

## สารชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด

### Bioactive Ingredients from Lactic Acid Bacteria

พัชร ลิ้มปิยเจียร<sup>1/</sup> สุภมาส กลิ่นขจร<sup>1/</sup> สุปรียา สุขเกษม<sup>1/</sup> พจนา สุภาสุรย์<sup>2/</sup>

Patcharee Limpisathian<sup>1/</sup> Supamas Klinkajorn<sup>1/</sup> Supreeya Sukkasem<sup>1/</sup> Patchana Supasoon<sup>2/</sup>

#### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in fermented products such as yogurt and proteolytic enzyme for industry used. The main roles of LAB are the production of lactic acid and proteolysis of the substrate to release peptides and free amino acids. In this study, peptide of nisin composed of 34 amino acids and  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) derived from free amino acid were investigated. Nisin as a biopreservative peptide produced by cleavage of leader peptides by specific peptidase from *Lactococcus* species. It inhibits biosynthesis of DNA, RNA, protein and polysaccharides in food poisoning bacteria and recognizes as safe. In addition, GABA produces from the substrate of glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme. It inhibits neurotransmitter at nerve receptor site to reduce blood pressure, sleeplessness and depression symptom. The objectives of this study were to produce nisin using soy milk as medium and use it as biopreservative in pasteurized soy milk and tofu. The investigation included the optimal condition for GABA synthesizing from glutamic acid as substrate by LAB and applied to use in food products. The research was conducted at Post-harvest and Processing Research and Development Office, Department of Agriculture during October 2011 - September 2013.

In this study, *Lactococcus lactis* 1520 (*Lc. 1520*) alone or together with *Lactobacillus delbrueckii* 892 (*Lb. 892*) were inoculated in sterilized soy milk growth medium fermented under nitrogen. Temperature was control at 30°C and stirred at 80 rpm. Clear zone method was using for nisin detection. The results showed that acidity was produced mostly by *Lactobacillus sp.* during pH 6.4 to 3.8. It was dropped to 4.0 within 10 hours. As the result, the production of nisin was in 24 hours and there were nonsignificant difference comparing to 48 hours. To comparison, nisin produced by *Lc. 1520* plus *Lb. 892* was higher than *Lc. 1520* alone in 24 hours. There were significant difference ( $p < 0.01$ ). Moreover, to study the optimal condition for synthesizing GABA, the three LAB; *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (*Lb. 8014*), *Lactobacillus brevis* NCIMB 947

<sup>1</sup> สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Post-Harvest and Products Processing Research and Development Office

<sup>2</sup> สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

Plant Standard and Certification Office



and *Lactococcus lactis* NCIMB 701007, were examined. The results showed that LAB which had the highest ability to synthesis GABA was *Lb.* 8014. It could synthesize GABA as 162.1 mg/100g when the MSG had change from 0% to 0.1%. After that the application GABA fermentation was performed in Chinese cabbage fermented to produce a product with high GABA as the sandwich spread. Furthermore, the GABA synthesization by LAB was applied in mushroom because it contained high amount of glutamic acid which was the precursor of GABA. The results showed that although mushrooms consisted high content of glutamic acid but LAB could not use it as the precursors in the synthesis of GABA. When GABA was determined in fermented mushroom, it showed small amount in the product. This could estimate that LAB could not utilize glutamic acid occurring in the mushroom. On the whole, soy milk has potential to use as an alternative medium for nisin production and it has strong possible to use as the biopreservative for soy products such as pasteurized soy milk and tofu. In addition, GABA was used for products with high GABA as the sandwich spread. Consuming 100 grams of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA 93.2 mg and also gained 213.18 kcal of energy.

**Key-words :** bacteriocin, nisin, soy milk, lactic acid bacteria, GABA,  $\gamma$ -Aminobutyric acid, ermentation

### บทคัดย่อ

แบคทีเรียแลคติกแอซิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตสารชีวภาพเพื่อเติมในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ สารชีวภาพที่เกิดจากการหมักแบคทีเรียแลคติกแอซิดสองชนิด ได้แก่ นิสิน (Nisin) เป็นสารกันบูดชีวภาพ (Biopreservative) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตคอคคัส และกาบ้า (GABA) เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งได้จากการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลคติกแอซิดเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการสังเคราะห์นินซินในถังหมักโดยใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตคอคคัส แลคทิส 1520 (*Lc.* 1520) และเทคโนโลยีการสังเคราะห์กาบ้าจากกรดกลูตามิกด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัส แพลนท์ลัม 8014 (*Lb.* 8014), แลคโตบาซิลลัสบริวิส 947 (*Lb.* 947) และแลคโตคอคคัสแลคทิส 701007 (*Lc.* 701007) รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากสารชีวภาพกับผลิตภัณฑ์อาหาร ดำเนินการวิจัย ณ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ปีงบประมาณ 2554 – 2556 การทดลองหมักนินซินจากนมถั่วเหลืองในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C ภายใต้อากาศไนโตรเจน อัตราการคนที่ 80 รอบต่อนาที และควบคุมความเป็นกรดระหว่าง 6.4 - 3.8 ด้วยการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส 892 (*Lb.* 892) พบว่าการหมักด้วย *Lc.* 1520 ควบคู่กับ *Lb.* 892 ช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง และมีผลต่ออัตราการผลิตนินซินของเชื้อ *Lc.* 1520 ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปริมาณนินซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับ *Lb.* 892 มี



ปริมาณมากกว่าในซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.1520* อย่างเดียวในเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการหมักกาบ้ำพบว่า *Lb. 8014* มีความสามารถในการสังเคราะห์กาบ้ำสูงที่สุดถึง 162.1 มก. ต่อ 100 ก. เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% การประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์กาบ้ำด้วย *Lb. 8014* ในการผลิตแฮมเห็ดนางฟ้า พบว่าถึงแม้เห็ดนางฟ้าจะมีปริมาณกลูตามิกสูงซึ่งแบคทีเรียแลคติกแอซิดจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กาบ้ำแต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกาบ้ำในแฮมเห็ดพบว่าปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกแอซิดไม่สามารถใช้กรดกลูตามิกในเห็ดนางฟ้าได้ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้คือการประยุกต์ใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตในซินมีความเป็นไปได้สูงและสามารถใช้ประโยชน์จากในซินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองได้แก่นมถั่วเหลืองพาสเจอร์ไรซ์และเต้าหู้แผ่นได้ และการประยุกต์ใช้ *Lb. 8014* ในการเพิ่มกาบ้ำในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกาบ้ำสูงซึ่งคือ แซนวิชสเปรดผักกาดขาว โดยการบริโภคแซนวิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับกาบ้ำ 93.2 มก. และได้รับพลังงาน 213.8 กิโลแคลอรี

**คำหลัก:** แบคทีเรียโอซิน ในซิน นมถั่วเหลือง แบคทีเรียแลคติกแอซิด กาบ้ำ

แกมมา-อะมิโนบิวไทริกแอซิด การหมัก

## คำนำ

แบคทีเรียแลคติกแอซิดถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกช่วยในระบบทางเดินอาหารในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารและยาโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียแลคติกแอซิดย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สั้นๆ ได้แก่ เปปไทด์ลดความดันโลหิตและควบคุมความสมดุลของเกลือแร่ (Sequence NWGPLY) ซึ่งเกิดจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองและเปปไทด์คลอโรสเตอรอล (Sequence LPYPR) จากการย่อยโปรตีนไกลซีนิน (Korhonen and Pihlanto, 2003) แบคทีเรียแลคติกแอซิดยังถูกใช้ในการผลิตสารชีวภาพเพื่อเติมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ สารชีวภาพที่เกิดจากการหมักแบคทีเรียแลคติกแอซิด (LAB) สองชนิด ได้แก่ ในซิน (Nisin) เป็นสารกันบูดชีวภาพ (Biopreservative) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตคอคคัส (*Lactococcus* sp.) และกาบ้ำ (GABA) เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (Inhibitory neurotransmitter) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* sp.) ในซินทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ตลอดจนเชื้อแลคติกแอซิดที่ทำให้อาหารบูดเปรี้ยวส่วนกาบ้ำทำหน้าที่ในการยับยั้งความกังวลและความเครียดโดยเข้าไปจับกับบริเวณส่วนรับสัญญาณประสาทมีผลต่อการลดความดันโลหิตเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และบรรเทาอาการนอนไม่หลับ ซึมเศร้าและระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติ

