา เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา)

มีการศึกษาวิจัยเพื่อหาคำตอบเกี่ยวกับน้ำหมักชีวภาพพอสมควรเช่น Kantachote และ Charernjiratrakul (2008b) ศึกษารูปแบบการหมักน้ำหมักชีวภาพโดยใช้วัตถุดิบ 2 ประเภท คือ ลูกยอป่า และสาหร่ายผมนางแต่ละถังมีพืชที่ใช้ 6 กิโลกรัม น้ำตาลแร่ธรรมชาติ 2 กิโลกรัม และน้ำประปา 20 ลิตร ใช้การปิดทับพื้นที่ว่างด้วยถุงพลาสติกอัดน้ำ เมื่อครบ 90 วัน ไม่พบฝ้าหรือฟิล์มยีสต์ที่ผิวหน้าน้ำหมัก ปริมาณกรด สูง เมทานอลต่ำ มาก การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง มี สีเหลืองใส ดูน่าดื่ม กลิ่นหอม รสหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นของสาหร่ายอยู่บ้าง ส่วนลูกยอป่าสีออกแดง ขณะที่ Prachyakij และคณะ (2008) ศึกษาการทำน้ำหมักโด ยเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ สาหร่ายผมนาง น้ำตาล ทราย น้ำ อัตราส่วน 3: 1: 10 (w/w/v) บรรจุในถังหมักพลาสติก ขนาด 15 ลิตร เติมหรือไม่เติม กล้าเชื้อตามชุดการทดลองที่ออกแบบ ไว้ 4 ชุดคือชุดที่ 1 หมักแบบ

ธรรมชาติไม่ใส่กล้าเชื้อเป็นชุดควบคุ ม ชุดที่ 2 ใส่ *L. plantarum* DW3 เป็นกล้าเชื้อ ชุดที่ 3 ใช้ 0.5% Potassium metabisulfite (KMS) ชุดที่ 4 ใช้ 0.5% Potassium metabisulfite (KMS) และใส่กล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 5% ปิดทับพื้นที่ว่างด้วยถุงพลาสติกอัดน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 ^{o}C เป็นเวลา 60 วัน พบว่าชุดที่ 2 ใช้ *L. plantarum* DW3 เป็นกล้าเชื้อและไม่ใส่ 0.5% KMS ได้น้ำหมักชีวภาพมีคุณภาพดีที่สุดทั้งในด้านการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและลดการปนเปื้อนของยีสต์และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ในน้ำหมักชีวภาพมีสารชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนที่ได้จากกระบวนการ เมแทบอลิซึม ของจุลินทรีย์ต่างๆ อีกส่วนหนึ่งเป็นสารสำคัญที่ได้มาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก เช่น สารแอนติออกซิ แดนซ์ (Antioxidant) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) กำจัดการก่อตัวของอนุมูลอิสระ งานวิจัยขอ ง Saengow และคณะ (2007) ศึกษาชนิดและปริมาณน้ำตาลต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรีย แลกติก และยีสต์รา ในน้ำหมักลูกสมอไทยโดย ใช้เชื้อ *L. plantarum* SK 15 หมักที่อุณหภูมิ 37±1 ^{o}C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าชนิดและปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการลดลงของปริมาณ จุลินทรี ย์ทั้งหมด แ ละปริมาณแบคทีเรียแล กติก การใช้น้ำตาลทรายขาว 10% โดยน้ำหนัก มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (4.87×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร) และแบคทีเรียแล กติก (5.05×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร) สูงสุด ต่อมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 ^{o}C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เหลือปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (5.13×10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร) และแบคทีเรียแล กติก (5.59×10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร) ทั้งนี้การลดลงของปริมาณจุลินทรีย์อาจเกิดจากในน้ำลูกสมอไทยมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นอาจมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำลูกสมอไทยเนื่องจากสมอไทยมีสรรพคุณทางยา ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักลูกสมอไทยหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการใช้น้ำตาลทรายแดง 10% โดยน้ำหนัก มีคะแนนความชอบด้านสี กลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวมสูงสุด

6. ความหมายของอนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม เป็นคู่ เมื่อมีอิเล็กตรอนไม่เป นคู่จึงทำให โมเลกุลนั้นไม เสถียร จึงพยายามจับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงให มีอิเล็กตรอนครบคู่ เพื่อความเสถียร เมื่อโมเลกุลที่อยู่ข างเคียงถูกดึงอิเล็กตรอนออกไป ต้องไปจับเอาอิเล็กตรอนจากอะต อมหรือโมเลกุลข างเคียงตัวอื่นต อๆไปเป นอยางนี้ต่อเนื่องไปเป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ โดยไมมีที่สิ้นสุดเพื่อใหตัวอะตอมหรือโมเลกุลมีความเสถียร และถ าหากอิเล็กตรอนที่ ไม มีคู่ 2 ตัวจับคู่ กันพอดี จะเปลี่ ยนเป นมีโมเลกุลที่ เสถียรเช น hydrogen radical ($H^{\bullet}$) hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$) เปนตน (Halliwell, 1991) ดูรายละเอียดตาราง 1-2

อนุมูลอิสระที่ พบจริงและเกิดขึ้ นในรางกายมนุษย เปนสิ่งที่ไมสามารถมอ งเห็นด้วยตาเปล่า (พนิดา, 2548) แตเกิดไดทั้งภายในและภายนอกร างกาย สามารถพบได มากที่ระบบเนื้อเยื่อใตผิวหนัง ทำใหเกิดอาการผิวแหงเสีย ขาดความยืดหยุ่น เกิดฝา ตกกระ หรืออาจมีอาการข้อเสื่อมไดถาอนมูลอิสระเข้าไปทำลายที่ไขขอกระดูก ดังนั้นอาจกลาวไดวา อนุมูลอิสระมีผลมากในทางทำให เกิดสภาวะเสื่ อม ทำใหระดับเซลล เสียหายได หลายรูปแบบ เช น อาจชวยกระตุ้นใหสารก อมะเร็งมีฤทธิ์ เพิ่มมากขึ้ น เนื่ องจากเกิดการเสื่ อมสภาพของเนื้ อเยื่อ ตลอดจนอาจทำลายโครงสร างทางเคมีของ ดี เอ็นเอ หรือ โครโมโซม อนุมูลอิสระสร างความเสียหายต อชีวโมเลกุลมาก โดยเฉพาะการออกซิไดซไขมันซึ่งเป็นสวนประกอบหลักของเยื่ อหุ้มเซลล ทำใหเยื่อหุ้มเซลล เสียสภาพ เป นเหตุใหเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวและมีความยืดหยุ่ นนอยลง อีกทั้งยังเขาจู่โจมทำให เกิดการแตกหัก และโปรตีนรวมตัวเป็ นก้อน ทำให เอนไซม เสื่อมสภาพ ฮอรโมนทำงานไม ปกติ นอกจากนี้ ถาอนุมูลอิสระเข าจับกับดีเอ็ นเอทำให เกิดการกลายพั นธุ์ (mutation) และการแบ่งเซลลผิดปกติ (Gladys, 1999) เป็นสาเหตุของโรคหัวใจ โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคความจำเสื่อม โรคมะเร็ง ตอกระจก และภาวะความเสื่ อมชราของเซลล์ (aging) (Culter, 1991)

อนุมูลอิสระอาจถูกจำแนก เป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. อนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide) เกิดขึ้นเมื่อไมโทคอนเดรียในเซลล์นำออกซิเจนออกมาใช้เป็นพลังงาน

2. อนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคชนิดหนึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระคุ ณสมบั ติทางเคมี ของไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ จัดว่ามีความไม่ เสถี ยรเป็ นอย่ างมาก จึงปล่อยอิเล็กตรอนออกมา ทำให้มีพิษรุนแรง

3. ซิงเกลด ออกซิเจน (singlet oxygen) เป็นอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรุนแรง หากร่ างกายได้ รับรังสีเอกซ์ รังสีอุลตร้าไวโอเลต ภายในร่ างกายก็ จะเกิ ดซิงเกลด ออก ซิเจนจำ นวนมากเป็ นอนุ มูลอิ สระ ซึ่ งก่อให้ เกิดโรคต่ างๆ เช่ น มะเร็ งผิวหนัง และเป็ น อันตรายต่อผิวหนัง

4. อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^{-}) มีฤทธิ์ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันรุนแรง กล่าวคือ ถ้ามีอนุมูลอิสระ ไฮดรอกซิลอยู่ในร่างกายเพียงชนิดเดียวก็ทำให้บุคคลคนนั้น มีโอกาสเสียชีวิต ถึง 50% เป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้ร่างกายแก่เร็ว เกิดโรคมะเร็ง และโรคในผู้สูงอายุเป็นต้น

6.1 ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป นแบบปฏิกิริยาลูกโซ แบงเปน 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็ นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว าขั้นตอนอินนิทิเอชัน (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป นอนุมูลอิสระตัวอื่นต อๆ กันไป เรียกว าขั้นพรอพาเกชั น (propagation step) และขั้นสุดท ายเรียกว า ขั้นเทอร มิเนชัน (termination step) เปนขั้นหยุดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ เป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูล อิสระ 2 อนุมูล ไดเปนสารที่มีความเสถียร (Hudson, 1990)

รางกายสิ่งมีชีวิตไดรับอนุมูลอิสระจากแหลงสำคัญ 2 แหลง ดังนี้

1. แหล งภายในร างกาย มาจากปฏิกิริยา เคมีต างๆหรือ ผลจากกระบวนการ เมแทบอลิซึมของรางกายเองที่เกิดขึ้นตลอดเวลา (Maxwell, 1995) ไดแกกระบวนการยอยสลาย อาหารโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ การกำจัดเชื้อแบคทีเรียโดยเซล ลเม็ดเลือดขาว และกระบวนการ ลิปิดเปอรออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) เปนตน

2. แหลงภายนอกรางกาย มาจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษตกคางประเภท ยาฆ่าแมลงยากำจัดวัชพืช อาหารที่ ใชสารกันบูด สารแต งสี แตงกลิ่น สารเพิ่มความกรอบ การ ปรุงอาหารด้ วยการทอดในน้ำ มันเดือดๆ อาหารที่ ปิ้งยางจนเกรียมจัด อาหารที่ รมควัน ตลอดจนการฉายรังสีหรือเคมีบำบัด การหายใจเอาควันพิษจากท อไอเสียรถ ยนต หมอกควัน เขมาจากโรงงาน และควันบุหรี่ เปนตน (Borek, 1997)

ตารางที่ 1-2 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (โอภา และคณะ, 2549)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวของ
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion ($O_2^{-\bullet}$)	H_2O_2, Ozone (O_3)
Hydroxyl ($HO^{\bullet}$)	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$)	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxyl ($RO_2^{\bullet}$)	Singlet oxygen (O_{21} g)
Alkoxyl ($RO^{\bullet}$)	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{-\bullet}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Carbon dioxide ($CO_2^{-\bullet}$)	Peroynitrous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide ($NO^{\bullet}$)	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide ($NO_2^{\bullet}$), ($NO_2^{-\bullet}$)	Nitrosyl cation (NO^+), Nitroxyl anion (NO^-) Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
	Dinitrogen trioxide (N_2O_3)
	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
	Peroynitrous acid (ONOOH)
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine ($Cl^{\bullet}$)	Hypochlorous acid (HOCl)
	Chloramines
	Chlorine gas (Cl_2)
Other	
Thioyl radical ($RS^{\bullet}$)	

6.2 สารตานอนุมูลอิสระ

สารตานอนุมูลอิสระ หรือที่เรียกวา สารแอนติออกซิแดนท (Antioxidants) หรือสารตานออกซิเดชัน จัดเปนสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ (สมหมาย, 2551; Strain and Benzie, 1999) ซึ่งสามารถแบงกลไกการยับยั้งของสารตานอนุมูลอิสระไดเปน 3 ชนิด ดังนี้

1. ทำการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant)

2. ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (scavenging antioxidant)

3. ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (chain breaking antioxidant)

ในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระอยู่ปริมาณหนึ่ง ซึ่งสารตานออกซิเดชัน ตามธรรมชาติ ในร่างกายมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตท (Superoxide dismutase) (SOD) พบในเม็ดเลือดแดง เอนไซม์คะตะเลส (catalase) พบในไซโตซอลของเซลล์ (Michiels et al, 1994) และสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ เช่น โคเอนไซม์คิวเทน (coenzyme Q10) (Beyer, 1992) ซึ่งสารตานออกซิ-เดชันเหล่านี้มีปริมาณจำกัด เมื่อร่างกายมีอนุมูลอิสระมากขึ้นจะเกิดการขาดความสมดุลระหว่างสารตานออกซิเดชันและอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นถ้ามนุษย์ไม่มีการบริโภคสารที่มีลักษณะช่วยในการตานออกซิเดชัน ก็จะก่อให้เกิดความเสื่อมถอยของเซลล์ในร่างกายและในที่สุดทั้งสุขภาพของร่างกายก็เสื่อมไปด้วย ดังนั้นมนุษย์เราจึงควรหาแหล่งอาหารหรือ สิ่งที่ช่วยเพิ่มเสริมให้มีสารตานออกซิเดชันสูงขึ้น เช่น

1. วิตามิน ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน (Sies and Stahl, 1995)

2. เกลือแร่ได้แก่ ทองแดงและสังกะสี เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตท และซีลีเนียมเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) (Michiels et al., 1994)

3. สารตานออกซิเดชันอื่นๆ ได้แก่ โคเอนไซม์เอนไซม์คิวเทน (Beyer, 1992) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น สารสกัดจากเปลือกสน (Jayaprakasha and Sakariah, 2001) กรดแอลฟา-ไลโปอิก (Scott et al., 1994) และสารประกอบฟีนอลิก (Velioglu et al., 1998) ซึ่งเป็นสารประกอบที่หาได้จากการเมแทบอไลท์ ในพืชทั่วไป ประกอบด้วยสารประกอบสำคัญได้แก่ โปรแอนโทไซยานิดินส์ (proanthocyanidins) อนุพันธ์ของกรดแกลลิก (gallic acids) และอนุพันธ์ของกรดเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิกส์ (hexahydroxydiphenic acid) สารประกอบฟีนอลิก

(phenolic compound) โดยสารประกอบฟี นอลิกที่สำคัญคือ ฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย catechin, proanthocyanins, anthocyanidins, flavone, flavonols และ glycosides ของสารเหล่านี้ (Baskin and Salem, 1997)

ในพืชที่มีความสามารถในการเป็นสารตานออกซิเดชันมักจะมีสารประกอบหลัก คือ สารฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาวานอยด์ กรดฟีนอลิก และ แอนโธไซยานินซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้น และเปลือกของพืช กลไกใน การตานออกซิเดชัน ของสารประกอบฟี นอลิกจะอยู่ในรูปของการกำจัดอนุมูลอิสระ การให้ไฮโดรเจนอะตอมและการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ สารตานออกซิเดชัน มีคุณประโยชน์ อย่างมากต่ อระบบที่ สำคัญต่าง ๆ ในร่างกาย ได้ แก่ ระบบหลอดเลือดและหัวใจ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบกลุ่มเซลล์ประสาทที่ ทำงานเฉพาะในสมอง การต่อต้านการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ และการชะลอความชรา ระบบต่างๆ เหล่านี้เกี่ยวของโดยตรงกับสุขภาพร่างกายของเรา ตัวอย่างเช่น โรคหัวใจที่เกิดจากการอุดตันของเส้นเลือดที่อาจเกิดขึ้นอย่างฉับพลัน ซึ่งบางทีอาจจะเกิดจากการสะสมสารต่ างๆ ที่บริเวณหลอดเลือดทำให้ผนังหลอดเลือดถูกทำลาย ในกรณี โรคอื่นๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ความเสียหายที่เกิดขึ้นไม่สามารถตรวจสอบได้ อย่างแน่ชัดว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเมื่อใด ความเสียหายเกิดขึ้นกับเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

6.3 วิธีการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 8 วิธี ไดแก

6.3.1 วิธี Scavenging activity of ABTS radical (Re et al., 1999)

วิธีนี้เปนวิธีวัดทางอ อมโดยใชสาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำใหเปนอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซด้วยโพแทสเซียมเปอร ซัลเฟต ให กลายเปน $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเปนอนุมูลที่มีสีฟา-เขียว มี λ_{max} ที่ 660, 734 และ 820 นาโนเมตร แตจะนิยมวัดคาการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยปรับค าการดูดกลืนแสงเริ่มต น $ABTS^{+\bullet}$ ใหเปน 0.700±0.02 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมตานออกซิเดชัน จะทำให $ABTS^{+\bullet}$ ลดลง ซึ่งทำใหสีจางลง (ดูสมการ) และสามารถนำไปคำนวณเปน % inhibition

$$ABTS^{+\bullet} \xrightarrow{\text{+ antioxidant}} ABTS$$

λ_{max} 734 nm   colourless

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{734\ control} - A_{734\ test\ sample})/A_{734\ control}] \times 100$$

ผลการวิเคราะห จะคำนวณเป นคาที่สัมพันธ กับสารต านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อวา Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ขอดีของวิธีนี้ คือ ทำได ง่าย อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ จะทำปฏิกิริยาอย างรวดเร็วกับสารต านออกซิเดชัน อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ละลายได ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย จึงทำให ศึกษาได ทั้งในสารที่ละลาย ในน้ำหรือละลายในไขมัน สวนข้อเสียของวิธีนี้ คือ $ABTS^{+\bullet}$ ไมเปนสารตามธรรมชาติที่ก อให เกิดอนุมูลในเซลลหรือ ร่างกาย

6.3.2 วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (Hou et al., 2001)

อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ เปนอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีมวง อยูในรูปอนุมูลอยู แล้วโดยไมต องทำปฏิกิริยาเพื่อให เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ การวิเคราะห เปนการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช เครื่องวัดค าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารตานออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร DPPH radical ใช ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย าง (scavenging activity) สารละลายของ $DPPH^{\bullet}$ มีสีมวงในเอทานอล และเมื่อได รับ H^{+} จะเปลี่ยนเป นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois, 1958)

$$DPPH^{\bullet} + RH \xrightarrow{\text{ตัวอยางทดสอบ}} DPPH\text{-}H + R^{\bullet}$$

(สีมวง) (สีเหลือง)

คาที่วัดได จะแสดงความสามารถในการสารต านออกซิเดชันออกมาในค า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517control} - A_{517 \text{ test sample}})/ A_{517 \text{ control}})] \times 100$$

ข อดีของวิธีนี้คือ ทำได ง าย นิยมใช เป นวิธีเบื้องต นในการทดสอบฤทธิ์ ตานอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ขอเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไมไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือ นอนุมูลที่เกิ ดในเซลลหรือรางกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได

6.3.3 วิธี Hydroxyl (OH^-) radical scavenging activity (Ohkawa et al., 1979)

Hydroxyl radical ($OH^•$) เปนอนุมูลอิสระที่ว องไว สามารถจู โจมชีวโมเลกุลที่สำคัญในรางกาย โดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ อยางตอเนื่อง (Spencer et al., 1994) สิ่งมีชีวิตสามารถสราง $OH^•$ radical โดย 2 กลไก ไดแก

ปฏิกิริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร ออกไซด (H$_2$O$_2$) แมวาเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได $OH^•$ แตในรางกายนั้น เปนไปไดวาเกิดจากเหล็ก Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได $OH^•$ โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว า Fenton reaction ดังสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OH^• + OH^- \quad \text{(Fenton reaction)}$$

การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ

$$H_2O + hv \longrightarrow H_2O^{+•} + e^-$$

$$H_2O^{+•} + H_2O \longrightarrow OH^• + H_3O^+$$

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $OH^•$ radical ของสารตัวอยาง ตองทำการสังเคราะห Hydroxyl radical ($OH^•$) จากน้ำตาล deoxyribose โดยปฏิกิริยา Fenton reaction model system เมื่อเติมสาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid จะเกิดเป็นสีชมพู เมื่อเติมสารที่ต องการทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง $OH^•$ radical ลงไปจะทำให สีชมพูของสารละลายจางลง โดย สามารถตรวจสอบไ ดจากการวัดค าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Mathew and Abraham, 2006) จากนั้นนำไปคำนวณเป น % inhibition ไดตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532 \text{ control}} - A_{532 \text{ test sample}})/A_{532 \text{ control}}] \times 100$$

6.3.4 วิธี Lipid peroxidation in liver homogenates (Halliwell et al., 1987)

เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ ของกรดไขมันชนิดไม อิ่มตัวอนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูล สามารถทำให เกิดลิป ดเปอร ออกไซด เป นจำนวนหลายร อยโมเลกุลก อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจาก ปฏิกิริยา Lipid peroxidation สามารถเกิดได งายกับเยื่ อหุ มเซลล ที่ประกอบด้วยลิปด 2 ชั้น การเกิดลิป ดออกซิเดชันกับลิป ดในเยื่อหุ มเซลล ทำให เยื่อหุ มเซลลมี

คุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ยังส่งผลกระทบตอเอนไซมและรีเซพเตอรที่ฝงตัวอยูในเยื่อหุมเซลลทำให เอนไซม และรีเซพเตอร มีการทำงานที่เสียไป เปนสาเหตุให้เกิดโรคตางๆ ไดอีกดวย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก Lipid peroxidation ไดแก สารไฮโดรคารบอน เชน อีเทน อีทีน และเพนเทน รวมถึง สารคีโตน และสารอัลดีไฮด เปนตน ซึ่งสารอัลดีไฮด ที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดิไฮด (Malondialdehyde, MDA) Lipid peroxidation เปนปฏิกิริยาลูกโซ ประกอบดวย 3 ขั้นตอน ไดแก ปฏิกิริยาเริ่มตนของการเกิดโซปฏิกิริยา การทวีเพิ่มขึ้นและการสิ้นสุดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาลูกโซเริ่มตนดวยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นและอนุมูลอิสระนี้เขาทำปฏิกิริยากับลิปดและทำใหเกิดอนุมูลลิปด ($L^{\bullet}$ หรือ $R^{\bullet}$) (โอภา และคณะ, 2549) วิธีนี้เปนการวิเคราะหความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ของสารสกัดทดสอบ โดยใชตับหนูมาทำให เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแลวทำใหเกิดผลผลิตจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation ไดเปนสารมาลอนไดอัลดี-ไฮด (Malondialdehyde, MDA) จากนั้นเติมกรดไทโอบารบิทูริกในสภาวะกรด สาร MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบารบิทูริก ไดเปนสารมีสีเรียกวา TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) เมื่อเติมสารสกัดทดสอบที่มีความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ลงไปจะทำใหสารสีจางลง จากการวัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (โอภา และคณะ, 2549) ขอดีของวิธีการนี้ คือ ทำการศึกษางาย สะดวก ไมต้องใชเครื่องมือที่มีราคาสูง แตมีขอเสีย คือ ตองใชสิ่งมีชีวิตในการทำการทดลอง ทำให ลดความนิยมลง เมื่อได คาการดูดกลืนแสงแลวนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532\ control} - A_{532\ test\ sample})/A_{532\ control}] \times 100$$

6.3.5 วิธี Metal chelating activity (Dinis et al., 1994)

การวัดความสามารถในการแยงจับกับโลหะเปนวิธีหนึ่งที่นิยมใช ในการหาความสามารถใน การตานออกซิเดชันของสารที่ตองการทดสอบ เพราะโลหะไอออนเปนตัวการสำคัญในการเรงปฏิกิริยาทำให เกิดสารอนุมูลอิสระตางๆมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยูในรูปเฟอรรัส หรือ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเปนสารอนุมูล Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) ซึ่งเปนอนุมูลอิสระตัวเริ่มตนที่ทำใหเกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ต่อไป ดังนั้นวิธีการวัดความสามารถในการ แยงจับโลหะ Fe^{2+} ของสารที่ตองการทดสอบนั้น อาศัยจากการวัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร ที่มีคาลดลง โดยเมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ Fe^{2+} แลวอยูในรูป Ferrozine - Fe^{2+} complex ซึ่งจะให สีแดง และถาสารที่ตองการทดสอบมีความสามารถในการแยงจับกับ Fe^{2+} จะอยูในรูป Antioxidant - Fe^{2+} complex แลวจะทำให สีแดงของ Ferrozine - Fe^{2+} complex จางลงได เมื่อไดคาการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{562\ control} - A_{562\ test\ sample})/A_{562\ control}] \times 100$$

6.3.6 วิธี Superoxide radical scavenging (Nikishimi et al., 1972)

Superoxide anion radical ($O_2^{+\bullet}$) เปนอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดขึ้นในเซลล ของสิ่งมีชีวิตและเป็ นตัวเริ่มต นที่ทำให เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ อีกมากมายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ นอกจากจะทำใหอนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแลว ฤทธิ์และความแรงของอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ เป็นอันตรายสูงขึ้นดวย แตตัวของ $O_2^{+\bullet}$ จะมีความว องไวนอยกวา $OH^{\bullet}$ ซึ่งการเกิด $O_2^{+\bullet}$ เป็นดังสมการ

$$O_2 + e^{\bullet} \longrightarrow O_2^{+\bullet}$$

$$O_2^{+\bullet} + O_2^{+\bullet} + 2H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

เมื่อ $O_2^{+\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำใหเกิด $OH^{\bullet}$ เรียกปฏิกิริยานี้ว า Haber-Weiss reaction (Kappus, 1992) ดังสมการ

$$O_2^{+\bullet} + H_2O_2 + H^{+} \longrightarrow OH^{\bullet} + O_2 + H_2O$$

การศึกษาสมบัติการเปนสารจับ $O_2^{+\bullet}$ ของสารตัวอยาง ซึ่ง $O_2^{+\bullet}$ จะผลิตมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารในระบบ Phenazine methosulphate (PMS) - Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) อนุมูล $O_2^{+\bullet}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร Nitroblue tetrazolium (NBT) ปฏิกิริยาระหวาง $O_2^{+\bullet}$ กับสาร NBT ใหผลิตภัณฑเปนสาร Diformazan (DF) ที่มีสีน้ำเงิน และสามารถวัดคาการดูดกลืนแสงไดที่ 560 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณเปน % inhibition ไดตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560\ control} - A_{560\ test\ sample})/A_{560\ control}] \times 100$$

6.3.7 วิธี Reducing power (Oyaizu, 1986)

ความสามารถของการเปนตัวใหอิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน- รีดักชันของสารที่ตองการทดสอบสามารถใชในการหาความสามารถในการต านออกซิเดชันได วิธีนี้เปนการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ หรือให อิเล็กตรอนของสารตัวอย างที่ต องการทดสอบแก สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต องการทดสอบจะเป นตัวให อิเล็กตรอนแกอนุมูลอิสระแล ว ทำให เปลี่ยนเป นสารที่คงตัว อีกทั้ง ยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ ของอนุมูลอิสระอีกดวย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยารีดักชันของ $Fe^{3+}(CN^{-})_6$ ไปเปน $Fe^{2+}(CN^{-})_6$ ซึ่งจะทำ

ให้มีสีน้ำเงินที่เข้มขึ้น สามารถตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึง ความสามารถในการรีดิวซที่มากขึ้น (NBT) ซึ่งมีสีเหลือง

6.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับรีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu และ Na_2CO_3 (Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos, 1999) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยาดังสมการ

$$\text{Phenolic compound} + [P_2W_{18}O_{62}^{7-} + H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}] \longrightarrow \text{Blue complex}$$

(Yellow)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นสารเชิงซ้อนมีสีฟ้า วัดที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกซึ่งเป็นสารมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก

Jumjai และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) Xia & Abbott จากอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของ *G. fisheri* (Aq.G) มีความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion และ hydroxyl radical รายงานในรูป gallic acid equivalents (GAE) มีค่าเท่ากับ 0.01±0.001 และ TEAC มีค่าเท่ากับ 1.45±0.394 ตามลำดับ สารสกัดด้วยน้ำของ *G. fisheri* สามารถยับยั้ง lipid peroxidation รายงานในรูป TEAC มีค่าเท่ากับ 0.46±0.006 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า *G. fisheri* มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้พบสารฟีนอลิกซึ่งรายงานในรูป GAE มีค่าเท่ากับ 0.28±0.005 กรัม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *G. fisheri* สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ มีรายงานของ Sreenivasan และคณะ (2007) รายงานว่าสารสกัดของสาหร่าย *G. changii* มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$ และพบสารฟีนอลิก Ganesan และคณะ (2008) สกัด *G. edulis* ด้วยเมทานอล พบว่า มีความสามารถในการยับยั้ง reducing power และมีสารฟีนอลิก Yakovleva (2008) พบว่าสาหร่าย *G. vermiculophylla* สามารถสร้าง ascorbate, superoxide dismutase, glutathione และ catalase Nishimiki และคณะ (1972) รายงานว่า สารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *G. fisheri* มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH$^{\bullet}$

สำหรับในการตรวจสอบคุ ณสมบัติฤทธิ์ต้านออกซิ เดชันน้ำหมักของ ไชยวัฒน์ และคณะ (2547) ศึกษาวิ จัยประเมิ นฤทธิ์ต้านออกซิ เดชันของน้ำ หมักชีวภาพ จำ นวน 28 ตัวอย่างจาก 24 แหล่งผลิตในเขต 8 จังหวัดพบว่าน้ำหมักชีวภาพมีความสามารถในการต าน ออกซิเดชันแตกต่างกัน โดยวัดเป็นค่าปริมาณวิตามินซี วิตามินอี ในน้ำหมักชีวภาพ ผลจากการศึกษาวิจัยสามารถแบ่งผลิตภัณฑ์ตามความสามารถในการต านออกซิเดชันได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการต้ านออกซิเดชั นน้อย ส่วนใหญ่ เป็นผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ มีส่วนผสมของลู กยอเป็ นหลั ก กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการต าน ออกซิเดชันปานกลาง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพสูตรผสม มีส่วนผสมของพืช หลายชนิ ดด้วยกันเช่น กระชายดำ ลูกยอมะขามป้ อม ผลไม้ ต่างๆ กลุ่ มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการต านออกซิเดชัน สูง เป็ นผลิ ตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ มีส่วนผสมของ มะขามป้ อม สมอไทย สมอพิ เภก และสมอเทศ เป็ นส่วนผสมหลั ก น้ำ หมักชีวภาพที่ มีความสามารถในการต านออกซิเดชันแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความแตกต่ างของวัตถุดิบที่ใช้กระบวนการผลิต และสภาพการรักษาที่แตกต่างกัน จึงทำให้น้ำหมักชีวภาพ มีความสามารถในการตานออกซิเดชันต่างกัน

ไชยวัฒน์และคณะ (2550) ศึกษาวิจัยทดสอบประสิทธิภาพน้ำหมักชีวภาพจากพืช 14 ชนิดโดยใช้อัตราส่วนของพืช 3 ส่วน น้ำผึ้ง 1 ส่วนและน้ำ 10 ส่วน หมักอย่างน้อย 3 เดือน จากนั้นก รองและตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ตรวจสอบสี ค่า พีเอช ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดอินทรีย์ รวมทั้งทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและหาปริมาณสารต้าน ออกซิเดชัน ผลการทดสอบพบว่า น้ำหมักชีวภาพมี ความสามารถในการต าน ออกซิเดชันแตกต่างกันออกไปเนื่องจากความแตกต่ างของวัตถุดิบที่ใช้ เช่น น้ำหมักชีวภาพจากใบชาอัสสัม ลูกหว้า กระชายดำ ใบหมี่ และมะคำดีควาย สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 12.25-25% ตามแต่ชนิดของพืช นอกจากนี้ น้ำหมักชีวภาพจากมังคุด ใบชาอัสสัม และลูกหว้า ให้ปริมาณ วิตามิ นอีสูง ขณะที่น้ำ หมักจากใบฝรั่ง กระชายดำ มะคำดีควายและส้มป่อย มีสารต้านออกซิเดชันระดับกลาง

สาร์ทจีน (2549) วิเคราะห์ความสามารถในการต านออกซิเดชันของตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพโดยวิธี Reducing power on ferric assay และคำนวณค่าเป็น Ferric reducing power (FRAP value) พบว่าสูตรน้ำหมักชีวภาพที่ใช้อัตราส่วนของพืช 3 ส่วน: น้ำตาลแดง 1 ส่วน: น้ำ 10 ส่วน มีความสามารถ ต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอนกับ Fe^{3+} ให้อยู่ในรูป Fe^{2+} สูงที่สุด ศึกษาน้ำหมักชีวภาพจากลูกยออัตราส่วนของพืช 3 ส่วนต่อน้ำผึ้ง 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วนและกล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp. 10% โดยวิธี ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorizing assay โดยเปรียบเทียบกับ

สารมาตรฐาน vitamin C, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) และ Quercetin พบว่าน้ำหมักชีวภาพมี ความสามารถในการต านออกซิเดชัน สูงสุดในวันที่ 15 ของกระบวนการหมัก และวิธี Chelating effect on ferrous พบว่าน้ำหมักชีวภาพมีค่า Chelating power สูงสุดในวันที่ 15 ของกระบวนการหมักอาจเนื่องมาจากปริมาณกรดแลกติกที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบสูตรต่างๆ ตามวัตถุดิบและกระบวนการผลิตพบว่าน้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการฟอกจางสีจะมีความสามารถในการตานออกซิเดชัน (โดยวิธี ABTS และ FRAP Assay) สูงกว่าสูตรที่ใช้น้ำผึ้งเนื่องจากในน้ำตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการฟอกจางสีจะมีสารประกอบพวกโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารตานออกซิเดชัน

สมหมาย (2551) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำหมั กชีวภาพจากมะหลอด โดยใช้อัตราส่วนของมะหลอด 3 ส่วน น้ำผึ้ง 1 ส่วนและน้ำ 10 ส่วน ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟี นอลิก ในระหว่างกระบวนการหมักตั้งแต่ระยะเวลา 0, 30, 60 และ 90 วัน ผลจากการทดลองพบว่า ผลมะหลอดสุกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ย 23.86 มิลลิกรัม /กรัม และเมื่ อผลมะหลอดถู กแปรรู ปเป็ นน้ำ หมักชี วภาพ พบว่ า ปริ มาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมบางสูตรมีปริมาณสูงขึ้นกว่าผลสุก แต่บางสูตรก็มีปริมาณลดลงกว่าผลสุก การทดลองแสดงว่ าในระหว่างกระบวนการหมั กปริมาณสารประกอบฟี นอลิกในน้ำหมักชีวภาพมี การเปลี่ ยนแปลงตลอดเวลายั งไม่ คงที่ ทั้งนี้อาจเป็ นผลจากการที่ มีกิจกรรมของจุลินทรีย์หรือมีปริ มาณจุ ลินทรี ย์แตกต่ างกัน แต่ เมื่อหมักครบ 90 วัน ปริ มาณสารประกอบฟีนอลิกรวมก็จะค่อนข้างลดลงกว่าตอนเป็นผลสุกในทุกสูตร ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ พารามิเตอร์นี้ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก และเมื่อครบกำหนดระยะเวลาหมั ก 90 วัน ระบบในน้ำ หมักชีวภาพมี การเกิ ดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารประกอบฟี นอลิ กในผลมะหลอด ดั งนี้ปริมาณสารประกอบฟี นอลิ กที่มีค่ามากที่ สุดอยู่ในช่วง 0 ถึง 60 วัน เมื่อระยะการหมักครบ 90 วัน ค่าจะมีแนวโน้มลดน้อยลง พรพิมล และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟ นอลิกรวมและ ความสามารถในการต านออกซิเดชันของผลมะหลอดและน้ำ หมักจากผลมะหลอด ผลจากการทดลองพบว าผลมะหลอดสดมีปริ มาณสารประกอบฟ นอลิกรวมเฉ ลี่ย 22.91±1.60 มิลลิกรัม /กรัม และมี ความสามารถในการต าน ออกซิเดชันเฉลี่ย 34.77±5.89% เมื่อผลมะหลอดถูกแปรรูปเป นน้ำ หมัก พบว าปริมาณสารประ กอบฟ นอลิกโดยรวมทุกสูตรลดลง มีค่าในช วง 0.45-10.17 มิลลิกรัม /กรัม และค า ความสามารถในการตานออกซิเดชันมีคาสูงขึ้นโดยมีค่าอยูในชวง 33.90-80.27%

ชิดชม และคณะ (2539) วิเคราะห์หา ความสามารถในการต านออกซิเดชันของของน้ำหมักลูกยอโดย ศึกษาวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าน้ำหมักลูกยอที่หมักในถังหมักอุณหภูมิ 30°C มีความสามารถในการต านออกซิเดชันสูงกว่าหมักในถังหมักที่สัมผัส

แดดถึง 2 เท่า โดยมีค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่จับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) เท่ากับ 1.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นอกจากนี้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันในน้ำ หมักสาหร่ายอาจเกิดจากกล้าเชื้อที่เติมลงไปหรือเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิ บ จากการศึกษาของ Lin และ Yen (1999) พบว่าแบคทีเรียแลกติก 19 สายพันธุ์มีความสามารถใ นการต้านออกซิเดชัน คือ *L. acidophilus, L. bulgaricus, Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium longum* ทุกสายพันธุ์แสดง ความสามารถในการต านออกซิเดชัน มีอัตราการยับยั้งการ autoxidation ascorbate ในช่วง 7-12% (lipid peroxidation เช่น ascorbate autoxidation (Mishra and Korachich, 1984; Rashid et al., 1993) ความสามารถในการตานออกซิเดชันที่แสดงออกได้แก่ ความสามารถใน การรวมตัวกับโลหะ, การกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน, การยับยั้งเอนไซม์ *S. thermophilus* 821 มีความสามารถในการรวมตัวกับโลหะ Fe^{2+} และ *B. longum* 15 708 มีความสามารถในการรวมตัวกับโลหะ Cu^{2+} ขณะที่ *L. acidophilus* E มีความสามารถในการยับยั้ง hydroxyl radical สูงสุดและ *B. longum* B6 มีความสามารถในการยับยั้ง hydrogen peroxide ดีที่สุดและปริมาณ reducing activity มากที่สุด

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA) เพื่อเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง
2. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต γ-aminobutyric acid (GABA) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
3. ศึกษา กระบวน การหมักน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง โดยใช้ กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA)

ขอบเขตการวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA) จากผลิตภัณฑ์อาหา รหมัก และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต กาบา เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนางและดูปริมาณกาบาที่มีในน้ำหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA) และมีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อน้ำหมักชีวภาพจากพืช
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต γ-aminobutyric acid (GABA) ของเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาใช้กับการหมักเป็นการเพิ่มคุณค่าของน้ำหมักชีวภาพที่มีกาบา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)	บริษัทผู้ผลิต
Baird-Parker Medium	Merck
Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)	Merck
Bismuth Sulfite Agar (BS)	Merck
Cooked Meat Medium	Difco
de Man Rogasa Sharp Agar (MRS agar)	Merck
de Man Rogasa Sharp Broth (MRS broth)	Merck
Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	Merck
Escherichia coli Broth (EC Broth)	Merck
Fluid Thioglycollate Medium	Difco
Lactose Broth	Difco
Perfringens Agar	Difco
Phenol Red Broth Base	Difco
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck

2. สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol (C_2H_5OH)	Merck
Acetonitrile (CH_3CN)	Merck
Amygdalin	Fluka
D(-)Arabinose	Himedia
L-ascobic acid (Vitamin C)	Sigma
Bromocresol purple	LABCHEM
n-butanol	Merck
D(+)Cellobiose	Fluka
Citric acid ($C_6H_8O_7$)	Merck

Ethanol (C_2H_5OH)	Merck
Esculin	Fluka
Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	Merck
Folin–Ciocalteau reagent	Merck
D-Fructose	UNIVAR
Galactose	Fluka
Gallic acid	Sigma
Glacial acetic acid (CH_3OOH)	Merck
D-Glucose	UNIVAR
Gamma aminobutyric acid (GABA)	Merck
Hydrochloric acid (HCl)	LABSCAN
Hydrogen peroxide (35% H_2O_2)	Merck
Lactose	UNIVAR
Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$ $.7H_2O$)	UNIVAR
D-Maltose	LABCHEM
Mannitol	UNIVAR
Methanol (CH_3OH)	Merck
Ninhydrin	Merck
Peptone	Difco
Phenolphthalein	BDH
Phenol	Merck
Phenylisothiocyanate (PITC)	Merck
Potassium persulfate	UNIVAR
($K_2S_2O_8$, dipotassium peroxodisulphate)	
Raffinose	Difco
L(+)Rhamnose	Himedia
D(-)Ribose	Himedia
Sodium acetate (NaHAc)	Merck
Sodium bicarbonate (Na_2CO_3)	Merck
Sodium chloride (NaCl)	LABSCAN
Sodium hydroxide (NaOH)	LABSCAN
Sodium L-glutamate monohydrate ($C_5H_8NNaO_4.H_2O$)	Merck
D-Sorbitol	BD

Sucrose	UNIVAR
Sulfuric acid	Merck
Tetrahydrated manganese sulfate ($MnSO_4$ $.4H_2O$)	BDH
Thichloro acetic acid (TCA)	Merck
Thiobarturic acid (TBA)	Eastman
TLC plate silica gel plate (60 F_{254}, 0.25 มิลลิเมตร)	Merck
Trehalose	Fluka
Triethylamine (TEA)	Merck
Tris (hydroxymethyl) methylamine	Fisher ChemAlert® Guide
Trolox	Sigma
2,2´-azinobiz(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	Sigma
2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma
2,4,6-collidine	Merck

