

การหมักกากกระเทียมโดยใช้หัวเชื้อจากน้ำกระเทียมดอง
จุฑามาศ เทพมาลี^{a*} วิชชุดา หาญจิริง^b ภฤณณะ คู่เทียม^b สุกุลคุณ มากคุณ^c
รณกร สร้อยนา^c นิจิตติยา สุวรรณสม^a จักรกฤษณ์ วัชรราชภู^a และ ไมตรี สุทธิจิตต์^a

Garlic residue fermentation with probiotic from pickled garlic
Chutamas Thepmalee^{a*}, Wichchuda Hanjing^b, Krissana Khoothiam^b,
Sakunkhun Makkhun^c, Ronnakorn Sroynak^c, Nittiya Suwannasom^a,
Jukkrit Wungrath^a and Maitree Suttajit^a

^aสาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา

^bสาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา

^cสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา

^aDivision of Biochemistry, School of Science, University of Phayao, Muang, Phayao

^bDivision of Microbiology and Parasitology, School of Science, University of Phayao, Muang, Phayao

^cDivision of Food science and Technology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Muang, Phayao

*Corresponding Author. E-mail address: th.chutamas@gmail.com

Received 30 April 2013; accepted 12 July 2013

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกากกระเทียมร่วมกับหัวเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง โดยบ่มน้ำกระเทียมดองที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แยกเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดองมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกในน้ำกระเทียมดอง ใช้หัวเชื้อน้ำกระเทียมดองที่มีความเข้มข้น 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml หมักร่วมกับกากกระเทียม โดยกลุ่มควบคุม คือ กากกระเทียมหมักไม่เติมเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ผลการทดลองพบว่า น้ำกระเทียมดองที่บ่มไว้ที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบเชื้อกลุ่ม *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* จัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก การเจริญของเชื้อโพรไบโอติกเจริญเติบโตได้ดีในวันที่ 7-10 ที่ 30 องศาเซลเซียส มีเชื้อประมาณ 9×10^{11} – 1.97×10^{13} CFU/ml และไม่พบการปนเปื้อน การหมักกากกระเทียมร่วมกับหัวเชื้อน้ำกระเทียมดอง พบว่าหัวเชื้อความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง มีค่า 3.19–3.72 ได้ปริมาณกรด 0.31–0.39 (กรัม/กรัม) และการเจริญของเชื้อในวันที่ 5-10 มีค่ามากที่สุด คือ 1.8×10^9 – 1.97×10^{10} CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เชื้อที่พบในกากกระเทียมหมัก คือ *Lactobacillus* sp. ในวันที่ 7-10 ของการหมักทุกกลุ่มไม่พบการปนเปื้อน ยกเว้นกลุ่มควบคุมพบการปนเปื้อนจาก *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งในน้ำกระเทียมดองและกากกระเทียมหมักมีค่าเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้น ความเป็นกรดจะช่วยลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ได้

คำสำคัญ: กระเทียม โพรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลคติก

Abstract

The objective of this project was to evaluate optimal condition of garlic residue fermentation with probiotic for pickled garlic. Pickled garlic was incubated at 25 and 30 °C for 15 days. Probiotic bacteria were isolated from pickled garlic and cultured on de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar medium containing bromocresol green as indicator. Then bacteria growth from pickled garlic was studied. The intensity of starter (garlic pickled) bacteria 10^4 , 10^6 , 10^8 and 10^{10} CFU/ml and control group (no inoculums) were used to ferment garlic residue and incubated at room temperature for a period of 10 days. The result showed that *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Eubacterium* which are the group of lactic acid bacteria were found in pickled garlic. The condition of 30 °C is a proper temperature for probiotic bacteria growth at 9×10^{11} – 1.97×10^{13} CFU/ml. Moreover, fermented garlic residue with 10^6 CFU/ml of probiotic bacteria can decrease pH from 3.72 to 3.19 acid content 0.31–0.39 (g/g). The highest density of probiotic bacteria growth is on day 5–10 and the density of bacteria was at 1.8×10^9 – 1.97×10^{10} CFU/ml was compared with control group. And *Lactobacillus* sp. can be isolated from fermented residue garlic. On day 7–10, the pathogens were not found during the fermentation in all experiment groups, but could be found *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in the control group. From the result can conclude that the bacteria growth increase acidity in both pickled garlic and fermented garlic residue. Furthermore, an effective pH decline is ensured, thereby minimizing the growth of undesirable microorganisms. Finally, the suitable condition of garlic residue fermentation is 10^6 CFU/ml of starter incubation period for 7 days.