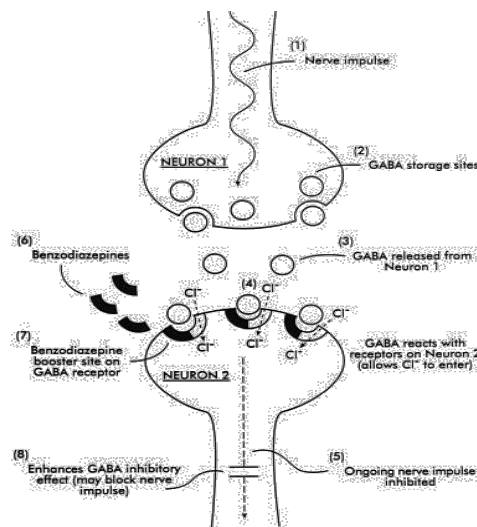
การใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการผลิตอาหารเพื่อความปลอดภัยและสุขภาพของผู้บริโภคจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งเป็นการลดอัตราความเสี่ยงโรคมะเร็งจากการใช้สารเคมีในผลิตภัณฑ์



อาหารในจีนจากแบคทีเรียชนิดแลคโตคอคคัสเป็นสารโพลีเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ชนิด มีขนาด 3500 DA สามารถย่อยได้ในระบบย่อยอาหารของคนปกติใช้ควบคุมแบคทีเรียโดยมีผลต่อผนังเซลล์(Cell membrane) และ RNA ของเชื้ออาหารเป็นพิษได้แก่ *Listeria (L.) monocytogene* *Staphylococcus aureus* *Bacillus (B.) cereus* และ *Clostridium botulinum* ในจีนได้รับการรับรองความปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้เป็นสารเจือปนในอาหารในปริมาณสูงถึง 10,000 IU/g (FDA, 1988) และมีแนวโน้มการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในต่างประเทศ เช่น ประเทศอังกฤษใช้ในจีน 2.5 - 5 มก./ลิตร ในการยืดอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 64.4°C นาน 2.5 นาที ซึ่งไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสปอร์และแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์อนุญาตให้ใช้ในจีนปริมาณไม่เกิน 10 มก./กก. ในผลิตภัณฑ์ประเภทครีม (Flavoured, Whipped, Thickened sour cream) และใช้ในผลิตภัณฑ์แป้งแผ่น (Hot plate flour) ในปริมาณ 3.75 มก./กก. เพื่อยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ซึ่งไม่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ ที่มีค่าความเป็นกรดที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ไข่เหลว ผลิตภัณฑ์ขนมหากนมนและไขมัน ซอส มายองเนส น้ำสลัด ซึ่งต้องควบคุมค่าความเป็นกรดที่ 4.2 เพื่อเพิ่มรสชาติแต่อาจเสื่อมเสียได้จากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจึงเติมในจีนในปริมาณ 2.5 - 5 มก./ล. และอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อและสัตว์ปีกในปี 2007 ในปริมาณ 6.9 และ 5.5 มก./กก. ตามลำดับ FSANZ (Food Standards Australian and New Zealand and Codex Standards) อนุญาตให้ใช้ในจีนในเนื้อและสัตว์ปีกปริมาณ 12.5 มก./กก. และ ระดับ GMP กับผลิตภัณฑ์นม ไข่ และ น้ำผักผลไม้ จึงเห็นได้ว่าในต่างประเทศมีการใช้ในจีนอย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคโนโลยีการผลิตในจีนในถังหมักและการใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์อาหาร ดำเนินการศึกษาถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้ประโยชน์จากในจีนที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย โดยทดสอบกับนมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนการผลิต เป็นเทคโนโลยีใหม่

สำหรับงานวิจัยในการสังเคราะห์  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (Inhibitory neurotransmitter) มีหน้าที่เข้าไปจับกับบริเวณส่วนรับสัญญาณประสาท (Nerve receptor site) ที่ก่อให้เกิดความกังวลและความเครียด ในร่างกายมนุษย์ปกติจะพบ GABA ประมาณ 30-40% ในเซลล์ประสาททั้งหมดในสมอง (Figure 1)

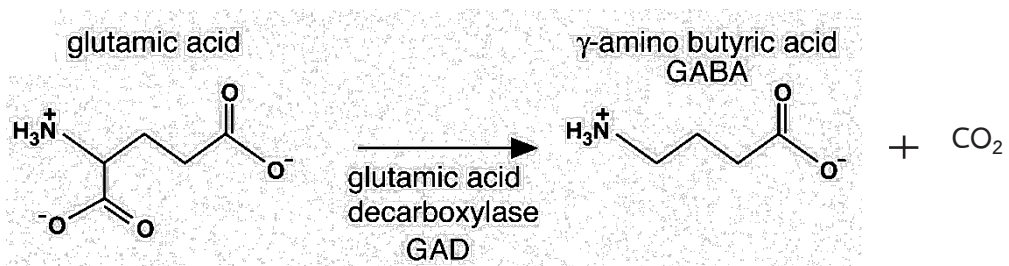




**Figure 1**  $\gamma$ -Aminobutyric acid(GABA) as the inhibitory neurotransmitter

[www.benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm](http://www.benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm) (Ashton, 2011)

GABA สามารถสังเคราะห์ในพืชและจุลินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพผ่านปฏิกิริยา (Decarboxylation) ของกรดกลูตามิกและเกลือของกรดกลูตามิกโดยเอนไซม์ GAD ดังนี้



**Figure 2** Glutamic acid as the precursor of GABA produces by enzyme GAD

From: Food Processing and Preservation Technology III(JAICA and Hiroshima Prefectural Food Research Center, 2007)

GABA เป็นสารที่มีผลงานวิจัยทางการแพทย์ระบุไว้ว่าเป็นสารช่วยในการบำบัดอาการต่างๆ โดยมีหน้าที่สำคัญคือลดความดันโลหิตแบบซิสโตลิก (Vemulapalli and Barletta, 1984) เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้เพื่อแยกแยะความแตกต่าง (Ishikawa and Saito, 1984) และบรรเทาอาการต่างๆที่เกิดขึ้นในวัยทองเช่นนอนไม่หลับ ซึมเศร้า และระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติ (Okada *et al.*, 2000) เนื่องจากวิถีชีวิตและการบริโภคอาหารของคนไทยที่เปลี่ยนแปลงไป ประกอบกับความเครียดทำให้อัตราการป่วยและตายจากโรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น โดยข้อมูลจากสำนักโรคไม่ติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ปี 2550 พบคนไทยมีอัตราตายต่อประชากร 1 แสนคน โดย



ป่วยเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด 55 คน โรคความดันโลหิตสูง 3.6 คน ซึ่งโรคเหล่านี้สามารถป้องกันได้ด้วยการลดพฤติกรรมเสี่ยงทั้งการสูบบุหรี่ การดื่มสุรา สารเสพติด ความเครียดและการขาดการออกกำลังกาย (สำนักนิเทศ, 2552) และอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการป้องกันโรคเหล่านี้คือการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆ (Nutraceutical food) โดยอาหารที่ได้รับความนิยมในกลุ่มนี้คืออาหารที่มี GABA หรือ  $\gamma$ -Aminobutyric acid เป็นองค์ประกอบซึ่งควรบริโภค GABA 250-500 มก./ครั้ง 3 ครั้งต่อวัน และเพื่อบำบัดอาการนอนไม่หลับต้องบริโภค GABA ปริมาณ 750 มก. ก่อนนอนจึงมีการผลิตอาหารที่มี GABA เป็นองค์ประกอบตัวอย่างเช่น ชาเขียวที่มี GABA สูง (Garbaron Tea) โดยการหมักชาในภาวะไม่มีอากาศการเพิ่มปริมาณ GABA ในจมูกข้าว โดยการแช่น้ำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ GABA ส่วนใหญ่จะเป็นการทำให้เกิด GABA จากการงอกของข้าว หรือ ธัญพืชต่างๆ โดยอาศัยสารตั้งต้นคือกรดกลูตามิกในการเกิดปฏิกิริยา (Carboxylation) จากวัตถุดิบตั้งต้น เช่น การศึกษาผลของกระบวนการแช่และกระบวนการงอกของข้าวกล้อง (หอมมะลิ 105) นอกจากนี้การใช้เชื้อจุลินทรีย์ LAB บางชนิดสามารถสร้าง GABA ได้โดย LAB เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase) ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะพื้นฐานวิทยา พบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตเกลือแลคติกเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1997)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การสร้างไนซิน