3. เครื่องมือและอุปกรณ์	ยี่ห้อ
ตู้บ่มเชื้อแบคทีเรีย (Incubator)	Gallenkamp
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)	Microflow
ตู้อบไอร้อน (hot air oven)	Venticell
หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	Tomy
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Harrier 18/80, Refrigerated
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Sorvall Rc 50
เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)	
เครื่องชั่ง (balance)	Metller Toledo
Vortex mixer	Scientifc
Micropipette	Eppendorf Research
Water bath	Julabo, Eco Temp Tw 20
เครื่องวัด Electrical conductivity (EC)	Metller Toledo
เครื่องวัดพีเอช	Metller Toledo
กล้องจุลทรรศน์	Olympus
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Agilent 1100 series, HP
Gas chromatography (GC)	HP6850 seriesII, HP
Filter paper	Whatman No.1

Cellulose acetate filter (0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร)	Sartorius
Freeze dryer	N.Y.12484, STS system
API 50 CHL kit	BioMrieux

4. ตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมักที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อ แบคทีเรีย แลกติก จำนวน 58 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาร้า, แหนม, กุ้งส้ม, หนาง (เนื้อวัว), บูดู, ปลาแป้งแดง, ไส้กรอกเปรี้ยว, โยเกิร์ต-นมเปรี้ยว, ปลาส้ม, ปลาส้มฟัก, ผักกาดดอง, ข้าวหมาก, สะตอดอง, ขนมจีน, หน่อไม้ดอง, กระเทียมดอง, ผักเสี้ยนดอง, กะหล่ำปลีดอง, แตงกวาดอง ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

5. เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย แลกติกของ รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติและคณะ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 22 ไอโซเลท แยก จากน้ำหมักชีวภาพจากพืช (รหัสเชื้อคือ DW) และเชื้อจาก culture collection ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research: TISTR) ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบได้แก่ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก มีทั้งอาหารหมักจากสัตว์และพืช ได้แก่ ปลาร้า, แหนม, กุ้งส้ม, หนาง (เนื้อวัว), บูดู, ปลาแป้งแดง, ไส้กรอกเปรี้ยว, โยเกิร์ต, นมเปรี้ยว, ปลาส้ม, ปลาส้มฟัก, ผักกาดดอง, ข้าวหมาก, สะตอดอง, ขนมจีน, หน่อไม้ดอง, กระเทียมดอง, ผักเสี้ยนดอง, กะหล่ำปลีดอง, แตงกวาดอง จำนวน 58 ตัวอย่าง ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 50 กรัม เจือจางใน normal saline dilution 0.85% (0.85% NaCl) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่อง stomacher ใช้ความเร็วรอบปานกลาง เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางส่วนผสมจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้ นมาทำการ pour plate หรือ streak บนอาหาร de Man Rogosa and Sharp (MRS) agar ที่เติม 0.04% bromocresol purple บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนอาหารที่เป็นของเหลว นำมา streak บนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.04% bromocresol purple โดยตรง เลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบ ๆ โคโลนี คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหาร MRS agar และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงและตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย นำมาย้อมสีแกรม (Gram stain) เพื่อตรวจดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ (Murray et al., 1994) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกติดสีแกรมบวก แล้วจึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลกติก โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติก catalase test จะให้ผลลบ (Alexsson, 1993) เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้โดยแทงลงไปในอาหาร MRS agar และเก็บในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์ และเก็บเชื้อไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญได้ดี

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติก อายุ 24 ชั่วโมง 1 loopful จากหลอดอาหาร MRS agar ลงในหลอดอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ

แบคทีเรียแลกติก 1% จากหลอดอาหาร MRS broth ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เชื้อละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญ โดยมีค่า $OD_{660\ nm}$ > 1.0 เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป

2.2 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติก อายุ 24 ชั่วโมง 1 loopful จากหลอดอาหาร MRS agar ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก 1% จากหลอดอาหาร MRS broth ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสม 2% monosodium glutamate (MSG) (Cho et al., 2007) และลงในอาหาร Glucose-Yeast extract-Peptone (GYP) ที่ผสม 2% MSG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Hiraga et al., 2008) (ดูรายละเอียดภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์หากาบาโดยใช้วิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) (Choi et al., 2006) (ดูรายละเอียดภาคผนวก ข) โดยพิจารณาจากค่า R_f ที่ได้เทียบกับค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานกาบาความเข้มข้น 0.1 M และ MSG ความเข้มข้น 0.1 M

คำนวณหาค่า R_f จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ solute เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่}}$$

2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้ดี

วิเคราะห์ปริมาณของกาบา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกาบาที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน นำส่วนใส (supernatant) ของตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) มาละลายด้วยสารละลายของ ethanol: water: triethylamine (อัตราส่วน 4: 4: 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสารละลายของ ethanol: water: triethylamine: phenylisothiocyanate (PITC) (อัตราส่วน 6: 1: 1: 1) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ต้องการด้วยเอทานอล

นำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (0.2   m nylon membrane filter) ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series) โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS C_{18} ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร อัตราการไหล (Flow rate) ที่ใช้คือ แบบเส้นตรง (linear gradient) 0-100% อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยสารละลาย B คือ 60% acetonitrile เป็นเวลา 50 นาที อุณหภูมิ 46°C เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือ สารละลาย A ประกอบด้วย 1.4 mM sodium acetate (NaHAc), 0.1% triethylamine (TEA), และ 6% acetonitrile (CH_3CN) (พีเอช 6.1) ปรับพีเอชด้วย acetic acid เข้มข้น สารละลาย B คือ 60% acetonitrile (60% acetonitrile: 40% water) เครื่องตรวจวัด (Detector) ที่ใช้คือ UV detector (VWD) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Cho et al., 2007) เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบามากที่สุด (ดูรายละเอียดภาคผนวก ข)

3. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการคัดเลือก

การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติก โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้ดีที่สุด 10 ไอโซเลท ซึ่งคัดเลือกจากข้อ 2.3 มาเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกในระดับ ชนิด (species) ด้วยการทดสอบดังนี้

3.1 การเทียบเคียงแบบดั้งเดิม

โดยอาศัยลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์ รูปร่างจากการย้อมสีแกรมและลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี ตามวิธีของ Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986)

3.1.1 การตรวจสอบความสามารถใ นการสร้างก๊าซจากการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red borth base) ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 1% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรด โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือ งให้ผลบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบและดูการสร้างก๊าซ ในหลอดดักก๊าซ ถ้ามีก๊าซจัดเป็น heterofermentative lactic acid bacteria ถ้าไม่มีก๊าซหรือมีก๊าซเล็กน้อย จัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยถ่ายเ ชื้อแบคทีเรียแลกติก อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้

น้ำตาล (phenol red broth base) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลความเข้มข้น 1% จำนวน 16 ชนิด ได้แก่ Amygdalin, Arabinose, Cellobiose, Esculin, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannitol, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Sorbitol, Sucrose และ Trehalose บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ 0.04% bromocresol purple ในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า (Commercial test kit)

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ Identification kit (Lactobacillus API 50 CHL 50300 บริษัท Bio Merieux Co., France) ซึ่งประกอบด้วย API 50 CHL เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CHL strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของแบคทีเรียแลกติก ทำการทดสอบได้โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหาร MRS Agar ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยปรับความขุ่นมากกว่า 2 McFarland ในอาหาร API 50 CHL จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ 120 ไมโครลิตร ลงใน API 50 CHL strip โดยพยายามไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°C อ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ช่องแรกคือ control (control คืออาหาร basal medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน) ส่วนผลบวกเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลและผลิตกรดออกมามีผลทำให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง สังเกตการเปลี่ยนสี ของอินดิเคเตอร์ในอาหารจากม่วงเป็นสีเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 คือ Esculin ถ้าเชื้อสามารถย่อย Esculin ได้จะเปลี่ยนเป็นสีดำ นำผลที่ได้มาเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V.5.0

3.3 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ 16S rRNA gene

ลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบาได้มากที่สุด (1 ไอโซเลท) ส่งตรวจที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการสกัดโครโมโซมจากแบคทีเรียแลกติก โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2% ลงในอาหารเหลว MRS หลอดใหม่ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอด microtube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 2-5 นาที ทำการเก็บตะกอนซ้ำประมาณ 2-3 รอบ เติม TE Buffer (10 mM Tris-HCl พีเอช 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปต้ม 10 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป้าหมาย (PCR product) ด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction, PCR) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' และ 5' ของยีน 16S rRNA ด้วยเครื่อง Thermalcycler PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียแลกติกที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของเอ็นไซม์ พีเอช 8.8 (1X) (10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_2$, 0.1% Triton X-100) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.0 mM, ดีเอ็นเอแม่แบบ 2-5 ไมโครลิตร, นิวคลีโอไทด์ (dNTP) 0.4 μM, ไพรเมอร์ชนิดละ 0.4 μM ไพรเมอร์ที่ใช้คือ 27F 5’- AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG-3’ และ 1389R 5’- ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3’, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Biolab) 1 ยูนิต ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermalcycler PCR และใช้โปรแกรมในการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอดังนี้ ในปฏิกิริยาเริ่มต้นใช้อุณหภูมิช่วง Denaturation 94°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ โดยใน 1 รอบใช้อุณหภูมิช่วง Denaturation 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Primer annealing ใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง Primer extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาครบจำนวน 35 รอบแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

PCR condition

94’C	3	min	
94’C	30	sec	35 cycle
55’C	30	sec	35 cycle
72’C	2	min	35 cycle
72’C	5	min	

Primer สำหรับ sequencing คือ 520F 5’- CAG C(A/C)G CCG CGG TAA T(A/T)C-3’ จากนั้นอ่านลำดับเบสของ DNA โดยนำ product ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing นำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเตอร์เน็ต เพื่อหาชนิดของเชื้อที่มีลำดับเบสของ DNA (ในที่นี้คือส่วนยีน 16S rRNA) โดยเข้าไปที่เวปไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

4. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต γ-aminobutyric acid (GABA)

4.1 การหาช่วงการเจริญที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกาบา

เลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 1% (v/v) ในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG (ดัดแปลงจาก Cho et al., 2007) เก็บตัวอย่างทุกๆ 5 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดค่าพีเอช แล้ววิเคราะห์หาปริมาณกาบาเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วง early log phase, middle log phase, late log phase และ stationary phase เพื่อดูว่าเชื้อผลิตกาบาออกมามากที่สุดช่วงใด โดยใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.3

4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบา โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)

4.2.1 การออกแบบการทดลอง

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาของแบคทีเรียแล กติกโดยปัจจัย (ตัวแปร) ที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณน้ำตาลซูโครส ปริมาณของ MSG และค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมัก เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย โดย การวางแผนใช้ RSM และกำหนดจุดทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยศึกษาปัจจัยละ 3 ระดับ (ตารางที่ 2-1) จากจำนวนปัจจัยและระดับที่ทำการศึกษานำไปกำหนดชุดการทดลองดังตารางที่ 2-2 และสำหรับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เลือกใช้ สูงสุดเพียง 12% ซึ่งเหมาะสมสำหรับน้ำหมัก ชีวภาพเพื่อดื่มไม่หวานเกินไป และเป็นปริมาณน้ำตาลที่สูงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ดวงพรและคณะ, 2547) และปริมาณ MSG ที่เลือกใช้สูงสุดเพียง 2% เพราะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค และค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 5-7 เพราะเป็นช่วงที่แบคทีเรียแลกติกเจริญได้ดี (Salminen and Wright, 1993) และเหมาะสมสำหรับสร้าง กาบา โดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 1% (v/v) เลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครสแทนกลูโคส MSG และปรับค่าพีเอชดังที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยไม่มีการเขย่า ทุกๆ 5 ชั่วโมงวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดค่า พีเอช จนเชื้อมีการเจริญลดลง เป็นเวลา 25 ชั่วโมง (ระยะ stationary phase จากข้อ 4.1) และวัดปริมาณกาบาที่มีการปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เครื่อง HPLC ตามช่วงเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4.1

ตารางที่ 2-1 ตัวแปรและระดับ ความเข้มข้นของตัวแปรสำหรับการออกแบบการทดล องเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

Variable name	Coded	Levels		
		-1	0	+1
Sucrose (W/V)	X_1	6	9	12
MSG (W/V)	X_2	0	1	2
pH	X_3	5	6	7

ตารางที่ 2-2 จำนวนการทดลองทั้งหมดที่ได้จากการวางแผนแบบ Central Composite Design เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

Run number	Code values			Real values		
	Sucrose X_1	MSG X_2	pH X_3	Sucrose (W/V)	MSG (W/V)	pH
1	-1	-1	-1	6.00	0.00	5.00
2	1	-1	-1	12.00	0.00	5.00
3	-1	1	-1	6.00	2.00	5.00
4	1	1	-1	12.00	2.00	5.00
5	-1	-1	1	6.00	0.00	7.00
6	1	-1	1	12.00	0.00	7.00
7	-1	1	1	6.00	2.00	7.00
8	1	1	1	12.00	2.00	7.00
9	-1	0	0	6.00	1.00	6.00
10	1	0	0	12.00	1.00	6.00
11	0	-1	0	9.00	0.00	6.00
12	0	1	0	9.00	2.00	6.00
13	0	0	-1	9.00	1.00	5.00
14	0	0	1	9.00	1.00	7.00
15	0	0	0	9.00	1.00	6.00
16	0	0	0	9.00	1.00	6.00
17	0	0	0	9.00	1.00	6.00
18	0	0	0	9.00	1.00	6.00
19	0	0	0	9.00	1.00	6.00
20	0	0	0	9.00	1.00	6.00

4.2.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของข้อมูลใช้สมการควอ ดราติกเพื่อหาความเหมาะสมของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งสามารถเสนอแบบจำลองการตอบสนองของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังตารางที่ 2-2 และการวิเคราะห์ปริมาณกาบาดังสมการที่ 1

$$\acute{Y} = \beta_0+\beta_1 X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2+\beta_{33}X_3^2+\beta_{12}X_1 X_2+\beta_{13}X_1 X_3+\beta_{23}X_2 X_3 \quad (1)$$

$\acute{Y}$ คือผลตอบสนองที่ทำนายด้วยสมการ (1) ขณะที่ X_1 X_2 และ X_3 คือตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง ส่วน β_0 คือค่าคงที่ของสมการ ขณะที่ β_1 β_2 และ β_3 คือสัมประสิทธิ์ของปัจจัยเดียว ส่วน β_{11} β_{22} และβ_{33} คือผลของปัจจัยที่เพิ่มเป็นสองเท่า และ β_{12} β_{13} และ β_{23} คือผลร่วมของสองปัจจัย การวิ เคราะห์ค่าทางสถิติแสดงโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) การหาสภาวะที่เหมาะสมของสมการควอดราติกโดยใช้โปรแกรม Design Expert (Version 6.0.2) (Stat-Ease Corporation, USA) สำหรับศึกษาความเหมาะสมของสมการหลายตัวแปร เพื่อใช้คำนวณผลหาสัดส่วน ที่เหมาะสมของปริมาณน้ำตาลซูโครส ปริมาณ MSG และค่าพีเอชเริ่มต้นในการผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

4.2.3 การยืนยันผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CCD

จากผลการทดลองโดยใช้ CCD จากค่าทำนาย (Predicted value) พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมคือ 6% ปริมาณของ MSG คือ 2% พีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 5 (ปริมาณกาบา 24.71 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ค่าจริง (Actual value) ที่ดีที่สุดคือปริมาณน้ำตาลซูโครส 6% ปริมาณของ MSG คือ 1% และพีเอชเริ่มต้นในการ หมักคือพีเอช 6 (ปริมาณกาบา 25.04 มิลลิกรัม/ลิตร) เมื่อวิเคราะห์จาก Contour Plot เพื่อนำสภาวะที่เหมาะสมไป ทวนสอบหรือยืนยันผลการทดลอง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ (Solution) คือ ปริมาณน้ำตาลซูโครส 6% ปริมาณของ MSG 1% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 5.73 ดังนั้นชุดการทดลองประกอบด้วย

- ปริมาณน้ำตาลซูโครส 6%
- ปริมาณของ MSG 1%
- พีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 5.73

5. กระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ได้ศึกษามาก่ อนสำหรับ การปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อในน้ำหมัก สาหร่ายผมนาง โดยเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* DW12 ความเข้มข้น 2% ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ระยะ late log phase จากข้อ 4.1) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ไปล้างด้วย 0.85% NaCl จำนวน 2 ครั้ง เติมเซลล์เปียกของ *L. plantarum* DW12 1.75 กรัม ลงในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง 500 มิลลิลิตร มีปริมาณกล้าเชื้อเท่ากับ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร (ยืนยันปริมาณกล้าเชื้อโดยวิธีการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.1×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร) ใช้เป็นกล้าเชื้อ และใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 5% ในการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

5.2 การทำน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

พืชที่นำมาใช้ในการหมักคือสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) น้ำตาลทรายแร่ธรรมชาติ และน้ำที่ใช้เป็นน้ำประปา ใช้ถังพล าสติกและก๊อกน้ำ ทำด้วยพลาสติก เกรดเอที่ใช้กับอาหาร ถังมีความจุ 15 ลิตร ทำการทดลองโดยใช้สาหร่ายผมนางเป็นสาหร่ายแห้ง ชั่งให้ได้น้ำหนัก 375 กรัม (ค่าที่คำนวณได้ คือ 371.10 กรัม จึงชั่ง 375 กรัม) สำหรับน้ำ 10 ลิตร และน้ำตาลทราย 1 กิโลกรัม (ได้ศึกษามาก่อนสำหรับการดูดน้ำของสาหร่ายแห้ง พบว่า สาหร่ายแห้ง 2.62 กรัม ดูดน้ำได้เต็มที่หรืออิ่มตัวภายใน 60 นาที ได้น้ำหนักเปียก 21.18 กรัม (8 เท่า) โดยปล่อยไว้นานกว่านี้ก็ไม่ดูดน้ำเพิ่ม) ใช้ไม้พายที่สะอาดกวนให้ทั่ว (สูตรดั้งเดิม ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ สาหร่ายผมนาง น้ำตาลทร าย น้ำสะอาดในอัตราส่วน 3: 1: 10 (w/w/v)) ขณะที่สูตรดัดแปลงใช้สารละลายอาหารที่มีความเข้มข้นของ น้ำตาลทราย MSG และปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 4.2.3 ด้วย 0.5 M citric acid และ 0.1 M sodium bicarbonate (Kim et al, 2009) และเติมสาหร่ายปริมาณเท่ากับสูตรดั้งเดิม) ผสมให้เข้ากันบรรจุในถังหมักพลาสติกขนาด 15 ลิตร ปิดทับพื้นที่ว่างด้วยถุงพลาสติก สะอาด อัดน้ำเพื่อไล่อากาศออกพยายามให้ มีอากาศเหลือน้อยที่สุด (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008) บ่มที่อุณหภูมิ 30±2°C เป็นเวลา 60 วัน

5.3 การออกแบบการทดลอง

วางแผนการทดลอง 3 ชุดการทดลอง คือ

ชุดที่ 1 สูตรดั้งเดิม แต่ปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 4.2.3 ไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2 สูตรดั้งเดิม ปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 4.2.3 เติมกล้าเชื้อ 5% (ดั้งเดิม-กล้าเชื้อ)

ชุดที่ 3 สูตรดัดแปลง ปรับปริมาณน้ำตาลซูโครส MSG และปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 4.2.3 เติมกล้าเชื้อ 5% (ดัดแปลง-กล้าเชื้อ)

แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ในระหว่างการหมักติดตามพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา

5.3.1 การเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยใช้ sterile pipette ดูดตัวอย่างน้ำหมักจำนวน 25 มิลลิลิตร ใส่ใน 0.85% NaCl 225 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อ 10 เท่าเป็นลำดับใน 0.85% NaCl 9 มิลลิลิตร นำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count: TBC) และแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) ด้วยวิธี pour plate method โดยใช้อาหาร Plate Count Agar (PCA) และ MRS agar ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจหายีสต์ด้วยวิธี spread plate method บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (BAM, 2002) โดยตรวจวิเคราะห์ ณ วันที่ 0, 1, 2, 4, 7, 14, 21, 30, 45 และ 60

5.3.2 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ (ดวงพร และคณะ, 2548)

การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี- กายภาพ โดย เก็บตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 30, 45 และ 60 เว้นแต่จะระบุไว้เป็นอย่างอื่น

5.3.2.1 ตรวจวัดพีเอช

เก็บตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง จำนวน 150 มิลลิลิตร จากถังหมัก ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter

5.3.2.2 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC)

นำตัวอย่างน้ำหมั กสาหร่ายผมนางที่เก็บจากข้อ 5.3.2.1 ที่ระยะเวลาต่างๆ วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Electrical conductivity meter

5.3.2.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity: TA)

ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง จากตัวอย่างข้อ 5.3.2.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการ ไตเตรตและคำนว ณในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 2002) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข

5.3.2.4 วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar: TS)

ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางจากตัวอย่างข้อ 5.3.2.1 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol sulfuric method (Dubolis et al. 1956) โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

5.3.2.5 การหาปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์

วัดปริมาณ ethanol, lactic acid และ acetic acid ของน้ำหมักอายุหมัก 0, 14, 30, 45 และ 60 วัน และวัดปริมาณ methanol ของน้ำหมักอายุหมัก 0 และ 60 วัน โดยใช้ Gas Chromatography (GC) ใช้ column HP 6850 อุณหภูมิที่ใช้ฉีดตัวอย่างและสารที่จะใช้ตรวจจับ (detector) ที่สภาวะ 240°C ตั้งระบบให้วิเคราะห์ตัวอย่างเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 75°C (1 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 180°C ในอัตรา 5°C ต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิ 230°C (5 นาที) ในอัตรา 15°C ต่อนาที และตรวจวัดด้วย flame ionization detector ตามวิธีของ Yang และ Choong (2001) (ส่งตรวจตัวอย่างที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

5.3.2.6 วิเคราะห์หาปริมาณของธาตุ

ธาตุที่ตรวจวิเคราะห์ในการศึก ษานี้ได้แก่ เหล็ก (Fe), โซเดียม (Na), โพแทสเซียม (K), สังกะสี (Zn), ทองแดง (Cu), สารหนู (As) และตะกั่ว (Pb) โดยใช้ Inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) เก็บตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางวันที่ 0 และ 60 วัน ทำการย่อยโดยใช้ตัวอย่างน้ำหมัก 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Vycor ตั้งบน

hot plate เติมกรดไนตริกเข้มข้น 65% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เปิดไฟอ่อนๆ ในตู้ควันจนของเหลวระเหยหมด ทำจนครบ 3 รอบ ทิ้งให้เย็น นำมาละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้ น 10% แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นปรับให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionized water สารละลายด้วยกรดเจือจางที่มีแร่ธาตุอยู่จะถูกดูดเข้าเครื่อง ICP-AES เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของแร่ธาตุ (ส่งตรวจตัวอย่างที่ ศูนย์เครื่องมือวิ ทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

5.3.2.7 วิเคราะห์หาปริมาณกาบา

นำตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางวันที่ 0, 14, 30, 45 และ 60 ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใส (supernatant) 1 มิลลิลิตร ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry) และวิเคราะห์หาปริมาณกาบา โดยใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 2.3 (ส่ง ตรวจ ตัวอย่าง ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

5.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำหมักชีวภาพ

หาความสามารถ การต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่างน้ำหมัก สาหร่ายผมนาง วันที่ 0, 14, 30, 45 และ 60 โดยใช้วิธีต่างๆ (ไชยวัฒน์, 2550) ดังนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข)

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scarvenging capacity assay (DPPH assay)
- 2,2´-azinobiz(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay
- Lipid peroxidation assay
- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

5.3.4 การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยา

การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยา ตรวจน้ำหมักสาหร่ายผมนางวันที่ 0 และ 60 ตรวจราและยีสต์ด้วยวิธี spread plate method บนอาหาร PDA จุลินทรีย์ที่บ่งชี้สุขลักษณะของน้ำหมักชีวภาพโดยตรวจ หาปริมาณ total coliforms และ *E. coli* โดยใช้วิธี Most Probable Number (MPN) ตรวจปริมาณของ *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* โดยใช้อาหาร Bismuth Sulfite agar (BS), Baird-Parker medium และ Perfringens agar ตามลำดับ และยืนยัน *S. aureus* ด้วย coagulase test (APHA, 1995) โดยเกณฑ์คุณภาพใช้เกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช.481/2547)

5.3.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ที่มีอายุการหมัก 120 วัน มาสังเกตสี ความใสหรือขุ่น ดมกลิ่น และชิมรส ชาติ ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงความน่าดื่มของน้ำหมักชีว ภาพ จัดได้ว่าเป็น multisample difference test และได้ทดสอบ การยอมรับ รวมโดยวิธีให้คะแนน (5-point hedonic scale) (Meilgard et al., 1998 อ้างโดย Prachyakij, 2008) ดูรายละเอียดใน ภาคผนวก ง

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำเสนอข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) และสำหรับการทดสอบ ทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วย Multivariate General Linear Model โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดทดสอบ โดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS version 15 สำหรับ Windows

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก

จากตัวอย่างอาหารหมักทั้งหมดจำนวน 58 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 317 ไอโซเลท จากอาหาร 44 ตัวอย่าง (คิดเป็น 75.86%) (ตารางที่ 3-1) ไม่พบแบคทีเรียแลกติกในปลาร้า และบูดู ตัวอย่างปลา ส้มสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้มากที่สุด 32 ไอโซเลท/ตัวอย่าง รองลงมา คือ ขนมจีน (19 ไอโซเลท/ตัวอย่าง) และแหนม (ประมาณ 11 ไอโซเลท/ตัวอย่าง)

ตารางที่ 3-1 จำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมัก

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท
Plara (ปลาร้า)	2	0	0
Nham (แหนม)	10	10	108
Kung som (กุ้งส้ม)	4	3	20
Nhang (หนางคือเนื้อวัวหมัก)	2	1	5
Budu (บูดู)	4	0	0
Plapangdang (ปลาแป้งแดง)	2	1	5
Isan sausage (ไส้กรอกอีสาน)	1	1	2
Drinking yogurt and yogurt (นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต)	5	5	10
Plasom (ปลาส้ม)	1	1	32
Som fak (ปลาส้มฟัก)	1	1	10
Pukgarddong (ผักกาดดอง)	5	4	20
Khaomak (ข้าวหมาก)	2	1	1
Satawdong (สะตอดอง)	4	4	10
Fermented Khanomjeen (ขนมจีนแป้งหมัก)	3	3	58
Nowmaidong (หน่อไม้ดอง)	3	3	15
Kratiumdong (กระเทียมดอง)	5	2	10
Paksaindong (ผักเสี้ยนดอง)	2	2	5
Cabbage pickle (กะหล่ำปลีดอง)	1	1	3
Cucumber pickle (แตงกวาดอง)	1	1	3
รวม	58	44	317

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิต γ-aminobutyric acid (GABA)

2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญได้ดี

ในการคัดเลือกใช้แบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 340 ไอโซเลท (22 ไอโซเลท จากงานวิจัยของ รศ.ดร. ดวงพร คันธโชติ และคณะ และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047) เมื่อพิจารณาจากความสามารถเจริญได้ดีในอาหาร MRS ได้จัดแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ตามการเจริญ คือ เจริญดีเยี่ยม (++++) เจริญดีมาก (+++) เจริญดี (++) และเจริญพอใช้ (+) รายละเอียดดังตารางที่ 3-2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ กลุ่มเจริญดีเยี่ยม 9% เจริญดีมาก 27% เจริญดี 2% และเจริญพอใช้ 62%

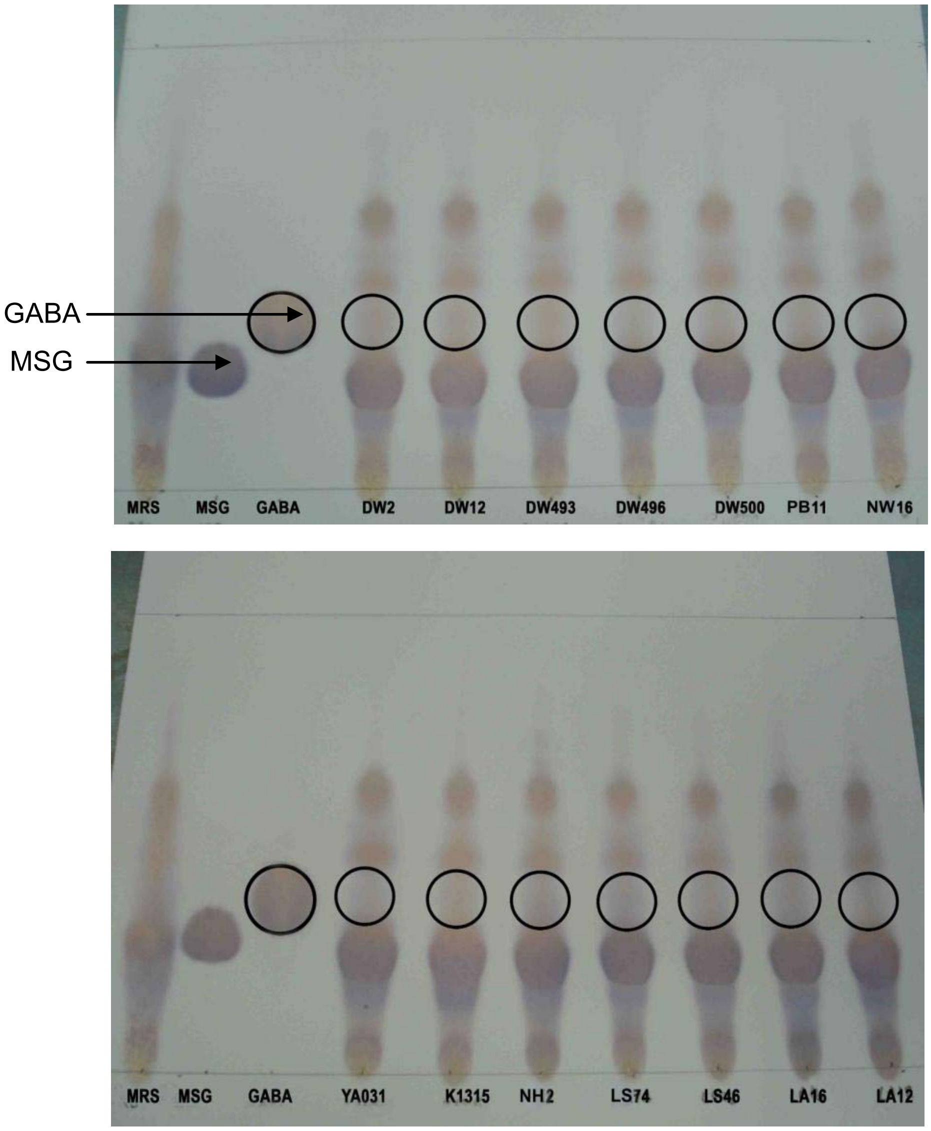
ตารางที่ 3-2 การเจริญของแบคทีเรียแลกติกอายุ 18 ชั่วโมง ที่คัดแยกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ เลี้ยงในอาหาร MRS broth

การเจริญ (OD $_{660}$ นาโนเมตร)	ระดับการเจริญ	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์
> 1.5	++++	31	9.12
> 1.0-1.5	+++	93	27.35
0.5-1.0	++	5	1.47
< 0.5	+	211	62.06
ทั้งหมด		340	100

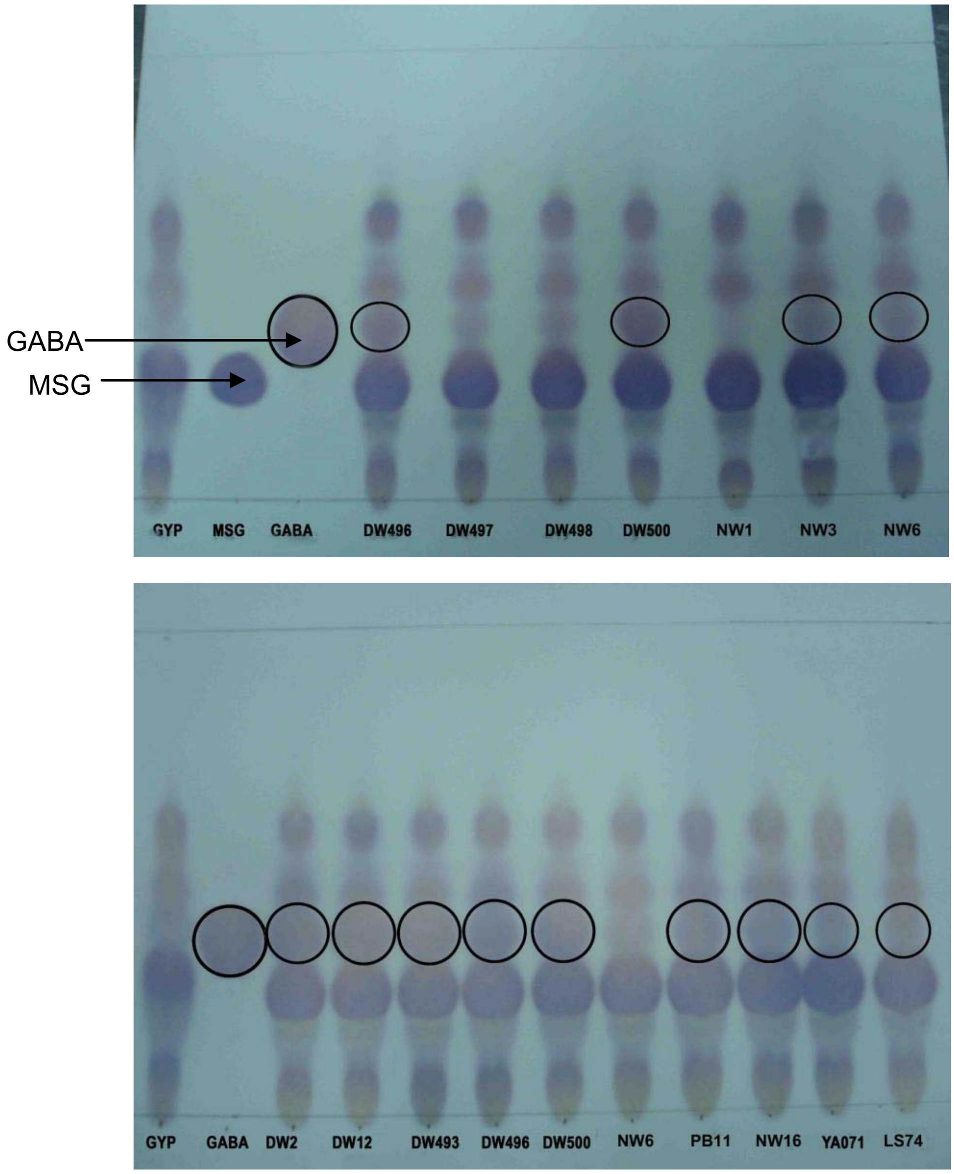
2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบา

จากการคัดเลือกเบื้องต้น นำแบคทีเรียแลกติก 124 ไอโซเลท ที่ผ่านการพิจารณาว่าเป็นกลุ่มเจริญดีเยี่ยมและเจริญดีมาก มาศึกษาหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิ ตกาบาได้ โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก มาวิเคราะห์หากาบาโดยใช้วิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ตามวิธีของ Choi และคณะ (2006) จากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 64 ไอโซเลท (51.61%) ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ผสม 2% MSG สามารถผลิตกาบาได้ อย่างไร ก็ตาม ผลการทดลองและแถบสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS broth (รูปที่ 3-1) จึงต้องยืนยันผลอีกครั้งโดยการเลี้ยง แบคทีเรียแลกติกในอาหาร GYP ที่ผสม 2% MSG (รูปที่ 3-2)

ค่า Retardation factor (R_f) ของ MSG และ GABA คือ 0.26 และ 0.36 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติก ทั้ง 64 ไอโซเลทสามารถผลิตกาบาได้และปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเชื้อที่แยกได้จากกระเทียมดอง และสะตอดอง ทุกไอโซเลทสามารถผลิตกาบาได้และตามด้วยน้ำหมักชีวภาพ รายละเอียดดังตารางที่ 3-3



รูปที่ 3-1 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างกาบา แถบที่: 1, อาหาร MRS; 2, สารละลายมาตรฐาน MSG ความเข้มข้น 0.1 M; 3, สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 0.1 M; 4-10, ไอโซเลทของแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ผสม 2% MSG อายุ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3-2 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างกาบา แถบที่: 1, อาหาร GYP; 2, สารละลายมาตรฐาน MSG ความเข้มข้น 0.1 M; 3, สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 0.1 M; 4-10, ไอโซเลทของแบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในอาหาร GYP broth ที่ผสม 2% MSG อายุ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3-3 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบา (GABA)

อาหารหมัก/Culture collection	จำนวนไอโซเลท	แบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบา (จำนวนไอโซเลทที่พบ)*
น้ำหมักชีวภาพ (Fermented plant beverages)	20	DW2, DW5, DW8, DW10, DW11, DW12, DW13, DW491, DW492, DW493, DW496, DW497, DW498, DW499, DW500 (15)
หน่อไม้ดอง (Nowmaidong)	8	NW3, NW6, NW14, NW15, NW16 (5)
ผักเสี้ยนดอง (Paksaindong)	5	PK7, PK 8 (2)
กะหล่ำปลีดอง (Pickled cabbage)	2	PB11 (1)
แตงกวาดอง (Pickled cucumber)	1	PC13 (1)
ผักกาดดอง (Pukgarddong)	9	LA1, LA2, LA3, LA6, LA12, LA16 (6)
กระเทียมดอง (Kratiumdong)	10	LS4, LS5, LS6, LS10, LS16, LS26, LS32, LS46, LS74, LS14 (10)
สะตอดอง (Satawdong)	4	ST4, ST28, ST32, ST81 (4)
นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต (Drinking yogurt and yogurt)	8	YA011, YA031, YA061, YA071, YA111 (5)
แหนม (Nham)	29	NH2, NH7, NH15, NL6, NL11, NL14 (6)
ปลาส้ม (Plasom)	8	PL15, PL16, PL29 (3)
ขนมจีนแป้งหมัก (Fermented khanom jeen)	17	KN1212, KN1304, KN1315 (3)
กุ้งส้ม (Kungsom)	1	KS7 (1)
หนางคือเนื้อวัวหมัก (Nhang)	1	HN2 (1)
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR)**	1	*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR047 (1)
รวม	124	64

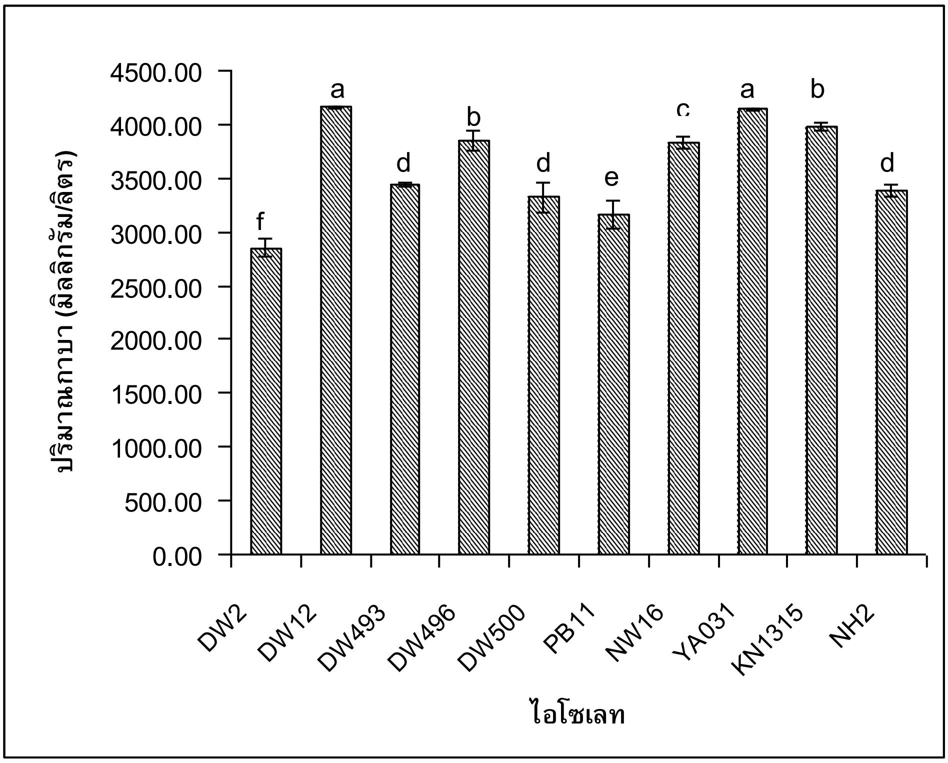
* ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนของไอโซเลทที่สามารถผลิตกาบาได้

** Thailand Institute of Scientific and Technological Research

จากผลการทดลองแสดงว่า แบคทีเรียแลกติกได้ ปลดปล่อย กาบา ออกมา ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการนำไปประยุกต์เป็นกล้าเชื้อของอาหารหมัก จะเพิ่มคุณค่าให้กับอาหารหมัก และจากการสังเกตผลของ TLC พบว่ามี แบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth เพียงจำนวน 10 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง กาบาและแสดงแถบสีได้ชัดเจนได้แก่ DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, NW16, YA031, YA061, NH2, LS74 ขณะที่ในอาหาร GYP มีจำนวน 14 ไอโซเลท สามารถสร้างกาบา และแสดงแถบสี ได้ชัดเจน ได้แก่ DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, PB11, NW16, LA12, LA16, LS46, YA031, NH2, KN1315, LS74