#### อุปกรณ์

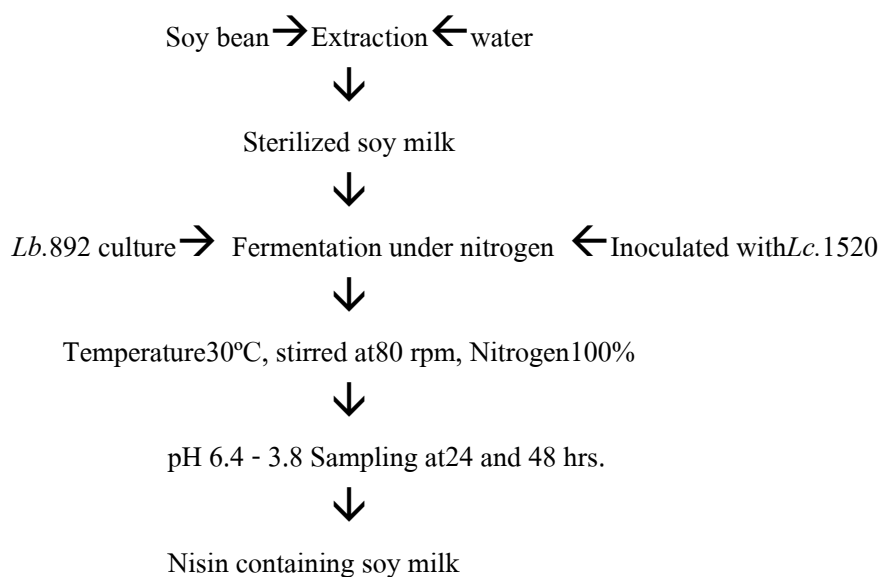
1. ถังหมักแบบควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องสกัดนมถั่วเหลือง
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
4. เชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
5. สารมาตรฐานไนซิน จากบริษัท B&K Technology Group
6. วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ถั่วเหลืองและเต้าหู้แผ่น



## วิธีการ

### 1. การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1) อาหาร MRS 2) นมถั่วเหลืองเดิมเชื้อ *Lc.1520* 3) นมถั่วเหลืองเดิมเชื้อ *Lc.1520* และ *Lb.892* และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของนมถั่วเหลืองที่ใช้หมัก การเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในอาหาร MRS ด้วยการขยายจากเชื้อที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  นำมาเลี้ยงเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลว MRS 2 ครั้งที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  24 ชั่วโมง แล้วเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที ให้น้ำหนักเซลล์คิดเป็น 0.4% เติมน้ำในอาหารเหลว MRS เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยวิธีสปร์ดเพลท (Spread plate) สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในนมถั่วเหลืองปริมาตร 1 ลิตร ใช้เชื้อ 0.4% ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 บริกซ์ (Brix) ในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  การเป็นสภาวะปลอดด้วยไนโตรเจนและอัตราการคนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที จึงบันทึกความเป็นกรดในช่วง pH 6.0 - 4.0 เก็บตัวอย่างที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปฏิกิริยาของไนซินด้วยวิธีเคลียร์โซน ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในนมถั่วเหลืองแบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb. 892* ร่วมกับการหมักเชื้อ *Lc.1520* โดยการเติมเชื้อทั้งสองร่วมกันในนมถั่วเหลืองภายใต้ไนโตรเจนเพื่อควบคุมการหมักให้มีสถานะเช่นเดียวกันกับข้างต้นและสภาวะความเป็นกรดในช่วง pH 6.4- 3.8 (Figure 3)



**Figure 3** Nisin fermentation in soy milk inoculated with *Lc. lactis* 1520 and *Lb.delbrueckii* 892

### 2. การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบเติมไนซินในผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นและนมถั่วเหลืองพลาสติก

เตรียมเต้าหู้แผ่นโดยใช้ถั่วเหลือง 1 กก. ต่อน้ำ 4 ล. แมกนีเซียมซัลเฟต 2 ช้อนโต๊ะ ล้างน้ำแล้วแช่น้ำจนเมล็ดถั่วพองและอมน้ำเต็มที เอาเปลือกออกให้หมดจึงปั่นจนละเอียด กรองส่วนผสมด้วยผ้าขาวบาง





บีบเอานมถั่วเหลืองออกให้หมด นำนมถั่วเหลืองมาต้มเดือดจนกระทั่งอุณหภูมิ 70 – 80 °C จากนั้น แบ่งนมถั่วเหลืองออกเป็น 4 ส่วนๆ ละ 1 ล. เติมนิโคติน 0 30 150 และ 750 ppm หรือ 0 0.6 1.5 และ 7.5 ก. ตามลำดับ คนให้ละลายเติมแมกนีเซียมซัลเฟตส่วนละครึ่งช้อนโต๊ะลงในนมถั่วเหลืองแต่ละส่วนคน ให้เข้ากันโดยค่อย ๆ เติมนิโคตินน้อยจนขึ้นและโปรตีนถั่วเหลืองจับตัวเป็นก้อน ตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้ โปรตีนตกตะกอนทับด้วยของหนักๆ ประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง จะได้เต้าหู้แข็ง บรรจุใส่ถุงปิดปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ Enterobacteriaceae โดยวิธี ISO 21528-2:2004 และแบคทีเรียแลกติกแอซิดโดยวิธี ISO 15214: 1998 นอกจากนี้ได้ดำเนินการทดสอบเติมนิโคตินใน นมถั่วเหลืองซึ่งเตรียมโดยใช้อัตราส่วน 1: 4 (ถั่วเหลือง: น้ำ) ที่ผ่านการต้มเดือดและเติมนิโคตินปริมาณ 0 10 20 และ 30 ppm เก็บรักษาในตู้เย็น 10 °C นาน 3 สัปดาห์

#### การเติมเชื้อ *Lc.1520* ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

เตรียมนมถั่วเหลืองด้วยการชั่งถั่วเหลืองแห้ง 160 ก. แช่น้ำทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืนให้เมล็ดพองเต็มที่ ประมาณ 16 ชั่วโมง เติมน้ำสะอาด 1,300 มล. ต้มจนอุณหภูมิถึง 83 °C จึงปั่นถั่วเหลืองให้ละเอียดแล้ว กรองผ่านตะแกรงแยกกากออกแล้วปรับความหวานด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 บริกซ์ เติมนมถั่วเหลืองที่ ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ล. ในถังหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หมักนมถั่วเหลืองโดยเติมเชื้อ *Lc.1520* และเชื้อ *Lb.892* พร้อมกันในถังหมักในปริมาณอย่างละ 0.4% หรือ 4 ก. ต่อนมถั่วเหลือง 1 ล. ควบคุม การเป็นสภาวะกรดด้วยไนโตรเจน คนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 30 °C บันทึก อุณหภูมิ pH และเก็บตัวอย่างนมถั่วเหลืองจากถังหมักที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง นำไปกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.2 ไมครอน จึงทดสอบเคลียร์โซน

#### การสังเคราะห์ก๊าบ

##### อุปกรณ์

1. Lactic acid bacteria สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* NCIMB 947 และ *Lactococcus lactis* NCIMB 701007
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Sheep agar
4. ผักกาดขาว

##### วิธีการ

#### 1.ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA เบื้องต้น

ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB ทำการเลี้ยงเชื้อ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. 8014*, *Lb. 947* และ *Lc. 701007* ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต (Monosodium glutamate; MSG) 0.1% และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% ทำการหมักภายใต้สภาวะ





ไว้รอออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด GABA ที่ผลิตได้โดยวิธี GABAase test (Spectrophotometric method) เพื่อดูความสามารถในการผลิต GABA ของ LAB

## 2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Glutamic acid decarboxylase; GAD) ในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของ LAB ที่สามารถสังเคราะห์ GABA ได้สูงสุดโดยใช้วิธีการ Pickle pickling test รวมทั้งทำการศึกษปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ GABA โดยจุลินทรีย์ LAB โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ปริมาณกรดกลูตามิก และปริมาณเกลือ ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมโดยแปรระดับสภาวะปริมาณกรดกลูตามิก: 0%, 0.25% และ 0.50% โดยน้ำหนักปริมาณเกลือ: 0%, 0.5% และ 1.0% โดยน้ำหนักและติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการหมักโดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณ LAB ที่มีชีวิต

## 3. คัดเลือก LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA

ทำการคัดเลือก LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA จาก 3 สายพันธุ์คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ด้วยวิธีการ Pickle pickling test โดยใช้ปริมาณเกลือ และ MSG ที่ได้จากข้อ 2

## 4. ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี GABA สูง

ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ GABA ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งทำการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ได้แก่ สี ความขุ่น รสชาติ รวมทั้งกลิ่นรสต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น รสชาติ และลักษณะปรากฏที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงพรรณนา (Descriptive Analysis) จากนั้นศึกษาคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์ได้แก่ สี (L a b) ค่าความเป็นกรดต่างปริมาณ GABA และปริมาณกรดกลูตามิก

## 5. วิเคราะห์คุณค่าโภชนาการของผลิตภัณฑ์

วิเคราะห์คุณค่าโภชนาการของผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคได้แก่พลังงาน พลังงานจากไขมัน ไขมันทั้งหมด โซเดียม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ใยอาหาร น้ำตาล โปรตีน วิตามิน B1 วิตามิน B2 แคลเซียม เหล็ก และ GABA

# ผลการทดลองและวิจารณ์

## การสร้างโนซิน

### 1. การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่สามารถผลิตโนซินได้แก่เชื้อ *Lc.* 1401, *Lc.* 1520, *Lb.* 1034 และ *Lb.* 938 จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโต (Exponential phase) และนับจำนวนโคโลนีทุก 24 48 และ 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่า *Lc.* 1401 *Lb.* 1034 และ *Lb.* 938 การเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระหว่าง 24 ชั่วโมง (Exponential phase) มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น  $1.14 \times 10^8$



$1.38 \times 10^9$ – $1.45 \times 10^8$  cfu/ml ตามลำดับ ยกเว้น *Lc.1520* การเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) อยู่ในช่วงระหว่าง 48 ชั่วโมง มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น  $1.43 \times 10^{10}$  cfu/ml เชื้อ *Lc.1520* จึงมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุดยาวนานกว่า *Lc.1401* *Lb.1034* และ *Lb.938* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบการสร้างไนซินของเชื้อแลคโตคอคคัสได้แก่ สายพันธุ์ ATCC11454, 354/07; University of Minnesota, 7960; University of Oregon, DL16; University of Utah, 150; University of Minnesota, และ 148; University of Minnesota ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Yang and Ray, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบแบคทีเรียโอซินในสายพันธุ์ *Lb. curvatus* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Lb.938* ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าการสร้างแบคทีเรียโอซินอาจแตกต่างกันคือเป็นแบคทีเรียโอซินชนิดแลคติซิน (Lacticin) ซึ่งมีผลยับยั้ง *L. monocytogenes* (อรอนงค์, 2550)

การทดสอบการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินด้วยเทคนิคการใช้เซลล์ไรโซนซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับการสร้างไนซิน ด้วยการยับยั้งเชื้อ *Lb.449* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีไนซิน การวิเคราะห์เซลล์ไรโซนโดยวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงกลมในสโรว์ จุดที่หยดตัวอย่าง พบว่า ไนซินที่ 20 50 100 และ 500 ppm มีค่าเฉลี่ยเซลล์ไรโซนที่ 9.29 13.29 17.25 และ 24.12 มม. ตามลำดับ สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1401* *Lc.1520* *Lb.938* และ *Lb.1034* ในอาหาร MRS เพื่อทดสอบ เซลล์ไรโซนพบว่าเชื้อ *Lc.1401* *Lb.938* และ *Lb.1034* ไม่มีการสร้างเซลล์ไรโซน ยกเว้น *Lc.1520* พบเซลล์ไรโซนในตัวอย่างที่ไม่เจือจางเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เป็น 12.4 11.3 และ 11.75 มม. ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบค่าประสิทธิภาพของไนซินที่เวลา 24 ชั่วโมง กับปริมาณไนซินมาตรฐานพบว่าอยู่ในช่วงประมาณ  $46.7 \pm 3.5$  ppm อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่มีค่าประสิทธิภาพของไนซินสูงสุดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างไนซินโดยเฉลี่ยอยู่ที่จุดกลางของช่วงระยะการเติบโต (Exponential phase) และยังขึ้นกับเชื้อที่ใช้ทดสอบเซลล์ไรโซน (Nisin sensitive strain) อีกด้วย (Nissen-Meyer, *et al.*, 1992)

ผลการวิเคราะห์หั่นมั่วเหลืองที่ใช้หมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) เป็น 15.88 0.83 0.53 15 และ 17% ตามลำดับ ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ ความชื้น สารเยื่อใย เถ้า แคลอรีจากไขมัน และแคลอรีทั้งหมดเป็น 82.64 0.17 0.12 4.77 และ 71.61% ตามลำดับ (Table 1)



**Table 1** Nutritive value in soy milk as medium for nisin production

| Nutritive value   | Percent |
|-------------------|---------|
| Carbohydrate      | 15.88   |
| Protein           | 0.83    |
| Fat               | 0.53    |
| Moisture          | 82.64   |
| Fiber             | 0.17    |
| Soluble solid     | 15      |
| Total solid       | 17      |
| Ash               | 0.12    |
| Calories from fat | 4.77    |
| Total calories    | 71.61   |

ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตส่งผลต่อการสร้างไนซินเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดใช้คาร์โบไฮเดรตในการเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก (Lactic acid) ในช่วงระยะการเจริญเติบโต (Logarithmic growth) และเริ่มกระบวนการสร้างไนซินต่อไป (Klaenhammer, 1993) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แล้ว ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในสูตรนมถั่วเหลืองที่ใช้มีปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

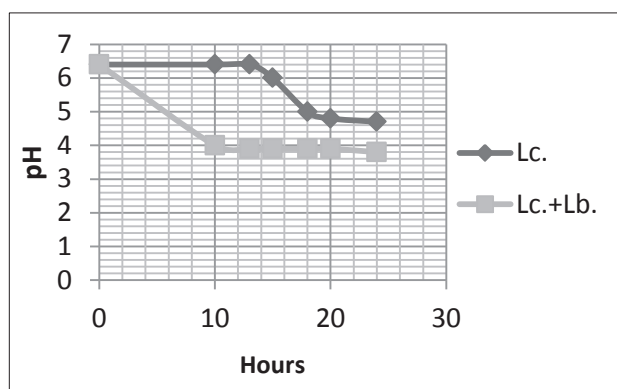
#### การเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในอาหาร MRS

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดประกอบด้วยเปปโทน บีฟเอกแทรก ยีสต์เอกแทรก กลูโคส และทวิน 80 (Peptone, Beef extract, Yeast extract, Glucose, Tween 80) เป็นส่วนใหญ่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต 2% และส่วนของโปรตีน 0.564% ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต จากผลการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น  $1.47 \times 10^9$   $1.43 \times 10^{10}$  และ  $1.46 \times 10^9$  cfu/ml จำนวนเซลล์สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงที่ 72 ชั่วโมง Nettles and Barefoot (1993) รายงานการสร้างไนซินในช่วงของ Logarithmic growth ซึ่งเกิดการสังเคราะห์เปปไทด์ (รวมทั้งเกิดการ Transcription และ Translation ของโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย Serine Cysteine และ Threonine) จากนั้นจึงส่งไปยังผนังเซลล์ในช่วงของการเจริญเติบโต (Exponential growth) และสอดคล้องกับรายงานของ Yang and Ray (1994) ว่า การเจริญเติบโตของเซลล์มีผลต่อการสร้างไนซินรวมทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อก็ส่งผลต่อค่าความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การสร้างไนซินยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีกได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ (Strain) และเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

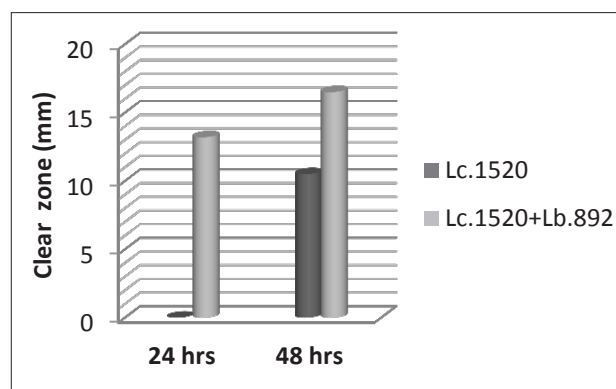


## การเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ในนมถั่วเหลืองและการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* แบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb.892* ในนมถั่วเหลือง