2.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้มาก

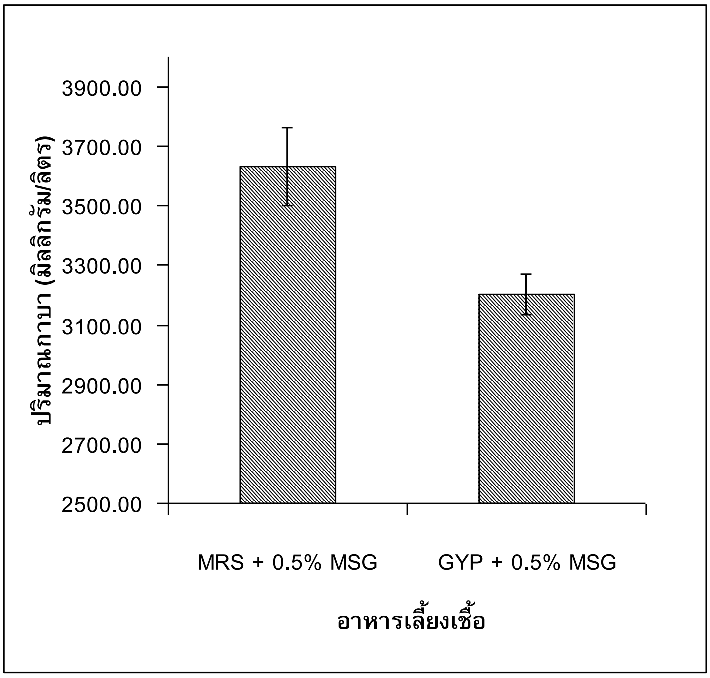
คัดเลือกแบคทีเรียแลกติก อันดับ 1-10 ที่สามารถผลิตกาบาได้ชัดเจนทั้งในอาหาร MRS broth และอาหาร GYP ที่ผสม 0.5% MSG และสามารถเจริญได้ดีเยี่ยมและดีมาก จำนวน 10 ไอโซเลท นำไปเลี้ยงใน อาหาร MRS broth ที่ผสม 0.5% MSG และนำไปวิเคราะห์ปริมาณของกาบา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเปรียบเทียบ กับสารละลายมาตรฐานของกาบา ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (Cho et al., 2007) จากรูปที่ 3-3 พบว่าไอโซเลท DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, PB11, NW16, YA031, KN1315 และ NH2 สามารถผลิตกาบาได้ 2,850.56, 4,156.10, 3,437.48, 3,849.86, 3,323.99, 3,159.96, 3,830.16, 4,143.89, 3,981.30, 3,383.59 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จึงคัดเลือกไอโซเลท DW12 ที่สามารถผลิตกาบาได้มากที่สุด (4,156.10 มิลลิกรัม/ลิตร) และเป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพจากพืชจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อของน้ำหมักชีวภาพ ขณะที่ไอโซเลท YA031 ก็สามารถผลิตกาบาได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P 0.05) เมื่อเทียบกับไอโซเลท DW12 แต่เป็นเชื้อที่แยกจากโยเกิร์ตจึงไม่นำไปศึกษาต่อเพราะอาจไม่เหมาะต่อการเจริญในน้ำหมักชีวภาพจากพืช



รูปที่ 3-3 การผลิตกาบาของแบคทีเรียแลกติก เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตัวเลขที่มี ตัวอักษรแตกต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05))

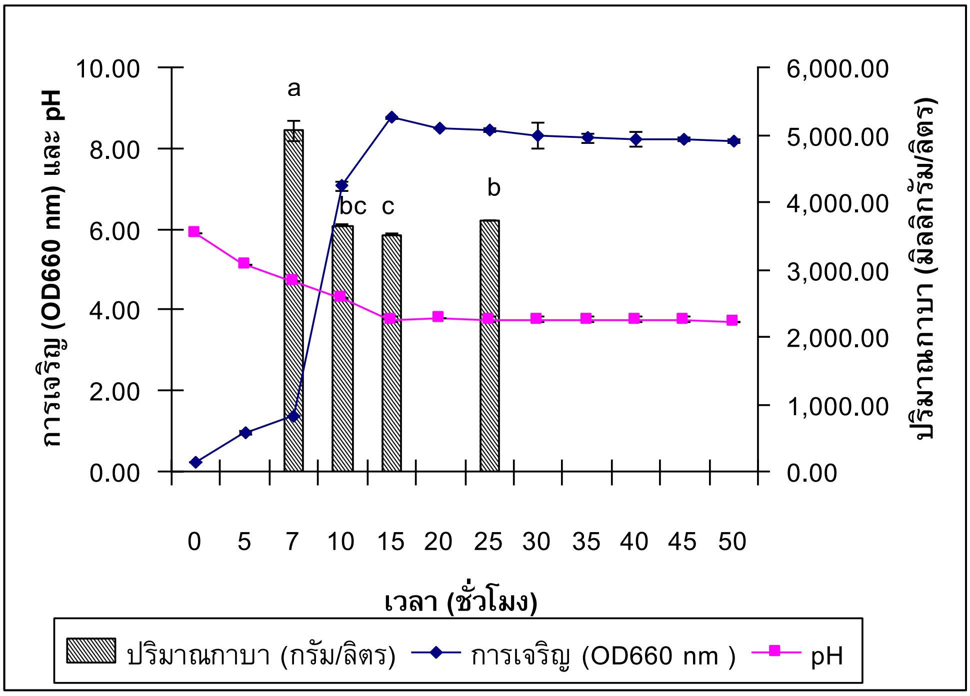
3. การหาสูตรและช่วงเวลาที่ผลิตกาบาได้มากจากเชื้อที่คัดเลือกได้

นำไอโซเลท DW12 มาเลี้ยงในอาหาร MRS และอาหาร GYP ที่ต่างก็เติม 0.5% MSG เพื่อศึกษาว่าไอโซเลท DW12 สามารถผลิตกาบาในอาหารชนิดใดได้มากกว่ากัน จากรูปที่ 3-4 พบว่าไอโซเลท DW12 สามารถผลิตกาบาในอาหาร MRS (3,600.20 มิลลิกรัม/ลิตร) ได้มากกว่าในอาหาร GYP (3,200.42 มิลลิกรัม/ลิตร) ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหาร MRS ที่เติม 0.5% MSG ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 3-4 ปริมาณกาบาที่ผลิตออกมาของแบคทีเรียแลกติก DW12 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และอาหาร GYP ที่ต่างก็เติม 0.5% MSG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำไอโซเลท DW12 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดค่าพีเอช ทุกๆ 5 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณกาบาช่วง early log phase, middle log phase, late log phase และ stationary phase จากรูปที่ 3-5 พบว่าช่วง early log phase คือ ชั่วโมงที่ 7, middle log phase คือ ชั่วโมงที่ 10, late log phase คือ ชั่วโมงที่ 15 และ stationary phase คือ ชั่วโมงที่ 25 และพบว่า ชั่วโมงที่ 7 แบคทีเรียแลกติกไอโซเลท DW 12 สามารถผลิตกาบาได้ 5,060.20 มิลลิกรัม/ลิตร ชั่วโมงที่ 10 สามารถผลิตกาบาได้ 3,653.37 มิลลิกรัม/ลิตร ชั่วโมงที่ 15 สามารถผลิตกาบาได้ 3,519.57 มิลลิกรัม/ลิตร ชั่วโมงที่ 25 สามารถผลิตกาบาได้ 3,725.67 มิลลิกรัม/ลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยง คือพีเอช 5.90 และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตลอดการเลี้ยงโดยมีค่าเริ่มต้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20 จนครบ 50 ชั่วโมงมีค่าพีเอช 3.7



รูปที่ 3-5 การเจริญ ค่าพีเอชและปริมาณกาบาที่ผลิตออกมาของแบคทีเรียแลกติก DW12 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.5% MSG เป็นเวลา 50 ชั่วโมง (ตัวอักษรแตกต่างกันบนกราฟแท่งหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05))

4. ผลการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการคัดเลือก

4.1 การเทียบเคียงแบบวิธีการแบบดั้งเดิมและการใช้ชุดทดสอบทางการค้า

นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบาได้ดี 10 ไอโซเลทคือ DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, PB11, NW16, YA031, KN1315 และ NH2 มาเทียบเคียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี (ตารางที่ 3-4) พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผล ลบ และเมื่อ บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) พบว่า 8 ไอโซเลท คือ DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, PB11, NW16 และ KN1315 สอดคล้องกับ *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลท NH2 สอดคล้องกับ *Lactobacillus fermentum* และอีก 1 ไอโซเลท คือ YA031 สอดคล้องกับ *Lactobacillus acidophilus* จากนั้นนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ *Lactobacillus* API50 CHL เพื่อยืนยันผลการเทียบเคียงเชื้อ แต่การทดสอบนี้ไม่ได้ทดสอบกับเชื้อ ไอโซเลท YA031 (*L. acidophilus*) เพราะเป็นเชื้อที่ทราบแล้วเพราะแยกจากโยเกิร์ต และได้เทียบเคียงเบื้องต้นดังกล่าวมาแล้ว

และสำหรับผลการทดลองโดยใช้ชุดทดสอบ แสดงในตารางที่ 3-5 จากผลการทดลองพบว่า 8 ไอโซเลทคือ DW2, DW12, DW493, DW496, DW500, PB11, NW16, KN1315 เป็น *Lactobacillus plantarum*1 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) เท่ากับ 99.9, 99.9, 99.4, 68.0, 99.9, 99.9, 99.9 และ 99.9% ตามลำดับ และอีก 1 ไอโซเลทคือ NH2 เป็น *Lactobacillus fermentum* 2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน เท่ากับ 98.4% (ตารางที่ 3-6) ซึ่งผลที่ได้ตรงกันสำหรับการใช้วิธีการแบบดั้งเดิมและชุดทดสอบทางการค้า

ตาราง 3-4 การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้ดี โดยวิธีการแบบดั้งเดิมตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (1986)

Isolate / Characteristic	DW 2	DW 12	DW 493	DW 496	DW 500	PB 11	NW 16	NH 2	YA 031	LA 16
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram Stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Growth at 15/45 °C	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	-/+	+/+	+/+
Carbohydrate fermentation										
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

เครื่องหมาย: + = เจริญและผลิตกรด, - = ไม่เจริญ

ตาราง 3-5 การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้ดีโดยใช้ API 50 CHL kit

Active ingredients	Isolates								
	DW 2	DW 12	DW 493	DW 496	DW 500	PB 11	NW 16	NH 2	LA 16
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+
-Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	+	+	+	-	+
-Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	+	+	-	+

ตาราง 3-5 (ต่อ) การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบาได้ดีโดยใช้ API 50 CHL kit

Active ingredients	Isolates								
	DW 2	DW 12	DW 493	DW 496	DW 500	PB 11	NW 16	NH 2	LA 16
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	-	-	+	+	+	-	+	-	-
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3-6 เปอร์เซ็นต์บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL kit

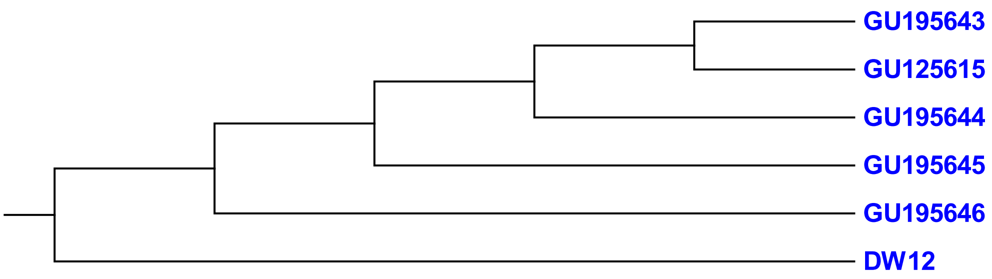
Isolates	Specific for bacteria	% similarity
1. DW2	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9
2. DW12	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9
3. DW493	*Lactobacillus plantarum* 1	99.4
4. DW496	*Lactobacillus plantarum* 1 *Lactobacillus pentosus*	68.0 32.0
5. DW500	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9
6. PB11	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9
7. NW16	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9
8. NH2	*Lactobacillus fermentum* 2	98.4
9. KN1315	*Lactobacillus plantarum* 1	99.9

4.2 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ 16S rRNA gene

นอกจากนี้เมื่อนำไอโ ซเลทที่ผลิตกาบาได้มากที่สุดคือไอโซเลท DW12 ไปเทียบเคียงลำดับเบสโดย 16S rRNA gene (โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) โดยใช้ Primer สำหรับการ amplify 16S rDNA คือ 27F 5’- AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG-3’ และ 1389R 5’- ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3’ และ Primer สำหรับ sequencing คือ 520F 5’- CAG C(A/C)G CCG CGG TAA T(A/T)C-3’ พบว่าอยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain S7 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% (ตารางที่ 3-7) ซึ่งตรงกับ Accession number คือ GU195646 (รูปที่ 3-6) (รายละเอียดภาคผนวก ค)

ตารางที่ 3-7 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท DW12 โดยใช้ 16S rDNA sequence analysis

Sample Name	Closets sequence	% similarity	Accession number
DW12	*Lactobacillus plantarum* strain S7 Length=1447 Score = 937 bits (1038), Expect = 0.0 Gaps = 0/519 (0%)Strand=Plus/Plus	519/519 (100%)	GU195646



รูปที่ 3-6 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท DW12

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

5.1 การออกแบบการทดลอง

หาสภาวะ เหมาะสม ต่อการผลิตกาบา โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Response Surface Methodology (RSM) โดยโปรแกรม Design Expert (version 6.0.2) ซึ่งได้กำหนด 3 ตัวแปรคือ X_1 = Sucrose, X_2 = MSG, X_3 = pH จากจำนวนตัวแปรหรือปัจจัยและระดับ 3 ระดับสำหรับแต่ละปัจจัย ที่ทำการศึกษานำไปกำหนดชุดการทดลอง ออกแบบ ชุดการทดลองได้ทั้งหมด 20 ชุด (run number) ดังตารางที่ 3-8

ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองจากตารางที่ 3-8 ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ linear multiple regression ซึ่งจุดศูนย์กลางในการออกแบบได้ทำ 5 ซ้ำเพื่อประเมินความคลาดเคลื่อนจากการทดลองพบว่า หลังจากบ่มชุดทดลองแต่ละชุดการทดลอง ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7

ชั่วโมง พบว่าชุดการทดลองที่ 9 ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 6% MSG 1% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 6 สามารถผลิตกาบาได้มากที่สุดคือ 25.04 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่ค่าทำนายผลิตกาบาของชุดนี้ได้ 23.34 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งเติมน้ำตาลซูโครส 6% MSG 2% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 5 มีค่าทำนายผลิตกาบาได้มากที่สุดเท่ากับ 24.71 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ค่าที่ได้จริงผลิตกาบาได้เพียง 24.29 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครส คือ 6% ปริมาณของ MSG คือ 1% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือพีเอช 6

5.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากสมการที่ (2) อธิบายได้ว่าปริมาณกาบา (Y) ขึ้นกับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และ MSG (น้ำตาลซูโครส: X_1 และ MSG: X_2) ถึง 94.53% (R^2 = 0.9453) โดยที่พีเอชเริ่มต้นในการหมัก ไม่มีผลต่อการผลิตกาบา โดยสมการดังกล่าวได้จาก ข้อมูลในตารางที่ 3-9 และ 3-10

$$Y = 6.53609 - 5.0857X_1 + 8.63364X_2 - 2.08182X_2^2 \qquad (2)$$

การมีนัยสำคัญทางสถิติของสมการที่ 2 ถูกตรวจสอบโดยใช้ F-test และการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับ response surface linear model ดังตารางที่ 3-9 ซึ่งพบว่ารูปแบบ (model) มีนัยสำคัญทางสถิติ (P 0.0001) และสำหรับค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) มีค่า 0.9453 และค่าที่ปรับแล้ว (Adjusted R^2) มีค่า 0.8961 แสดงว่าปริมาณของกาบาถูกกำหนดโดยตัวแปร (น้ำตาลทรายและ MSG) และประมาณ 10% ของการผันแปรทั้งหมดที่ไม่สามารถอธิบายโดยใช้ model จากตารางที่ 3-10 ปริมาณน้ำตาลทรายและ MSG มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตกาบา (P 0.0001) และเมื่อปริมาณ MSG เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า มีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.0288) ต่อการผลิตกาบาเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 3-8 การผลิตกาบาของไอโซเลท DW12 ในอาหาร MRS broth ดัดแปลง โดยใช้ Central Composite Design แสดงค่าเป็นจริง (Actual value) และค่าทำนาย (Predicted value)

Run number	Sucrose (X_1) (W/V)	MSG (X_2) (W/V)	pH (X_3)	GABA content (mg/L) Predicted	actual
1	6.00	0.00	5.00	16.80	16.72
2	12.00	0.00	5.00	9.06	9.07
3	6.00	2.00	5.00	24.71	24.29
4	12.00	2.00	5.00	13.57	14.17
5	6.00	0.00	7.00	15.08	14.19
6	12.00	0.00	7.00	9.69	9.82
7	6.00	2.00	7.00	23.95	23.64
8	12.00	2.00	7.00	15.15	14.94
9	6.00	1.00	6.00	23.34	25.04
10	12.00	1.00	6.00	15.08	14.55
11	9.00	0.00	6.00	12.37	13.20
12	9.00	2.00	6.00	19.06	19.41
13	9.00	1.00	5.00	16.71	16.60
14	9.00	1.00	7.00	16.64	17.92
15	9.00	1.00	6.00	17.80	16.67
16	9.00	1.00	6.00	17.80	16.11
17	9.00	1.00	6.00	17.80	16.17
18	9.00	1.00	6.00	17.80	18.66
19	9.00	1.00	6.00	17.80	17.23
20	9.00	1.00	6.00	17.80	19.63
R^2				0.9453	
Adjusted R^2				0.8961	

ตารางที่ 3-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาบา

Source	Degree of freedom	Sum of Square	Mean Square	F Value	p-value
Model	9	316.61	35.18	19.21	< 0.0001
Residual	10	18.31	1.83		
Lack of Fit	5	8.01	1.60	0.78	0.6053
Pure Error	5	10.30	2.06		
Corrected Total	19	334.92			

R^2 = 0.9453, Adjusted R^2 = 0.8961

เมื่อ X_1 = Sucrose

X_2 = MSG

ตารางที่ 3-10 ค่าสัมประสิทธิ์แบบจำลองของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกาบา

Variable	Coefficient	standard error	F-value	p-value
β_0	17.80	0.47	19.21	< 0.0001
$\beta_1 X_1$	-4.13	0.43	93.30	< 0.0001
$\beta_2 X_2$	3.35	0.43	61.11	< 0.0001
$\beta_3 X_3$	-0.03	0.43	0.01	0.9382
$\beta_{11} X_1^2$	1.41	0.82	2.98	0.1151
$\beta_{22} X_2^2$	-2.08	0.82	6.51	0.0288
$\beta_{33} X_3^2$	-1.13	0.82	1.91	0.1974
$\beta_{12} X_1 X_2$	-0.85	0.48	3.16	0.1060
$\beta_{13} X_1 X_3$	0.59	0.48	1.51	0.2475
$\beta_{23} X_2 X_3$	0.24	0.48	0.25	0.6303

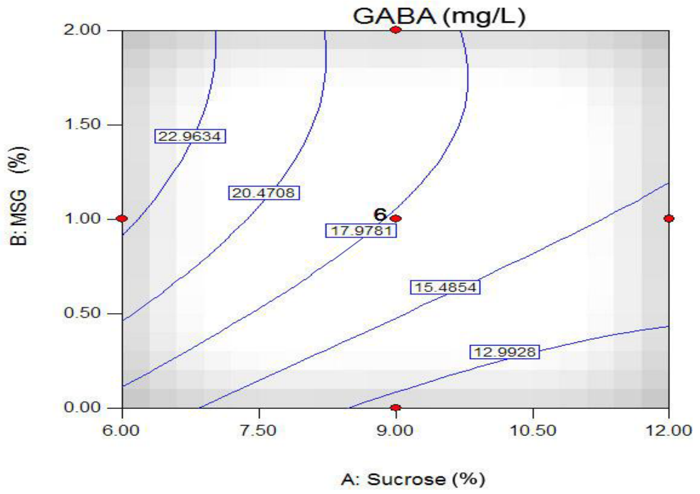
เมื่อ X_1 = Sucrose

X_2 = MSG

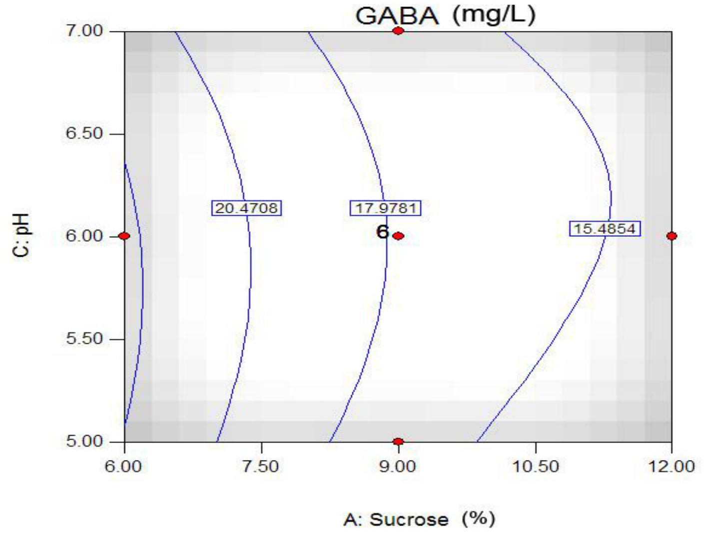
X_3 = pH

จากผลการวิเคราะห์โดยใช้ Contour plot ซึ่งพิจารณาจากพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการผลิตกาบา ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางได้แก่ค่า ความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของ

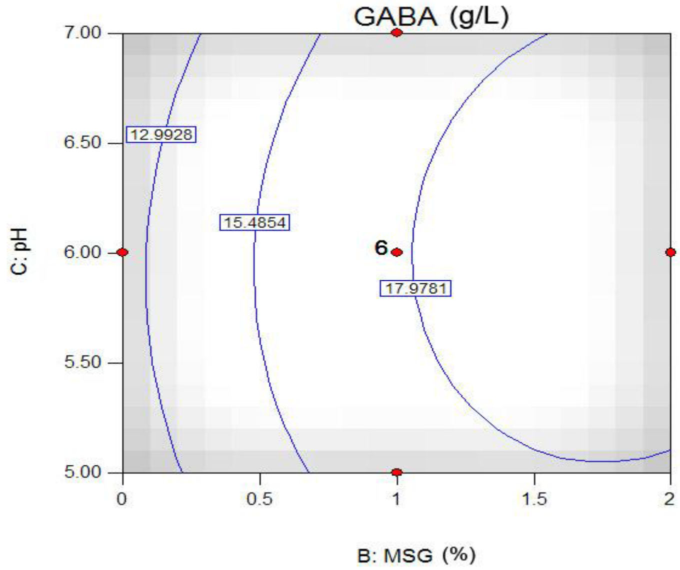
MSG ค่าพีเอชเริ่มต้นการหมัก จากรูปที่ 3-6 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของน้ำตาล อยู่ในช่วง 6-7% ความเข้มข้นของ MSG 1-2% จากรูปที่ 3-7 อัตราส่วนที่เหมาะสม ของน้ำตาล ต่อการผลิตกาบา อยู่ในช่วง 6-6.2% ค่าพีเอชเริ่มต้นการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.1-6.3 และจากรูปที่ 3-8 อัตราส่วนที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของ MSG อยู่ในช่วง 1.1-2% ค่าพีเอชเริ่มต้นการหมักที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.1-7 แต่เมื่อใช้สมการที่ 2 ค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมักไม่มีผลต่อการผลิตกาบา ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาที่เลือกคือ ต้องการใช้ MSG ให้น้อยที่สุด เพราะส่งผลรบกวนต่อรสชาติของน้ำหมักและการยอมรับของผู้บริโภค จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 1% ส่วนค่าพีเอชที่เห มาะสม ในการเริ่มต้นหมักคือ พีเอช 6 เพราะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (Salminen and Wright, 1993)



รูปที่ 3-7 ผลของ Sucrose และ MSG ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12



รูปที่ 3-8 ผลของ Sucrose และ pH ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12



รูปที่ 3-9 ผลของ MSG และ pH ต่อการผลิตกาบาโดย *L. plantarum* DW12

5.3 การยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CCD

จากผลการวิเคราะห์โดยใช้ CCD ซึ่งพิจารณาจากพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการผลิตกาบา พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสม คือปริมาณน้ำตาลซูโครส คือ 6% ปริมาณของ MSG คือ 1% และพีเอชเริ่มต้นในการหมักคือ 5.73 (Desirability = 0.936) (ตารางที่ 3-11) ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้เพื่อเป็นการทวนสอบหรือยืนยันผลการทดลอง ซึ่งปริมาณกาบาที่ได้ (25.01 มิลลิกรัม/ลิตร) ใกล้เคียงมากกับชุดการทดลองที่ 9 (25.04 มิลลิกรัม/ลิตร) จึงเลือกใช้พีเอช 6.00 เป็นพีเอชเริ่มต้น ในการหมัก เนื่องจาก เมื่อเกิดกระบวนการหมักค่าพีเอช ในน้ำหมัก จะลดลงอีก และช่วงพีเอช 5.73-6.00 ต่างก็มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (Salminen and Wright, 1993) ดังนั้นจึงเลือกใช้ อัตราส่วนน้ำตาลทราย: MSG: pH เป็น 6: 1: 6 เพื่อนำไปใช้ในการหมักสาหร่ายผมนาง

ตารางที่ 3-11 การวิเคราะห์ค่าที่เหมาะสมในการผลิตกาบา ได้ดีที่สุดในอาหาร MRS broth โดย *L. plantarum* DW12

Solution	Maximum	Run no. 9
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (%)	6	6
ปริมาณของ MSG (%)	1	1
พีเอช	5.73	6.00
กาบา (มิลลิกรัม/ลิตร)	25.01	25.04
Desirability	0.936	

6. กระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

6.1 ชุดการทดลองสำหรับการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

ชุดการทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้คือ

- ชุด A สูตรดั้งเดิม (สาหร่ายผมนาง: น้ำตาลทราย: น้ำสะอาด (3: 1: 10 (w/w/v))) ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม)
- ชุด B สูตรดั้งเดิมปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% (ดั้งเดิม-กล้าเชื้อ)
- ชุด C สูตรดัดแปลงปรับปริมาณน้ำตาลทราย 6% (w/v), MSG 1% (w/v) และปรับพีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5 % (ดัดแปลง-กล้าเชื้อ)

รูปที่ 3-10 กระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางในถังหมักพลาสติกขนาด 15 ลิตร

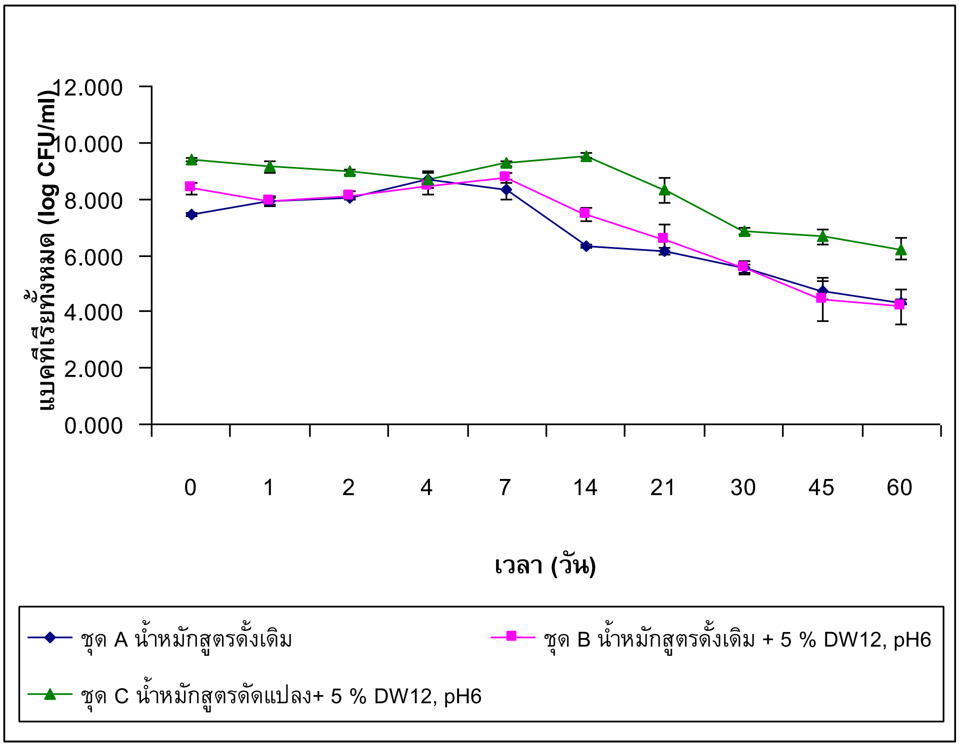
6.2 บทบาทของจุลินทรีย์

6.2.1 แบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count: TBC)

จากการทดลองพบว่า น้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดั้งเดิมที่เติมกล้าเชื้อ (ชุด B) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) เริ่มต้น 8.37 log CFU/ml และน้ำหมักสาหร่ายผมนา งสูตรดัดแปลงที่เติมกล้าเชื้อ (ชุด C) มีปริมาณ TBC เริ่มต้น 9.41 log CFU/ml ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดั้งเดิมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุด A) มีปริมาณ TBC เริ่มต้น 7.45 log CFU/ml (ดูรูปที่ 3-11)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริ มาณ TBC ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางทั้ง 3 ชุด มีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย สำหรับช่วง 2 วันแรกของการหมัก น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีปริมาณ TBC เพิ่มขึ้นเป็น 8.02 log CFU/ml แต่น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ ชุด C มีปริมาณ TBC ลดลงเหลือเท่ากับ 8.12 และ 8.96 log CFU/ml ตามลำดับ แต่เมื่ออายุการหมักครบ 7 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ ชุด C มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นโดยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ ชุด C มี TBC เท่ากับ 8.34 และ 9.26 log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนชุด A มี TBC ลดลงเหลือเท่ากับ 8.34 log CFU/ml

จากนั้นน้ำหมักสาหร่ายผม นางชุด C ที่อายุการหมัก 14 วัน มี TBC สูงสุดเท่ากับ 9.54 log CFU/ml ในขณะที่ ชุด A และชุด B มีปริมาณ TBC ลดลง และเมื่อครบ 21 วัน มีปริมาณ TBC ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C ลดลงเหลือ 6.13, 6.56 และ 8.32 log CFU/ml ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และ ชุด C มีปริมาณ TBC เหลือเท่ากับ 4.32, 4.18 และ 6.23 log CFU/ml ตามลำดับ

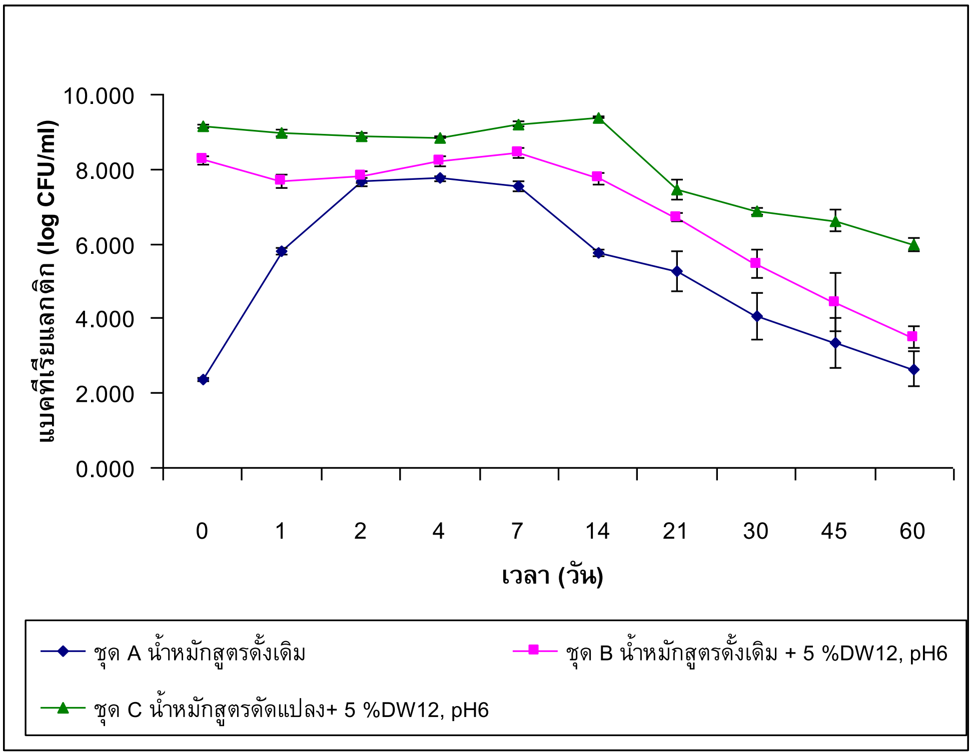


รูปที่ 3-11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) ในการหมักสาหร่ายผมนาง ที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

6.2.2 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB)

จากการทดลองพบว่าใน ส่วนผสมของ น้ำหมักสาหร่ายผมนางมีแบคทีเรียแลกติก (LAB) อยู่ซึ่งสังเกตได้จากน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดั้งเดิมชุด A เมื่อเริ่มต้นการหมักพบว่ามี LAB 2.37 log CFU/ml น้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดั้งเดิมที่เติมกล้าเชื้อ (ชุด B) มีปริมาณ LAB เริ่มต้น 8.24 log CFU/ml และน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดัดแปลงที่เติมกล้าเชื้อ (ชุด C) มีปริมาณ LAB เริ่มต้น 9.16 log CFU/ml (ดูรูปที่ 3-12) หลังจากการหมัก 1 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีปริมาณ LAB เหลือเท่ากับ 7.69 log CFU/ml สำหรับชุด C หลังจากการหมัก 4 วัน LAB มีจำนวนลดลง เหลือ 8.85 log CFU/ml เมื่อน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีอายุการหมักได้ 7 วัน ปริมาณ LAB เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 มี LAB ค่อนข้างคงที่ในวันที่ 2-7 เฉลี่ย 7.65 log CFU/ml น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีอายุการหมักได้ 7 วัน ปริมาณ LAB เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 มี LAB 8.45 log CFU/ml เมื่อน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีอายุการหมักได้ 14 วัน ปริมาณ LAB เพิ่มขึ้นจากวันที่ 4 โดยมี LAB 9.38 log CFU/ml ปริมาณ LAB ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองค่อยๆ ลดลงเมื่อถึงวันที่ 21 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C มี LAB เหลืออยู่ 5.27, 6.70 และ 7.47 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุด

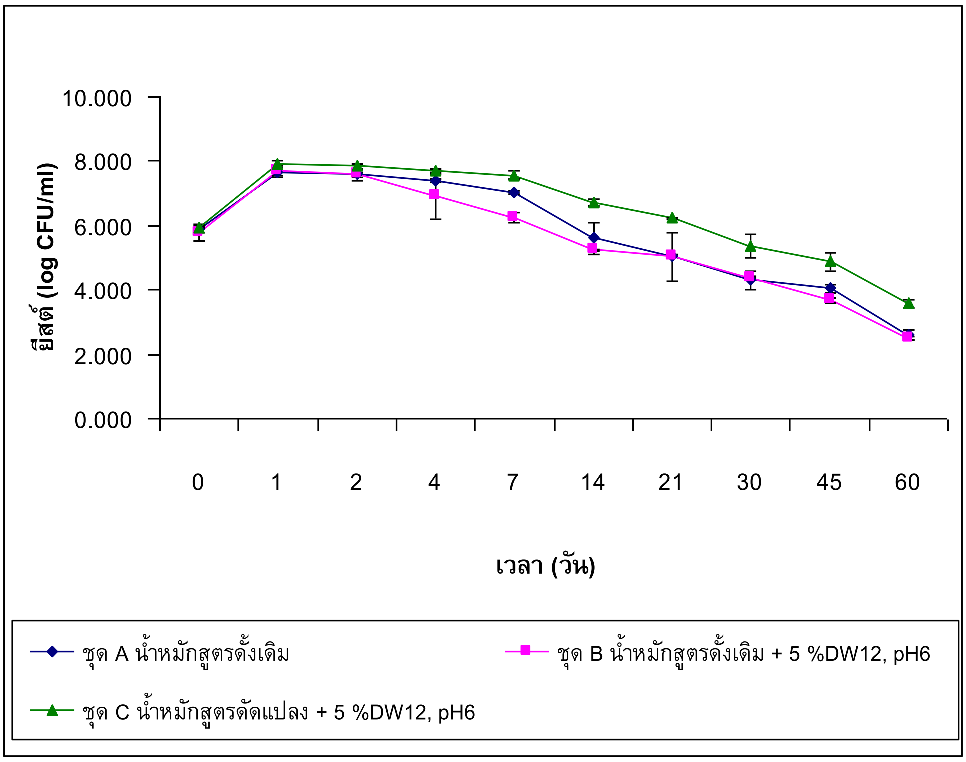
การหมัก 60 วัน ชุดการทดลองที่เติม กล้าเชื้อมีปริมาณ LAB เหลืออยู่มากกว่าชุดที่ไม่เติมกล้าเชื้อ โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B และ ชุด C มี LAB เหลืออยู่ 3.49 และ 5.97 log CFU/ml ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มี LAB เหลืออยู่ 2.65 log CFU/ml สำหรับบทบาทของ LAB ในช่วง 14-60 วัน พบว่าปริ มาณลดลงอย่างต่อเนื่องและเป็นในลักษณะเดียวกันในทุกชุดการทดลอง



รูปที่ 3-12 การเปลี่ยนแปลงป ริมาณแบคทีเรียแลกติก (LAB) ในการหมักสาหร่ายผมนาง ที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

6.2.3 ยีสต์

ในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง พบว่ามีปริมาณยีสต์ปนเปื้อนในทุกชุดการทดลอง (ดูรูปที่ 3-13) โดยเริ่มต้นน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C มียีสต์เท่ากับ 5.89, 5.78 และ 5.95 log CFU/ml ตามลำดับ หลังจากการหมัก 1 วัน ปริมาณยีสต์มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยชุดน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีปริมาณยีสต์สูงสุดเป็น 7.94 log CFU/ml หลังจากการหมัก 2 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C พบว่ายีสต์มีแนวโน้มลดลงตลอดอายุการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C ยังคงมีปริมาณยีสต์ 2.60, 2.50 และ 3.57 log CFU/ml ตามลำดับ

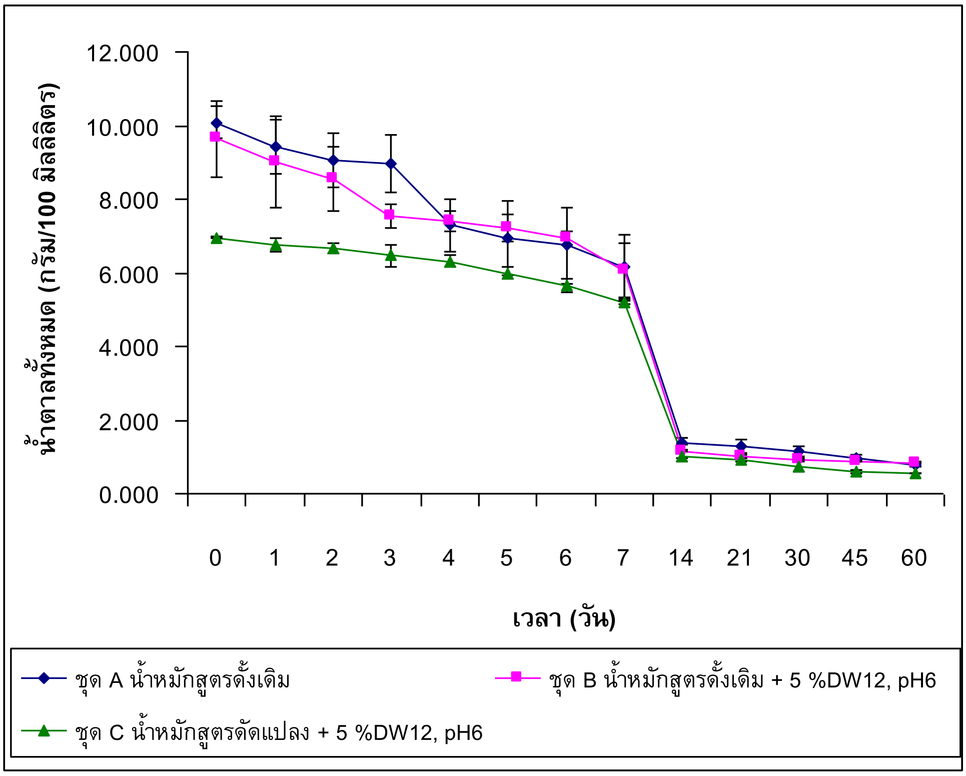


รูปที่ 3-13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ในการหมักสาหร่ายผมนาง ที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

7.1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

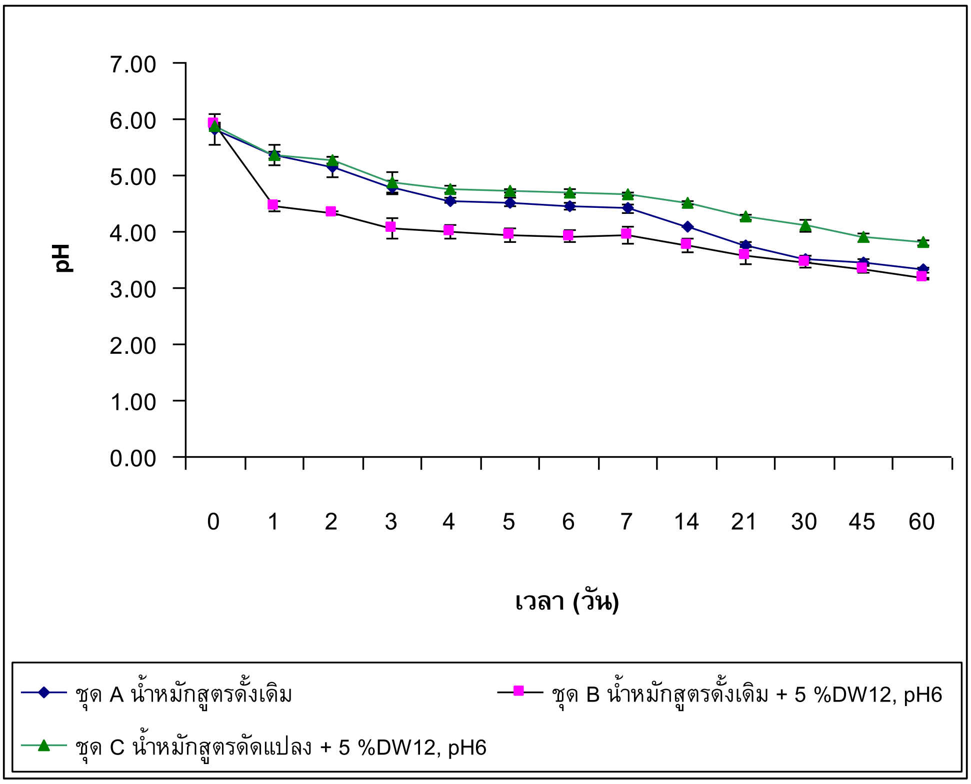
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงตามอายุการหมักซึ่งเป็นผลจากการใช้ของจุลินทรีย์ น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และ ชุด B มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 10.0 และ 9.6% ตามลำดับ (สาหร่ายผมนาง: น้ำตาลทราย: น้ำสะอาด ในอัตราส่วน 3: 1: 10 (w/w/v)) และชุด C มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 6.92% มีแนวโน้มการลดลงของน้ำตาลเป็นไปในรูปแบบเดียวกันทุกชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B พบว่าน้ำตาลที่เหลืออยู่ 0.78 และ 0.81% ตามลำดับ ส่วนชุด C พบว่าน้ำตาลเหลืออยู่ 0.55% (ดูรูปที่ 3-14)



รูปที่ 3-14 การลดลงของน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7.2 ค่าพีเอช

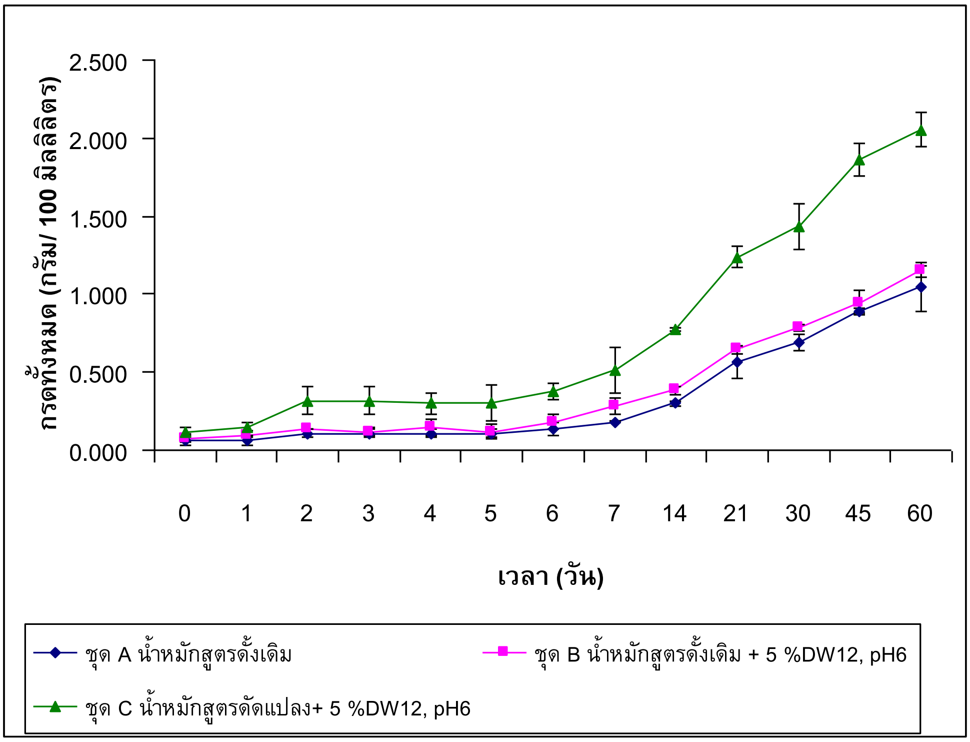
ค่าพีเอชเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C คือ 5.82, 5.91 และ 5.88 ตามลำดับ (ดูรูปที่ 3-15) มีแนวโน้มลดลงตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น และชุด B มีการลดลงมากเมื่อเทียบกับชุด A และชุด C เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 3.17-3.80 ได้แก่ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (พีเอช 3.32) น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B (พีเอช 3.17) และน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C (พีเอช 3.80)



รูปที่ 3-15 การลดลงของพีเอชในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

สำหรับค่าความเป็นกรด ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักอันเนื่องมากจากการหมักของจุลินทรีย์โดยใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรท (ดูรูปที่ 3-16) ค่าความเป็นกรดเริ่มต้นประมาณ 0.06-0.12 กรัม/100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์แรกของการหมัก หลังจากนั้นทุกชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นของค่าความปีนกรดมากขึ้นจนสิ้นสุดการหมัก 60 วัน โดยปริมาณสูงสุดพบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ให้ค่าความเป็นกรด 2.06 กรัม/100 มิลลิลิตร ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และ ชุด B ให้ค่าความเป็นกรด 1.05 กรัม/100 มิลลิลิตร และ 1.15 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

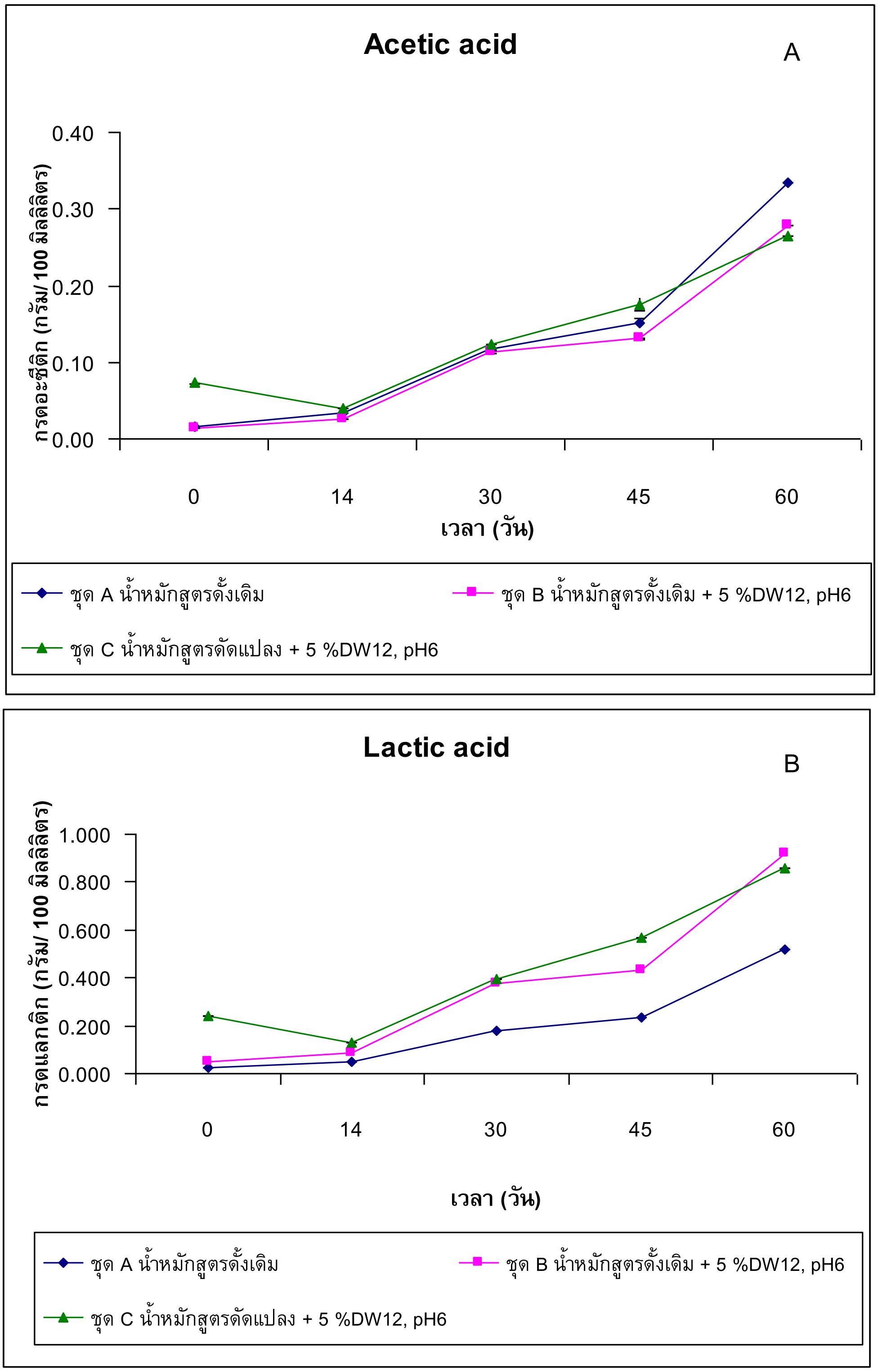


รูปที่ 3-16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7.4 ปริมาณกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์

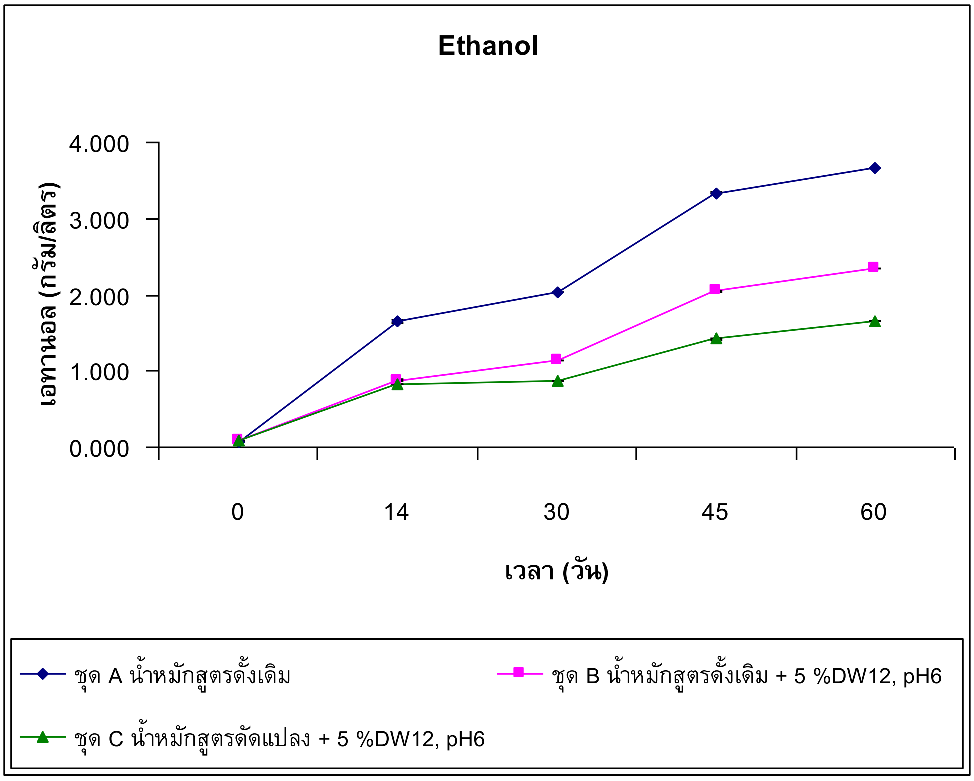
สำหรับปริมาณกรดอินทรีย์คือแลกติกและอะซิ ติกโดยตรวจสอบพบว่า มีกรดอะซิติกมากกว่ากรดแลกติกโดยเฉพาะน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C (ดูรูปที่ 3-17A) ปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และ ชุด B มีค่าเท่ากัน คือ 0.02 กรัม/ 100 มิลลิลิตร ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C คือ 0.07 กรัม/100 มิลลิลิตร ปริมาณกรดอะซิติกมีการเพิ่มขึ้นตลอดการหมักทุกชุดการทดลอง ปริมาณกรดอะซิติกเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน มีปริมาณสูงสุดในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (0.33 กรัม/100 มิลลิลิตร) น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B (0.28 กรัม/100 มิลลิลิตร) และปริมาณต่ำสุดใน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C (0.26 กรัม/100 มิลลิลิตร) ตามลำดับ

ปริมาณกรดแลกติกเริ่มต้นใน น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C คือ 0.02, 0.04 และ 0.24 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3-17B) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน พบว่า น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุด และมีค่าใกล้เคียงกับชุด C (0.92, 0.86 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีค่า 0.52 กรัม/100 มิลลิลิตร



รูปที่ 3-17 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกร ดอินทรีย์ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

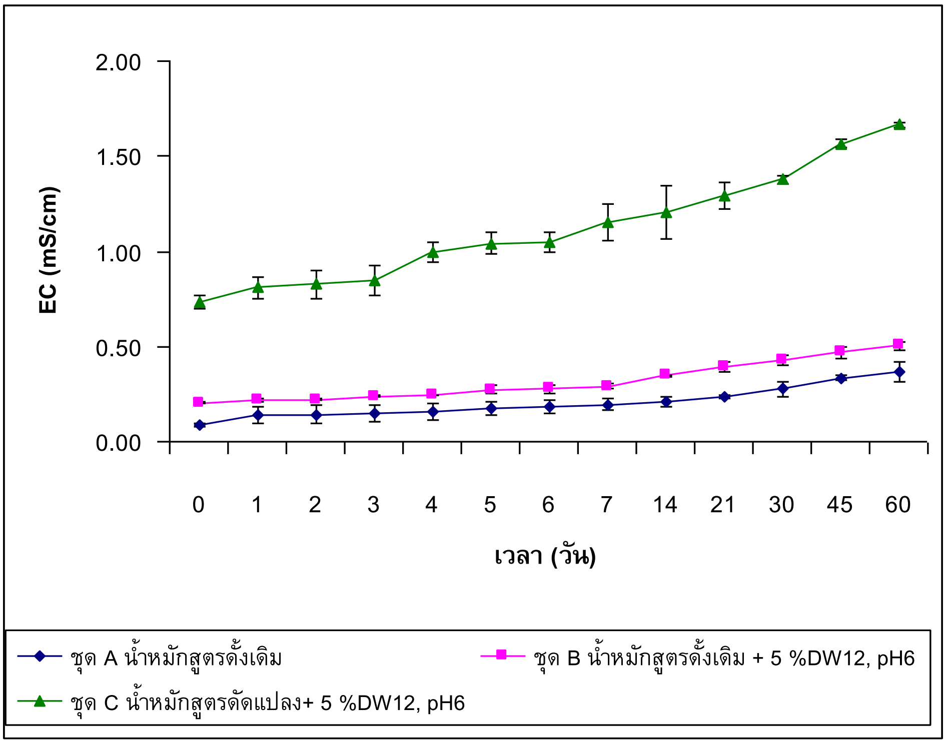
พบว่าทุกชุดการทดลองไม่พบเมทานอลเลยตลอดการหมัก 60 วัน และจากรูปที่ 3-18 ปริมาณเอทานอลเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ชุด B และชุด C คือ 0.07 0.08 และ 0.09 กรัม/ลิตร ตามลำ ดับ ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตามอายุการหมัก ทุกชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ปริมาณเอทานอลสูงสุดพบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A คือ 3.66 กรัม/ลิตร ตามด้วยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B (2.30 กรัม/ลิตร) และปริมาณต่ำสุดพบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C คือ 1.65 กรัม/ลิตร



รูปที่ 3-18 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ เอทานอล ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7.5 ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC)

สำหรับค่า EC ซึ่งแสดงถึงปริมาณสิ่งที่เจือปนในสารละลายที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ ซึ่งในการวัดการ EC ในน้ำหมักก็เพื่อติดตามการละลายแร่ธาตุและสารต่างๆ จากพืชออกมาในน้ำหมัก รวมถึงสารที่เกิดจากเมแทบอไลท์ขอ งจุลินทรีย์ พบว่าค่า EC ของน้ำหมักทุกชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการห มัก (รูปที่ 3-19) ค่า EC เริ่มต้นของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และ ชุด B เท่ากับ 0.09 และ 0.20 mS/cm และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ค่า EC ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และ ชุด B เท่ากับ 0.36 และ 0.50 mS/cm ตามลำดับ ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C ค่า EC สูงกว่าชุด A และชุด B มากโดยมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 0.74 mS/cm และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ค่า EC เท่ากับ 1.66 mS/cm



รูปที่ 3-19 การเปลี่ยนแปลงค่า EC ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

7.6 ปริมาณของธาตุที่ตรวจสอบ

เมื่อพิจารณาถึง ปริมาณธาตุต่างๆที่ตรวจสอบได้แก่ สารหนู (As) เหล็ก (Fe) โซเดียม (Na) โพแทสเซียม (K) ตะกั่ว (Pb) และสังกะสี (Zn) ทุกธาตุมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักซึ่งสอดคล้องกับค่า EC (รูปที่ 3-20) และตาราง 3-12

สำหรับ ธาตุโซเดียม (Na) พบว่ามีปริมาณธาตุโซเดียม เริ่มต้นใน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ชุด B และชุด C คือ 18.97, 21.07 และ 645.13 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (LOQ ของธาตุโซเดียมเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัม/ลิตร) (ดูรูปที่ 3-20A) น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และชุด B มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (28.90 และ 29.87 มิลลิกรัม/ลิตร) ขณะที่ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ธาตุโซเดียมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น มี ปริมาณธาตุโซเดียมสูงสุดเท่ากับ 847.63 มิลลิกรัม/ลิตร

สำหรับธาตุโพแทสเซียม (K) พบว่ามีปริมาณธาตุโพแทสเซียม เริ่มต้นใน น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C คือ 45.06, 47.58 และ 66.90 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (LOQ ของธาตุโพแทสเซียมเท่ากับ 0.002 มิลลิกรัม/ลิตร) (ดูรูปที่ 3-20B) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมั กวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีปริมาณธาตุโพแทสเซียมสูงสุด (92.28 มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B (78.87 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A (62.43 มิลลิกรัม/ลิตร)

น้ำหมักสาหร่ายมผมนางเป็นแหล่งที่ดีของ ธาตุเหล็ก (Fe) พบว่ามีปริมาณธาตุเหล็กเริ่มต้นใน น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C คือ 1.39, 2.87 และ 2.79 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (LOQ ของธาตุเหล็กเท่ากับ 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร) (ดูรูปที่ 3-20C) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น มีปริมาณ สูงสุดเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 ได้แก่ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (19.07 มิลลิกรัม/ลิตร) น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B (28.87 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีธาตุเหล็กสูงสุด (31.70 มิลลิกรัม/ลิตร) ตามลำดับ

ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C มีปริมาณธาตุทองแดง (Cu) เริ่มต้น 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร (LOQ ของธาตุทองแดงเท่ากับ 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร) (ดูรูปที่ 3-20D) เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีปริมาณธาตุทองแดงสูงสุด (0.03 มิลลิกรัม/ลิตร) น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และชุด C ปริมาณของธาตุทองแดงไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ธาตุสังกะสี (Zn) มีปริมาณเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร (LOQ ของธาตุสังกะสีเท่ากับ 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร) ในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B และชุด C มีปริมาณธาตุสังกะสี เท่ากับ 0.23 และ 0.61 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ดูรูปที่ 3-20E) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีปริมาณธาตุสังกะสี สูงสุด (0.70 มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B (0.66 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C (0.61 มิลลิกรัม/ลิตร) ตามลำดับ

จากผลการทดลองตร วจพบตะกั่วในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ทุกชุดการทดลอง โดยพบว่ามีปริมาณตะกั่วเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A คือ 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร ในชุด B และชุด C มีปริมาณตะกั่วเริ่มต้น 0.009 มิลลิกรัม/ลิตร (LOQ ของตะกั่วเท่ากับ 0.009 มิลลิกรัม/ลิตร) (รูปที่ 3-20F) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักที่เพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B มีตะกั่วสูงสุด (0.15 มิลลิกรัม/ลิตร) รองลงมาคือน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (0.14 มิลลิกรัม/ลิตร) และน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีตะกั่วต่ำสุด (0.10 มิลลิกรัม/ลิตร)

สำหรับสารหนู (As) ตรวจไม่พบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และชุด C (LOQ ของสารหนูเท่ากับ 0.033 มิลลิกรัม/ลิตร)

ตารางที่ 3-12 ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆที่ตรวจสอบของน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรต่าง ๆ เมื่อมีอายุหมัก 60 วัน กับเกณฑ์มาตรฐาน

แร่ธาตุ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ชุด A น้ำหมักสูตรดั้งเดิม	ชุด B น้ำหมักสูตรดั้งเดิม + 5% DW12, pH6	ชุด C น้ำหมักสูตรดัดแปลง + 5% DW12, pH6	USFDA*	FDA, Thailand**
ตะกั่ว	0.14	0.15	0.10	0.005	0.50
เหล็ก	19.07	28.87	31.70	0.30	15.00
สังกะสี	0.70	0.66	0.61	5.00	5.00
โซเดียม	28.90	29.87	847.63	-	-
โพแทสเซียม	62.43	78.87	92.28	-	-
ทองแดง[a]	ND	0.03	ND	1.00	5.00
สารหนู[b]	ND	ND	ND	0.05	0.20

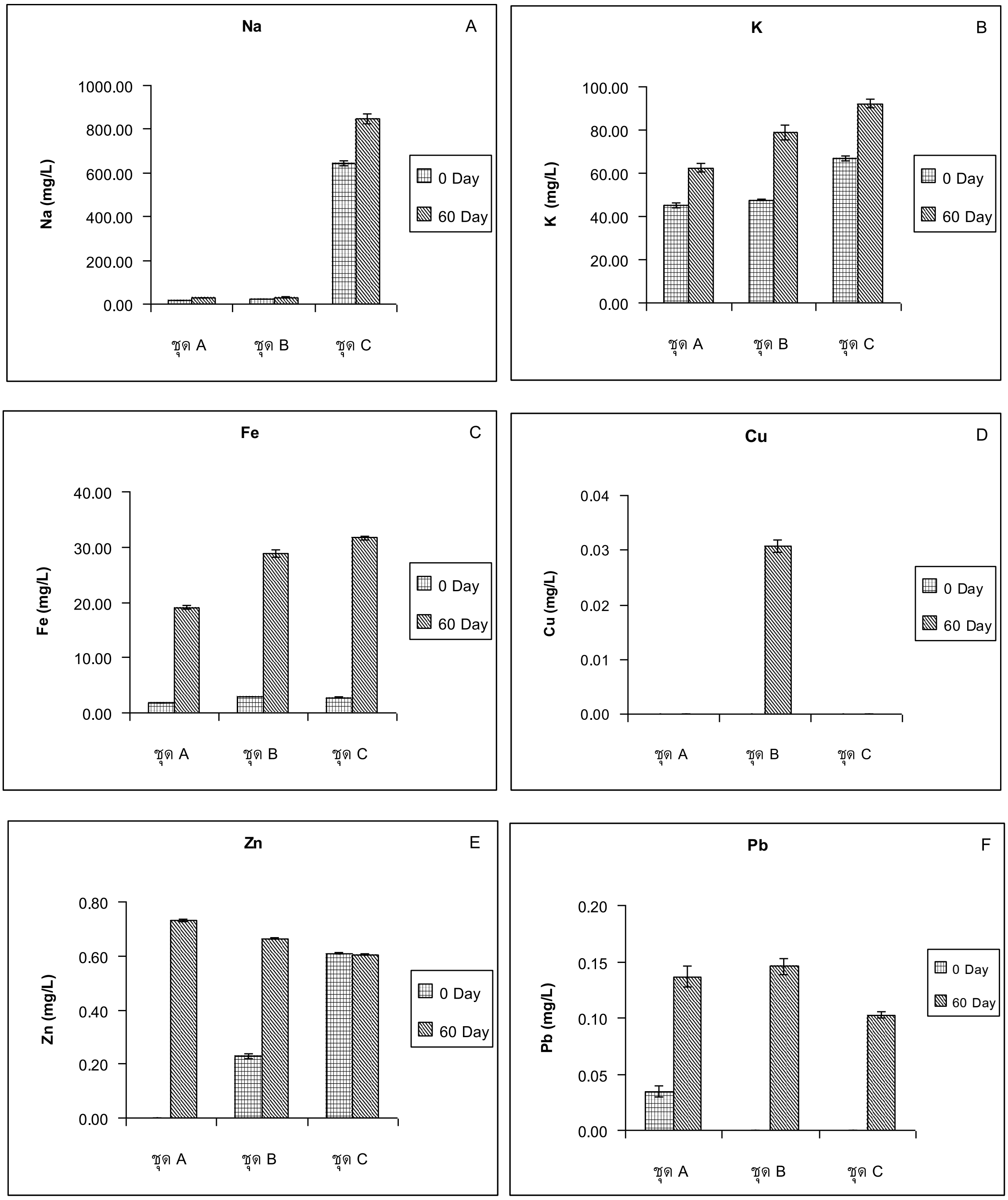
* USFDA for drinking water (FDA, 2003)

** มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 (2543) เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุ ที่ปิดสนิท (กองควบคุมอาหาร, สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA, 2000))

[a,b] ขีดขั้นต่ำในการตรวจวัด (LOQ): ทองแดง = 0.001 มก/ล, สารหนู = 0.033 มก/ล

ND (Not detected)

- คือ ไม่มีการกำหนด



รูปที่ 3-20 การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุที่ตรวจสอบในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

เมื่อกำหนดให้ ชุด A คือสูตรดั้งเดิม ไม่เติมกล้าเชื้อ พีเอชเริ่มต้น 6.0 (ชุดควบคุม)

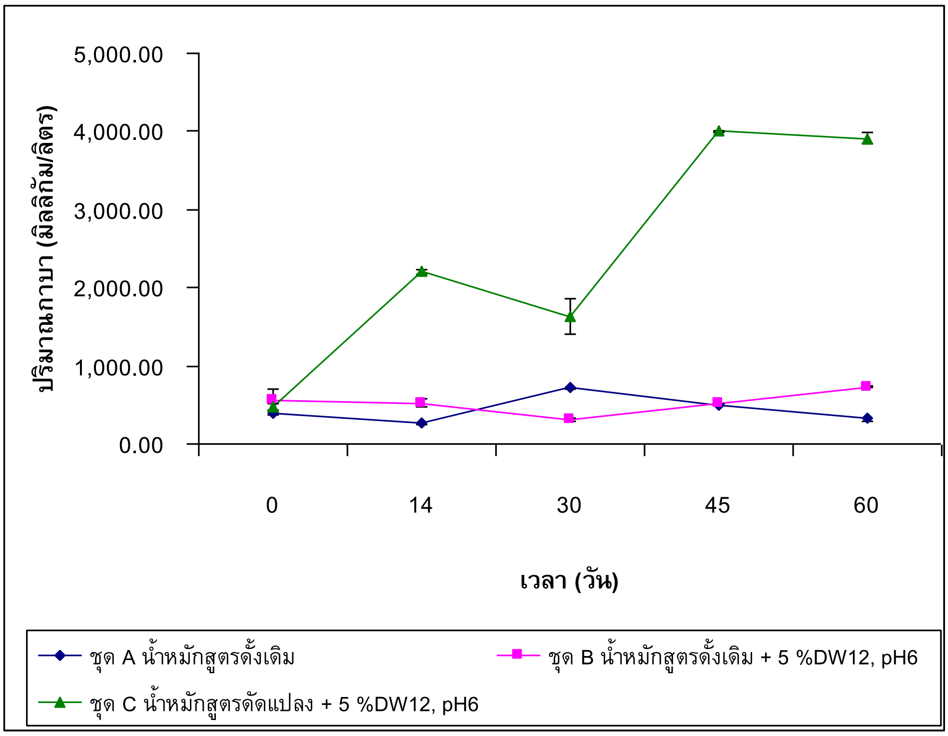
ชุด B คือสูตรดั้งเดิม เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% พีเอช 6.0 (ดั้งเดิม-กล้าเชื้อ)

ชุด C คือสูตรดัดแปลง เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5 % พีเอช 6.0 (ดัดแปลง-กล้าเชื้อ)

* ขีดขั้นต่ำในการตรวจวัด (LOQ): Na = 0.005 มก/ล, K = 0.002 มก/ล, Fe = 0.001 มก/ล, Cu = 0.001 มก/ล, Zn = 0.001 มก/ล, Pb = 0.009 มก/ล

7.7 ปริมาณกาบา

สำหรับปริมาณกาบา พบว่ามีปริมาณกาบาเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C เท่ากับ 384.44, 560.57 และ 475.39 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ดูรูปที่ 3-21) น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีปริมาณกาบาสูงสุดเมื่อหมักได้ 30 วัน (716.49 มิลลิกรัม/ลิตร) และมีแนวโน้มลดลง เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 60 วัน มีปริมาณกาบาเหลืออยู่เท่ากับ 339.42 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B ปริมาณกาบามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากวันแรกของการหมัก และมีปริมาณกาบาสูงสุดเมื่อหมักได้ 60 วัน (730.29 มิลลิกรัม/ลิตร) สำหรับน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C ปริมาณกาบามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมัก มีปริมาณกาบาสูงสุดเมื่อหมักได้ 45 วัน (3,998.20 มิลลิกรัม/ลิตร) และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีปริมาณปริมาณกาบาเหลืออยู่ 3,911.18 มิลลิกรัม/ลิตร



รูปที่ 3-21 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกาบาในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท DW12 ซึ่งผลิตกาบา

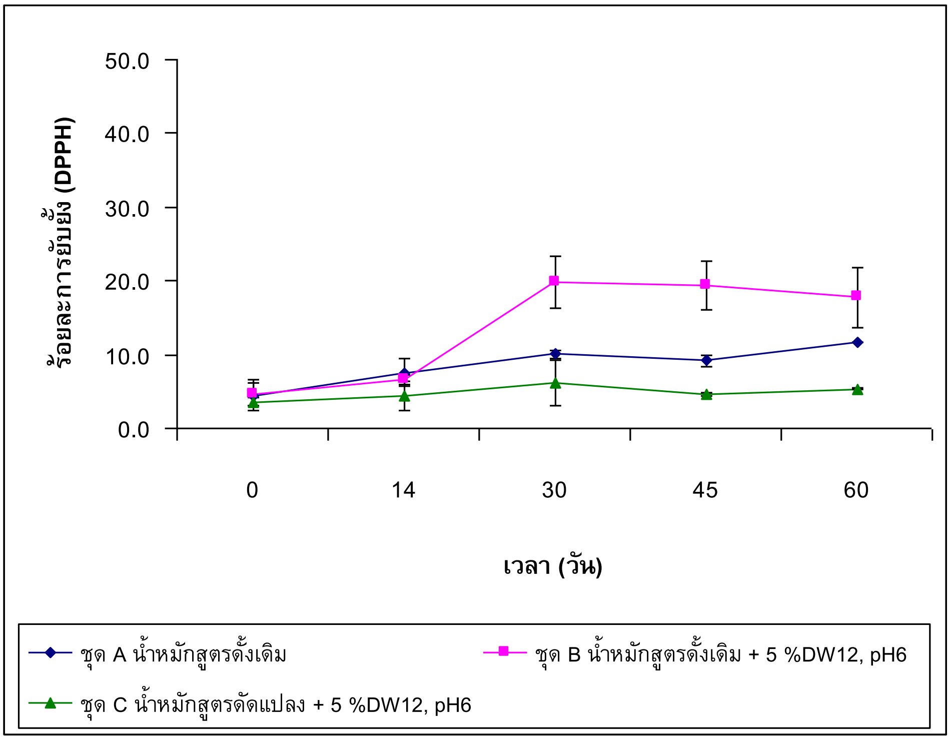
8. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

จากการศึกษา ความสามารถในการต านออกซิเดชัน ของน้ำหมักสาหร่ายแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีต่างๆ พบว่า น้ำหมักชีวภาพมี ความสามารถในการต านออกซิเดชันแตกต่างกันออกไปเนื่องจากความแตกต่างของวัตถุดิบและสัดส่วนที่ใช้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

8.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scarvenging capacity assay (DPPH assay)

วิธีนี้เป็นการทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH˙ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งในการศึกษานี้ใช้ Vitamin C อนุมูล DPPH˙ เปนอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม วง อยู ในรูปอนุมูลอยู แล วโดยไม ต องทําปฏิกิริยาเพื่อให เกิดอนุมูล การวิเคราะห เป นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกําจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให ไฮโดรเจนอะตอม

จากการทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางทั้ง 3 สูตรที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยสังเกตความสามารถในการจับ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง (Chen et al, 1999) ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่ ระยะเวลาการหมักต่างๆ แสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อนุมูลอิสระ DPPH ได้ในช่วง 3.59-19.85% (รูปที่ 3-22) พบว่าตัว อย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B ซึ่งเป็นสูตรดั้งเดิมและ เติมกล้าเชื้อ DW12 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดีที่สุด โดยพบว่าเมื่อ เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 4.63% และมีความสามารถในการต้านออก ซิเดชันมากที่สุดเมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน คือ 19.85% เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 17.75% รองลงคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A เป็นน้ำหมักสูตรดั้งเดิมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม) เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 4.49% และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด เท่ากับ 11.62% ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C เป็นน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดัดแปลงที่เติมกล้าเชื้อ DW12 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน น้อยที่สุด เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 3.60% และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน เท่ากับ 6.23% และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 5.36%



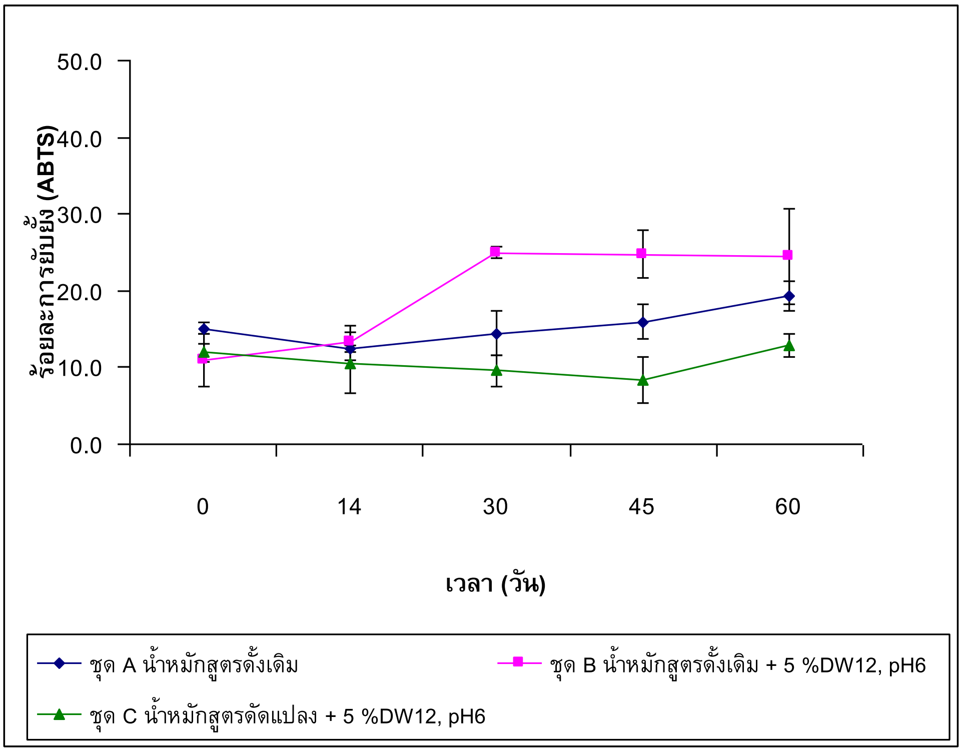
รูปที่ 3-22 การต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

8.2 2, 2´-azinobiz(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay

วิธีนี้เป็นการทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งในการศึกษานี้ใช้ trolox

จากผลการวิเคราะห์การต้านออกซิเดชันโดย พิจารณาการยับยั้งอนุมูล อิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ในรูปร้อยละการยับยั้ง ในตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เปรียบเทียบเป็นปริมาณสารมาตรฐานคือ trolox โดยจากผลการทดลองที่ได้ (รูปที่ 3-23) สามารถเรียงลำดับ ร้อยละการยับยั้งซึ่งหาจาก linear regression equation ของ calibration curve (Y = 1.74X + 4.53, R^2 = 0.9944) อยู่ในช่วง 8.37-24.95 % ถาคาดังกลาวมีค่ามาก แสดงวาสารนั้นมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ไดดี พบว่าตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดีที่สุด เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 10.92% และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันดีที่สุดเมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน เพิ่มขึ้นเป็น 24.96% และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 24.50% รองลงมาคือน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 15.13% และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เพิ่มขึ้นมากที่สุด เท่ากับ 19.29% น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน น้อยที่สุด เริ่มต้น

การหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 11.91% และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เท่ากับ 12.86%



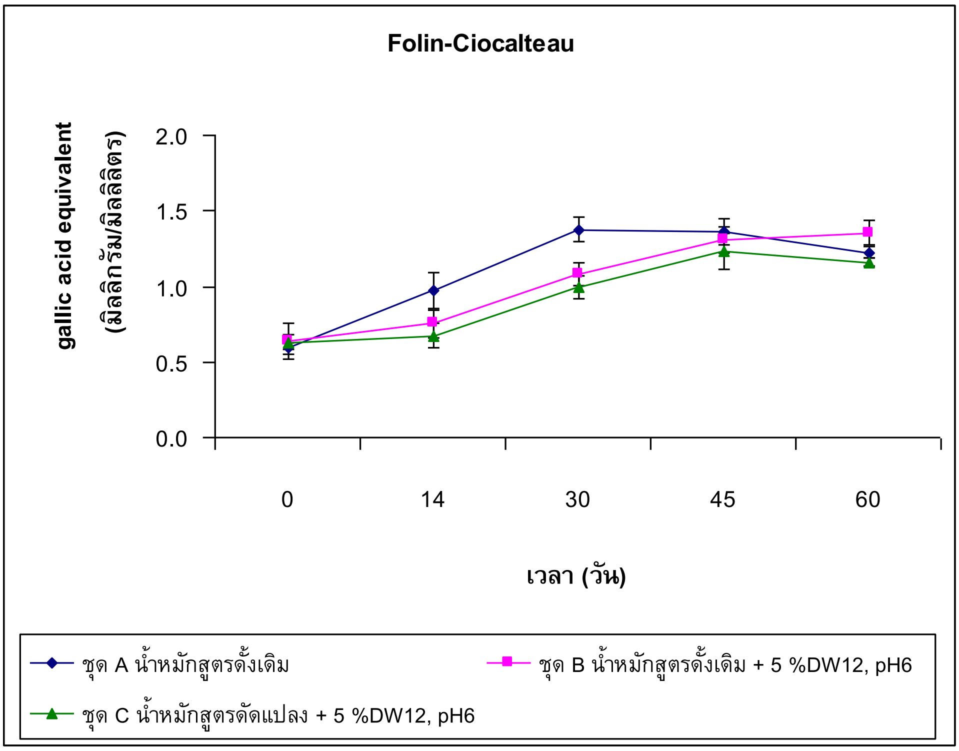
รูปที่ 3-23 การต้านออกซิเดชันโดยวิธี ABTS ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

8.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลรวมในรูปของ gallic acid equivalents ต่อตัวอย่างน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร (มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/มิลลิลิตรของตัวอย่าง) จากรูปที่ 3-24 ผลการทดลองพบว่าสามารถคำนวณ ปริมาณสารฟีนอลรวมใน ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง จาก linear regression equation ของ calibration curve ($Y = 0.0002X + 0.0008$, $R^2 = 0.999$) ซึ่งจะอยู่ในช่วง 0.59-1.38 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/มิลลิลิตรของตัวอย่าง

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในสารตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง สูตรต่างๆ เปรียบเทียบเป็นปริมาณสารมาตรฐานคือ กรดแกลลิก จากนั้นคำนวณผลแล้ วรายงานเป็นหน่วย มิลลิกรัมของ กรดแกลลิก /มิลลิลิตรของตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง พบว่าในช่วงวันที่ 0-45 ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดีที่สุด เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้าน