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ร่วมกับเชื้อ *Lb.892* ในถั่วงอกนมถั่วเหลือง ภายใต้ไนโตรเจน ควบคุมอัตราการคนที่ 80 รอบ/นาที่ อุณหภูมิที่ 30 °C และความเป็นกรดในช่วง 6.4 - 3.8 โดยเก็บตัวอย่างทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างจากถั่วงอกที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* เพียงอย่างเดียวในนมถั่วเหลือง ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงในช่วง 72 ชั่วโมง เป็น  $1.47 \times 10^9$ ,  $1.43 \times 10^{10}$  และ  $1.46 \times 10^9$  cfu/ml ตามลำดับ ไม่พบปริมาณเคลียร์โซนในช่วง 24 ชั่วโมง แต่พบในช่วง 48 ชั่วโมงโดยมีค่าเฉลี่ยของเคลียร์โซนอยู่ที่ 11.7 มม. หากแต่การเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ร่วมกับเชื้อ *Lb.892* ในเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นวัดจากค่าเคลียร์โซน 13.19 มม. และพบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นในเวลา 48 ชั่วโมง ในถั่วงอกที่เลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ร่วมกับเชื้อ *Lb.892* โดยมีค่าเคลียร์โซน 16.5 มม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของเคลียร์โซนระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกันที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (Figure 5) และแตกต่างกับการเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ 48 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง *Lc.1520* อย่างเดียวความเป็นกรดไม่ลดลง (Figure 4) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.1520* ร่วมกับ *Lb.892* ลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 4 ในช่วง 10 ชั่วโมง และลดลงเป็น 3.8 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเคลียร์โซนพบว่าการหมักเชื้อ *Lc.1520* ควบคู่กับ *Lb.892* ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณไนซินไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) นั้นหมายความว่าสามารถเก็บเกี่ยวไนซินได้ในเวลา 24 ชั่วโมง (Table 2)



**Figure 4** The pH of soy milk inoculated with *Lc.1520* alone and *Lc.1520* plus *Lb.892*



**Figure 5** Nisin activity by clear zone inoculated with *Lc.1520* alone and *Lc.1520* plus *Lb.892* in soy milk medium

**Table 2** Analysis of variance of nisin activity inoculated with *Lc. 1520* plus *Lb. 892* in 24 and 48 hours

|                            | Lc+Lb 24 hrs.   | Lc+Lb 48 hrs. |
|----------------------------|-----------------|---------------|
| Mean                       | 13.19444        | 16.5          |
| Variance                   | 3.153093        | 4.119318      |
| Observations               | 45              | 45            |
| df                         | 44              | 44            |
| <b>P(F&lt;=f) one-tail</b> | <b>0.189369</b> |               |

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การหมักด้วย *Lc. 1520* ควบคู่กับ *Lb. 892* มีผลต่ออัตราการผลิตไนซินของเชื้อ *Lc. 1520* ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang and Ray (1994) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อแลคโตคอคคัส 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Trypticase glucose yeast extract broth) โดยสรุปว่าความเป็นกรดสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินที่แตกต่างกันและพบว่าไนซินมีค่าปฏิกิริยาสูงสุดที่ความเป็นกรด 6.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TGE buffer หากแต่ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองและอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

## 2. การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

### การทดสอบเติมไนซินในผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบไนซินด้วยการเติมลงในนมถั่วเหลืองพลาสติกจอร์จที่ระดับ 0 10 20 และ 30 ppm อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ พบว่าปริมาณไนซินตั้งแต่ 10 20 และ 30 ppm มีผลต่อแบคทีเรียแลคติกแอซิดและมีผลให้ปริมาณกรดแลคติกลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงจาก  $4.3 \times 10^6$  cfu/ml ที่ 0 ppm หรือไม่มีการเติมไนซินเลย เป็น  $2.1 \times 10^6$   $1.0 \times 10^6$   $5.2 \times 10^5$  cfu/ml ตามลำดับ และปริมาณกรดแลคติกก็ลดลงเช่นกันจาก 0.19 ก./100 ก. ที่ 0 ppm เป็น 0.090.110.07 ก./100 ก. ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อปริมาณไนซินเพิ่มขึ้น 10 ppm ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงประมาณครึ่งหนึ่งและมีผลให้กรดแลคติกลดลงเช่นกันทำให้นมถั่วเหลืองมีรสเปรี้ยวน้อยลงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมถั่วเหลืองได้ (Table 3)

นอกจากนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับเต้าหู้แผ่น อายุการเก็บรักษา 7 วัน ปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงมากกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm และที่ความเข้มข้นของไนซินเพิ่มขึ้น 5 เท่าจาก 30 ppm เป็น 150 ppm และลดลงเหลือน้อยกว่า 10 cfu/ml เมื่อความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 750 ppm (Table 4) ดังนั้นไนซินจึงมีแนวโน้มในการใช้ยับยั้งการเสื่อมเสียเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกแอซิดได้ในผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น



**Table 3** Lactic acid bacteria (LAB) and Lactic acid in pasteurized soy milk storage

| Storage 3 weeks 10°C | LAB <sup>1</sup>    | Lactic acid <sup>2</sup> |
|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Nisin (ppm)          | cfu/ml              | g/100g                   |
| 0                    | 4.3x10 <sup>6</sup> | 0.19                     |
| 10                   | 2.1x10 <sup>6</sup> | 0.09                     |
| 20                   | 1.0x10 <sup>6</sup> | 0.11                     |
| 30                   | 5.2x10 <sup>5</sup> | 0.07                     |

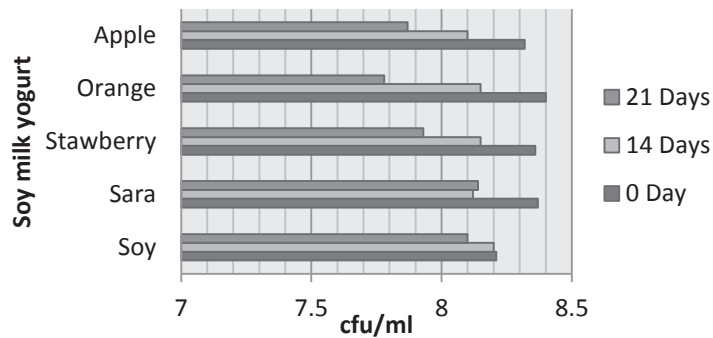
<sup>1/</sup> ISO: 5214: 1998<sup>2/</sup> In house method based on Food Research International; HPLC analysis**Table 4** Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria in soy bean cake after storage at 10°C

| Soy bean cake       | Enterobacteriaceae  | LAB                 |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| storage 7 days 10°C | cfu/ml              | cfu/ml              |
| Nisin (ppm)         |                     |                     |
| 0                   | 2.8x10 <sup>4</sup> | 1.1x10 <sup>4</sup> |
| 30                  | 3.9x10 <sup>3</sup> | 1.2x10 <sup>2</sup> |
| 150                 | 4.0x10 <sup>2</sup> | 1.0x10 <sup>2</sup> |
| 750                 | 1.6x10 <sup>2</sup> | <10 (None)          |

### การทดสอบเชื้อ *Lc.1520* ในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีรายงานการวิจัยการใช้แบคทีเรียแลคติกแอซิดในการเติมลงในอาหารหมักเพื่อการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโอสซินควบคู่กับกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารชนิดนั้นๆ บูดเสียรวมทั้งมีการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดหลายสายพันธุ์เพื่อสร้างแบคทีเรียโอสซินที่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารบูดเสียได้หลายชนิด ได้แก่ อาหารแช่เย็น ผักดอง เครื่องดื่ม ไข่ไก่ และเนยแข็ง เป็นต้น (Nettles, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในการทดสอบการเติมเชื้อ *Lc.1520* ลงในโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลือง ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงอายุการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 10°C (Chilling temperature) ในตู้เย็นคือมีปริมาณจาก 2.1x10<sup>8</sup> เป็น 2.0x10<sup>8</sup> cfu/ml และลดลงครั้งหนึ่งเมื่อเก็บรักษาไว้ 3 สัปดาห์ พบปริมาณ 1.0x10<sup>8</sup> cfu/ml สำหรับนมถั่วเหลืองที่มีการเติมรสได้แก่ รสสละ รสตรอบเบอร์ รสส้ม และรสแอปเปิ้ล ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิด ที่เก็บรักษาที่ 0 วันเป็น 3.7x10<sup>8</sup> 3.6x10<sup>8</sup> 4.0x10<sup>8</sup> และ 3.2x10<sup>8</sup> cfu/ml ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาไว้ 2 สัปดาห์พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงมากกว่าครั้งหนึ่งเป็น 1.2x10<sup>8</sup> 1.5x10<sup>8</sup> 1.5x10<sup>8</sup> และ 1.0x10<sup>8</sup> cfu/ml ตามลำดับ และลดลงใกล้เคียง 10<sup>7</sup> cfu/ml ที่อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ (Figure 6)