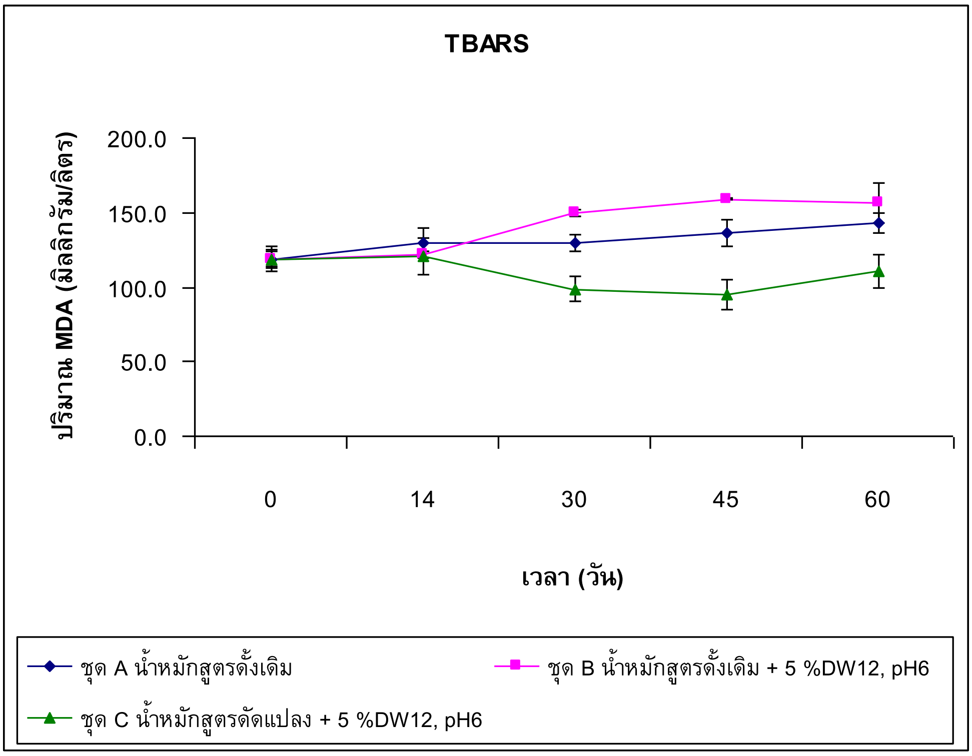
ออกซิเดชัน เท่ากับ 0.59 มิลลิกรัมของ กรดแกลลิก /มิลลิลิตร มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน เท่ากับ 1.38 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก / มิลลิลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 1.22 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก /มิลลิลิตร รองลงมาคือ ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 0.64 มิลลิกรัมของ กรดแกลลิก/มิลลิลิตร เมื่อผ่านการหมักไป 45 วัน ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 1.31 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก /มิลลิลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมาก กว่าชุด A และชุด C มีค่าเท่ากับ 1.36 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก /มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 0.63 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/มิลลิลิตร และ มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดเมื่อผ่านการหมักไป 45 วัน เท่ากับ 1.24 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก /มิลลิลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีความสามารถใน การต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 1.16 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/มิลลิลิตร



รูปที่ 3-24 การต้านออกซิเดชันโดยวิธี Folin-Ciocalteu’s reagent ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

8.4 Lipid peroxidation assay

จากการที่ ปริมาณ MDA ในน้ำหมักสาหร่ายที่สูงขึ้นนั้นจั ดว่าเป็นสิ่งหนึ่งที่สามารถบ่งบอกได้โดยอ้อมถึงปริมาณสารอนุมูลอิสระที่มากขึ้นด้วย (จารุณีและคณะ, 2550) ดังนั้นความสามารถในการต้านออกซิเดชัน จึงพิจารณา จากปริมาณ MDA ที่ลดลง จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณ MDA ในสารตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบเป็นปริมาณสา รมาตรฐานคือ Trimethylpropane (TMP) จากนั้นคำนวณผลรายงานเป็นปริมาณ MDA (มิลลิกรัม/ลิตร) จากผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 3-25 ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ดีที่สุด เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 มีปริมาณ MDA เท่ากับ 118.96 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อใช้เวลาการหมัก 30 และ 45 วัน มีปริมาณ MDA เท่ากับ 98.54 และ 95.21 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วันมีค่าปริมาณ MDA เท่ากับ 111.04 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนาง สูตรชุด C สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ดีที่สุด เมื่อใช้เวลาการหมัก 30-45 วัน ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 มีปริมาณ MDA เท่ากับ 118.96 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีปริมาณ MDA เท่ากับ 143.13 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่า น้ำหมักสาหร่ายผมนาง สูตรดั้งเดิม ไม่สามารถ ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 มีปริมาณ MDA เท่ากับ 118.96 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 มีปริมาณ MDA เท่ากับ 156.35 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงว่า น้ำหมักสาหร่ายผมน างชุด B ไม่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation



รูปที่ 3-25 การต้านออกซิเดชันโดยวิธี Lipid peroxidation assay ของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

9. คุณภาพทางจุลชีววิทยาและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช

จากตาราง 3-13 พบว่าทุกชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระ คือตรวจไม่พบ Total coliforms และตรวจไม่พบเชื้อก่อโรค *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุดชุดการทดลองมี ค่าพีเอช อยู่ระหว่าง 3.17-3.80 ซึ่งทุกชุดการทดลอง ผ่านเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) ที่กำหนดให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของน้ำหมักพืชมีพีเอชต่ำกว่า 4.3 ส่วนปริมาณเอทานอล พบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ชุด B และชุด C คือ 3.66, 2.30, 1.65 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) ที่กำหนดให้ มีเอทานอลไม่เกิน 30 กรัม/ลิตร ส่วนการตรวจหา จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอย่างเช่นปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) แบคทีเรียแลกติก (LAB) และยีสต์ เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และ ชุด C มีปริมาณ TBC เหลือเท่ากับ 4.32, 4.18 และ 6.23 log CFU/ml ตามลำดับ พบว่าประเภทของจุลินทรีย์ที่พบหลงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากที่สุดคือ แบคทีเรียแลกติก เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ชุดการทดลองที่เติม กล้าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่มากกว่าชุดที่ไม่เติม กล้าเชื้อ

โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B และ ชุด C มีแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่ 3.49 และ 5.97 log CFU/ml ขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่ 2.65 log CFU/ml ปริมาณยีสต์ที่ปนเปื้อนในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง โดยเริ่มต้นน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C มียีสต์เท่ากับ 5.89, 5.78 และ 5.95 log CFU/ml ตามลำดับ พบว่ายีสต์มีแนวโน้มลดลงตลอดอายุการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C ยังคงมีปริมาณยีสต์ 2.60, 2.50 และ 3.57 log CFU/ml ตามลำดับ น้ำหมักทุกชุดการทดลองไม่ผ่าน เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) ซึ่งกำหนดปริมาณยีสต์ต่ำกว่า 2 log CFU/ml (100 เซลล์/มิลลิลิตร) (กองวิเคราะห์อาหาร) (ตารางที่ 3-13) และถ้าหากพิจารณาว่าน้ำหมักมักถูกเจือจางก่อนการดื่ม ก็จะผ่านเกณฑ์กำหนดในทุกชุดการทดลอง

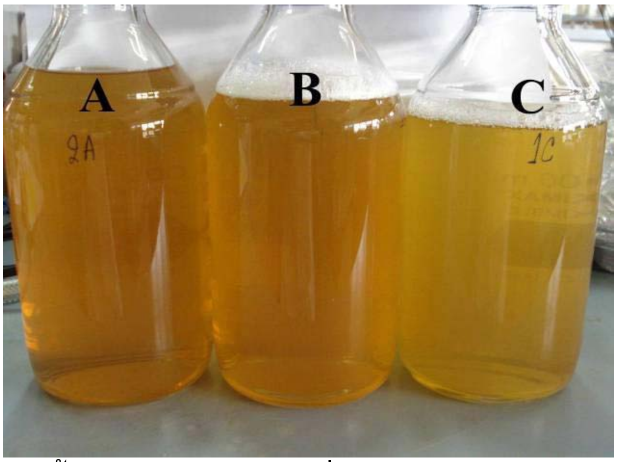
ตารางที่ 3-13 คุณภาพทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรต่างๆ เมื่อมีอายุหมัก 60 วัน กับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547)

ลักษณะ	ชุด A น้ำหมักสูตรดั้งเดิม	ชุด B น้ำหมักสูตรดั้งเดิม + 5% DW12, pH 6	ชุด C น้ำหมักสูตรดัดแปลง + 5% DW12, pH 6	มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547)
TBC (log CFU/ml)	4.32	4.18	6.23	-
LAB (log CFU/ml)	2.65	3.49	5.97	-
Yeast (log CFU/ml)	2.60	2.50	3.57	2
Salmonella sp. (เซลล์/50 มิลลิลิตร)	ND	ND	ND	ND
S. aureus (เซลล์/1 มิลลิลิตร)	ND	ND	ND	ND
C. perfringens (เซลล์/0.1 มิลลิลิตร)	ND	ND	ND	ND
Total coliforms	ND	ND	ND	-
E. coli (MPN//100 มิลลิลิตร)	ND	ND	ND	2.2
พีเอช	3.32	3.17	3.80	4.3
เอทานอล (กรัม/ลิตร)	3.66	2.30	1.65	30
เมทานอล* (กรัม/ลิตร)	ND	ND	ND	0.24

หมายเหตุ TBC = Total bacterial count
LAB = Lactic acid bacteria
ND (Not detected)
- คือไม่มีการกำหนด
* ขีดขั้นต่ำในการตรวจวัด (LOQ): เมทานอล = 0.1 กรัม/ลิตร

10. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

การทดสอบ ทางประสาทสัมผัส เริ่มทำ โดยการชิมตัวอย่างน้ำหมักสาห ร่ายผมนางอายุ 120 วัน จำนวน 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 3-26) โดยเตรียมตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 แก้ว ทดสอบการประเมินทางประสาทสัมผัส แบบ Hedonic test โดยมีผู้ทดสอบ 20 คน ซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท /เอก และบุคลากร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อายุระหว่าง 20-55 ปี และไม่เคยผ่านการฝึกฝนการทดสอบทางประสาทสัมผัสมาก่อน แล้วให้คะแนนความชอบทั่วไปในด้านสี กลิ่น รสชาติ ความใส และการยอมรับ รวม โดยให้คะแนน เป็นความแตกต่าง แบบ Hedonic-5-scale คือ 5 = ยอมรับมากที่สุด 4 = ยอมรับมาก 3 = ยอมรับ 2 = ยอมรับน้อย และ 1 = ไม่ยอมรับ (แบบฟอร์มการทดสอบ ภาคผนวก ง) แล้วนำข้อมูล มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Multivariate General Linear Model โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดทดสอบโ ดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 3-26 ลักษณะของน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส

เมื่อกำหนดให้ ชุด A คือสูตรดั้งเดิม (สาหร่ายผมนาง: น้ำตาลทราย: น้ำสะอาด อัตราส่วน 3: 1: 10 (w/w/v)) ไม่เติมกล้าเชื้อ พีเอชเริ่มต้น 6.0 (ชุดควบคุม)

ชุด B คือสูตรดั้งเดิม เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% พีเอชเริ่มต้น 6.0 (ดั้งเดิม-กล้าเชื้อ)

ชุด C คือสูตรดัดแปลง ปรับปริมาณน้ำตาลทราย 6% (w/v), MSG 1% (w/v) พีเอชเริ่มต้น 6.0 เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5 % (ดัดแปลง-กล้าเชื้อ)

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของ น้ำหมักสาหร่ายผมนาง จากผู้ประเมินทั้งหมด 20 คน มีดังนี้ (ตารางที่ 3-14)

ในด้านกลิ่น กลิ่นของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และชุด A มีกลิ่นหมักและมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย ส่วนในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่มีกลิ่นหมักมากกว่าชุด B และชุด A จากผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ได้รับคะแนนสูงสุด (2.85) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (2.75) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับคะแนนด้านกลิ่นน้อยที่สุด (1.80) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P 0.05)

ในด้านรสชาติ รสชาติของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีรสชาติเปรี้ยวอมหวาน ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีรสชาติเปรี้ยว อย่างเดียว ซึ่งแตกต่างกับ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่มีรสชาติเปรี้ยวและมีรสเค็มเล็กน้อย จากผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ได้รับคะแนนสูงสุด (2.85) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A (2.75) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับคะแนนด้านรสชาติน้อยที่สุด (1.80) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P 0.05)

ในด้านสี พบว่าสีของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B มีน้ำตาลอมส้ม ซึ่งแตกต่างกับสีของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่มีสีเหลืองอมน้ำตาล จากผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ได้รับคะแนนสูงสุด (3.95) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B (3.80) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับคะแนนด้านสีน้อยที่สุด (3.30) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ(P 0.05)

ในด้านความใสของน้ำหมัก พบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B มีความใสใกล้เคียงกัน ไม่มีตะกอน แตกต่างเล็กน้อยกับน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่มีความขุ่นกว่าเล็กน้อย จากผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ได้รับคะแนนสูงสุด (3.75) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B (3.70) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับคะแนนด้านความใสน้อยที่สุด (3.05) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P 0.05)

ในด้าน การยอมรับรวม เมื่อดูจากการยอมรับโดยรวม ผู้ชิมทั้งหมดให้การยอมรับน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B ใกล้เคียงกันทั้งในด้าน กลิ่น รสชาติ สี และความใส ส่วนในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ผู้ชิมส่วนใหญ่ยอมรับได้ปานกลางในด้านสีและความใส แต่ยอมรับได้น้อยมากในด้านกลิ่นและรสชาติ จากผลการทดสอบพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ได้รับการยอมรับรวมคะแนนสูงสุด (3.05) รองลงมาคือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A

(2.90) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับการยอมรับรวม น้อยที่สุด (2.10) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P 0.05)

ตารางที่ 3-14 ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่มีอายุหมัก 120 วัน

ชุดการทดลอง	การยอมรับรวม	กลิ่น	รสชาติ	สี	ความใส
ชุด A น้ำหมักสูตรดั้งเดิม	2.90^{a}*	2.75^{a}	2.75^{a}	3.95^{a}	3.75^{a}
ชุด B น้ำหมักสูตรดั้งเดิม + 5% DW12, pH 6.0	3.05^{a}	2.85^{a}	2.85^{a}	3.80^{a}	3.70^{a}
ชุด C น้ำหมักสูตรดัดแปลง + 5% DW12, pH 6.0	2.10^{b}	1.80^{b}	1.80^{b}	3.30^{b}	3.05^{b}

หมายเหตุ *ตัวเลขที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแต่ละสดมภ์หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 58 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติก ได้ 317 ไอโซเลท จากอาหารหมัก 44 ตัวอย่าง คิดเป็น 75.86% กรณีที่ไม่พบแบคทีเรียแลกติกในปลาร้า และบูดู (ตาราง 3-1) อาจมีสาเหตุจากอาหารทั้งสองชนิดมีความเค็มมาก โดย มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มีค่าสูงประมาณร้อยละ 12-24 (Tanasupawat, 1998) ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ ในอาหารรวมถึงแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ทนเกลือ นอกจากปัจจัยของปริมาณเกลือ ค่าพีเอช และอายุ การเก็บของอาหารหมักแล้วยังพบว่ามีปัจจัยอย่างอื่นอีกที่สำคัญคือการใช้สารกันบูดหรือสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ อาจทำให้แยกแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักบางชนิดได้น้อย และไม่ได้เลย (จุไรรัตน์, 2550)

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกาบา

แบคทีเรียแ ลกติกส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตกาบาได้ เป็นเชื้อที่ คัดแยกมาจากผักดอง เช่น กระเทียมดอง พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกาบ าได้จำนวน 10 ไอโซเลท จากตัวอย่างที่นำมาทดสอบ 10 ไอโซเลท (10/10) สะตอดอง (4/4) ผักกาดดอง (6/9) น้ำหมักชีวภาพจากพืช (15/20) (ตารางที่ 3-3) รวมทั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW12 ที่สามารถผลิตกาบาได้สูงสุด (รูปที่ 3-3) และใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตน้ำหมักสาหร่ายผมนางในการศึกษาครั้งนี้ ก็คัดแยกมาจากน้ำหมักชีวภาพเช่นกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยอื่นๆ ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรี ยแลกติกที่ผลิตกาบาได้จากผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว เช่น *L. hilgardii* K-3, *L. sakei* B2-16, *L. buchneri, L. brevis* OPK-3 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B ที่คัดแยกได้จากกิมจิ (Kim et al. 2002; Kook et al., 2004; Park and Oh, 2005; Cho et al., 2007; Lu et al.,2008) และ *Lactobacillus* sp. LI3 คัดแยกจาก Senmaizuke (ผักดองแบบดั้งเดิมของเมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น) (Ueno et al., 2007) ข้อดีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกมาจากน้ำหมักชีวภาพและนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง คือคาดว่าเชื้อจะสามารถปรับตัวได้เร็วและเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเชื้อ 2 ไอโซเลทที่สามารถผลิตกาบาได้มากและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P 0.05) คือ ไอโซเลท DW12 และ YA031 แต่เนื่องจากไอโซเลท YA031 เป็นเชื้อ *L. acidophilus* (ตารางที่ 3-4) ที่แยกจากโยเกิร์ตจึงไม่ได้นำไปศึกษาต่อ และไอโซเลท DW12 เป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพจากพืชจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อของน้ำหมักชีวภาพ

3. ผลการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ผ่านการคัดเลือก

การทดสอบความสามารถในกา รหมักคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DW12 สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานได้ จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ Amygdalin, Cellobiose, Esculin, Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannitol, Raffinose, Ribose, Sorbitol, Sucrose และ Trehalose (ตารางที่ 3-4 และ 3-5) จึงเหมาะสำหรับเป็นกล้าเชื้อสำหรับน้ำหมักชีวภาพเพราะสามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส ซึ่งอาจพบในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง อีกทั้งยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 45 °C ซึ่งเหมาะสมกับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักคือ 30±2 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิเกือบทั้งปีของเขตร้อน เช่น ประเทศไทย *L. plantarum* DW12 จัดเป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Facultative heterofermenter สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกได้ 50% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 25% และกรดอะซิติกหรือเอทานอล 25% ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนแ ละไม่มีออกซิเจน สามารถทำให้พีเ อช ลดต่ำลง ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่ต้องการอย่างหนึ่งของแบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมแก่การพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพ เพราะกรดอิ นทรีย์ เช่น กรดแลกติกและกรดอะซิ ติก รวมทั้งเอทานอล ที่เกิดจากแบค ทีเรียแลกติกมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น แบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* และยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 (ศศิธร, 2548) *S. aureus* PSSCMI 0004, *Salmonella* sp. PSSCMI 0002 และ *V. parahaemolyticus* VP4 (Kantachote et al., 2008; Kantachote and Charernjiratrakul, 2008b) และพบว่าแบคทีเรียแลกติก ที่มีบทบาทในการหมักในน้ำหมักชีวภาพได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum, L. plantarum, L. fermentum* และ *L. brevis* (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008b)

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากสมการที่ (2) $Y = 6.53609 - 5.0857X_1 + 8.63364X_2 - 2.08182X_2^2$ อธิบายได้ว่าปริมาณกาบาขึ้นกับค่าความเข้มข้นของ น้ำตาลทราย และปริมาณ MSG ส่วนค่า

พีเอชเริ่มต้นในการหมัก ไม่มีผลต่อการผลิตกาบา ดังนั้น เมื่อทวนสอบหรือยืนยันผลการทดลอง แล้วจึงเลือก สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาคือ ต้องการใช้ MSG ให้น้อยที่สุด เพราะส่งผลรบกวนต่อรสชาติของน้ำหมักและการยอมรับของผู้บริโภค แต่ต้อง สามารถผลิตกาบาได้มาก จึงเลือกใช้ MSG 1% พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักวิเคราะห์โดยใช้ CCD คือพีเอช 5.73 (Desirability = 0.936) เมื่อทวนสอบหรือยืนยันผลการทดลองได้ ปริมาณกาบา เท่ากับ 25.01 มิลลิกรัม /ลิตร ใกล้เคียงมากกับชุดการทดลองที่ 9 (25.04 มิลลิกรัม /ลิตร) ที่มีอัตราส่วนของน้ำตาลทราย: MSG: pH คือ 6: 1: 6 ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอช 6.0 เป็นพีเอชเริ่มต้นในการหมัก เนื่องจากเมื่อเกิดกระบวนการหมักค่าพีเอชในน้ำหมักจะลดลงอีก และช่วงพีเอช 5.73-6.0 มีความเหมาะสมต่ อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก อัตราส่วนที่นำไปใช้สำหรับน้ำหมักสาหร่ายสูตรดัดแปลงคือน้ำตาลทราย: MSG: pH คือ 6: 1: 6

L. plantarum DW12 สามารถผลิตกาบาได้เท่ากับ 25.04 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ยังมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบ กับงานวิจัยอื่นๆ ที่เลือกใช้ ปริมาณ MSG 1% เช่น Ueno และคณะ (1997) สามารถคัดแยก *L. brevis* ได้จากกิมจิ และผลิตกาบาได้ 5,090 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร Glucose-Yeast extract-Peptone (GYP) medium ที่ผสม 1% MSG Lu และคณะ (2008) คัดแยก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B จากกิมจิ สามารถผลิตกาบา 3,680 มิลลิกรัม/ลิตร ในอาหาร MRS broth ที่ผสม 1% MSG ส่วน Park และ Oh (2007) คัดแยก *L. brevis* OPK-3 และ *L. brevis* OPY-1 ได้จากกิมจิ สามารถผลิตกาบาได้ 424.67 และ 2,023 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในอาหาร MRS broth ที่ผสม 1% MSG สำหรับปริมาณน้ำตาล ทรายที่เลือกใช้ 6-12% ซึ่งเหมาะสมสำหรับน้ำหมักชีวภาพเพื่อดื่ม ไม่หวานเกินไป และเป็นปริมาณน้ำตาลที่สูงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ดวงพรและคณะ , 2547) ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสม ในการเริ่มต้นหมักคือ พีเอช 6 เพราะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก (Salminen and Wright, 1993)

5. กระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

5.1 การทำน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

วัตถุดิบ ที่นำมาใช้ในการหมักคือสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) ซึ่งเป็นสาหร่ายทะเลประเภทสาหร่ายสีแดง เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่ง ผลิตกาบาจากธรรมชาติ ที่จะนำมาผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ ส่วนใหญ่คือผั กและผลไม้ (Kim et al., 2009) และมีการศึกษาแหล่งผลิตกาบาจากพืชทางทะเล เช่น สาหร่ายทะเล น้อยมาก จึงเป็นสาเหตุที่เลือกสาหร่ายผมนางเป็นวัตถุดิบในการทำน้ำหมักชีวภาพครั้งนี้ เนื่องจาก สาหร่ายผมนาง

ประกอบด้วย คารโบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมันจำเป็น (ω-3 และ ω-6) เส้นใย วิตามิน และ แร ธาตุ ซึ่งมีปริมาณสูงกว า พืชทั่วไป (Burtin, 2003; MacArtain et al., 2007) และมีรายงานว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีความสามารถ anticoagulation ป้องกันเซลล์เสียหายจากการ ออกซิไดซ์ได้ มีความสามารถในการ ต้าน ออกซิเดชัน และ มีฤทธิ์ immunomodulatory (Athukorala et al., 2007; Kim and Joo, 2007) และสามารถพบได้ในทะเลสาบสงขลาและอ่าวปัตตานี จึงทำให้ง่ายต่อการหาวัต ถุดิบ รวมทั้งเลือกใช้น้ำตาลไม่ฟอกสีมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน เรียกว่าน้ำตาลแร่ธรรมชาติ เม็ดใหญ่กว่าน้ำตาลทรายโดยทั่วไป เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค

5.2 บทบาทของจุลินทรีย์

แบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria count: TBC) จากรูปที่ 3-11 พบว่าช่วง 2 วันแรกของการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อดั้งเดิมที่อยู่ในสาหร่ายผมนางมีความได้เปรียบในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ ส่วนแบคทีเรียทั้งหมดที่ลดลงในช่วง 2 วันแรกของการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และในช่วง 4 วันแรกของการหมัก ชุด C เนื่องจากกล้าเชื้อที่เติมลงไป ยังไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ได้ การที่จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำห มักชุด B และชุด C มีสูงกว่าชุด A นั้นเนื่องจากมีการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% รวมกับเชื้อดั้งเดิมที่มีอยู่ในสาหร่ายผมนางด้วย โดยสังเกตจากชุด A ซึ่งเป็นชุดควบคุม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นสูงถึง 7.45 log CFU/ml เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นแบบไม่ได้พาสเจอไรซ์หรือฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนหมัก จึงมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ จากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ($P<0.05$) ส่งผลให้ตลอดระยะเวลาการหมักมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แตกต่างกัน เมื่ออายุการหมักครบ 7 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และชุด C แบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากความสามารถในการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดทั้งแบคทีเรียดั้งเดิมที่มีอยู่ในสาหร่ายผมนางและกล้าเ ชื้อที่เติมลงไป เมื่อครบ 21 วันปริมาณ แบคทีเรียทั้งหมดของน้ำหมักสาหร่ายผมนางทั้งสามสูตรมีค่าลดลง เพราะการดำรงชีวิตของแบคทีเรียทั้งหมดนั้นจำเป็นต้องมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม แต่เมื่อปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นต่อเนื่องมาจากการผลิตกรดจากน้ำตาลที่ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง 1.05-2.06 กรัม/100 มิลลิลิตรและพีเอชที่อยู่ในช่วง 3.17-3.80 (รูปที่ 3-14, 3-15, 3-16) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย (Jay, 2002) แบคทีเรียทั้งหมดจึงมีแนวโน้มลดลง เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ชุด B และ ชุด C มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเหลือเท่ากับ 4.32, 4.18 และ 6.23 log CFU/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งหมด ส่วนใหญ่น่าจะเป็นแบคทีเรียแลกติก โดยเฉพาะน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ ชุด C (รูปที่ 3-11, 3-12)

ส่วนปริมาณแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) เริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรที่เติมกล้าเชื้อคือ ชุด B และ ชุด C มีค่าเท่ากับ 8.24 log CFU/ml และ 9.16 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ($P<0.05$) อาจเป็นเพราะขณะที่เติมกล้าเชื้อลงในถังหมัก การกระจายของกล้าเชื้อในถังหมักยังไม่สม่ำเสมอ และการที่ชุด C มีปริมาณเชื้อสูงกว่าอาจเป็นเพราะว่าชุดนี้มีก ารเติม MSG และมีน้ำตาลน้อยกว่าเชื้อจึงกระจายตัวได้ดีกว่า แต่ปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสม น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A เมื่อเริ่มต้นการหมักพบว่ามี แบคทีเรียแลกติก เริ่มต้น 2.37 log CFU/ml จากรายงานของ Prachyakij และคณะ (2008) ได้ศึกษาการผลิตน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุดที่หมักแบบธรรมชาติไม่ เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 มีแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้น 1.5 log CFU/ml แสดงว่าในการหมักครั้งนี้มีเชื้อแบคทีเรียแลกติกดั้งเดิมที่ติดมากับสาหร่ายผมนางมีปริมาณมาก กว่า อาจเนื่องจาก ความแตกต่างของ แหล่งที่มาของวัตถุดิบ ส่วนงานวิจัยของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008b) ได้เตรียมกล้าเชื้อ *L. plantarum* W90A ความเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร สำหรับเป็นกล้าเชื้อในน้ำหมักลูกยอป่า เมื่อนำไปตรวจนับพบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นของ *L. plantarum* W90A เท่ากับ 8.6 log CFU/ml ส่วนการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW3 ของ Prachyakij และคณะ (2008) มีแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นเท่ากับ 8 log CFU/ml

น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ C หลังจากการหมัก 1-4 วัน มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกลดลง ซึ่งการลดลงนั้นคงอยู่ในช่วงการปรับตัวของแบคทีเรี ยแลกติกทั้งที่มีอยู่ดั้งเดิมและที่เติมลงไปเพื่อให้เข้ากับสภาวะ แวดล้อมใหม่ ทำให้แบคทีเรียแลกติกใน ชุดที่เติมกล้าเชื้อ ลดลง (รูปที่ 3-12) เมื่อสังเกตจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลลดลง (รูปที่ 3-14) ขณะเดียวกับค่าความเป็นกรดมีแนวโน้ วเพิ่มมากขึ้น และส่งผลให้ค่าพีเอชลดลง (รูปที่ 3-15, 3-16) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกพบว่าแบคทีเรียแลกติกในน้ำหมักสาหร่ายผมนางมีการปรับตัวที่ดี โดยดูจากปริมาณแบคทีเรียแลกติก ค่าพีเอชโดยเฉลี่ย 4.13 ซึ่งยังเอื้อต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติก (รูปที่ 3-15) การปรับพีเอชเมื่อเริ่มต้นการหมักเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อส่งเสริมการเจริ ญของ แบคทีเรียแลกติกที่ ชอบสภาพเป็นกรดเล็กน้อยระหว่าง 5.58-6.20 (Salminen and Wright, 1993) เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ชุดการทดลองที่เติม กล้าเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่มากกว่าชุดที่ไม่ เติมกล้าเชื้อ โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ชุด B และ ชุด C มีแบคทีเรียแลกติกเหลืออยู่ 2.65, 3.49 และ 5.97 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เหลืออยู่ จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่เหลืออยู่คือแบคทีเรียแลกติก

สำหรับน้ำหมักสาห ร่ายผมนางชุด C มีปริมาณแบคทีเรียแลกติ กมากส่งผลต่อปริมาณกรดที่ได้ ชุด C จึงมีปริมาณกรด ทั้งหมดสูงสุด (2.06 กรัม/100 มิลลิลิตร) (รูปที่ 3-12, 3-16) จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก

ลงไปให้ค่าความ เป็นกรดมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมกล้าเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทในการผลิตกรดนั่นเอง การลดลงของน้ำตาลมีความสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดและค่าพีเอช เมื่อปริมาณน้ำตาลลดลง ทำให้ค่าความเป็นกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้น และพีเอชมีค่าต่ำลง (รูปที่ 3-14, 3-15, 3-16) เมื่อพิจารณาระหว่าง น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C และชุด B ที่มีการเติมกล้าเชื้อเหมือนกันแต่ปริมาณน้ำตาลที่เติม ลงไปแตกต่างกัน โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีความเข้มข้น ของน้ำตาลน้อย กว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B แต่จากการทดลองพบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีค่าพีเอชลดลงน้อยกว่าแต่ปริมาณกรดสูงกว่ามาก อาจเนื่องมาจากน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีการเติม MSG ซึ่งอาจมีคุณสมบัติเป็นตัวช่วยให้พีเอชเปลี่ยนแปลงน้อย (high buffer capacity) แต่การที่มีปริมาณกาบาสูงจึงส่งผลให้มีความเป็นกรดสูงขึ้น ทำให้น้ำหมักสาหร่ายผมนา งชุด C มีค่าพีเอช ลดลง น้อยกว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B

สำหรับ ยีสต์ การที่น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองมียีสต์ลดลงหลังจากวันที่ 1 เพราะว่านอกจากกล้าเชื้อที่เติมลงไปแล้ว แบคทีเรียแลกติกดั้งเดิมที่มีอยู่ในชุดการทดลองนี้อาจมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเจริญข องยีสต์ที่ปนเปื้อนมา เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน พบยีสต์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของน้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองในปริมาณที่สูง 2-3 log CFU/ml และในระหว่าง การหมักมีปริมาณเอทานอลสูง (1.65-3.66 กรัม/ลิตร) เมื่อเทียบกับปริมาณ กรดอะซิติก (0.26-0.33 กรัม/100 มิลลิลิตร) และกรดแลกติก (0.52-0.92 กรัม/100 มิลลิลิตร) (รูปที่ 3-17, 3-18) จำนวนยีสต์ที่ลดลงอาจเกิดจากการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่อยู่ในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง มีหลายง านวิจัยที่กล่าวว่า แบคทีเรียแลก ติกกลุ่ม *Lactobacillus* sp. สามารถสร้างสารที่อ อกฤทธิ์ยับยั้งราและยีสต์ได้ เช่น *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 สามารถยับยั้ง *Aspergillus fumigatus, A. nidulans, Penicillium roqueforti, Mucor hiemalis, Talaromyces flavus, Fusarium poae, F. graminearum, F. culmorum* และ *F. sporotrichoides* (Magnusson et al., 2003) มีรายงานว่า *L. plantarum* สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ ยับยั้งราเส้นใยและยีสต์ (Strom et al., 2002; Sjogren et al., 2003)

สำหรับเชื้อ *L. plantarum* DW3 ที่คัดแยกจากน้ำหมักสาห ร่ายผมนางและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Duangjitcharoen, 2006) มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ที่ปนเปื้อนในน้ำหมักได้ เช่น *Rhodotorula* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp., *Endomycopsis* sp. และ *Candida* sp. (Prachyakij et al., 2007) ดังนั้นเมื่อใช้เป็นกล้าเชื้อพบว่าสามารถยับยั้งยีสต์ได้เป็นอย่างดี และได้น้ำหมักที่ ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช.481/2547) ซึ่งกำหนดปริมาณยีสต์ ต้องต่ำกว่า 2 log CFU/ml (100 เซลล์/มิลลิลิตร) (Prachyakij et al., 2008) แต่สำหรับการทดลองนี้ น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน อาจเป็นเพราะเชื้อ *L. plantarum* DW12 มีความสามารถผลิตกาบาได้ดีแต่

ความสามารถในการยับยั้งยีสต์ได้ไม่ดีเท่าที่ควร หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณยีสต์เริ่มต้นมีค่าสูงมาก (5.78-5.95 log CFU/ml) (รูปที่ 3-13) เมื่อเทียบกับ Prachyakij และคณะ (2008) ซึ่งมียีสต์เริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml และถ้าหากพิจารณาว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางมักถูกเจือจางก่อนการดื่มประมาณ 10 เท่า ก็จะผ่านเกณฑ์กำหนดในทุกชุดการทดลอง

5.3 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี-กายภาพในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และ ชุด B มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 10% (สาหร่ายผมนาง: น้ำตาลทราย: น้ำสะอาด ในอัตราส่วน 3: 1: 10 (w/w/v)) ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 6.92% เพิ่มขึ้นประมาณ 1% จากที่เติมคือ 6% อาจเนื่องจากน้ำตาลที่เติมลงไปยังไม่เป็นเนื้อเดียวกัน และ ส่งผลให้ด้านล่างของถังหมักมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่าส่วนบน เมื่อดูดตัวอย่างจากก๊อกด้านล่างถังหมักมาทำให้ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ตามที่กล่าวมา ในวันแรกชุดที่ไม่เติมกล้าเชื้อคือน้ำหมั กสาหร่ายผมนางชุด A มีน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่า (ชุด A = 10.0%, ชุด B = 9.6%) แต่เมื่อครบ 60 วันของการหมัก น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ที่เติมกล้าเชื้อมีน้ำตาลลดลงมากกว่า (ชุด A = 0.78%, ชุด B = 0.81%) (รูปที่ 3-14) เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มี พีเอช 3.32 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีพีเอช 3.17 และน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีพีเอช 3.80 และเมื่อพิจารณาถึงค่า พีเอช ให้ผลสอดคล้องกับการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลกติก ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเป็นกรดและปริมาณน้ำตาล โดยพบว่าชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อ คือ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีค่าความเป็นกรด 2.06 กรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ที่มีค่าความเป็นกรด 1.05 กรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งชัดเจนว่าเป็นเพราะมีแบคทีเรียแลกติกมากกว่า (รูปที่ 3-12, 3-16) มีบทบาทในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่ง อาหารและสร้างกรด เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียแลกติกกับน้ำตาล พบว่าปริมาณน้ำตาลของ น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C เหลือ 0.55% ซึ่งน้อยกว่าการทดลองชุดอื่นๆ ซึ่ง เป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ต่ำกว่า

สำหรับค่าความเป็นกรด (Acidity) ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 3-16) อันเนื่องมากจากการหมักของ แบคทีเรียแลกติก โดยใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรท สำหรับน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก มากส่งผลต่อปริมาณกรดที่ได้ สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าน้ำ หมักสาหร่ายผมนางที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงไปให้ค่าความปีนกรดมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมกล้าเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทในการผลิตกรดนั้นเอง การลดลงของปริมาณ

น้ำตาลและค่าพีเอชมีความสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดและปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3-16, 3-17)

ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตามอายุการหมัก (รูปที่ 3-18) เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ปริมาณเอทานอลสูงสุดพบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A คือ 3.66 กรัม/ลิตร ตามด้วยน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และชุด C (2.30, 1.65 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น น่าจะเป็นบทบาท จากยีสต์ที่เหลืออยู่ มากกว่า จากกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 (Facultative heterofermenter) ทั้งนี้เป็นเพราะน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ที่ไม่เติมกล้าเชื้อ มีเอทานอลสูงกว่าชุดที่ เติมกล้าเชื้อ และเป็นที่ทราบดีว่ายีสต์เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถหมักน้ำตาลได้เอทานอลในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ และเป็นเชื้อ ทั่วไปที่พบว่าปนเปื้อนในน้ำหมักชีวภาพ (Prachayakij et al. 2007) ส่วนกรณีที่ ทุกชุดการทดลอง ตรวจไม่พบเมทานอลเลยตลอดการหมัก 60 วัน แสดงว่าโดยธรรมชาติสาหร่ายผม นางเป็นพืชที่มีปริมาณเพคตินต่ำ ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตามอายุการหมักทุกชุดการทดลอง แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช.481/2547) ที่กล่าวว่า เอทานอลต้องไม่เกิน 30 กรัม/ลิตร (ร้อยละ 3) เมทานอลต้องไม่เกิน 240 มิลลิกรัม/ลิตร

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity: EC) และปริมาณของธาตุต่างๆ พบว่า ค่านำไฟฟ้า มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากวันแรกของการหมัก ค่า EC เริ่มต้นของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และ ชุด B เท่ากับ 0.09 และ 0.20 mS/cm เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ค่า EC ของน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และ ชุด B เท่ากับ 0.36 และ 0.50 mS/cm ตามลำดับ ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C ค่า EC สูงกว่าชุด A และชุด B มาก โดยมีค่า เริ่มต้นเท่ากับ 0.74 mS/cm และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน ค่า EC เท่ากับ 1.66 mS/cm (รูปที่ 3-19) เป็นผลมา จากธาตุต่างๆ เช่น ปริมาณโซเดียม เหล็กและโพแทสเซียม รวมถึงสารอินทรีย์ที่แตกตัวอยู่ในรูปไอออน อาจอธิบายได้ว่า กรดและเอทานอลที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก และยีสต์ ทำให้สารหรือแร่ธาตุต่างๆ ของสาหร่ายผมนางละลายออกมาในน้ำหมัก สำหรับน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B และ ชุด C ที่เติมกล้าเชื้อลงไปมีปริมาณเหล็กและโพแทสเซียมมากกว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A (รูปที่ 3-20B, 3-20C) เนื่องจากกรดอินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่าง กระบวน การหมักของแบคทีเรียแลกติก และ กล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 ที่เติมลงไป สามารถส่งผลต่อ ปริมาณเหล็กและโพแทสเซียม ที่สะสมอยู่ในสาหร่ายผมนางละลาย ออกมาโดยเฉพาะกรด ทาร์ทาริก (tartaric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) มีผลต่อการปลดปล่อยธาตุเหล็ก (Gillooly et al., 1983; Glahn et al., 1998; Salovaara et al., 2002) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจวิเคราะห์หากรดอินทรีย์ทั้งสอง สำหรับน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่เติมกล้าเชื้อและเติม MSG นั้น มีค่านำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นมากที่สุดนั้นเป็นผลร่วมกันระหว่างปริมาณ MSG ที่มีโซเดียมเป็นส่วนประกอบ (รูปที่ 3-18, 3-19)

สำหรับธาตุเหล็ก (Fe) โซเดียม (Na) โพแทสเซียม (K) และสังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3-20) เป็นข้อดีเพราะว่าธาตุเหล่านี้มีประโยชนต่อร่างกาย ธาตุสังกะสีและธาตุเหล็ก เป็น cofactor ของเอนไซม์ที่ต่อต้านการออกซิเดชัน (Woodruff et al, 2004) ธาตุโซเดียมในน้ำหมั กสาหร่ายผมนางที่มีอายุการหมัก 60 วัน เพิ่มขึ้นมากที่สุด ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C โดยมีปริมาณโซเดียมสูงสุด 847.63 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3-20A) เนื่องจากน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด C มีการเติม MSG ลงไปเพื่อเป็น ตัวกระตุ้นในการผลิตกาบา ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนา งชุด A และชุด B มีปริมาณธาตุโซเดียม 28.90-29.87 มิลลิกรัม/ลิตร ใกล้เคียงกับรายงานของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008a) ที่พบธาตุโซเดียมในน้ำหมักลูกยอและน้ำหมักสาหร่ายผมนา งที่มีอายุการหมัก 90 วัน ปริมาณ 20-30 มิลลิกรัม/ลิตร จากผลดังกล่าวจึงจำเป็นที่ จะต้องกำหนดปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคน้ำหมักสาหร่ายผมนางแต่ละวัน สำหรับธาตุโซเดียมซึ่งถ้ามีมากเกินไปอาจเกิดผลเสียต่อสุขภาพโดยร่างกายต้องการ 1000-3000 มิลลิกรัม /วัน (ปาหนัน , 2530) ปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่พบในน้ำหมักสาหร่ายผมนางทั้ง 3 ชุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 โดยน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และ C มีปริมาณธาตุโพแทสเซียม (62.43 , 78.87 และ 92.28 มิลลิกรัม /ลิตร ตามลำดับ) (รูปที่ 3-20B) ถือว่ามี ค่าน้อยกว่ารายงานของ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008a) ซึ่งพบโพแทสเซียมในน้ำหมักส าหร่ายผมนางที่มีอายุการหมัก 90 วัน ซึ่งมีค่า 120-180 มิลลิกรัม/ลิตร ทั้งนี้ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากแหล่งของสาหร่ายผมนางที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งใช้ส าหร่ายผมนางจาก จ .ปัตตานี ขณะที่ Kantachote และ Charernjiratrakul (2008a,b) ใช้สาหร่ายผมนางจาก จ .สงขลา ร่างกายต้องการโพแทสเซียม 2000-4000 มิลลิกรัม/วัน (ปาหนัน, 2530) ดังนั้นการบริโภคอาหารอื่นๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็น

จากผลการทดลองตรวจพบตะกั่วในน้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองที่มีอายุการหมัก 0 วัน โดยเฉพาะน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A มีปริมาณตะกั่ว 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร (รูปที่ 3-20F) สาเหตุอาจมาจากตะกั่ว ที่สะสมอยู่ในสาหร่ายผมนางซึ่งมีแหล่งที่มาจากอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี ซึ่ง รองรับน้ำจาก เหมืองแร่ดีบุกในเขตบ้านถ้ำทะลุ อำเภอบันนังสตา จังหวัดยะลา จากรายงานของพรพิมล (2541) พบว่ามีปริมาณ เหล็ก สังกะสี ตะกั่ว ไม่เกิน ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำแหล่งน้ำผิวดิน และมาตรฐานคุณภาพแหล่งน้ำเพื่อการประปาขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1992) โดยปี พ.ศ. 2540 บริเวณอ่าวปัตตานี มีตะกั่ว 0.37 มิลลิกรัม/ลิตร (ณรงค์ศักดิ์ และ สมชาย , 2551) ขณะที่รายงานของประดิษฐ์ (2542) พบสารหนู ตะกั่ว ปรอท สังกะสี และแคดเมียม ในสาหร่ายผมนาง 0-1.25, 1.26-3.31, 0-0.07, 0.07-6.81 และ 0-0.07 มิลลิกรัม /ลิตร ตามลำดับ ระดับตะกั่วในเลือดประมาณ 0.1 มิลลิกรัม /ลิตร ส่งผลต่อระบบประสาทและสมองได้ มาตรฐานระดับตะกั่วในเลือดของผู้ใหญ่ ไม่ควรเกิน 0.40 มิลลิกรัม/ลิตร ในเด็กไม่ควรเกิน 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร (เกณฑ์มาตรฐานกองอาชีวอนามัย กรมอนามัย กระทรวง

สาธารณสุข) และค่ามาตรฐานความปลอดภัยของระดับตะกั่วในเลือดขององค์การอนามัยโลกไม่ควรเกิน 0.20 มิลลิกรัม/ลิตร แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่ 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลอง มีปริมาณตะกั่ว (0.10-0.15 มิลลิกรัม /ลิตร) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ที่ยอมให้มีได้ในเครื่องดื่มหรือน้ำดื่ม คือ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร (ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543)

สำหรับธาตุเหล็ก (รูปที่ 3-20C) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่ 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางทุกชุดการทดลองมีปริมาณธาตุเหล็กสูงกว่ามาตรฐานน้ำดื่มของ USFDA (FDA, 2003) และมาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทของกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 214 (พ.ศ. 2543) โดยในวันแรกของการหมักพบว่ามีปริมาณธาตุเหล็กเล็กน้อย (1.39-2.87 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 60 วัน ปริมาณธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นเป็น 19.07-31.70 มิลลิกรัม/ลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Prachyakij และคณะ (2008) ที่พบว่าในวันแรกของการหมักสาหร่ายผมนางไม่พบธาตุเหล็กแต่เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 60 วัน ปริมาณธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นเป็น 0.16–0.18 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากแร่ธาตุที่อยู่ในกระบวนการหมักสาหร่ายผมนางอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ ธาตุเหล็กที่มีอยู่ในพืชมักอยู่ในรูปที่ไม่ละลาย แต่การหมักทำให้ ธาตุเหล็ก ละลายออกมา การขาด ธาตุเหล็ก เป็นสาเหตุหลักของโรคโลหิตจาง (WHO, 2002) ปริมาณ แร่ธาตุที่ละลายน้ำได้ในน้ำหมักสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก (รูปที่ 3-20C และ 3-16) โดย Bergvist และคณะ (2005) และ Prachyakij และคณะ (2008) พบว่าน้ำหมักที่ใช้แบคทีเรียแลกติกในการหมักสามารถเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กที่ละลายน้ำได้มากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น ปริมาณที่ร่างกายต้องการธาตุเหล็กสำหรับชายอายุ 16 ปีขึ้นไปคือ 10 มิลลิกรัม /วัน ขณะที่ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนต้องการ 15 มิลลิกรัม/วัน และเมื่อพิจารณาการดื่มน้ำหมักมักดื่มในรูปที่เจือจางจึงมีความปลอดภัย และตาม ประกาศกระทรวงสาธารณสุขกำหนดปริมาณธาตุเหล็ก 15 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 214/2543)

ในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C มีปริมาณธาตุทองแดง (Cu) เริ่มต้น 0.001 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักวันที่ 60 น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B มีปริมาณธาตุทองแดงสูงสุด (0.03 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานน้ำดื่ม ที่กำหมดให้มีสูงสุดได้ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งร่างกายต้องการ 2-5 มิลลิกรัม/วัน ทองแดงในปริมาณที่ไม่เป็นพิษมีผลช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ (เสาวนีย์,2532) ส่วนธาตุสังกะสีซึ่งก็ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ธาตุสังกะสีอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ โดยร่างกายต้องการธาตุสังกะสี 15 มิลลิกรัม /วัน (เสาวนีย์ , 2532) และปริมาณสุงสุดที่ยอมให้มีได้ในเครื่องดื่มหรือน้ำดื่ม คือ 5 มิลลิกรัม/ลิตร (ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 และ 234) ธาตุสังกะสีในปริมาณที่ไม่เป็นพิษมีผลช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ

5.4 ปริมาณกาบา

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีการคัดแยกแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกาบาเพื่อใช้ เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *L. plantarum* C48 สามารถผลิตกาบาได้ 16.0 มิลลิกรัม/ลิตร (Leroy et al., 2004; Siragusa et al., 2007) ส่วน Komatsuzaki และคณะ (2005) สามารถคัดแยก *L. plantarum* NFRI 7313 สามารถผลิตกาบาได้มากกว่า 185.62 มิลลิกรัม/ลิตร จากอาหารหมักแบบดั้งเดิมของญี่ปุ่น สำหรับปริมาณกาบาในน้ำหมักสาหร่าย ผมนางพบว่ามีปริมาณกาบาเริ่มต้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, ชุด B และชุด C เท่ากับ 384.44, 560.57 และ 475.39 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องจากตามธรรมชาติสาหร่ายทะเลมีองค์ประกอบคือกรดกลูตามิก (Lee et al., 2010) ซึ่งเป็นสับสเตรทให้แบคทีเรียแลกติกที่ ติดมากับวัตถุดิบหรือกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 ที่เติมลงไปสามารถเปลี่ยนกรดกลูตามิกเป็นกาบาได้ สูง แม้จะไม่เติม MSG ลงไป (ชุด A และ B) อย่างไรก็ตามสำหรับน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ที่มีปริมาณกาบาเพิ่มขึ้นตลอดอายุการหมักเนื่องจากมีการเติม MSG ลงไปแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* DW12 สามารถนำไปเปลี่ยนเป็นกาบา ทำให้มีปริมาณกาบาสูงถึง 3,998.20 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A และชุด B มีกาบาเพียง 339.42 และ 730.29 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาของ Lee และคณะ (2010) พบว่าการเติมก ล้าเชื้อ *L. brevis* BJ20 ในการหมักสาหร่ายแบบดั้งเดิมของประเทศญี่ปุ่น (Sea tangle) สามารถเปลี่ยนกรด กลูตามิกที่มีอยู่ในสาหร่ายตามธรรมชาติให้กลายเป็นกาบา (2,465 มิลลิกรัม/ลิตร) ได้มากกว่าการหมักสาหร่ายที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (23.9 มิลลิกรัม/ลิตร) และยังพบว่ากรดอะ มิโนอื่นๆ เช่น alanine, valine, glycine และ leucine มีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วยหลังจากการหมัก 5 วัน มีรายงานความปลอดภัยในการได้รับกาบาในปริมาณเหมาะสม เช่น ได้รับปริมาณกาบา 120 มิลลิกรัมจากซีอิ้ว ที่มีเกลือน้อย (Less-sodium soy sauce) ที่เกิดจากการหมักของ *Lactobacillus* sp. ซึ่งคัดแยกจาก Miso จำนวน 1 ครั้งต่อวันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ช่วยลดความดันโลหิตสูงในกลุ่มอาสาสมัคร (Yamakoshi et al., 2006) (ดังนั้นถ้าดื่มน้ำหมัก สาหร่ายผมนาง เจือจาง 10 เท่า น้ำหมักจะมีความเข้มข้นของกาบาเท่ากับ 0.40 มิลลิกรัม /มิลลิลิตร ต้องดื่ม ให้ได้ 300 มิลลิลิตร ต่อวัน จึงจะ ได้รับปริมาณกาบา 120 มิลลิกรัม)

6. ความสามารถในการตานออกซิเดชันของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง

จากการทด สอบความสามารถต้าน การออกซิเดชันของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ทั้ง 4 วิธี ซึ่งในแต่ละวิธีแสดงผลการยับยั้งชนิดของอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยวิธี ABTS และ DPPH assay พบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, B และ C มีความสามารถในการต้าน

ออกซิเดชันอนุมูลอิสระ DPPH เริ่มต้นเท่ากับ 4.49%, 4.63% และ 3.60% ตามลำดับ ชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด คือ 19.85% เมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน สอดคล้องกับวิ ธี ABTS assay ที่พบว่า น้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A, B และ C ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ เริ่มต้นเท่ากับ 15.13%, 10.92% และ 11.91% ตามลำดับ และชุด B มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด คือ 24.96 % เมื่อผ่านการหมักไป 30 วัน สามารถสรุปได้ว่า ชุด B ซึ่งเป็นสูตรดั้งเดิมและเติม กล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อนุมูลอิสระ DPPH และ $ABTS^{\cdot+}$ ได้ดีกว่าชุดที่ไม่เติมกล้าเชื้อ และพบว่าในตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด และชุด C สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation ได้ดีที่สุดเมื่อมีอายุการหมัก 30-45 วัน แต่เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ พบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำหมักสาหร่ายทุกชุดการทดลองยังมีค่าน้อย

ความสามารถในการต านออกซิเดชันอาจเกิดจากสาหร่ายผมนาง ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการหมัก (รูปที่ 3-22, 3-23, 3-24) เพราะมีรายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายผมนางมีความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion โดยมีค่าเท่ากับ 0.01±0.001 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก /มิลลิลิตร และมีความสามารถในการยับยั้ง hydroxyl radical มีค่า TEAC เท่ากับ 1.45±0.394 และสามารถยับยั้ง lipid peroxidation มีค่า TEAC เท่ากับ 0.46±0.006 (Jumjai et al., 2009) Lee และคณะ (2010) รายงานว่า สาหร่ายเป็นแหล่งผลิตกาบาและมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ พบว่าสาหร่ายหมัก (fermented sea tangle) ที่ใช้ *L. brevis* BJ20 เป็นกล้าเชื้อมีความ สามารถต้า นออกซิเดชันโดยใช้วิธี DPPH assay มีค่าระหว่าง 87.7- 92.8% เมื่อใช้สาหร่ายหมักความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถ ยับยั้ง Superoxide radicals ได้ 96.2% เมื่อใช้สาหร่ายหมักความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รวมทั้งการใช้น้ำตาลทรายแดงที่ไม่ผ่านการฟอกสี ก็มีผลต่อการต้านออกซิเดชัน สอดคล้องกับรายงานของสาร์ทจีน (2549) ที่กล่าวว่าน้ำหมักชีวภาพที่ใช้น้ำตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการฟอกจางสี มีความสามารถในการ ต้านออกซิเดชัน (โดยวิธี ABTS และ FRAP Assay) สูงกว่าสู ตรที่ใช้น้ำผึ้งเนื่องจากในน้ำ ตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการฟอกจางสี มีสารประกอบพวกโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน

นอกจากนี้ความสามารถในการต้านออกซิเดชันในน้ำหมักสาหร่ายอาจเกิดจากกล้าเชื้อที่เติมลงไปหรือเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติ ที่ติดมากับวัตถุดิบ มีรายงานว่า *L. plantarum* สามารถใช้สารประกอบฟีนอลิกและปลดปล่อยสารประกอบในรูปของกลิ่นออกมาและมีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Rodríguez, 2009) จากการศึกษาของ Lin และ Yen (1999) พบว่าแบคทีเรีย แลกติก 19 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน คือ *L. acidophilus, L. bulgaricus, Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium longum* ทุกสายพันธุ์แสดงความสามารถในการต านออกซิเดชัน โดยมีอัตราการยับยั้งการ autoxidation

ascorbate ในช่วง 7-12% ความสามารถในการตานออกซิเดชันที่แสดงออกได้แก่ ความสามารถในการรวมตัวกับโลหะ การกำจัดอ อกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การยับยั้งเอนไซม์ เช่น *S. thermophilus* 821 มีความสามารถในการรวมตัวกับโลหะ Fe^{2+} และ *B. longum* 15 708 มีความสามารถในการรวมตัวกับโลหะ Cu^{2+} เชื้อ *L. acidophilus* E มีความสามารถในการยับยั้ง hydroxyl radical สูงสุดส่วน *B. longum* B6 มีความสามารถในการยับยั้ง hydrogen peroxide ดีที่สุดและมีปริมาณ reducing activity มากที่สุด

จากการศึกษาการหมักน้ำหมักลูกยอของ Wang และคณะ (2009) พบว่าเมื่อเติมกล้าเชื้อ *B. longum* ลงไปในน้ำหมักลูกยอทำให้น้ำหมักมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าการเติมเชื้อ *L. casei* และ *L. plantarum* ทั้งนี้ลักษณะทางเคมี-กายภาพที่เปลี่ยนไปของน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่แตกต่างกันเช่นปริมาณกรดอินทรีย์และสารประกอบที่แบคทีเรียแลกติกผลิตออกมาอาจมีผลต่อความสามารถต้านออกซิเดชันได้ด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของสาร์ทจีน (2549) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำหมักชีวภาพจากลูกยอ อัตราส่วนของลูกยอ : น้ำผึ้ง: น้ำ (ในอัตราส่วน 3: 1: 10) และเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp. 10% โดยวิธี ABTS (2, 2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) free radical decolorizing assay พบว่าน้ำหมักชีวภาพมีความสามารถในการต านออกซิเดชันสูงสุดในวันที่ 15 ของกระบวนการหมัก และวิธี Chelating effect on ferrous พบว่าน้ำหมักชีวภาพมีค่า Chelating power สูงสุดในวันที่ 15 ของกระบวนการหมักอาจเนื่องมาจากปริมาณกรด แลกติกที่มีปริมาณเพิ่มสู งขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่อาจกล่าวได้ว่าจุลินทรีย์มีผลโดยตรงต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดล งของความสามารถใน การต้านออกซิเดชัน (รูปที่ 3-25) เนื่องจากขาดชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อ (Abiotic control) เพราะอาจเป็นไปได้ว่าการสกัดสาหร่ายผมนางด้วยน้ำมีผลต่อการเกิดการต้านออกซิเดชันได้ (Jumjai et al., 2009)

7. คุณภาพทางจุลชีววิทยาและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

คุณลักษณะของน้ำหมักชีวภาพที่ดีคือต้องตรวจไม่พบ Total coliforms และ *E. coli* ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์ไม่มีการปนเปื้อนด้วยสิ่งสกปรก เช่นดิน รวมถึงอุจ าระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น (APHA, 1995) พบว่าประเภทของจุลินทรีย์ที่พบหลงเหลืออยู่ในน้ำหมักมากที่สุดคือ แบคทีเรียแลกติก ผลิตภัณฑ์มีลักษณะของน้ำหมักที่แสดงถึงการควบคุมสภาพการหมักได้ดีคือจำกัดปริมาณอากาศให้น้อยและผลจากการเจริญของจุลินท รีย์ในที่จำกัดปริมาณอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดสภาพ อากาศน้อย และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลสูงประมาณ 6-10% โดยปริมาตร (รูปที่ 3-14) ซึ่งเป็นสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลกติกแล้วเกิดกรดอินทรีย์เช่นกรดแลกติก และกรดอะซิติก รวมทั้งเอทานอล ผ ลของการเกิดสารประกอบเหล่านี้เป็นการถนอมอาหารทำให้ได้น้ำหมัก

สาหร่ายผมนาง และความเป็นกรดที่เกิดขึ้นทำให้น้ำหมักสาหร่ายผมนางมีรสเปรี้ยวนำ ซึ่งมีปริมาณกรดตั้งแต่ 1.05-2.05 กรัม/100 มิลลิลิตร (รูปที่ 3-16) ความเป็นกรดที่เกิดขึ้นในน้ำหมักสาหร่ายผมนางสอดคล้องกับสภาพพีเอชของน้ำหมักเมื่อมีอายุการหมัก 60 วัน ซึ่งพบว่าน้ำหมักมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.17-3.80 ซึ่งสภาพความเป็นกรดสูง พีเอชต่ำกว่า 4.00 (รูปที่ 3-15) สามารถป้องกันการเจริญของ *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ (Banwart, 1989)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก เช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดโพรไพโอนิก มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด เช่น *E. coli, Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่อาจปนเปื้อนมา ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของ พีเอช ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรด เนื่องจากพีเอชในน้ำหมักสาหร่ายผมนาง มีค่าต่ำกว่า 5.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมให้กรดอินทรีย์ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดี โดยกรดอะซิติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ดีกว่ากรดแลกติกเนื่องจากมีค่า pKa สูงกว่า (ค่า pKa ของกรดแลกติก = 3.08, กรดอะซิติก = 4.75, กรดโพรไพโอนิก = 4.87) จึงแตกตัวได้น้อยกว่ากรดแลกติกเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชเท่ากัน ทำให้กรดอะซิติกสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* ได้ดีกว่ากรดแลกติกและกรดซิตริก (Ahmad and Marth, 1989; Wong and Chen, 1988) กรดอินทรีย์สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย กลไกการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์เกิดจากกรดอ่อนที่ไม่แตกตัวแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนใน ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดและกระจายไปทั่วเซลล์ มีผลยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ส่งผลทำลายเซลล์หรือยับยั้งจุลินทรีย์นั้นๆ ได้ (Fuller, 1989)

นอกจากนี้ Bearso และคณะ (1997) มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้ง คือ กรดอินทรีย์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่า พีเอชในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด (Salminen and Wright, 1998) ด้วยการจำกัดปริมาณอากาศและมีปริมาณน้ำตาลสูง รวมทั้งมีการเติมกล้าเชื้อ แบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทหลักในการเกิดน้ำหมักชีวภาพ ทำให้ตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรค อย่างไรก็ตามด้วยสภาพการหมักดังกล่าว ยีสต์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก็สามารถเจริญได้เช่นกัน โดยเฉพาะช่วงต้นที่มีปริมาณอากาศอยู่ส่งเสริมให้ยีสต์เจริญ และต่อมาเป็นสภาพที่มีอากาศน้อยทำให้ยีสต์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี เพราะยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสผลิตเอทานอลโดยวิถี EMP ได้ pyruvate และสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอล (Norr et al., 2003) ดังเช่นเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) (รูปที่ 3-13)

8. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่าย

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายผมนางโดยวิธี Hedonic test เป็นการทดสอบแบบชอบหรือไม่ชอบ ต่อผลิตภัณฑ์ โดยผู้ทดสอบการรับรสซึ่งไม่ได้ผ่านการฝึกฝนการ ชิมมาก่อน (In-house employee) ไม่เคยมีประสบการณ์ชิม จำนวน 20 คน พบว่ามีการยอมรับที่แตกต่างกันในน้ำหมักสาหร่ายผมนางแต่ละชุดการทดลองอาจเนื่องมาจากน้ำหมักสาหร่ายผมนางแต่ละชุดการทดลอง มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณน้ำตาลทรายและ MSG ส่งผลต่อการยอมรับของผู้ทดสอบ ดังนี้ในด้านสี รสชาติ กลิ่น ความใส และการยอมรับรวม พบว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ที่มีส่วนประกอบคือสาหร่ายผมนาง น้ำตาลทราย และน้ำสะอาด (3: 1: 10) และเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% มีสีน้ำตาลอมส้ม กลิ่นหมักและมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย รสชาติเปรี้ยวอมหวาน ได้รับการยอมรับมากที่สุดอาจเนื่องมาจากผู้ทดสอบยอมรับในเรื่องของสีและความใสแต่ในส่วนรสชาติ และกลิ่นได้รับการยอมรับแต่ยอมรับน้อยอาจเป็นเพราะ ตัว วัตถุดิบ เอง คือตัวสาหร่ายผมนาง มีกลิ่นเฉพาะตัว น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A ได้รับการยอมรับรองลงมาอาจเ นื่องมาจากผู้ทดสอบยอมรับในเรื่องของสีและความใส แต่ในส่วนรสชาติ และกลิ่นได้รับการยอมรับน้อยกว่าเพราะมีรสเปรี้ยวมากกว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด B ส่วนน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ได้รับการยอมรับน้อยที่สุด เนื่องจาก MSG ไปรบกวนรสชาติของน้ำหมัก ทำให้มีรสเค็มกว่าน้ำห มักสาหร่ายผมนางชุดการทดลองอื่นๆ

ทั้งนี้ความใสของน้ำหมักชีวภาพขึ้นกับประเภทของพืชที่ใช้เป็นหลัก ขณะที่สีก็ขึ้นกับพืชที่ใช้และแหล่งน้ำตาลซึ่งอาจเป็นน้ำ ตาลทรายแดงหรือผสมด้วยน้ำผึ้ง ส่งผลให้ส่วนใหญ่ของน้ำหมักมีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ซึ่งสีนี้น่าเกิดจากปฏิกิริย าทางเคมีที่เรียกว่า Millard reaction ระหว่างสารประกอบคาร์บอนิล ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกับกรดอะมิโน เช่น น้ำตาลกูลโคสกับกรด อะมิโนไลซิน รวมทั้งระยะเวลาการหมักก็มีผลต่อสีด้วยเช่นกันโดยสีเ กิดจากการที่น้ำสกัดเอาสารต่างๆ ที่ละลายน้ำได้ออกมา และจากนั้นผลของการหมักที่เกิดเอทานอลส่งผลให้สารมากชนิดขึ้นจากพืชถูกสกัดออกมา ก็น่าจะมีผลต่อสีของน้ำหมักด้วยเช่นกัน ดังเช่นในการทดลองนี้ เพราะสีของน้ำหมัก มีสีน้ำตาล อมส้มและสี เหลือง กลิ่นของน้ำหมักยังคงกลิ่นของสาหร่ายผมนาง ที่นำมาหมักอยู่ และรวมกับกลิ่นที่มาจากก ระบวนการหมักเพราะกรดอินทรีย์และ ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์รวมตัวกับ เอทานอลที่เกิดจากการหมักทำให้เกิดสารพวก Aromatic esters ส่งผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์หมัก (Battcock and Azam-Ali, 1998; ดวงพรและคณะ, 2547)

ใน ประเทศ ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ยังมีข้อมูลไม่เพียงพ อ ทำให้ ไม่ มีข้อกำหนดปริมาณของ MSG ที่บริโภคต่อวัน อย่างไรก็ตามข้อมูล ในประเทศอังกฤษมีข้อมูลการ

บริโภค MSG เฉลี่ยแล้วสูงถึง 590 มิลลิกรัม/วัน และอาจบริโภคได้มากถึง 2,330 มิลลิกรัม/วัน และสามารถบริโภคได้มากถึง 5,000 มิลลิกรัม/วันได้ (Food Standards Australia New Zealand, 2003) แม้ว่าคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญว่าด้วยวัตถุเจือปนอาหาร (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives: JECFA) และคณะกรรมาธิการกฎหมายอาหาร (FAO/WHO Codex Alimentarius Commission) ขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ ร่วมกับองค์การอนามัยโลก ได้ประเมินผลความปลอดภัยของผงชูรสจากงานวิจัยมากกว่า 200 รายงานได้สรุปว่าสามารถบริโภค MSG ได้ทุกๆวันตลอดชีวิตอย่างปลอดภัย โดยไม่จำเป็นต้องกำหนดปริมาณบริโภคต่อวัน (Acceptable Daily Intake; not specified) (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2005) แต่สำหรับการทดลองนี้ เนื่องจากต้องการใช้ MSG ให้น้อยที่สุดเพราะส่งผลรบกวนต่อรสชาติของน้ำหมักและการยอมรับของผู้บริโภค

ทั้งนี้ปฏิกิริยาในการตอบสนองของผู้ทำการทดสอบอาจมีข้อมูลแปรปรวนเกิดขึ้นโดยการแปรผันตามปัจจัยที่มีผลต่อการประเมินทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ปัจจัยทา ง สรีรวิทยา เช่น ก ารปรับตัวของการรับสัมผัส และปัจจัยทางจิตวิทยา เช่น การขาดแรงจูงใจ เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 317 ไอโซเลทจากอาหารหมัก 44 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 58 ตัวอย่าง คิดเป็น 75.86% และพบว่าแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ที่สามารถผลิตกาบาสามารถเทียบเคียงชนิดได้เป็น *Lactobacillus plantarum*

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกาบาโดย ใช้ Response Surface Methodology (RSM) พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ คืออัตราส่วนของน้ำตาลทราย : MSG: พีเอชเริ่มต้นในการหมัก ในอัตราส่วน 6: 1: 6 และนำไปประยุกต์ใช้ในน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดัดแปลงและเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5%

3. ในกระบวนการหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนาง เมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A, ชุด B และ ชุด C มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเหลือเท่ากับ 4.32 4.18 และ 6.23 log CFU/ml ตามลำดับ แบคทีเรียแลกติกเหลือเท่ากับ 2.65 3.49 และ 5.97 log CFU/ml ขณะที่ยีสต์เหลืออยู่เท่ากับ 2.60 2.50 และ 3.57 log CFU/ml ตามลำดับ

4. พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมัก 60 วัน น้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C สามารถผลิตกาบาได้ดีที่สุดและมีค่าสูงสุดเมื่อมีอายุการหมัก 45 วัน (3,998.20 มิลลิกรัม/ลิตร)

5. ตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด B ซึ่งเป็นสูตรดั้งเดิมและเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* DW12 5% มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน อนุมูลอิสระ DPPH และ $ABTS^{\cdot+}$ ได้ดีที่สุดเมื่อมีอายุหมัก 30 วัน ขณะที่ในตัวอย่างน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ชุด A มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด

6. จากตัวอย่างน้ำหมักน้ำหมักสาหร่ายผมนางที่นำมาวิเคาะห์พบว่าทุกตัวอย่างผ่านเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำหมักพืช (มผช. 481/2547) ยกเว้นปริมาณยีสต์

7. จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำหมักสาหร่ายผมนาง ผู้ชิมทั้งหมดให้การยอมรับระดับปานกลางในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด A และชุด B ใกล้เคียงกันทั้งในด้าน กลิ่น รสชาติ สี ความใสและการยอมรับรวม ส่วนในน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C ผู้ชิมส่วนใหญ่ยอมรับได้ระดับปานกลางในด้านสีและความใส แต่ให้การยอมรับได้น้อยมากในด้านกลิ่นและรสชาติ ถึงแม้ว่าน้ำหมักสาหร่ายผมนางชุด C มีปริมาณกาบาสูงและมีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ยังต้องปรับปรุงในเรื่องรสชาติและกลิ่น ผู้บริโภคถึงจะให้การยอมรับ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีความเข้มข้นและความเป็นกรดสูงมาก การเจือจางด้วยน้ำ หรือผสมน้ำผึ้งก่อนดื่ม จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นและความเป็นกรดลดลง ซึ่งอาจส่งผลให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น แต่มีข้อควรระวังคือเมื่อผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรดลดลง จะทำให้การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ภายนอกเกิดได้ง่ายขึ้นและทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาสั้นลงได้ ดังนั้นควรผสมเมื่อจะดื่ม
2. การดื่มน้ำหมักสาหร่ายสูตรดัดแปลง กรณีที่ต้องก ารคุณค่าทางโภชนาการ จากกาบา ควรดื่มน้ำหมักเมื่อมีอายุการหมักได้ 45 วัน แต่ถ้าต้องการฤทธิ์ต้านออกซิเดชันควรดื่มน้ำหมักเมื่อมีอายุการหมักได้ 30 วัน
3. การศึกษาการต้านออกซิเดชันควรมีชุดควบคุมที่ปราศจากเชื้อด้วยเพื่อจะตอบโจทย์ว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นบทบาทที่เ กิดจากวัตถุดิบ เช่น สาหร่ายผมนางหรือเป็นเพราะกล้าเชื้อที่ใช้ หรือเป็นบทบาทร่วมกัน
4. เนื่องจากน้ำหมักสาหร่ายผมนางสูตรดัดแปลงมีความเค็มหลงเหลืออยู่ ดังนั้นควรศึกษาต่อโดยการลดปริมาณ MSG ให้น้อยลงโดยยังผลิตกาบาได้สูงและได้รสชาติที่เป็นที่ยอมรับ
5. ควรศึกษาการ นำน้ำหมัก สาหร่ายผมนาง ไปเป็นน้ำปรุงรสอาหารประเภทยำ เพราะมีประโยชน์ในเรื่องเพิ่มรสชาติ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ตลอดจนประโยชน์จากกาบา

รายการเอกสารอ้างอิง

กองวิเคราะห์อาหาร . เกณฑ์คุณภาพทาง จุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร . กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร.

กรมอนามัย . 2540 . ปริมาณโลหะหนักในแม่น้ำปัตตานีและแม่น้ำปากพนัง . กระทรวงสาธารณสุข.

กาญจนา ขาวผ่อง . 2551. ลักษณะของน้ำหมักลูกยอป่า (*Morinda coreia* Ham) และผลการเจริญเติบโตของมะเขือเทศราชินี (*Lycopersicon esculentum* Mill). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คณิต ไชยาคำ และคุสิต ตันวิไลย . 2535. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนาง *Gracilaria fisheri* บริเวณทะเลสาบสงขลาตอนนอก. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 7. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 13 หน้า.

จงกลนี จงอร่ามเรือง . 2550 . การสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลที่เก็บจากอ่า วคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี ชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 11: 11-18.

จงกมล จริยกุล. 2550. การผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต . สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุไรรัตน์ ร่วมพันธ์. 2550. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้าน . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต . สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชิดชม ฮิรางะ มาลัย บุญรัตนกรกิจ มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด และกรุณ า วงษ์กระจ่าง . 2550. การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักยอในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มน้ำลูกยอไทย . สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ปีที่ 39. ฉบับที่ 1, หน้า 95-104.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2547. มาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช .). คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2550. น้ำหมักชีวภาพ เทคโนโลยีเพื่อความพอเพียง สู่นวัตกรรมเพื่อสุขภาพชุมชนที่ยั่งยืน . ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. ปทุมธานี.

ณรงค์ศักดิ์ คงชัย และสมชาย วิบุญพันธ์. 2551. การตรวจสอบคุณภาพผลผลิตสัตว์น้ำบริเวณอ่าวไทยตอนล่าง. การประชุมทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีครั้งที่ 34. เข้าถึงได้จาก: http://www.nstlearning.com/blog/?p=409 (วันที่สืบค้น 20 ตุลาคม 2552)

ดวงพร คันธโชติ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองภิภพ. 2547. ลักษณะน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาพใต้ของประเทศไทยและผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคของระบบทางเดินอาหาร. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี หน้า 141-143.

ดวงพร คันธโชติ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงค์ฤทธิ์ อัศวเรืองพิภพ . 2548. ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไท ย. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 27(3): 601-615.

ดวงพร คันธโชติ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล . 2550. เรื่องการปรับปรุงคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินเป็นหัวเชื้อ . รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เสนอ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 214) พ.ศ. 2543. เรื่องเครื่องดื่มในภาชนะที่ปิดสนิท. เข้าถึงได้จาก: http://newsser.fda.moph.go.th/food/file/Laws/Notification%20of%20Ministry%20of%20PublicHealth/Law03P214.pdf (วันที่สืบค้น 20 มีนาคม 2553).

ประดิษฐ์ มีสุข. 2542. การหาปริมาณสารหนู และโลหะหนักในผลิตภัณฑ์จากทะเลสาบสงขลา. หนังสือรวมบทคัดย่อ ผลงานวิจัยของคณาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาไทย ในระหว่างปี 2540-2542. หน้า 28-29

ปาหนัน บุญหลง. 2530. โภชนาการ. พิมพ์ครั้งที่ 4 เชียงใหม่: สำนักพิมพ์ปอง.

ไพโรจน์ พรหมานนท์ และ สมิง ทรงถาวรทวี . 2533. การเพาะพันธุ์สาหร่ายวุ้น *Gracilaria fisheri* โดยใช้แกลบเป็นวัสดุรองรับการเกาะของสปอร์ . วารสารการประมง 43(5): 327-336.

พนิดา กุลประสูติดิลก . 2548. วิธีต้านอนุมูลอิสระในตัวคุณ . สำนักพิมพ์สุขภาพใจ . กรุงเทพมหานคร.

พรพิมล วราทร. 2541. ปัญหาตะกั่วในลุ่มน้ำปัตตานี . Fact Sheet สถานการณ์สุขภาพและสิ่งแวดล้อม, กรมอนามัย. ปีที่ 3. ฉบับที่ 6 มีนาคม 2541.

วราภรณ์ แก้วไทย. 2547. การทดลองเลี้ยงสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheries*). ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง สุราษฎร์ธานี. เข้าถึงได้จาก: http://library.kku.ac.th/cgibin/websis?show- 000798&from=fac (วันที่สืบค้น 20 ธันวาคม พ.ศ. 2551).

วิทยา ศรีมโนภาษ. 2521. สาหร่ายทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทย. เอกสารเผยแพร่สถานีวิจัยประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ฉบับที่ 3. 14 หน้า.

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา . สาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) เข้าถึงได้จาก : http://www.geocities.com/welcometonica121/new-28.htm (วันที่สืบค้น 20 กันยายน 2551).

สมหมาย ปัตตาลี . 2551. การศึกษาคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลมะหลอด . สารนิพนธ์ การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา . มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สาร์ทจีน ภีระจันทร์. 2549. ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถต้าน ออกซิเดชันและปริมาณโพลีฟีนอลของเครื่องดื่มกรดแลกติกที่หมักด้วยแลกโตบาซิลลัสและมะขามป้อม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์- เภสัชกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

สุวัฒน์ ธนานุภาพไพศาล และ สอรัฐ มากบุญ. 2541. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายผมนางเชิงพาณิชย์. รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี. 23 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค เข้าถึงได้จาก: http://filing.fda.moph.go.th/library/e-learning/CPIC. (วันที่สืบค้น 20 กันยายน 2552).

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. 2532. หลักโภชนาการปัจจุบัน . พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพมหานคร . ไทยวัฒนาพานิชจำกัด. หน้า 74-81.

เสาวภา สวัสดิ์พีระ. 2541. อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของหอยเป๋าฮื้อ , *Haliotis asinina* เมื่อเลี้ยงด้วยสาหร่ายต่างชนิด . รายงานวิจัย, สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลบางแสน, มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.

ศศิธร ศิริลุน. 2548. จลนพลศาสตร์ของการหมักลูกยอและฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์- เภสัชกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

ศศิธร ศิริลุน สุชาติ ปันจัยสีห์ และ ไชยวัฒน์ ไชยสุต. 2547. คุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชที่มีผลต่อความปลอดภัยในการบริโภคในท้องตลาดประเทศไทย, น. 24-36. ใน ไชยวัฒน์ ไชยสุต, มาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีว ภาพเพื่อการบริโภค . สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ , กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี , กรุงเทพมหานคร.

อรพรรณ เสลามาศสกุล ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2552. คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Gracilaria fisheri.* วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, ปีที่ 40, ฉบับที่ 3(พิเศษ) กันยายน-ธันวาคม 2552.

โอภา วัชระคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุณยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัตต์สินทอง . 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พริ้นท์.

Aarnikunnas, J. 2006. Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Department of Basic Veterinary Sciences. Division of Microbiology and Epidemiology. University of Helsinki.

Adam, M.R. and Moss M.O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 232-248.

Ahmad, N. and Marth, E.H. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptone broth acidified with acetic, citric or lactic acid. Journal of Food Protection. 52: 688-695.

AOAC. 2002. Official methods of analysis of the association of official analytical chemist, 17th edn. The Association of Official Analytical Chemist, Inc., USA.

Aoki, H., Furuya, Y., Endo, Y. and Fujimoto, K. 2003. Effect of γ-Aminobutyric Acid-enriched Tempeh-like Fermented Soybean (GABA-Tempeh) on the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 67(8): 1806-1808.

Athukorala, Y., Kim, K.N. and Jeon, Y.J. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*, Food and Chemical Toxicology. 44: 1065-1074.

APHA. 1995. American public health association standard methods for the examination of water and wastewater, 19^{th} edn. Washington DC, USA.

Axelsson, L.T. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *In* (ed. Salmien, S. and Wright, A.V.), Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. pp 1-72.

Axelsson, L.T. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects., (Eds Salminen, S., von Wright, A., and Ouwehand A.). pp 1-66.

BAM. 2002. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8^{th} ed., AOAC International, USA.

Banerjee, A., Dasgupts, N. and De, B. 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit, Food chemistry. 90: 727-733.

Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology 2nd ed. Chapman & Hall, New York.

Barszczewski W. and Robak M. 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. Food Microbiology. 21(2): 227-231.

Baskin, S.I. and Salem, H. 1997. Oxidants, Antioxidants, and Free Radical. Taylor & Francis. United State.

Battcock, M. and Azam-Ali, S. 1998. Fermented fruits and vegetables: A global perspective. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. FAO Agricultural Services Bulletin. (14): 134.

Benzie and Strain, 1996. I.F. Benzie and J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.

Bearso, S., Bearson, B. and Foster, J.W., 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. 147: 173-180.

Bergqvist, S. W., Sandberg, A. S., Carlsson, N. G., and Andlid, T. 2005. Improved iron solubility in carrot juice fermented by homoand hetero-fermentative lactic acid bacteria. Food Microbiology. 22: 53–61.

Beshkova, D.M.E.D., Simova, Z. I., Simov, G. I., Frengova and Spasov, Z.N. 2002. Pure culture for making kefir. Food Microbiology. 19: 537-544.

Beyer, R.E. 1992. An analysis of role of coenzyme Q in free radical generation and as antioxidant. Biochemistry and Cell Biology. 70: 390-403.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181: 1199-1200.

Boekhout, T. and Robert, V. 2003. Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects, Behr's Verlag, Bayreuth.

Buckenhuskes, H.J. 1997. Fermented vegetables. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, I.M. Editors, Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers, A.S.M Press, Washington, DC. pp. 595-609.

Burtin, P. 2003. Nutritional Value of Seaweeds. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2(4): 498-503.

Chen, X.X., Li, D., Lv, J.X., Fang, F. 1997. Determination of gamma aminobutyric acid and glutamic acid in human cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography (in Chinese). Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications (Chinese). 15: 237–239.

Cho, Y.R., Chang, J.Y. and Chang, H.C. 2007. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(1): 104-109.

Choi, S.I., Lee, J.W. and Park, S.M. 2006. Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. Journal of Microbiology and Biotechnology. 16: 562–568.

Cross, M.L. 2004. Immune-signaling by orally-delivered probiotic bacteria: Effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. Journal of Immunopathology and Pharmacology. 17, 127-134.

Culter, R.G. 1991. Antioxidants and aging. American Journal of Clinical Nutrition. 53: 375-379.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria ed. Salminen, *S.* and Wright, A. pp 127-159.

Devi, K.P., Suganthy, N., Kesika P., and Pandian, S.K. 2008. Bioprotective Properties of Seaweeds: In vitro Evaluation of Antioxidant Activity and Antimicrobial Activity Against Food Borne Bacteria in Relation to Polyphenolic Content. BMC Complementary and Alternative Medicine. 8(38): 1-11.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic and Professional. ISBN 0-75140174-9.

Duangchitchareon, Y. 2006. Selection of probiotic lactic acid bacteria from some pickles and biologically fermented plant products., Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Phenol-sulfuric total sugar. Analytical Chemistry. 28: 350–356.

FDA. 2003. Requirements for specific standardized beverages, Sec.165.110 Bottled water. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=165.110&st=drinking%20water (accessed 25 September 2009).

Ferner, D.J. 2001. Toxicity, heavy metals. Medical Journal. 2(5): 1.

Food Standards Australia New Zealand . 2003. MONOSODIUM GLUTAMATE: A Safety Assessment. http://www.foodstandards.gov.au. (accessed 25 September 2009).

Fuller, R. 1989. Probiotics in human and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 1430-1434.

Gladys, B. 1991. Nutrition in chronic disease prevention. In Antioxidant Food Supplements in Human Health. Packer, L., Hiromatsu, M. and Yoshikawa, T. pp 46-47. San Diego: Academic Press.

Glahn, R.P., Lee, O.A., Yeung, A., Goldman, I. and Miller, D. 1998. Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. The Journal of Nutrition. 128(9): 1555-1561.

Graciela, M., Vignolo, M, de Kairuz, M., Aida, A.P., de Ruiz, H., and Oilver, G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *L. casei* CRL 705. Journal of Applied Bacteriology. 78: 5-10.

Gran, H.M., Gadaga, H.T. and Narvhus, J.A. 2003. Utilization of various starter cultures in the production of Amasi, a Zimbabwean naturally fermented raw milk product. International Journal of Food Microbiology. 88: 19-28.

Guin Ting Wong, C., Bottiglieri, T., and Carter Snead, O. 2003. GABA, γ-hydroxybutyric acid, and neurological disease. Annals of Neurology. 6: 3–12.

Guzel-seydim, Z.B., Seydim, A.C., Greene, A.K. and Bodin, A.B. 2000. Determination of organic acid and and volatile flavor substances in kefir during fermentation. Journal of Food Composition and Analysis. 13: 35-43.

Hagiwara, H., Seki, T., and Ariga, T. 2004. The effect of pre-germinated brown rice intake on blood glucose and PAI-1 levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 68: 444–447.

Halliwell, B. 1991. Drug antioxidant effects: A basis for drug selection. Drugs. 42(4): 569-605.