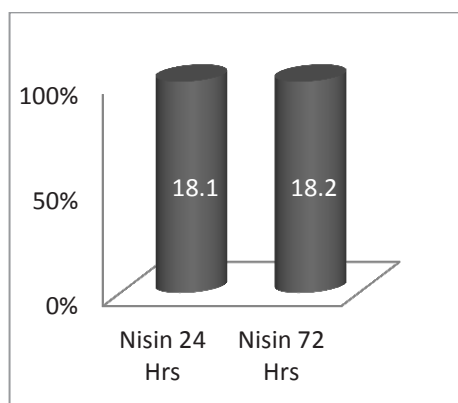




**Figure 6** Lactic acid bacteria in soy milk yogurt inoculated with *Lc.1520*

จำนวนแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่ลดลงมีผลให้ปริมาณกรดลดลงด้วย การบูดเสียของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองขึ้นกับอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นจากการหมักเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่เป็นโปรไบโอติก (Probiotic) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีรสเปรี้ยว และมีค่า pH ลดลง เป็นผลให้อายุการเก็บรักษาลดลง การเติมโนซินจึงช่วยลดความเป็นกรดและสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไว้ได้โยเกิร์ตที่มีการเติม *Lc.1520* จึงมีรสเปรี้ยวช้า สามารถยืดอายุการเก็บรักษา สอดคล้องกับรายงานการใช้เชื้อแลคโตคอคคัสแลคทิส (*Lc. lactis* DPC3147) ในการยืดอายุการเก็บรักษาโยเกิร์ตและชีส โดยใช้ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A และ *B. cereus* (Deegan, *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น ผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยโนซินเช่นกัน ดังนั้นหากมีการเติมโนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วย

การทดสอบค่าโนซินโดยวิธีเคลียร์โซนในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองพบว่ามีค่าเฉลี่ยเคลียร์โซนที่ 24 และ 72 ชั่วโมง ที่ 18.1 และ 18.2 มม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Figure 7)



**Figure 7** Nisin activity by clear zone in soy milk yogurt at 24 and 72 hours

ดังนั้นปริมาณโนซินสามารถเกิดขึ้นได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการหมัก คือ ในช่วงที่โยเกิร์ตสามารถรับประทานได้ โดยทั่วไปความเป็นกรดที่ใช้หมักโยเกิร์ตนมอยู่ที่ 4.9 ในเวลา 5 - 6 ชั่วโมง ซึ่ง





ความเป็นกรดและเวลาที่ใกล้เคียงกับโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองกล่าวคือความเป็นกรดของนมถั่วเหลืองอยู่ที่ 4.8 ในเวลา 8 ชั่วโมง แต่ในการบ่มโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองนั้นปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ที่ 17% ทำให้โยเกิร์ตที่ได้มีลักษณะเป็นโยเกิร์ต นมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม (Table 5)

**Table 5** Sensory evaluation of soy milk yogurt by 34 panels.

| Flavor          | Sweet       | Color       | Viscosity   | Sour        | Odor        | Acceptance  | Average             |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| Sara            | 6.33        | 6.65        | 5.62        | 6.14        | 6.43        | 6.43        | 6.27 <sup>abc</sup> |
| Soy             | 6.00        | 5.21        | 4.90        | 5.53        | 5.79        | 5.84        | 5.54 <sup>ab</sup>  |
| Orange          | 5.95        | 6.44        | 4.79        | 5.39        | 5.21        | 5.47        | 5.54 <sup>b</sup>   |
| Stawberry       | 5.63        | 6.53        | 5.42        | 5.42        | 5.84        | 5.47        | 5.72 <sup>ab</sup>  |
| Apple           | 5.84        | 5.74        | 4.63        | 5.37        | 4.84        | 5.16        | 5.26 <sup>ab</sup>  |
| Lychee          | 5.37        | 5.74        | 4.68        | 4.53        | 4.79        | 4.63        | 4.96 <sup>ac</sup>  |
| Bitouy          | 5.21        | 5.63        | 4.95        | 4.47        | 4.63        | 4.58        | 4.91 <sup>ab</sup>  |
| Vanilla         | 5.26        | 4.32        | 4.32        | 4.37        | 5.00        | 4.47        | 4.62 <sup>c</sup>   |
| <b>Std Dev.</b> | <b>0.40</b> | <b>0.78</b> | <b>0.43</b> | <b>0.63</b> | <b>0.64</b> | <b>0.69</b> |                     |

Mean with the same superscript letters are non-significant difference ( $p < 0.05$ ) by DMRT.

จากการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติมแบคทีเรียแลคติกแอซิดชนิดโปรไบโอติกและชนิดที่สร้างไนซิน (โยเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบบเดย สตรอเบอร์รี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) (Table 5) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน จากผู้บริโภคที่คุ้นเคยกับการบริโภคนมถั่วเหลืองและโยเกิร์ตจากนม จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละ รองลงไปคือรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) รสสตรอเบอร์รี่ ส้ม แอปเปิ้ล และใบบเดย ตามลำดับ ส่วนรสวานิลลาและลิ้นจี่ มีคะแนนการทดสอบชิมที่แตกต่างจากรสนมถั่วเหลือง และได้คะแนนโดยรวมต่ำกว่า 5 ซึ่งน้อยกว่ารสสละ นมถั่วเหลือง ส้ม สตรอเบอร์รี่ และแอปเปิ้ล สำหรับรสใบบเดยนั้นได้คะแนนรวมเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เช่นกันหากแต่ไม่มีความต่างจากรสนมถั่วเหลือง จึงมีแนวโน้มที่ผู้บริโภคจะให้การยอมรับได้ ผู้บริโภคทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น คะแนนคุณลักษณะ ได้แก่ ความหวาน สี ความหนืด ความเปรี้ยว กลิ่นและการยอมรับ โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.4 0.78 0.43 0.63 0.64 และ 0.69 ตามลำดับ โดยที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนของสีมีค่ามากที่สุด สีจึงเป็นคุณลักษณะที่มีความแตกต่างทั้ง 5 รสมากที่สุด รองลงไปได้แก่ การยอมรับรวม กลิ่น ความเปรี้ยว ความหนืด และความหวาน ตามลำดับ

สำหรับคุณลักษณะความเป็นกรด ได้แก่ pH อยู่ในช่วง 3.4 - 3.5 ปริมาณกรดซิตริกอยู่ในช่วง 1.3 - 2.0 และกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.9 - 0.6 ก. /100 ก. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 15 - 16 บริกซ์ และปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ในช่วง 17 - 18.5% โดยกรดที่พบส่วนใหญ่เป็นกรดซิตริกมากกว่ากรด



แลคติกเกือบเท่าตัว (Table 6) ทั้งในรสนมถั่วเหลืองและรสอื่นๆ ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่ในกลิ่นรสผลไม้ที่  
ใช้เดิม ส่วนกรดแลคติกนั้นเป็นกรดที่เกิดจากการเติมเชื้อโยเกิร์ตคือแลคโตบาซิลลัสรวมทั้งเกิดจาก  
แลคโตคอกคัสที่เติมลงไปเพื่อผลิตในจีน

**Table 6** Acidity pH soluble solid and total solid of soy milk yogurt

| Flavour    | pH   | Citric<br>acid <sup>1</sup> (g/100g) | Lactic<br>acid <sup>1</sup> (g/100g) | Soluble solid<br>(%) | Total solid<br>(%) |
|------------|------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------------|
| Sara       | 3.42 | 2.06                                 | 0.93                                 | 15.6                 | 17.7               |
| Soy        | 3.44 | 1.36                                 | 0.64                                 | 15                   | 17.03              |
| Orange     | 3.48 | 1.86                                 | 0.87                                 | 15                   | 17.59              |
| Strawberry | 3.43 | 1.93                                 | 0.9                                  | 15                   | 18.51              |
| Apple      | 3.4  | 1.83                                 | 0.86                                 | 15                   | 17.47              |
| Lychee     | 3.53 | 1.82                                 | 0.86                                 | 16                   | 18.42              |
| Bitouy     | 3.52 | 1.91                                 | 0.9                                  | 15.8                 | 17.03              |
| Vanilla    | 3.56 | 1.86                                 | 0.87                                 | 15                   | 17.08              |

<sup>1/</sup> In house method based on Food Research International; HPLC analysis

ปริมาณแลคติกที่ต่ำยังเกี่ยวข้องกับสารอาหารจากกลูโคสและแลคโตสซึ่งไม่มีในนมถั่วเหลืองโดยที่  
LAB ใช้กรดไพรูวิกในขบวนการเมแทบอลิซึม (Pyruvate as the principal final H receptor in  
metabolism)