Han, S.B. and Kim, Y.H. 2006. Production method of γ-aminobutyric acid-enforced fermentative products by lactic acid bacteria, γ-aminobutyric acid-enforced fermentative products produced by the method and their utilization. Korea. Patent 10-0547018.

Hao, R. and Schmit, J.C. 1993. Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. the Biochemical Journal. 293: 735-738.

Hayakawa, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Taniguchi, R. and Oda, K. 1997. Production of γ-aminobutyric acid by lactic acid bacteria. Seibutsu Kogaku Kaishi 75: 239-244.

Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerace in adults with lactose maldigestion. Research. 103(5): 582-586.

Hiller, A.J. and Davision, B.E. 1991. Bacteriocin as food preservatives. Food Research Qoart. 51: 60-64.

Hiraga, K., Ueno., Y. and Oda, K. 2008. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 72: 1299–1306.

Holum, J.R. 1983. Elements of general and biological chemistry. John Wiley and Sons, New York.

Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W. and Lin, Y.H. 2001. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (Dioscorea batatas Decne) tuber. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4956-4960.

Huang, J., Mei, L., Wu, H. and Lin, D. 2007. Biosynthesis of γ-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 865–871.

Ismail, A. and Hong, T.S., 2002, Antioxidant Activity of Selected Commercial Seaweeds, Malaysian Journal of Nutrition, 8(2): 167-177.

Jakobs, C., Jaeken, J. and Gibson, K.M. 1993. Inherited disorders of GABA metabolism. Journal of Inherited Metabolic Disease. 16: 704–715.

Jay, J.M. 2002. Modern food Microbiology. 6^{th} Edn. Chapman and Hall, Melbourne.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., and Sakariah, K.K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinefera*) extracts on peroxidation model in vitro. Food Chemistry. 73: 285-290.

Jeun, J.H., Kim, H.D., Lee, H.S., and Ryu, B.H. 2004. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced γ-aminobutyric acid (GABA) from traditional salt fermented anchovy. Korea Journal of Food and Nutrition. 1: 72-79.

Jorgensen, E.M. 2005. GABA. WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, DOI/10.1895/wormbook.1.14.1, http://www.wormbook.org.

Jumjai, U., Kanjanapothi, D., Srichairattanakul, S. and Taesotikul, T. 2009. Antioxidant Activity of a Red Marine Alga *Gracilaria Fisheri* Xia & Abbott. Proceeding of 1st Graduate Research Conference. Chiangmai University, November 27th 2009.

Jun, H., Le-he, M., Hong, W. and Dong-qiang, L. 2007. Biosynthesis of γ-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 865–871.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, Non-Sporing Gram Positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. eds.). pp 1208-1234.

Kang, M.S. 2002. GABA production by *Lactobacillus sakei* isolated from kimchi. Proceeding Symposium Korea Society Microbiology Biotechnology. p. 176.

Kang, M.S., Cho, S.C., Kook, M.C., Pyun, Y.R., and Choi, C.I. 2006. Novel strains of *Lactobacillus* spp. and method for preparing γ-aminobutyric acid using the same. Korea. Patent 10-0549094.

Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W. 2008a. Effects of initial air removal methods on microorganisms and characteristics of fermented plant beverages. Pakistan journal of biological sciences. 11(2): 173-180.

Kantachote, D., and Charernjiratrakul, W. 2008b. Selection of lactic acid bacteria for fermented plant beverages to use as inoculants for improving the quality of the finished product. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11(22): 2545-2552.

Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., and Umsakul, K. 2008. Antibacterial activities of fermented plant beverages collected in southern Thailand. Journal of Biological Science. 8(8): 1280-1288.

Kantachote, D. Kowpong, K., Charernjiratrakul, W. and Pengnoo, A. 2009. Microbial succession in a fermenting of wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) fruit plus molasses and its role in producing a liquid fertilizer. Electronic Journal of Biotechnology 12(3): DOI: 10.2225/vol12-issue3-fulltext-12.

Kato, T., Inuzuka, L., Kondo, M., Matsuda, T. 2001. Growth of nisin-producing *Lactococci* in cooked rice supplemented with soybean extract and its application to inhibition of *Bacillus subtilis* in rice miso. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65: 330–337.

Kim, M.J., Higashiguchi, S., Iwamto, Y., Lee, S.Y., Hong, S.Y., Hurh, B.S. and Lee, Y.H. 2002. Production of γ-aminobutyric acid by lactic acid bacteria and its physiological effects in human volunteer test. Proceeding Symposium Korea Society Microbiology Biotechnology. pp 15-1.

Kim, M.H. and Joo, H.J. 2007. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells, Immunology Letters 115: 138–143.

Kim, S.H., Shin, B.H., Kim, Y.H., Nam, S.W. and Jeon, S.J. 2007. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12: 707–712.

Kim, J.Y., Lee, M.Y., Ji, G.E., Lee, Y.S. and Hwang, K.T. 2009. Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. International Journal of Food Microbiology. 130: 12–16.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.

Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N. and Kimura, T. 2005a. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. Journal of Food Engineering Article in Press.

Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., and Shima, J. 2008. Characterization of Glutamate Decarboxylase from a High γ-Aminobutyric Acid (GABA)-Producer, *Lactobacillus paracasei*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 72 (2): 278–285.

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T. 2005b. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. Food Microbiology. 22: 497–504.

Kono, I., and Himeno, K. 2000. Changesin γ-aminobutyric acid content during beni-koji making. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 64: 617–619.

Kook, M.C., Jo, S.C., Song, J.S., Choi C.I., Jung, J.Y., Park, Y.S. and Byeon, Y. R. 2004. GABA production by *Lactobacillus sakei* B2-16. International symposium and annual meeting of the Korean society of food science and Technology. p 142.

LeBlanc, S.J., Herdt, J. and Seymour, T. 2004. Factors associated with peripartum serum concentrations of vitamin E, retinol, and -carotene in Holstein dairy

cattle, and their associations with periparturient disease. Journal of Dairy Science. 87: 609-619.

Lee, B-J., Kim, J-S., Kang, Y.M., Lim, J-H., Kim, Y-M., Lee, M-S., Jeong, M-H., Ahn, C-B. and Je, J-Y. 2010. Antioxidant activity and γ-aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis*_BJ20 isolated from traditional fermented foods, Food Chemistry.
DOI: 10.1016/j.foodchem. 2010.02.071.

Leroy, F., and de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology. 15(2): 67-78.

Li, H., Cao, Y., Gao, D. and Xu, H. 2008. A high γ-aminobutyric acid-producing ability *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 58: 649–653.

Li, H., Qiu, T., Cao, Y., Yang, J. and Huang, Z. 2009. Pre-staining paper chromatography method for quantification of gamma-aminobutyric acid. Journal of Chromatography A. 1216: 5057–5060.

Lin, M.Y. and and Yen, C.L. 1999. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 1460-1466

Lu, X., Chen, Z., Gu, Z. and Han, Y. 2008. Isolation of gamma-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. Biochemical engineering journal. 41: 48–52.

MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., and Rowland, I.R. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. Nutrition Reviews. 65(12): 535-543.

Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjogren J. and Schnurer J. 2003. Broad and complex Antifungal activity amoung environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 219: 129-135.

Manyam, B.V., Katz, L., Hare, T.A., Kaniefski, K. and Tremblay, R.D. 1981. Isoniazid-induced elevation of cerebrospinal fluid (CSF) GABA levels and effects on chorea in huntington's disease. Annals of Neurology. 10: 35–37.

Maras, B., Sweeney, G., Barra, D., Bossa, F., and John, R.A., 1992. The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry. 204: 93–98.

Meilgard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1998. Sensory Evaluation Techniques. 2^{nd}. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress, Free Radical Biology and Medicine 17(3): 235–248.

Mishra, O.P. and Korachich, G.B. 1984. Inhibition of the autoxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyrich*, *Megasphaera elsdenii*, and *Escherichia coli*. Life Sciences. 35: 849-854.

Mundt, J.O., Graham, W.F. and McCarty, I.E. 1967. Spherical lactic acid-producing bacteria of southern-grown raw and processed vegetables. Journal of Applied Microbiology. 15, pp 1302–1308.

Mundt, J.O. and Hammer, J.L., 1968. Lactobacilli on plants. Journal of Applied Microbiology. 16: 1326-1330.

Murray, J.M., Tavassoli, M., al-Harithy, R., Sheldrick, K.S., Lehmann, A.R., Carr, A.M. and Watts, F.Z. 1994. Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe rad2* gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage. Molecular and Cellular Biology. 14: 4878-4888.

Nikishimi, M., Rao, N. and Yagi, K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen, Biochemical and Biophysical Research Communication 46: 849–854.

Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki, I. 1998. Production of γ-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. Dairy Foods. 81: 1486-1491.

Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I. and Aso, H. 1999. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. Microbiology. 145: 1375–1380.

Norr, A.A., Hameed, A., Bhatti, K.P., and Tunio, S.A. 2003. Bio-ethanol fermentation by the bioconversion of sugar from dates by *Saccharomyces cerevisiae* strain ASN-3 and HA-4. Biotechnology. 2(1): 8-17.

Oh, S.H. and Oh, C.H. 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. Food Science and Biotechnology, 12: 248-252.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry. 95: 351-358.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. Editors, Lactic Acid Bacteria-Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 375-395.

Park, K.B., Ji, G.E., Park., M.S. and Oh, S.H. 2005. Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ-aminobutyric acid production. Biotechnology Letters. 27: 1681–1684.

Park, K.B. and Oh, S.H. 2007a. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. Bioresource Technology. 98: 312-319.

Park, K.B. and Oh, S.H. 2007b. Production of yogurt with enhanced levels of gamma aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. Bioresource Technology, 98: 1675-1679.

Pongtep, W. 2003. Influence of physical factors and various complex media on growth and Bacteriocin production of two-synergistic peptide with heat stable Bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3, Isolated from Thai fermented fish. http://www.union.dss.go.th/elib/cgibin/uc.exe?op=baddtocart&bid=3259&lang=1&db=FSTIN&pat (accessed 20 November 2008).

Prachyakij, P. 2008. Isolation and selection of antifungal lactic acid bacteria to use as inoculants for improving quality of fermented plant beverages. the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology. Prince of Songkla University.

Prachyakij, P., Charernjiratrakul, W., and Kantachote, D. 2008. Improvement in the quality of a fermented seaweed beverage using an antiyeast starter of *Lactobacillus plantarum* DW3 and partial sterilization. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 1713–1720.

Prachyakij, P., Schnurer, J., Charernjiratrakul, W. and Kantachote, D. 2007. Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages. The Songklanakarin Journal of Science and Technology. 29(Suppl. 2): 211-218.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology and Medicine 26: 1231–1237.

Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., de las Rivas, B., de Felipe, F.L., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J.M., Muñoz, R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 132: 79–90.

Rossetti, V., Lombard, A. 1996. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. The Journal of Chromatography B. 681: 63–67.

Saengow, S., Waiprib, Y., Tongta, A. and Chaiyasut, C. 2007. Effects of Sugar Type and Concentration on Microbial Count of *Terminalia chebula* Retz. Fermented Liquids. The Journal of Agricultural Science. 38(6): 271-274.

Saikusa, T., Horino, T., Mori, Y. 1994. Accumulation of γ-aminobutyricacid (GABA) in the rice germ during water soaking. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 58: 2291–2292.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. Lactic Acid Bacteria.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1998. Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects. Marcel Dekker, INC. Newyork. 617 p.

Sarkar, S. 2008. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt, British Food Journal. 110: 717–740.

Sawai, Y., Yamaguchi, Y. and Miyana, D. 2001. Cycling treatment of anaerobic and aerobic Incubation increases the content of γ-aminobutyric acid in tea shoots. Amino Acids. 20: 331–334.

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. International Journal of Food Microbiology. 29: 255–270.

Shin, J.Y., Yang, J.W., Jang W.S. and Hong, S.D. 2007. Perception status and efficacy of OROS-MPH and parent perception in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: multi-center, observational study during 4 weeks, The Korean Journal of. Physiology and Pharmacology. 18: 50-59.

Sies, H. and Stahl, W. 1995. Vitamins E and C, -carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition. 62: 1315–1321.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., and Gobbetti. M. 2007. Synthesis of γ-aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. Applied and Environmental Microbiology. 73(22): 7283–7290.

Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J. and Kenne, L. 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Applied and Environmental Microbiology. 69: 7554-7557.

Smith, D.K., Kassam, T., Singh, B., and Elliott, J.F. 1992. *Escherichia coli* has two homologousglutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. Journal of Bacteriology. 174: 5820–5826.

Stiles, M.E. and Hastings, J.W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: Protential for use in meat preservation. Trends in Food Science & Technology. 2 (10): 247-251.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology. 36: 1-29.

Suk, H.M. 2002. Function of GABA and possibility of the development of new materials. Food Technology. 15: 81-85.

Swetwiwathana, A., Zendo , T., Lotong, N., Nayamaha, J. and Sonomoto, K. 2003. 49nd Brazillian Congress of Meat Science and Technology. pp 322-324.

Talarico, T.D., Casas, I.A., Chung, T.C., and Dobrogosz,W.J. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 33: 674–679.

Tanasupawat, S., Sane, O. and Kazuo, K. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. The Journal of General and Applied Microbiology. 44: 193–200.

Tsushida, T. and Murai, T. 1987. Conversion of glutamic acid to γ-aminobutyric acid in tea leavesunder anaerobic conditions. Agricultural and Biological Chemistry. 51: 2865–2871.

Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., and Oda, K. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61: 1168–1171.

Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S., Yoshiharu, M. and Oda, K. 2007. Isolation and Utilization of a Lactic Acid Bacterium, Producing a High Level of γ-Aminobutyric Acid (GABA). The Society for Biotechnology, Japan. 85(3): 109-114.

Varanyanond, W., Tungtrakul, P., Surojanametakul, V., Watanasiritham, L., and Luxiang, W. 2005. Effect of water soaking on gamma-aminobutyric acid (GABA) in germ of different Thai rice varieties. The Kasetsart Journal. (Nat. Sci.) 39: 411-415.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 46: 4113–4117.

Wang, J.J., Lee, C.L. and Pan, T.M. 2003. Improvement of monacolin K, gamma-aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 30: 669-676.

Watanabe, K., Umeda, K., Kurita, Y., Takayama, C. and Miyakado, M. 1990. Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga, *Plocamium telfairiae*: structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. Pesticide Biochemistry and Physiology. 37: 275-286.

WHO. 1992. Human Exposure to Lead: Report of the Human Exposure Assessment Location (HEAL) Programme, Bangkok.

WHO. 2002. Micronutrient deficiencies. Battling iron deficiency anemia. WHO 2002. http://www.who.int/nut/ida.htm (accessed 25 September 2009).

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1998. The Lactic bacteria: The Genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional. pp 7-15.

Woodruff, R.C., Phillip, J.P. and Hilliker, A.J. 2004. Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient Drosophila. Genome. 47(6): 1029-1035.

Yang, M.H. and Choong, Y.M. 2001. A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C_2-C_{12}) volatile organic acids in foods. Food Chemistry. 75: 101-108.

Yang, S.Y, Lu , F.X., Lu, Z.X., Bie, X.M., Jiao, Y., Sun, L.J., and Yu, B. 2008. Production of γ-aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. Amino Acids. 34: 473–478.

Yokoyama, S., Hiramatsu, J., and Hayakawa, K. 2002. Production of γ-aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. Journal of Bioscience and Bioengineering. 93: 95–97.

Yuan, Y.V., and Walsh, N.A. 2006. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Extracts from A Variety of Edible Seaweeds. Food and Chemical Toxicology. 44: 1144-1150.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) (Merck)

Peptone from casein	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D(+)Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganeses sulfate	0.04	กรัม
Agar	14.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง MRS 68.2 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟ จนส่วนผสมเข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. de Man Rogosa and Sharpe broth (Merck)

Peptone from casein	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D(+)Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม

Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganeses sulfate	0.04	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS 52.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Plate Count Agar (PCA, Merck)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหาร 22.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)

Potato extract	4.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหาร PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5. Phenol Red Broth Base (Difco)

Bacto Beef Extract	1.0	กรัม
Bacto Proteose Peptone no.3	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Bacto Phenol Red	0.018	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมน้ำตาล 1% พีเอช 7.4±0.2 ต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115°C ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

6. Glucose Yeast Extract Peptone (GYP) medium (Hiraga et al., 2008)

glucose	10.0	กรัม
yeast extract	10.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
sodium acetate	2.0	กรัม
$MgSO_4 .7H_2O$	0.02	กรัม
$MnSO_4 .4H_2O$	0.001	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.001	กรัม
NaCl	0.001	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟ จนส่วนผสมเข้ากัน ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

7. API 50 CHL medium (API, BioMerieux)

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Dipotassiumphosphate	2.0	กรัม
Diammoniumcitrate	2.0	กรัม
Sodiumacetatetrihydrate	5.0	กรัม
Manganasesulphateheptahydrate	0.20	กรัม
Magnesiumsulphatetetrahydrate	0.05	กรัม
Bromocresol purple	0.17	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

8. Baird Parker medium (BP, Merck)

Peptone	10.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Sodium pyruvate	10.0	กรัม

Glycine	12.0	กรัม
Lithium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง BP 58.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50°C เติม egg-yolk tellurite emulsion จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

9. *Escherichia coli* broth (EC, Merck)

Tryptone	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
Di-potassium phosphate	4.0	กรัม
Mono-potassium phosphate	1.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว EC 37.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซในหลอดทดลองฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

10. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB, Merck)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Ox-bile (purified)	20.0	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว BGLB 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร พร้อมหลอดดักก๊าซในหลอดทดลองฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

11. Eosin Methylene Blue Agar (EMB, Merck)

Tryptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Eosine Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.06	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง EMB 36.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

1.1 Crystal violet

- สารละลาย A: ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
- สารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้เป็น crystal violet staining reagent

1.2 95% Ethyl alcohol (decolorizing solvent)

1.3 Gram iodine (mordant)

บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodide 2.0 กรัม เข้าด้วยกันค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปบดผสมจนกระทั่งไอโอดีนล ะลาย ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

1.4 Safranin (counterstain)

ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Reagent ทดสอบคะตะเลส (3% H_2O_2)

35% H_2O_2	8.6	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้เย็น

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮครอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจาก คาร์บอนไดออกไซด์ (ต้มน้ำกลั่น 20 นาที) ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปเปรียบเทียบหาค่ามาตรฐานโดยไทเทรตโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต ($KHC_8H_4O_4$)

4. สารละลายฟีนอล์ฟธาลีน

เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟธาลีน 1 กรัม ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N ทีละหยดจนหยดแรกให้สีชมพู เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร หรือละลายฟีนอล์ฟธาลีน 1 กรัม ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธี titration method (AOAC, 2002)

สารเคมี

1. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (น้ำกลั่นต้มเดือด 20 นาที ใส่ soda lime เล็กน้อย)
2. สารละลาย 0.1 N NaOH (NaOH 4 กรัม เติมน้ำกลั่นครบ 1 ลิตร) เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ได้และเป็นแก้วทนด่าง ก่อนนำมาใช้ให้หาความเข้มข้นมาตรฐาน

2. การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

Acid potassium phthalate (อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120°C แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) ชั่ง 0.3 กรัม ใส่ลงใน flask 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เมื่อ Acid potassium phthalate ($KHC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติม phenolphthalein (ชั่งสาร 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95% และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร) 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน

$$\text{คำนวณได้จากสูตร (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{มิลลิลิตร ของ } 0.1 \text{ NaOH} \times 204.229}$$

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติม phenolphthalein 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนๆ ปริมาณกรด คำนวณเป็นกรดแลกติกได้จากสูตร

$$\text{กรดทั้งหมด (กรัม/100 มิลลิลิตร)} = \frac{N \times V \times 90 \times 100}{1000 \times 1}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric method (Dubois et al., 1956)

สารเคมี

1. สารละลายซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลาย phenol 5%

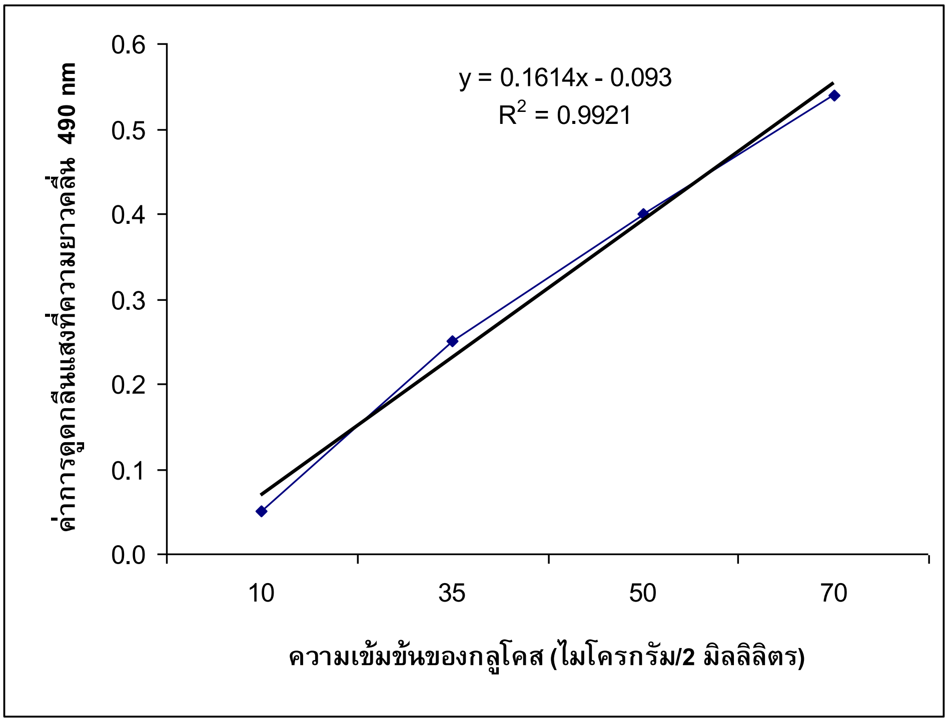
ชั่ง phenol 5 กรัมปรับน้ำให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายในขวดสีชา

วิธีวิเคราะห์

1. แช่หลอดทดสอบขนาด 20x150 มิลลิลิตร ในน้ำแข็ง ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดสอบออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีก วางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เอาค่าที่ได้ Plot curve ระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาล

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.35 กรัม ปรับน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้น 10, 35, 50, 70 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร โดยดูดสารละลายกลูโคสมา 1, 5, 5, 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6, 5, 2, 0 มิลลิลิตร ตามลำดับ
2. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำแข็ง เติมสารละลายฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดสอบออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีก วางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
4. นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน



รูปผนวก ข 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำหมักชีวภาพ

4.1 Lipid peroxidation assay

ดัดแปลงจากวิธี Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) assay (Banerjee et al., 2005)

สารเคมีและการเตรียม

1. Egg yolk ความเข้มข้น 10% v/v (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

   Egg yolk 10 มิลลิลิตร (ไข่แดง 1 ฟอง) ละลายกับ phosphate buffer พีเอช 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. TCA reagent (Thichloro acetic acid)

   ละลาย TCA 10 กรัม ด้วย 0.6 M HCl 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. TBA reagent (Thiobarturic acid)

   ชั่ง TBA (Eastman, mw. 144.15) 0.12 M มา 1.7298 กรัม ละลายด้วย 0.26 M 2-amino 2-hydroxymethy-1,3-propanediol 100 มิลลิลิตร (Tris, mw 121.1 ชั่งมา 3.1486 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร) เก็บที่อุณหภูมิห้อง กรอง ด้วยกระดาษ Whatman No.1 ก่อนใช้

4. NSS (normal saline solution)

   ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. สารมาตรฐาน MDA 10 mmol/ลิตร

   เตรียมโดยใช้ Trimethylpropane (TMP, sigma) 20.8 ไมโครลิตร เติม HCl เข้มข้น (ความเข้มข้น 37%) ประมาณ 5-8 หยด เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 10 มิลลิลิตร

6. Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$) (MW=278.05) เตรียมความเข้มข้น 0.32 M 50 มิลลิลิตร

   ชั่ง Ferrous sulphate 1.7795 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง (อาจใช้สารอื่นที่มี Fe^{2+})

วิธีทำ

1. เตรียมสารเคมีทั้งหมดล่วงหน้าได้ 1 วัน, เตรียม Egg yolk วันที่ทำการทดลอง
2. การผสมสารตัวอย่าง
   2.1 เติม NSS 0.45 มิลลิลิตร + Standard TMP 0.1 มิลลิลิตร + ferrous sulphate 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
   2.2 เติม NSS 0.45 มิลลิลิตร+ egg yolk 0.5 มิลลิลิตร + ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร + ferrous sulphate 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
3. นำสาร 2.1 และ 2.2 มาเติม TBA 0.2 มิลลิลิตร และ TCA 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. ต้มในน้ำเดือด 30 นาที
5. ตั้งให้เย็น นำไปหมุนเหวี่ยง 3,500 rpm นาน 5 นาที
6. นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นปรับเป็นศูนย์
7. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากตัวอย่างมาหาความเข้มข้นโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

ชุดการทดลอง	สาร
Negative control	น้ำกลั่น (Set 0)
Positive control	NSS 0.45 มิลลิลิตร+ ferrous sulphate 50 ไมโครลิตร +TBA 0.2 มิลลิลิตร +TCA 1.0 มิลลิลิตร
Standard TMP	NSS 0.45 มิลลิลิตร + std. TMP 0.1 มิลลิลิตร + ferrous sulphate 50 ไมโครลิตร +TBA 0.2 มิลลิลิตร +TCA 1.0 มิลลิลิตร
Sample	NSS 0.45 มิลลิลิตร + egg yolk 0.5 มิลลิลิตร+ ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร + ferrous sulphate 50 ไมโครลิตร +TBA 0.2 มิลลิลิตร +TCA 1.0 มิลลิลิตร

% Inhibition of lipid peroxidation = (1 – E/C) x 100

เมื่อ C = absorbance value of the fully oxidized control (positive control)

E = $(Abs532_{+TBA}) - (Abs532_{-TBA})$

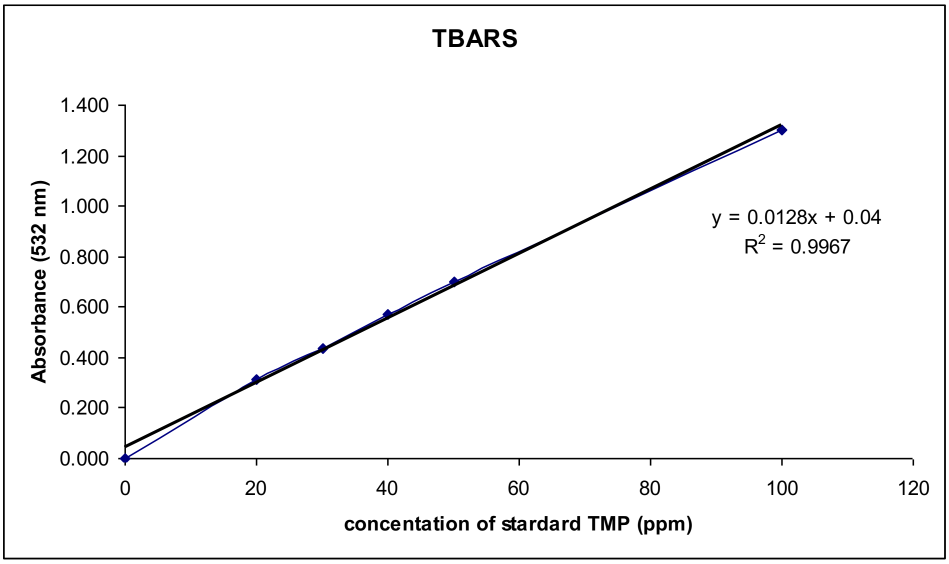
การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

นำ stock ของ TMP ความเข้มข้น 10 ppm มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 จะได้ standard ความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งเพื่อให้ความเข้มข้น ตามตาราง

ความเข้มข้น (ppm)	50	40	30	20	10	0
Standard TMP 100 ppm (มิลลิลิตร)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0

กราฟมาตรฐานของ TMP

ความเข้มข้นของ Standard TMP (ppm)	Absorbance 532 นาโนเมตร
0	0.000
20	0.311
30	0.437
40	0.569
50	0.701
100	1.299



รูปผนวก ข 2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง TMP กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

4.2 การวิเคราะห์ Radical scavenging activity โดยวิธี DPPH system

DPPH radical scavenging activity (ดัดแปลงจาก Banerjee et al., 2005)

สารเคมีและการเตรียม

1. 0.004% 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใน methanol
   ชั่ง DPPH 0.008 กรัม ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร
2. สารมาตรฐาน Vitamin C (L-ascobic acid, mw 176.12 กรัม/mol)
3. ตัวอย่าง

วิธีทำ

1. เติมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรในสารละลาย 0.004% DPPH 3 มิลลิลิตร
2. เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ control ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer
4. คำนวณหา % ของ radical scavenging activity ตามสมการ

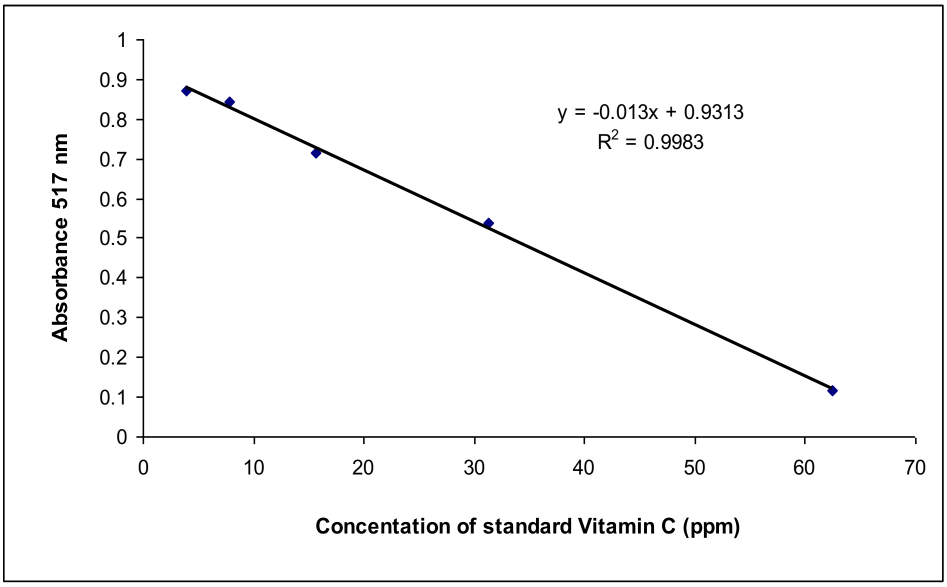
$$\text{DPPH-scavenging activity (\%)} = \frac{(OD_{517}\ \text{ชุดควบคุม} - OD_{517}\ \text{ตัวอย่าง})}{(OD_{517}\ \text{ชุดควบคุม})} \times 100$$

ชุดการทดลอง	สาร	ค่า Absorbance 517 นาโนเมตร
Negative control	methanol	Set 0
Positive control	Methanol + 0.004% DPPH	Ao
Sample/Standard Vitamin C	Sample 0.1 มิลลิลิตร + 0.004% DPPH	Ae ($OD_{517\ \text{ตัวอย่าง}}$ = Ao – Ae)

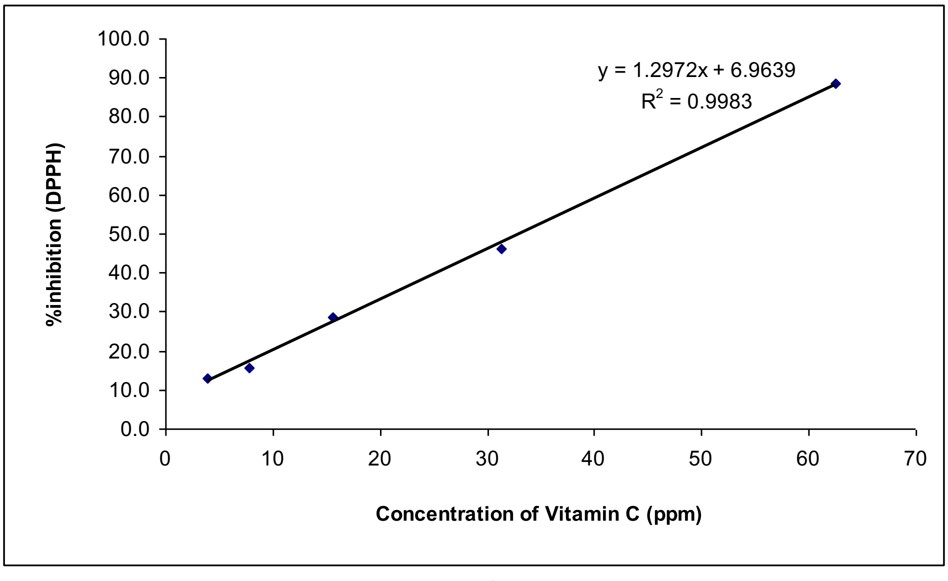
การทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของ Vitamin C

1. เตรียม สารละลายมาตรฐาน Vitamin C ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
2. ชั่ง Vitamin C 0.001 กรัม ละลายใน methanol 1 มิลลิลิตร
3. เจือจางด้วย methanol ในอัตราส่วน 1:2 จะได้ สารมาตรฐาน Vitamin C ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
4. จากนั้นเจือจางด้วย methanol ในอัตราส่วน 1:2 ต่อไปเรื่อยๆ ตามตาราง

ความเข้มข้น (ppm)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.9062
Standard Vitamin C (มิลลิลิตร)	1	1	1	1	1	1	1	1
methanol (มิลลิลิตร)	1	1	1	1	1	1	1	1



รูปผนวก ข 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน Vitamin C กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



รูปผนวก ข 4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Vitamin C

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารป ระกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

วิธี Folin–Ciocalteau เป็นอีกวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolics ในพวกสารสกัดจากผัก และผลไม้ได้ โดยวิธีนี้จะให้ตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Folin–Ciocalteau reagent กับ Sodium bicarbonate ที่อาศัยปฏิกิริยารีดอ กซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเนื่องจาก molybdotungstate reagent และดูการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบ คือ Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน

Folin–Ciocalteau reagent

1. Folin–Ciocalteau reagent 0.2 N
   (2 มิลลิลิตร ของ 2 N Folin–Ciocalteau reagent ละลายในน้ำ DI 10 มิลลิลิตร)
2. Sodium carbonate (Na_2CO_3) 75 กรัม/ลิตร
3. Standard gallic acid solution 100 มิลลิกรัม/50 มิลลิลิตร
4. ตัวอย่าง 1.0 กรัม/100 มิลลิลิตร

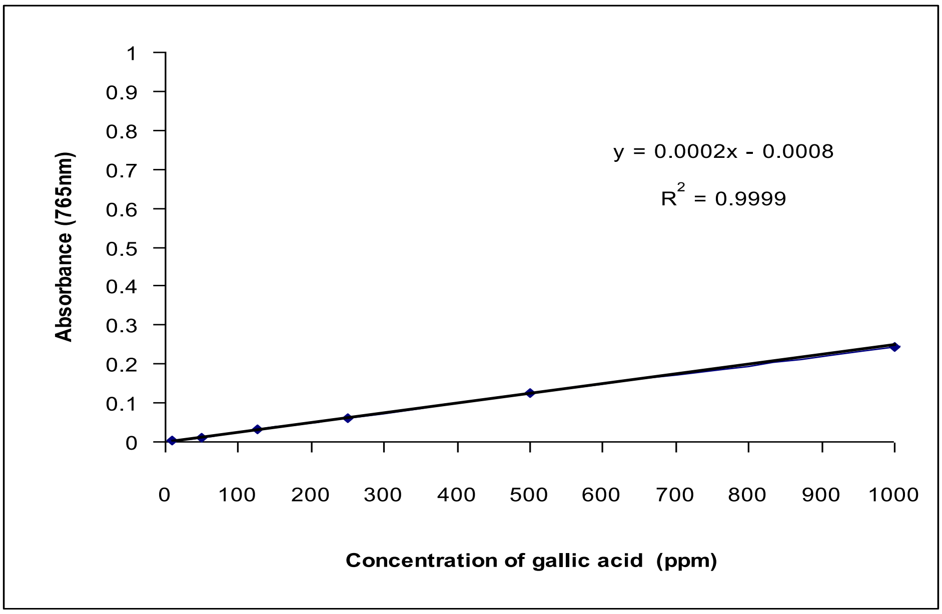
วิธีทำ

1. การเตรียมตัวอย่างและ Standard gallic acid
   1.1 นำตัวอย่าง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และน้ำ DI ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
   1.2 Standard Gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร และน้ำ DI ปริมาตร 2.19 มิลลิลิตร
2. นำสาร 1.1 และ 1.2 มาเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer
5. คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอ ลิกทั้งหมด โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Gallic acid รายงานผลในรูป Phenolic contents = Gallic acid/gram (GE/g)

ชุดการทดลอง	สาร
Negative control (blank)	DI water 2.2 มิลลิลิตร + Folin-Ciocalteu 0.2 มิลลิลิตร +รอ 5 นาที + Na_2CO_3 0.6 มิลลิลิตร รอ 30 นาที
Standard gallic acid	std. gallic acid 0.01 มิลลิลิตร + DI water 2.19 มิลลิลิตร+ Folin-Ciocalteu 0.2 มิลลิลิตร + รอ 5 นาที + Na_2CO_3 0.6 มิลลิลิตร รอ 30 นาที
Sample	sample 200 ไมโครลิตร + DI water 2 มิลลิลิตร + Folin-Ciocalteu 0.2 มิลลิลิตร + รอ 5 นาที + Na_2CO_3 0.6 มิลลิลิตร รอ 30 นาที

การทำกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

ความเข้มข้นของ gallic acid (ppm)	Absorbance (765 นาโนเมตร)
10	0.002
50	0.012
125	0.031
250	0.061
500	0.124
1000	0.245
2000	0.498



รูปผนวก ข 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง สารมาตรฐาน gallic acid กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

4.4 2,2´-azinobiz(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay

สารเคมีและการเตรียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox (mw 250.3) ความเข้มข้น 2.5 mM 10 มิลลิลิตร

ชั่ง trolox 0.0062 กรัม ละลายด้วย absolute ethanol ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol ความเข้มข้นในช่วง 2.5-0.5 mM

2. เตรียมสารละลาย 7 mM ABTS

ชั่ง ABTS 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

3. Potassium persulfate 2.45 mM ($K_2S_2O_8$, dipotassium peroxodisulphate, mw 270.21 g/mol) ชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.0066 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

4. **ABTS stock solution**
   - 7 mM ABTS : Potassium persulfate 2.45 mM = 1:0.5 mol/mol
   - ให้ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์ โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12-16 ชั่วโมง
   - เก็บในขวดสีชาไว้ได้ประมาณ 2-3 วัน

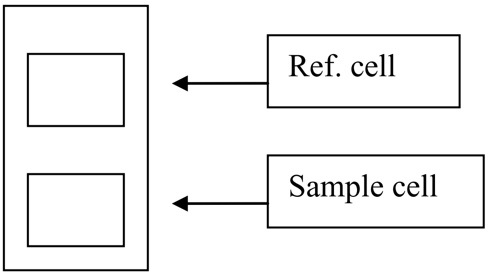
5. **ABTS working solution**
   - Dilute ABTS stock solution ด้วยน้ำ DI ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.7-0.9
   - เตรียมใหม่ทุกวัน
   - เก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน trolox 100 ไมโครลิตร เติม 2 มิลลิลิตร ABTS working solution
2. ผสมให้เข้ากัน เริ่มจับเวลาทิ้งไว้ 3 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/Vis spectrophotometer

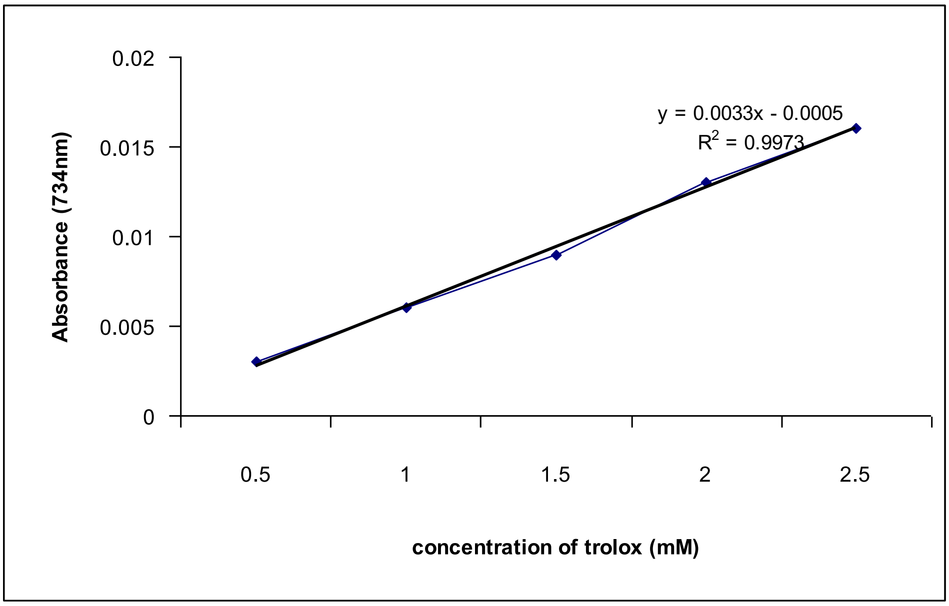
ชุดการทดลอง	สาร	ค่า Absorbance 517 nm
negative control (Ref. cell)	DI water 0.1 มิลลิลิตร + DI water 2 มิลลิลิตร + รอ 3 นาที	set 0
negative control (sample cell)	DI water 0.1 มิลลิลิตร + ABTS working solution 2 มิลลิลิตร + รอ 3 นาที	(ไม่ต้อง set 0 เพื่อ check Ab. ของ ABTS working solution)
positive control (Ref. cell)***	std. trolox/sample 0.1 มิลลิลิตร + DI water 2 มิลลิลิตร + รอ 3 นาที	(ค่า a)
positive control (sample cell)***	std. trolox/sample 0.1 มิลลิลิตร + ABTS working solution 2 มิลลิลิตร + รอ 3 นาที	(ค่า x)

**ถ้าสีเข้มเกินไปเจือจาง sample ด้วย DI water (sample 20 ไมโครลิตร: DI water 80 ไมโครลิตร)

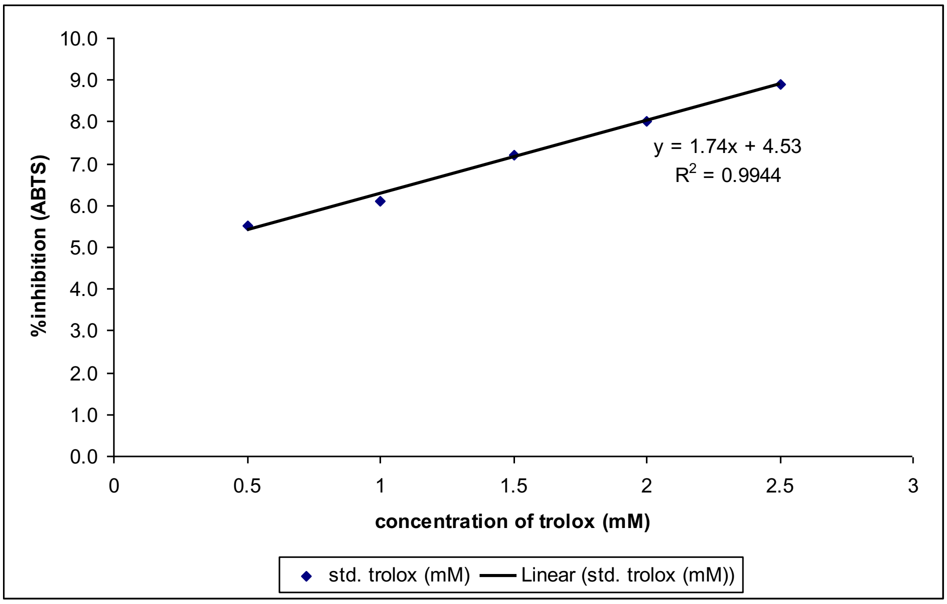


การทำกราฟมาตรฐานของ Trolox

ความเข้มข้น (mM)	2.5	2.0	1.5	1	0.5
Standard trolox 2.5 mM (มิลลิลิตร)	2	1.6	1.2	0.8	0.4
ethanol (มิลลิลิตร)	0	0.4	0.8	1.2	1.6



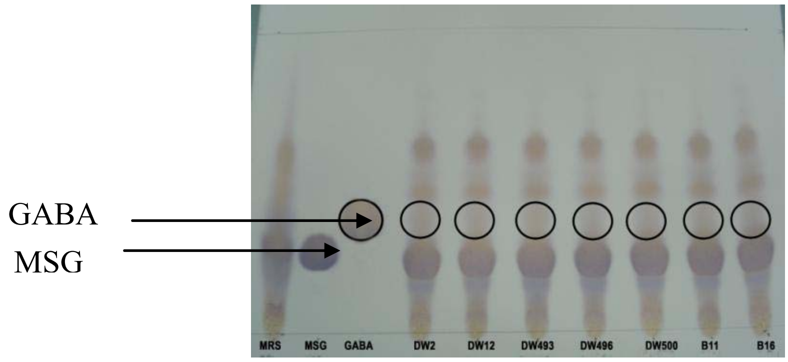
รูปผนวก ข 6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน Trolox กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



รูปผนวก ข 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

5. วิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) (ดัดแปลงจากวิธีของ Choi et al., 2006)

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติก 1 loopful จากหลอดอาหาร MRS broth ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสม 2% monosodium glutamate (MSG) (Cho et al., 2007) และลงในอาหาร glucose-yeast extract-peptone (GYP) ที่ผสม 2% MSG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Hiraga et al., 2008) บ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{o}C นำส่วนใส (supernatant) ของตัวอย่างที่ต้องการแยกหยดสารบนแผ่น TLC plate silica gel plate (Merck; 60 F_{254}, 0.25 มิลลิเมตร) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำแผ่น TLC มาวางในถังแก้วที่มีตัวทำละลายอยู่ ตัวทำละลายชะสารจากข้างล่างขึ้นข้างบน ในขณะที่ทำการทดลองปิดฝาแก้วเพื่อให้บรรยากาศในถังแก้วอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย คือ n-butanol: acetic acid: water (4: 1: 1) จากนั้น spray ด้วย ninhydrin reagent (ninhydrin 0.1 กรัม, absolute ethanol 70 มิลลิลิตร, glacial acetic acid 21 มิลลิลิตร, 2,4,6-collidine 2.9 มิลลิลิตร) แล้วนำไปอบที่ 100 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที แถบของตัวอย่างจะเกิดสีขึ้น

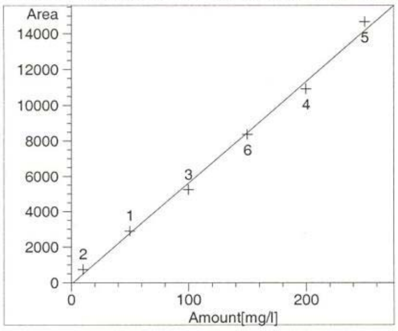


รูปผนวก ข 8 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างกาบา แถบที่: 1, อาหาร MRS/GYP; 2, สารละลายมาตรฐาน MSG ความเข้มข้น 0.1 M; 3, สารละลายมาตรฐานกาบา ความเข้มข้น 0.1 M; 4-10, ไอโซเลทของแบคทีเรียแลกติก

6. วิเคราะห์ปริมาณของกาบา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจาก Cho et al., 2007)

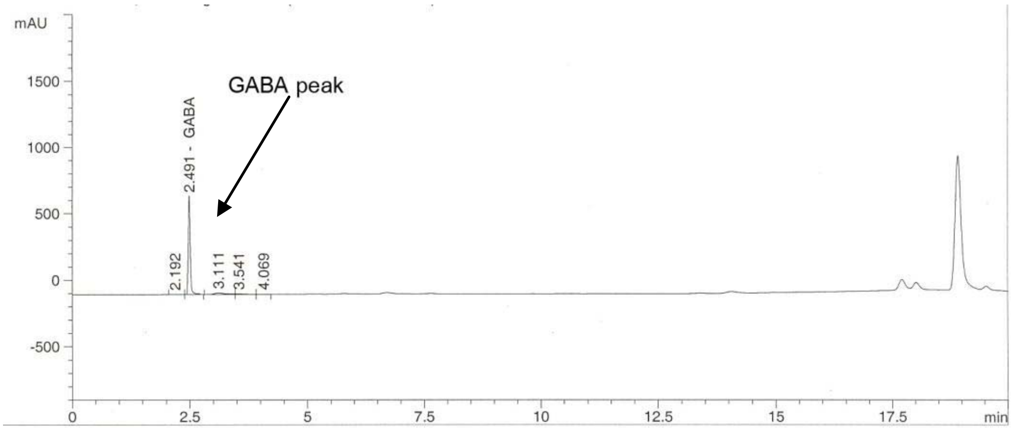
การหาปริมาณ กาบา โดย เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกาบาที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน นำส่วนใส (supernatant) ของตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freez dry) มาละลายด้วย สารละลายของ ethanol: water: triethylamine (อัตราส่วน 4:4:2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมา ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับ สารละลายของ ethanol: water: triethylamine: phenylisothiocyanate (PITC) (อัตราส่วน 6: 1: 1: 1) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ต้องการด้วยเอทานอล นำไป กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร (0.2 m nylon membrane filter) ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series) โดยใช้ คอลัมน์ Hypersil ODS C_{18} ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 ไมโครเมตร อัตราการไหล (Flow rate) ที่ใช้คือ แบบเส้นตรง (linear gradient) 0-100% อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยสารละลาย B คือ 60% acetonitrile เป็นเวลา 50 นาที อุณหภูมิ $46^{o}C$ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือสารละลาย A ประกอบด้วย 1.4 mM sodium acetate (NaHAc), 0.1% triethanolamine (TEA), และ 6% acetonitrile (CH_3CN) (พีเอช 6.1) ปรับพีเอช ด้วย acetic acid เข้มข้น สารละลาย B คือ 60% acetonitrile (60% CH_3CN: 40% water) เครื่องตรวจวัด (Detector) ที่ใช้คือ UV detector (VWD) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

```
Calibration Report Options :
    Printout of recalibrations within a sequence:
        Calibration Table after Recalibration
        Normal Report after Recalibration
    If the sequence is done with bracketing:
        Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

RetTime   Lvl    Amount       Area      Amt/Area   Ref Grp Name
 [min] Sig      [mg/l]
-------|--|--|----------|----------|----------|---|--|---------------
  2.586  1  2    10.00000   742.98981 1.34591e-2 +      Gaba
            1    50.00000 2892.78223 1.72844e-2
            3   100.00000 5237.18555 1.90942e-2
            6   150.00000 8366.44531 1.79288e-2
            4   200.00000 1.09271e4  1.83032e-2
            5   250.00000 1.46694e4  1.70423e-2
=====================================================================
                           Peak Sum Table
=====================================================================

***No Entries in table***
=====================================================================
=====================================================================
                         Calibration Curves
=====================================================================
```




```
Gaba at exp. RT: 2.586
VWD1 A, Wavelength=254 nm
Correlation:              0.99763
Residual Std. Dev.:   400.03024
Formula: y = mx + b
      m:      57.03973
      b:     -85.71959
      x: Amount[mg/l]
      y: Area
```

รูปผนวก ข 9 กราฟมาตรฐานของกาบา

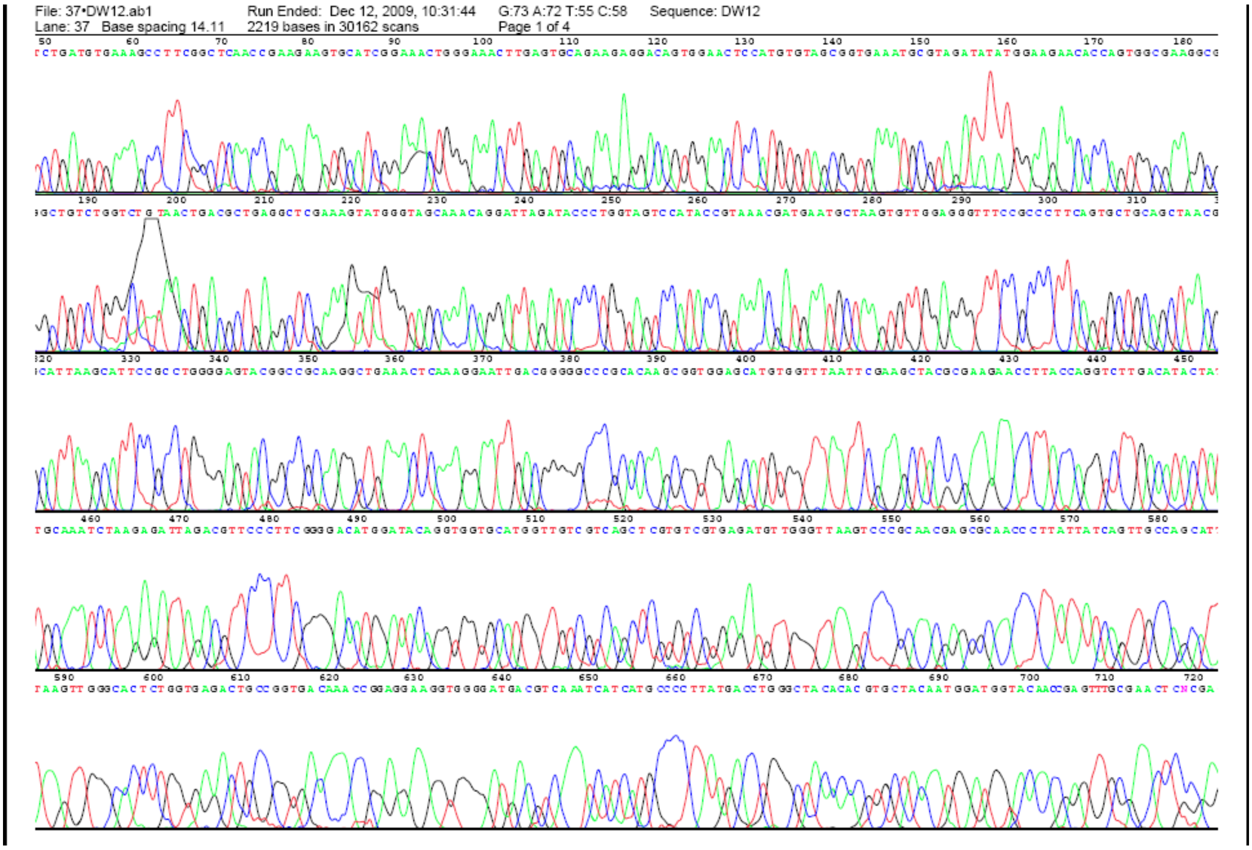


รูปผนวก ข 10 Peak ของกาบา โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจาก Cho et al., 2007)

ภาคผนวก ค

ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก โดยวิธี partial 16S rDNA sequencing electropheogram หน่วยโครงการพัฒนาวิช าการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



รูปผนวก ค 1 การจัดจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี partial 16S rDNA sequencing electropheogram

Lactobacillus plantarum strain S7

Length = 1447

Score = 937 bits (1038), Expect = 0.0

Identities 519/519(100%), Gaps = 0/519 (0%)

Strand = Plus/Plus

Accession number GU195646

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Sample Name : DW12

---

519 bp Identification

Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments: SCORE
E VALUE

GU195646 *Lactobacillus plantarum* strain S7 937
0.0
GU195645 *Lactobacillus plantarum* strain S4 937
0.0
GU195644 *Lactobacillus plantarum* strain S3 937
0.0
GU195643 *Lactobacillus plantarum* strain S1 937
0.0
GU125615 *Lactobacillus plantarum* strain IMAU10173 937
0.0

BLASTN 2.2.22+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

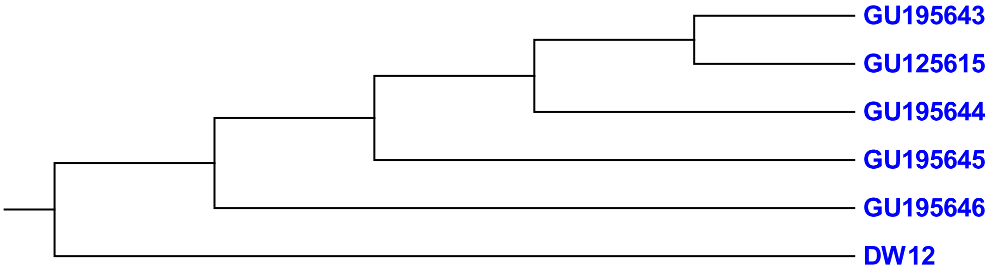
RID: J6KCFTWR013

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
10,430,650 sequences; 29,668,669,480 total letters

Query= DW12 Length=519

```
>DW12
CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTG
CAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAG
GGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGAT
TAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
```

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)




```
>gi|268619090|gb|GU195646.1|  Lactobacillus plantarum strain S7 16S
ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1447

 Score =  937 bits (1038),  Expect = 0.0
 Identities = 519/519 (100%), Gaps = 0/519 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  49    TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
108
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  574   TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
633

Query  109   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
168
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  634   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
693

Query  169   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
228
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  694   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
753

Query  229   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
288
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  754   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
813

Query  289   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
348
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  814   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
873

Query  349   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
408
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  874   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
933

Query  409   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
468
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  934   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
993

Query  469   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
528
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  994    TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
1053

Query  529    GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  567
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1054   GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1092
```

>gi|268619089|gb|GU195645.1| *Lactobacillus plantarum* strain S4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1446

```
 Score =  937 bits (1038),  Expect = 0.0
 Identities = 519/519 (100%), Gaps = 0/519 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  49     TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
108
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575    TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
634

Query  109    GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
168
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  635    GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
694

Query  169    ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
228
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  695    ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
754

Query  229    GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
288
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  755    GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
814

Query  289    GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
348
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  815    GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
874

Query  349    CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
408
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  875    CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
934

Query  409    TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
468
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  935    TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
994

Query  469    TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
528
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  995    TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
1054

Query  529    GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  567
```

```
                 |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1055  GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1093
```

>gi|268619088|gb|GU195644.1| *Lactobacillus plantarum* strain S3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1448

```
 Score =  937 bits (1038),  Expect = 0.0
 Identities = 519/519 (100%), Gaps = 0/519 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  49    TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
108
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575   TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
634

Query  109   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
168
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  635   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
694

Query  169   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
228
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  695   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
754

Query  229   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
288
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  755   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
814

Query  289   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
348
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  815   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
874

Query  349   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
408
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  875   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
934

Query  409   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
468
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  935   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
994

Query  469   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
528
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  995   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
1054

Query  529   GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  567
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1055  GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1093
```

```
>gi|268619087|gb|GU195643.1|  Lactobacillus plantarum strain S1 16S
ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1451

 Score =  937 bits (1038),  Expect = 0.0
 Identities = 519/519 (100%), Gaps = 0/519 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  49    TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
108
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  576   TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
635

Query  109   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
168
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  636   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
695

Query  169   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
228
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  696   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
755

Query  229   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
288
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  756   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
815

Query  289   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
348
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  816   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
875

Query  349   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
408
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  876   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
935

Query  409   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
468
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  936   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
995

Query  469   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
528
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  996   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
1055

Query  529   GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  567
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1056  GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1094
```

>gi|268527590|gb|GU125615.1| *Lactobacillus plantarum* strain IMAU10173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1457

```
 Score =  937 bits (1038),  Expect = 0.0
 Identities = 519/519 (100%), Gaps = 0/519 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  49    TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
108
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  576   TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
635

Query  109   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
168
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  636   GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
695

Query  169   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
228
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  696   ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTA
755

Query  229   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
288
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  756   GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGA
815

Query  289   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
348
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  816   GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGC
875

Query  349   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
408
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  876   CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
935

Query  409   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
468
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  936   TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGA
995

Query  469   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
528
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  996   TTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
1055

Query  529   GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  567
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1056  GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT  1094
```

```
LOCUS       GU195646                1447 bp    DNA     linear   BCT 23-NOV-
2009
DEFINITION  Lactobacillus plantarum strain S7 16S ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   GU195646
VERSION     GU195646.1  GI:268619090
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus plantarum
  ORGANISM  Lactobacillus plantarum
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1447)
  AUTHORS   Wan,Q. and Cao,J.
  TITLE     Isolation and identification of lactic acid bacteria from
natural
            fermented pickle
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1447)
  AUTHORS   Wan,Q., Cao,J., Wu,X.Q., Li,Y.F., Fu,Y. and Li,F.J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (09-NOV-2009) College of Bioengineering, Henan
University
            of Technology, Lianhua Street, Zhengzhou, Henan 450001, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1447
                     /organism="Lactobacillus plantarum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="S7"
                     /isolation_source="pickle"
                     /db_xref="taxon:1590"
                     /country="China"
                     /collection_date="18-Aug-2009"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 27f, rev_name: 1492r"
     rRNA            <1..>1447
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ctatacatgc aagtcgaacg aactctggta ttgattggtg cttgcatcat gatttacatt
       61 tgagtgagtg gcgaactggt gagtaacacg tgggaaacct gcccagaagc gggggataac
      121 acctggaaac agatgctaat accgcataac aacttggacc gcatggtcca agtttgaaag
      181 atggcttcgg ctatcacttt tggatggtcc cgcggcgtat tagctagatg gtggggtaac
      241 ggctcaccat ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt aatcggccac attgggactg
      301 agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccacaa tggacgaaag
      361 tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga agggtttcgg ctcgtaaaac tctgttgtta
      421 aagaagaaca tatctgagag taactgntca ggtattgacg gtatttaacc agaaagccac
      481 ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt ccggatttat
      541 tgggcgtaaa gcgagcgcag gcggtttttt aagtctgatg tgaaagcctt cggctcaacc
      601 gaagaagtgc atcggaaact gggaaacttg agtgcagaag aggacagtgg aactccatgt
      661 gtagcggtga aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctgtctggtc
      721 tgtaactgac gctgaggctc gaaagtatgg gtagcaaaca ggattagata ccctggtagt
      781 ccataccgta aacgatgaat gctaagtgtt ggagggtttc cgcccttcag tgctgcagct
      841 aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctgaaactca aaggaattga
      901 cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgcg aagaacctta
      961 ccaggtcttg acatactatg caaatctaag agattagacg ttcccttcgg ggacatggat
     1021 acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac
     1081 gagcgcaacc cttattatca gttgccagca ttaagttggg cactctggtg agactgccgg
     1141 tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct
     1201 acacacgtgc tacaatggat ggtacaacga gttgcgaact cgcgagagta agctaatctc
     1261 ttaaagccat tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc ctacatgaag tcggaatcgc
     1321 tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc
     1381 gtcacaccat gagagtttgt aacacccaaa gtcggtgggg taacctttta ggaaccagcc
     1441 gcctata
```

```
LOCUS       GU195645                1446 bp    DNA     linear   BCT 23-NOV-
2009
DEFINITION  Lactobacillus plantarum strain S4 16S ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   GU195645
VERSION     GU195645.1  GI:268619089
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus plantarum
  ORGANISM  Lactobacillus plantarum
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1446)
  AUTHORS   Wan,Q. and Cao,J.
  TITLE     Isolation and identification of lactic acid bacteria from
natural
            fermented pickle
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1446)
  AUTHORS   Wan,Q., Cao,J., Wu,X.Q., Li,Y.F., Fu,Y. and Li,F.J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (09-NOV-2009) College of Bioengineering, Henan
University
            of Technology, Lianhua Street, Zhengzhou, Henan 450001, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1446
                     /organism="Lactobacillus plantarum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="S4"
                     /isolation_source="pickle"
                     /db_xref="taxon:1590"
                     /country="China"
                     /collection_date="18-Aug-2009"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 27f, rev_name: 1492r"
     rRNA            <1..>1446
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gctatacatg caagtcgaac gaactctggt attgattggt gcttgcatca tgatttacat
       61 ttgagtgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag cgggggataa
      121 cacctggaaa cagatgctaa taccgcataa caacttggac cgcatggtcc gagnttgaaa
      181 gatggcttcg gctatcactt ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat ggtgnggtaa
      241 cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact
      301 gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atggacgaaa
      361 gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttgtt
      421 aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac ggtatttaac cagaaagcca
      481 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta
      541 ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct tcggctcaac
      601 cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg
      661 tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctgtctggt
      721 ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag
      781 tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc
      841 taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg
      901 acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc gaagaacctt
      961 accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg gggacatgga
     1021 tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa
     1081 cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attaagttgg gcactctggt gagactgccg
     1141 gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc
     1201 tacacacgtg ctacaatgga tggtacaacg agttgcgaac tcgcgagagt aagctaatct
     1261 cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggaatcg
     1321 ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
     1381 cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agtcggtggg gtaaccttta ggaaccagcc
     1441 gctaag
```

```
LOCUS       GU195644                1448 bp    DNA     linear   BCT 23-NOV-
2009
DEFINITION  Lactobacillus plantarum strain S3 16S ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   GU195644
VERSION     GU195644.1  GI:268619088
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus plantarum
  ORGANISM  Lactobacillus plantarum
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1448)
  AUTHORS   Wan,Q. and Cao,J.
  TITLE     Isolation and identification of lactic acid bacteria from
natural
            fermented pickle
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1448)
  AUTHORS   Wan,Q., Cao,J., Wu,X.Q., Li,Y.F., Fu,Y. and Li,F.J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (09-NOV-2009) College of Bioengineering, Henan
University
            of Technology, Lianhua Street, Zhengzhou, Henan 450001, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1448
                     /organism="Lactobacillus plantarum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="S3"
                     /isolation_source="pickle"
                     /db_xref="taxon:1590"
                     /country="China"
                     /collection_date="18-Aug-2009"
                     /note="PCR_primers=fwd_name: 27f, rev_name: 1492r"
     rRNA            <1..>1448
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gctatacatg caagtcgaac gaactctggt attgattggt gcttgcatca tgatttacat
       61 ttgagtgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag nggggggataa
      121 cacctggaaa cagatgctaa taccgcataa caacttggac cgcatggtcc nagtttgaaa
      181 gatggcttcg gctatcactt ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat ggtgnggtaa
      241 cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact
      301 gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atggacgaaa
      361 gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttgtt
      421 aaagaagaac atatctgaga gtaactgntc aggtattgac ggtatttaac cagaaagcca
      481 cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta
      541 ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct tcggctcaac
      601 cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg
      661 tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctgtctggt
      721 ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag
      781 tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc
      841 taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc aaaggaattg
      901 acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc gaagaacctt
      961 accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg gggacatgga
     1021 tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa
     1081 cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attaagttgg gcactctggt gagactgccg
     1141 gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc
     1201 tacacacgtg ctacaatgga tggtacaacg agttgcgaac tcgcgagagt aagctaatct
     1261 cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggaatcg
     1321 ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc
     1381 cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agtcggtggg gtaacctttt aggaaccagc
     1441 cgcctaag
```

```
LOCUS       GU195643                1451 bp    DNA     linear   BCT 23-NOV-
2009
DEFINITION  Lactobacillus plantarum strain S1 16S ribosomal RNA gene,
partial
            sequence.
ACCESSION   GU195643
VERSION     GU195643.1  GI:268619087
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus plantarum
  ORGANISM  Lactobacillus plantarum
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1451)
  AUTHORS   Wan,Q. and Cao,J.
  TITLE     Isolation and identification of lactic acid bacteria from
natural
            fermented vegetable juice
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1451)
  AUTHORS   Wan,Q., Cao,J., Wu,X.Q., Li,Y.F., Li,F.J. and Fu,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-OCT-2009) College of Bioengineering, Henan
University
            of Technology, Lianhua Street, Zhengzhou, Henan 450001, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1451
                     /organism="Lactobacillus plantarum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="S1"
                     /isolation_source="fermented vegetable juice"
                     /db_xref="taxon:1590"
     rRNA            <1..>1451
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gcctatacat gcaagtcgaa cgaactctgg tattgattgg tgcttgcatc atgatttaca
       61 tttgagtgag tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata
      121 acacctggaa acagatgcta ataccgcata acaacttgga ccgcatggtc cnagtttgaa
      181 agatggcttc ggctatcact tttggatggt cccgcggcgt attagctaga tggtggggta
      241 acggctcacc atggcaatga tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac
      301 tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa
      361 agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtgaa gaagggtttc ggctcgtaaa actctgttgt
      421 taaagaagaa catatctgag agtaactgnt caggtattga cggtatttaa ccagaaagcc
      481 acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt
      541 attgggcgta aagcgagcgc aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa
      601 ccgaagaagt gcatcggaaa ctgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat
      661 gtgtagcggt gaaatgcgta gatatatgga agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg
      721 tctgtaactg acgctgaggc tcgaaagtat gggtagcaaa caggattaga taccctggta
      781 gtccataccg taaacgatga atgctaagtg ttggagggtt tccgcccttc agtgctgcag
      841 ctaacgcatt aagcattccg cctggggagt acggccgcaa ggctgaaact caaaggaatt
      901 gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagctacg cgaagaacct
      961 taccaggtct tgacatacta tgcaaatcta agagattaga cgttcccttc ggggacatgg
     1021 atacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca
     1081 acgagcgcaa cccttattat cagttgccag cattaagttg ggcactctgg tgagactgcc
     1141 ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg
     1201 ctacacacgt gctacaatgg atggtacaac gagttgcgaa ctcgcgagag taagctaatc
     1261 tcttaaagcc attctcagtt cggattgtag gctgcaactc gcctacatga agtcggaatc
     1321 gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc
     1381 ccgtcacacc atgagagttt gtaacaccca aagtcggtgg ggtaaccttt taggaaccag
     1441 ccgcctaagt g
```

```
LOCUS       GU125615               1457 bp    DNA     linear   BCT 22-NOV-
2009
DEFINITION  Lactobacillus plantarum strain IMAU10173 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   GU125615
VERSION     GU125615.1  GI:268527590
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus plantarum
  ORGANISM  Lactobacillus plantarum
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1457)
  AUTHORS   Sun,Z., Luo,B., Liu,W., Yu,J., Menghe,B. and Zhang,H.
  TITLE     Identification and characterization of the dominant lactic acid
            bacteria from the two humped camel milk produced in Inner
Mongolia
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1457)
  AUTHORS   Sun,Z., Luo,B., Liu,W., Yu,J., Menghe,B. and Zhang,H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-OCT-2009) Key Laboratory of Dairy Biotechnology
and
            Engineering, Education Ministry, Inner Mongolia Agricultural
            University, 306 Zhaowuda Road, Hohhot, Inner Mongolia 010018,
China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1457
                     /organism="Lactobacillus plantarum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="IMAU10173"
                     /isolation_source="fermented camel milk"
                     /culture_collection="LABCC:S1-1"
                     /db_xref="taxon:1590"
                     /country="China: Western Inner Mongolia"
     rRNA            <1..>1457
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgctatacat gcaagtcgaa cgaactctgg tattgattgg tgcttgcatc atgatttaca
       61 tttgagtgag tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggaaac ctgcccagaa gcgggggata
      121 acacctggaa acagatgcta ataccgcata acaacttgga ccgcatggtc cgagcttgaa
      181 agatggcttc ggctatcact tttggatggt cccgcggcgt attagctaga tggtggggta
      241 acggctcacc atggcaatga tacgtagccg acctgagagg gtaatcggcc acattgggac
      301 tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgaa
      361 agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtgaa gaagggtttc ggctcgtaaa actctgttgt
      421 taaagaagaa catatctgag agtaactgtt caggtattga cggtatttaa ccagaaagcc
      481 acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt
      541 attgggcgta aagcgagcgc aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc ttcggctcaa
      601 ccgaagaagt gcatcggaaa ctgggaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat
      661 gtgtagcggt gaaatgcgta gatatatgga agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg
      721 tctgtaactg acgctgaggc tcgaaagtat gggtagcaaa caggattaga taccctggta
      781 gtccataccg taaacgatga atgctaagtg ttggagggtt tccgcccttc agtgctgcag
      841 ctaacgcatt aagcattccg cctggggagt acggccgcaa ggctgaaact caaaggaatt
      901 gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagctacg cgaagaacct
      961 taccaggtct tgacatacta tgcaaatcta agagattaga cgttcccttc ggggacatgg
     1021 atacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca
     1081 acgagcgcaa cccttattat cagttgccag cattaagttg ggcactctgg tgagactgcc
     1141 ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg
     1201 ctacacacgt gctacaatgg atggtacaac gagttgcgaa ctcgcgagag taagctaatc
     1261 tcttaaagcc attctcagtt cggattgtag gctgcaactc gcctacatga agtcggaatc
     1321 gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc
     1381 ccgtcacacc atgagagttt gtaacaccca aagtcggtgg ggtaaccttt taggaaccag
     1441 ccgcctaagg tggacca
```

รูปผนวก ค 2 ผลของการบ่งชี้ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* DW12 โดยใช้ API 50 CHL kit โดยสีเหลืองแสดงผล positive สีม่วงแสดงผล negative

ตารางผนวก ค 1 การบ่งชี้ชนิดของ *Lactobacillus plantarum* DW12 โดยใช้ API 50 CHL kit

Carbohydrate fermentation	DW12	Carbohydrate fermentation	DW12	Carbohydrate fermentation	DW12
Glycerol	-	Mannitol	+	D-Raffinose	+
Erythritol	-	Sorbitol	+	Amidon	-
D-Arabinose	-	α-Methyl-D-mannoside	-	Glycogen	-
L-Arabinose	+	α-Methyl-D-glucoside	-	Xylitol	-
Ribose	+	N-Acetyl glucosamine	+	β-Gentiobiose	-
D-Xylose	-	Amygdaline	+	D-Turanose	+
L-Xylose	-	Arbutin	+	D-Lyxose	-
Adonitol	-	Esculine	+	D-Tagatose	-
β-Methyl-xyloside	-	Salicine	+	D-Fucose	-
Galactose	+	Cellobiose	+	L-Fucose	-
D-Glucose	+	Maltose	+	D-Arabitol	-
D-Fructose	+	Lactose	+	L-Arabitol	-
D-Mannose	+	Melibiose	+	Gluconate	-
L-Sorbose	-	Saccharose	+	2-Ceto-gluconate	-
Rhamnose	-	Trehalose	+	5-Ceto-gluconate	-
Dulcitol	-	Inulin	-		
Inositol	-	Melezitose	+		

ภาคผนวก ง

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

Hedonic-5-scale

ผลิตภัณฑ์............น้ำหมักสาหร่ายผมนาง อายุการหมัก 120 วัน..
ชื่อ.. วันที่...........................เวลา.......................

คำแนะนำ กรุณาสังเกตและทดสอบตัวอย่าง แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

5 = ยอมรับมากที่สุด 4 = ยอมรับมาก
3 = ยอมรับ 2 = ยอมรับน้อย
1 = ไม่ยอมรับ

	รหัสตัวอย่าง		
ปัจจัย	101	202	303
กลิ่น	....	....	....
รสชาติ	....	....	....
ความใส	....	....	....
สี	....	....	....
การยอมรับรวม	....	....	....

ข้อเสนอแนะ
....
....
....

ขอบคุณค่ะ

ภาคผนวก จ

มผช. 481/2547
มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน
น้ำหมักพืช

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมเฉพาะน้ำหมักพืชแท้และน้ำหมักพืชปรุงพร้อมดื่ม บรรจุในภาชนะบรรจุ

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 น้ำหมักพืช หมายถึง เครื่องดื่มที่ได้จากการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชชนิดเดียวหรือหลายชนิด เช่น ลูกยอ ลูกสมอไทย เหง้ากระชายดำ ผลมะขามป้อม ผลมะเม่า ที่สดหรือแห้งและอยู่ในสภาพดีมาล้างให้สะอาดอาจหั่นหรือตัดแต่งนำมาผ่านกรรมวิธีการผลิตน้ำหมักพืชในภาชนะที่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำหมักพืช

2.2 กรรมวิธีการผลิตน้ำหมักพืช หมายถึง การหมักพืชหรือการสกัดน้ำจากพืช ด้วยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกรดแลกติกเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus, Lactobacillus casei,* ไบฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*), *Lactobacillus acidophillus* หรือจุลินทรีย์อื่น ที่สามารถใช้ในการผลิตน้ำหมักพืช ทั้งนี้อาจมีจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักบ่มที่มีชีวิตคงเหลืออยู่

2.3 น้ำหมักพืชแท้ หมายถึง น้ำหมักพืชที่ไม่มีการเจือน้ำ และไม่ปรุงแต่งกลิ่นรส

2.4 น้ำหมักพืชปรุง หมายถึง น้ำหมักพืชที่ทำจากน้ำหมักพืชแท้ อาจมีการเจือน้ำ ปรุงแต่งกลิ่นรส

3. ชนิด

3.1 น้ำหมักพืช แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

3.1.1 น้ำหมักพืชแท้

3.1.2 น้ำหมักพืชปรุง

4. คุณลักษณะที่ต้องการ

4.1 ลักษณะทั่วไป

ต้องเป็นของเหลว อาจตกตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้ อาจมีชิ้นเนื้อพืชปนอยู่ได้บ้างเล็กน้อย

4.2 สี กลิ่น และกลิ่นรส

ต้องมีสี กลิ่น และกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้และกรรมวิธีการผลิต ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 9.1 แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

4.3 สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

4.4 วัตถุเจือปนอาหาร (ถ้ามี)

หากมีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

4.5 เอทิลแอลกอฮอล์

ต้องไม่เกินร้อยละ 3 โดยปริมาตร

4.6 เมทิลแอลกอฮอล์

ต้องไม่เกิน 240 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.7 ความเป็นกรด-ด่าง

ต้องไม่เกิน 4.3

4.8 จุลินทรีย์

4.8.1 *Salmonella* sp. ต้องไม่พบในตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร

4.8.2 *Staphylococcus aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

4.8.3 *Clostridium perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร

4.8.4 *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร

4.8.5 ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

5. สุขลักษณะ

5.1 สุขลักษณะในการทำน้ำหมักพืช ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

6. การบรรจุ

6.1 ให้บรรจุน้ำหมักพืชในภาชนะบรรจุที่สะอาด ปิดได้สนิท และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

6.2 ปริมาตรสุทธิหรือน้ำหนักสุทธิของน้ำหมักพืชในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

7. เครื่องหมายและฉลาก

7.1 ที่ภาชนะบรรจุน้ำหมักพืชทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ ให้เห็นได้ง่ายและชัดเจน

(1) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำหมักกระชายดำเข้มข้น น้ำหมักกระชายดำพร้อมดื่ม

(2) ส่วนประกอบที่สำคัญ

(3) ชนิดและปริมาณวัตถุเจือปนอาหาร (ถ้ามี)

(4) ปริมาตรสุทธิหรือน้ำหนักสุทธิ

(5) วัน เดือน ปีที่บรรจุ และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า “ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)”

(6) ข้อแนะนำในการเก็บรักษาตามชนิดของผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิต

(7) คำเตือนได้แก่ “หยุดบริโภคเมื่อมีอาการผิดปกติ ” และคำเตือนพิเศษอื่นๆ ของแต่ละผลิตภัณฑ์

(8) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

ในกรณีใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

8. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

8.1 รุ่นในที่นี้ หมายถึง น้ำหมักพืชชนิดเดียวกันที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำในระยะเวลาเดียวกัน

8.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

8.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.3 ข้อ 6 และข้อ 7 จึงจะถือว่าน้ำหมักพืชรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไปและสี กลิ่น และกลิ่นรส ให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ 8.2.1 แล้ว จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.1 และข้อ 4.2 จึงจะถือว่าน้ำหมักพืชรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร เอทิลแอลกอฮอล์ เมทิลแอลกอฮอล์และความเป็นกรด -ด่าง ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุนำมาทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 300 มิลลิลิตรหรือน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 300 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาตรรวม หรือน้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.4 ถึงข้อ 4.7 จึงจะถือว่าน้ำหมักพืชรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบจุลินทรีย์ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ โดยมีปริมาตรรวมไม่น้อยกว่า 500 มิลลิลิตรหรือน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 300 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่น

เดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาตรรวม หรือน้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.8 จึงจะถือว่าน้ำหมักพืชรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างน้ำหมักพืชต้องเป็นไปตามข้อ 8.2.1 ข้อ 8.2.2 ข้อ 8.2.3 และข้อ 8.2.4 ทุกข้อ จึงจะถือว่าน้ำหมักพืชรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

9. การทดสอบ

9.1 การทดสอบลักษณะทั่วไปและสี กลิ่น และกลิ่นรส

9.1.1 ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบน้ำหมักพืชอย่างน้อย 5 คนแต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

9.1.2 เทตัวอย่างน้ำหมักพืชลงในแก้วใสโดยมีกระดาษสีขาวเป็นฉากหลัง ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจและชิม

9.1.3 หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตาราง

ตาราง จ 1 หลักเกณฑ์การให้คะแนนน้ำหมักพืช

(ข้อ 9.1.3)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	ต้องเป็นของเหลว อาจตกตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้ อาจมีชิ้นเนื้อพืชปนอยู่ได้บ้างเล็กน้อย	4	3	2	1
สี กลิ่น และกลิ่นรส	ต้องมีสี กลิ่น และกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้และกรรมวิธีการผลิตปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์	4	3	2	1

9.2 การทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ให้ตรวจพินิจ

9.3 การทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร เอทิลแอลกอฮอล์ เมทิลแอลกอฮอล์ และความเป็นกรด-ด่าง

ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

9.4 การทดสอบจุลินทรีย์

ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

9.5 การทดสอบปริมาตรสุทธิหรือน้ำหนักสุทธิ

ให้ใช้เครื่องวัดปริมาตรหรือเครื่องชั่งที่เหมาะสม

ภาคผนวก ก.

สุขลักษณะ

(ข้อ 5.1)

ก.1 สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ก.1.1 สถานที่ตั้งอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ทำเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดย

ก.1.1.1 สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะและสกปรก

ก.1.1.2 อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า ควัน มากผิดปกติ

ก.1.1.3 ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

ก.1.2 อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบก่อสร้างในลักษณะที่ง่า ยแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.1.2.1 พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำ ก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาดและซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.1.2.2 แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ

ก.1.2.3 พื้นที่ปฏิบัติงานไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

ก.2 เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ทำ

ก.2.1 ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ทำจากวัสดุผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.2.2 เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

ก.3 การควบคุมกระบวนการทำ

ก.3.1 วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพ มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.3.2 การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง ให้มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

ก.4 การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.4.1 น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.4.2 มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม

ก.4.3 มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่ผลิตภัณฑ์

ก.4.4 สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง และใช้ในปริมาณที่เหมาะสมและเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

ก.5 บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน หลังการใช้ห้องสุขาและเมื่อมือสกปรก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอนุสรา รัตนบุรี
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5110220121

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จ**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2550

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสนับสนุนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เป็นผู้ช่วยนักวิจัย (Research Assistant) พ.ศ. 2551 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Ratanaburee, A., Charernjiratrakul, W. and Kantachote, D. 2009. Isolation of Lactic Acid Bacteria with Ability to Produce γ-Aminobutyric Acid (GABA) Isolated from Fermented Foods. Proceeding of 1st Graduate Research Conference. Chiangmai University, November 27, 2009. pp. 441-448