Lactose Galactosidase from LAB  $\longrightarrow$  D-Glucose + D- Galactose

Glucose  $\longrightarrow$  Pyruvic acid  $\longrightarrow$  Lactic acid

## การสังเคราะห์กาบ้า

### 1. ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA เบื้องต้น

จากการศึกษาความสามารถของ LAB ในการสังเคราะห์ GABA ทำการศึกษาเบื้องต้นใน 3 สายพันธุ์คือ  
*Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ผลจากการตรวจสอบการสังเคราะห์ GABA ของ LAB โดยการเลี้ยง  
เชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมกรดกลูตามิก 0.1% ทำการหมักภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา  
48 ชั่วโมง พบว่า *Lb.* 8014, *Lc.* 701007 และ *Lb.* 947 มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA จาก  
โมโนโซเดียมกลูตาเมต โดย *Lb.* 8014 มีความสามารถในการเปลี่ยน MSG เป็น GABA ได้สูงที่สุด  
จากนั้นจึงนำเชื้อ LAB ทุกสายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการหมักและการสังเคราะห์ GABA  
ด้วยวิธี Pickle pickling test เพื่อคัดเลือก LAB ที่มีความสามารถสูงที่สุดในการเปลี่ยน MSG เป็น  
GABA ต่อไป



## 2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GAD ในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB

ทำการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ของ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการทดสอบ Pickle Pickling Test และใช้วัตถุดิบเป็นผักกาดขาว เพื่อคัดเลือก LAB ที่สามารถสังเคราะห์ GABA และเติม MSG 3 ระดับคือ 0% 0.25% และ 0.50% โดยน้ำหนัก และเกลือที่ระดับ 0% 0.5% และ 1% โดยน้ำหนัก ทำการหมักภายใต้สภาวะ Anaerobic condition นาน 48 ชั่วโมง และตรวจวัดการเจริญของ LAB ทั้งสามสายพันธุ์ (Table 7)

**Table 7** Growth of LAB of 3 species after fermentation at 37°C 48 hours

| MSG \ NaCl | 0%                                                      | 0.5% | 1.0% |
|------------|---------------------------------------------------------|------|------|
|            | 0%                                                      | 0.1% | 0.1% |
| 0%         | -                                                       | ++   | +    |
| 0.1%       | -                                                       | ++   | +    |
| -          | means not found LAB                                     |      |      |
| +          | means LAB > 10 <sup>3</sup> cfu/g                       |      |      |
| ++         | means LAB > 10 <sup>3</sup> cfu/g 10 <sup>7</sup> cfu/g |      |      |

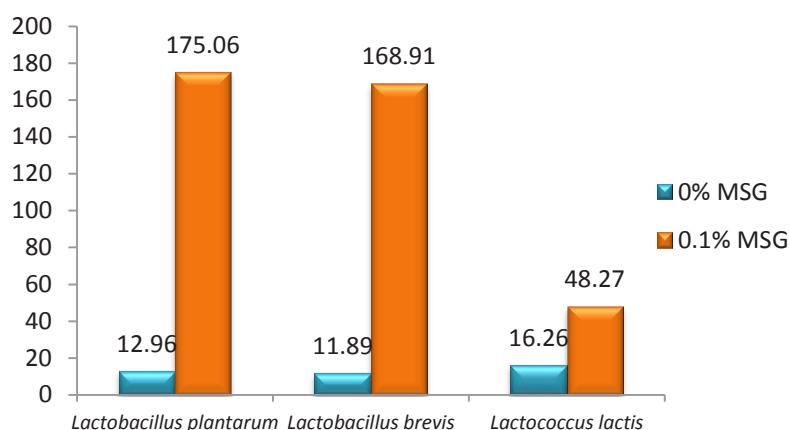
จากตาราง พบว่า LAB ไม่สามารถเจริญได้ในการทำ Pickle pickling test ที่มีปริมาณเกลือ 0% ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นของ MSG โดยจะเกิดการเน่าเสียก่อนครบเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นเป็น 0.5% LAB จะสามารถเจริญได้ดีขึ้น แต่เมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นถึง 1.0% โดยน้ำหนัก การเจริญเติบโตของ LAB จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเกลือมีผลต่อการลดน้ำในผลิตภัณฑ์และทำให้แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป คำนวณอัตราที่ลดลง จึงส่งผลกระทบต่ออัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้นปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับ LAB คือ 0.5% โดยน้ำหนัก และปริมาณ MSG ที่ 0.1% โดยน้ำหนัก

## 3. คัดเลือก LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA

จากการทดลองทำ Pickle pickling test กับเชื้อ LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 โดยใช้ผักกาดขาวเป็นวัตถุดิบ กำหนดปริมาณเกลือที่ใช้เป็น 0.5% โดยน้ำหนัก และกำหนดปริมาณ MSG เป็น 0 และ 0.1% โดยน้ำหนัก ผลจากการทดลองพบว่า LAB ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA สูงที่สุดคือ *Lb.* 8014 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ GABA ได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 162.10 มก./100 ก. เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% โดยน้ำหนัก รองลงมาคือ *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ซึ่งมีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ได้เพิ่มสูงขึ้น 157.02 และ 32.01 มก./100 ก. ตามลำดับ เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% โดยน้ำหนัก (Figure 8) ดังนั้น LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA คือ *Lb.* 8014 จึงเลือก LAB ชนิดนี้เพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป



GABA (mg/100g)



**Figure 8** Synthesis of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* NCIMB 947 and *Lactococcus lactis* NCIMB 701007 at 0 and 0.1% MSG by weight

#### 4. ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี GABA สูง

จากสภาวะในการสังเคราะห์ GABA ที่เหมาะสมในข้อ 3 จึงทำการทดลองประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 และเปลี่ยนชนิดของวัตถุดิบเริ่มต้นจากผักกาดขาวเป็นผลิตภัณฑ์เกษตรที่มีปริมาณกลูตามิกเริ่มต้นสูงได้แก่ เห็ดชนิดต่างๆ คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดฟาง และเห็ดภูฐานผลจากการวิเคราะห์ปริมาณกลูตามิกเริ่มต้นในรูปของกรดแอมลกลูตามิกและปริมาณ GABA เริ่มต้น (Table 8) ผลจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิกในเห็ดทั้ง 3 ชนิด พบว่า เห็ดที่มีปริมาณกรดกลูตามิกสูงที่สุดคือ เห็ดนางฟ้า รองมาคือ เห็ดฟางและ เห็ดภูฐาน โดยปริมาณกรดกลูตามิกที่ตรวจวัดได้เป็น 5,044 4,109 และ 3,742 ก. ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเห็ดนางฟ้าเป็นวัตถุดิบในการประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 ต่อไป

**Table 8** Glutamic acid and GABA content in dry mushroom

| Types of mushroom      | Glutamic acid<br>(mg/100 g) |
|------------------------|-----------------------------|
| Oyster mushroom        | 5,044                       |
| Straw mushroom         | 4,109                       |
| Indian oyster mushroom | 3,742                       |

จากการทดลองประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 ในการผลิตเป็นแหนมเห็ดนางฟ้า โดยมีส่วนประกอบดังนี้



**Table 9** Formula of fermented mushroom for GABA synthesization

| Formula (g)      | 1    | 2    | 3    | 4    |
|------------------|------|------|------|------|
| Steamed mushroom | 750  | 750  | 750  | 750  |
| Garlic           | 30   | 30   | 30   | 30   |
| Sticky rice      | 100  | 100  | 100  | 100  |
| MSG              | 2.75 | 0    | 2.75 | 0    |
| Salt             | 17.6 | 17.6 | 26.4 | 26.4 |
| <i>Lb.</i> 8014  | 3    | 3    | 3    | 3    |

จากการทดลองพบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมง ของการหมักเห็ดนางฟ้าในทุกทริทเมนต์ที่ 35-37°C. *Lb.* 8014 ได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า  $10^8$  cfu/g ส่งผลให้ pH ของเห็ดลดลงต่ำกว่า 4.5 และเมื่อตรวจวัดปริมาณกรดแกลตมิกในผลิตภัณฑ์จะอยู่ระหว่าง 0.3-0.23% โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณ GABA ในผลิตภัณฑ์เห็ดนางฟ้า พบว่าในทุกทริทเมนต์มีปริมาณ GABA ในระดับที่ต่ำคือ 1.42-1.56 มก./100 ก. แสดงให้เห็นว่าผลิตผลเกษตรที่มีปริมาณกรดแกลตมิก (L-glutamic acid) เริ่มต้นในวัตถุดิบที่สูง แต่อาจจะอยู่ในรูปที่ LAB ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จึงทำให้ไม่เกิดการเพิ่มขึ้นของ GABA ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ ดังนั้น ผักกาดขาวจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ GABA โดย *Lb. Plantarum* 8014

จากนั้นนำผักกาดขาวคองที่ได้มาผลิตเป็นแซนวิชสเปรด ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ เต้าหู้ขาว น้ำมันพืช น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู และผักกาดขาวคอง GABA สูง เมื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการพบว่า แซนวิชสเปรดผักกาดขาวคองมีคุณค่าทางโภชนาการ (Table 10)

**Table 10** Nutritive values of Chinese cabbage of sandwich spread containing high GABA

| Nutritive value of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA<br>(100 g of edible part) |        |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------|
| Total calories                                                                              | 213.18 | Kcal |
| Total calories from fat                                                                     | 133.02 | Kcal |
| Total fat                                                                                   | 14.78  | g    |
| Saturated fat                                                                               | 2.56   | g    |
| Cholesterol                                                                                 | 0.00   | mg   |
| Protein                                                                                     | 2.86   | g    |
| Total carbohydrate                                                                          | 17.18  | g    |
| Fiber                                                                                       | 2.76   | g    |



| Nutritive value of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA<br>(100 g of edible part) |        |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----|
| Sugar                                                                                       | 6.01   | g  |
| Sodium                                                                                      | 647.87 | mg |
| VitaminA                                                                                    | -      |    |
| VitaminB1                                                                                   | 0.08   | mg |
| VitaminB2                                                                                   | 0.00   | mg |
| Calcium                                                                                     | 11.98  | mg |
| Iron                                                                                        | 0.78   | mg |
| GABA                                                                                        | 93.2   | mg |

จากตารางพบว่าการบริโภคแซนด์วิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับพลังงาน 213.8 กิโลแคลอรี คิดเป็นพลังงานจากไขมัน 133.2 กิโลแคลอรี โดยการบริโภคแซนด์วิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับ GABA 93.2 มก. ซึ่งถือว่าเป็นการได้รับ GABA ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับการบริโภคอาหารอื่นในปริมาณที่เท่ากัน (Table 11)

**Table 11** GABA content in food products (Matsumoto *et al.* 1997)

| Food Items | GABA content (mg/100g) |
|------------|------------------------|
| Dry tea    | 100-200                |
| Melon      | 74.5                   |
| Tomato     | 62.6                   |
| Kimji      | 59.4                   |
| Chocolate  | 14.5                   |
| Brown rice | 10.0                   |
| Pumpkin    | 9.7                    |
| Tofu       | 6.4                    |

## สรุปผลการทดลอง

### การสร้างไนซิน

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดได้แก่ *Lc.1401* *Lc.1520* *Lb.938* และ *Lb.1034* เพื่อทดสอบการผลิตไนซิน โดยการวิเคราะห์เคลียร์โซนซึ่งไม่พบการสร้างไนซินสำหรับเชื้อ *Lc.1401* *Lb.938* และ *Lb.1034* ยกเว้น *Lc.1520* พบว่ามี การสร้างไนซินในการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลือง ด้วยการหมักเชื้อ *Lc.1520* ควบคู่กับ *Lb.892* เพื่อช่วยเร่งอัตราการเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วและมีผลต่ออัตราการสร้างไนซินของเชื้อ *Lc.1520* กล่าวคือปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.1520*



ร่วมกับ *Lb.*892 ในเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณมากกว่าในชินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.*1520 อย่างเดียว ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ )งานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าการใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตในชินทางการค้ามีความเป็นไปได้สูงสามารถลดต้นทุนได้เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ อีกทั้งถั่วเหลืองยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับผลกระทบจากการเปิดตลาดการค้าเสรีอาเซียน งานวิจัยนี้ยังได้ประยุกต์ใช้ประโยชน์จากในชินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยการเติมในชินและการเติมเชื้อ *Lc.*1520 พบว่าการเติมในชินโดยตรงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ ผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น มีผลให้แบคทีเรียแลคติกแอซิดซึ่งทำให้อาหารเกิดการบูดเปรี้ยวมีปริมาณลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการขยายผลการใช้ในชินในการยับยั้งการบูดจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดและสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นได้นอกจากนี้แล้วการเติมเชื้อ *Lc.*1520 สามารถยืดอายุโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองให้มีรสเปรี้ยวน้อยลงโดยพบการสร้างในชินในเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติม *Lc.*1520 (โยเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอร์รี่ สลัดและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน ผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสลัด รองลงไปคือ รสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) รส สตรอเบอร์รี่ ส้ม แอปเปิ้ล และใบเตย ตามลำดับ ผู้ทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้นผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยในชินเช่นกัน หากมีการเติมในชินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องคำนึงถึงการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วยจากผลการวิจัยการใช้ประโยชน์ของในชินกับผลิตภัณฑ์อาหารอาจนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ที่มีนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้ด้วย

**การสังเคราะห์ก๊าบ**

จากการทดลองสังเคราะห์ GABA โดย LAB ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 พบว่า *Lb.* 8014 มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ได้สูงที่สุดในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB ไม่สามารถตัดสินได้จากปริมาณกรดกลูตามิกเริ่มต้นที่มีอยู่ในวัตถุดิบได้ การทำ pickle pickling test เริ่มต้น จะเป็นการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ในเบื้องต้น LAB แต่ละสายพันธุ์จะเหมาะกับวัตถุดิบเริ่มต้นที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นหากต้องการใช้วัตถุดิบอื่นๆ ในการเพิ่มปริมาณ GABA จะต้องมีการศึกษาถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมด้วย

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มีความเป็นไปได้ในการขยายผลการใช้ในชินในการยับยั้งการบูดจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดและสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ เต้าหู้แผ่นได้และจากผลการวิจัยการใช้ประโยชน์ของในชินกับผลิตภัณฑ์อาหารสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ที่มีนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้ด้วยนอกจากนี้ในการเพิ่มปริมาณ GABA โดยการใช้





LABสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่างๆ ที่มีการใช้ LAB อยู่แล้ว เช่น ผักดอง กิมจิ โยเกิร์ต หรือ แหนม แต่อาจต้องมีการศึกษาถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ GABA สูงสุด

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยนี้ ดร. เสริมสุข สลักเพชร ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์เกษตร ผู้เชี่ยวชาญด้านวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้คำแนะนำ กลั่นกรองงานวิจัยเป็นอย่างดีและขอขอบคุณคณณัฏวิชัยในโครงการวิจัยและพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการแปรรูปผลิตผลเกษตรเป็นอาหารทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

### เอกสารอ้างอิง

- สำนักนิเทศ. 2552. สธ.จัด 152 หมู่บ้านนำร่องทำหมู่บ้านต้นแบบลดโรคเรื้อรังห้วงลดอัตราการป่วยและเสียชีวิตของประชาชนจาก [www.moph.go.th/show\\_hotnew.php?idHot\\_new=22869](http://www.moph.go.th/show_hotnew.php?idHot_new=22869). กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.
- อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, 2550. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ 23; 145-160.
- Ashton, H. 2014. THE BENZODIAZEPINES: WHAT THEY DO IN THE BODY. from <http://www.benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm>.
- Benkerroum, N. and Sandine, WE. 1988. Inhibitory Action of Nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*. 71; 3237-3245.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biologial Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal*. 16; 1058-1071.
- FDA (U.S. Food & Drug Administration) /Federal Register. 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS Status as a Direct Human Food Ingredient. 21 CFR Part 184, *Fed Reg* 53; 11247-11251.
- Gibbs, BF. Zougman, A., Masse R., Mulligan, C. 2004. Production and Characterization of Bioactive Peptides from Soy Hydrolysate and Soy-fermented foods. *Food Research International*. 37; 123-131.
- Ishikawa, K., and Saito, S. 1978. Effect of Intraventricular  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) on Discrimination Learning in Rats. *Psychopharmacology*. 56; 127-132.
- JAICA and Hiroshima Prefectural Food Research Center. 2007. เอกสารประกอบการฝึกอบรม Food Processing and Preservation Technology III.



- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 12; 39-89.
- Korhonen and Pihlanto, A. 2003. Food Derived Bioactive Peptides-Opportunities for Designing Future Foods. *Curr Pharm Des*. 9; 1297-1308.
- Matsumoto Y, Ohno K., and Hiraoka Y. 1997. Studies on the utilization of functional food materials containing high levels of gamma-aminobutyric acid (Part1). *Ehime Kougi Kenkyu Houkoku*. 35; 97-100.
- Nettles, C.G., and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*. 4; 338-356.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., and Nes, I.F. 1992. A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Journal of Bacteriology*. 174; 5686-5692.
- Okada, T., Sugishita, T. Murakami. T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., and Takahashi, T. 2000. Effect of the Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 47; 596-603.
- Vermulapalli, S. and Barletta, M. 1984. The Role of the Sympathetic Nervous System in the Cardiovascular Effects of Systemically Administered  $\gamma$ -Aminobutyric Acid. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 267; 46-58.
- Yang, R., and Ray, B. 1994. Factors Influencing Production of Bacteriocins by LAB. *Food Microbiology*. 11; 281-291.
- Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H. 1997. The Lactic Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, New York. p.7-15.