Keywords: garlic, probiotic, lactic acid bacteria

บทนำ

สภาพเศรษฐกิจของจังหวัดพะเยาในปี 2539-ปัจจุบันพบว่ารายได้ส่วนใหญ่ของประชากรในจังหวัดพะเยาขึ้นอยู่กับสาขาการเกษตรมากที่สุด รองลงมาเป็นสาขาการค้าส่งและค้าปลีก กระเทียมเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของจังหวัดพะเยา แต่อย่างไรก็ตามราคากระเทียมในปี 2555 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปี 2554 ณ ช่วงเวลาเดียวกันเนื่องจากการนำเข้ากระเทียมจากจีนนอกโควตา และยังมีการนำกระเทียมไปป้องกันจากพม่าเข้ามาในตลาดเมืองไทย ในขณะที่กระเทียมเก่ายังมีค้างสต็อกในมือพ่อค้าจำนวนมาก จึงมีการชะลอการรับซื้อกระเทียมจากเกษตรกร ราคากระเทียมที่เกษตรกรขายได้จึงมีแนวโน้มลดลง จากปัญหาราคากระเทียมตกต่ำ จึงทำให้เกษตรกรผู้ปลูกกระเทียมในอ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา มีการรวมกลุ่มเป็นวิสาหกิจชุมชนเพื่อพัฒนาและเพิ่มมูลค่ากระเทียม โดยนำมาผลิตและแปรรูปเป็นน้ำมันหอมระเหยชนิดแคปซูล ที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีสารต้านออกซิเดชันและมีปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง แต่จากการผลิตน้ำมันหอมระเหยนี้เป็นผลให้มีส่วนเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันกระเทียม คือ กากกระเทียมซึ่งไม่มีกลิ่นและมีเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก โดยกากกระเทียมมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ อินนูลิน (inulin) ซึ่งจัดเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ที่ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในลำไส้ เช่น *Lactobacillus* sp. มีการรายงานของ Kaur และ Gupta (2002) ได้กล่าวถึงประโยชน์ของอินนูลินที่ใช้เป็นพรีไบโอติก จะก่อให้เกิดผลดีต่อผู้บริโภคมหากได้รับในปริมาณที่เหมาะสม ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกมีมากมายหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยวโยเกิร์ต ไส้กรอกเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง แหนมชีวภาพ และปลาหมึกพริก โดยกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้ คือ แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* เป็นต้น

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเกิดแนวคิดที่จะนำกากกระเทียมที่เหลือทิ้งมาหมักด้วยเชื้อพรีไบโอติกจากหัวเชื้อน้ำกระเทียมดอง เพื่อให้ได้กากกระเทียมหมักที่มีเชื้อพรีไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) กรดอินทรีย์อื่นๆ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของอาหารหมัก นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีความสามารถในการสร้างสารแบคทีเรียซิน (bacteriocin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นได้ ช่วยให้อาหารมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น กากกระเทียมหมักที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปแปรรูปหรือเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ซอสหรือน้ำจิ้มสุก ซึ่งอันจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของกากกระเทียมเหลือใช้ และสร้างรายได้ให้แก่ชุมชนได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งในปัจจุบันธุรกิจร้านอาหารประเภทสุกี้ เป็นที่นิยมอย่างแพร่

หลายของกลุ่มผู้บริโภค ดังนั้น จึงนำกากกระเทียมที่เหลือจากการสกัดน้ำมันกระเทียมมาหมักร่วมกับน้ำกระเทียมดองโดยมีข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของหัวเชื้อน้ำกระเทียมดอง ศึกษาจนได้วิธีการหมักที่เหมาะสม กล่าวคือ ใช้ระยะเวลาการหมักน้อยที่สุด และได้ปริมาณเชื้อพรีไบโอติกมากที่สุด จนได้กากกระเทียมหมักที่จะนำไปใช้เป็นส่วนผสมของการทำน้ำจิ้มสุกี้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อน้ำกระเทียมดอง
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกากกระเทียมร่วมกับหัวเชื้อพรีไบโอติกที่ได้จากน้ำกระเทียมดอง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกเชื้อพรีไบโอติกและศึกษาการเจริญของเชื้อพรีไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

ทำการดองโดยนำกระเทียมปลอกเปลือกแล้วมาล้างให้สะอาด แช่ว้าด่างทับทิมทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นล้างกระเทียมด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง แล้วนำมาผึ่งแดดทิ้งไว้ครึ่งวันหรือ 1 วัน นำภาชนะที่มีฝาปิดมาลวกด้วยน้ำร้อน ใส่กระเทียม 100 กรัม ลงในภาชนะที่เตรียมไว้แล้วเติมเกลือ 6 กรัม ลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากันและเติมน้ำข้าวขาวเหนียว 200 มิลลิลิตร ลงในภาชนะปิดฝาให้สนิท (ไชยวัฒน์, 2553) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดองกระเทียมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 วัน ทั้ง 2 อุณหภูมิ

1.1 จำแนกเชื้อพรีไบโอติกในน้ำกระเทียมดอง ด้วยวิธีการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยนำน้ำกระเทียมดองมา spread plate ลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า ขนาด สี และบันทึกผลการทดลองทำการการย้อมสีแกรม (gram's staining) และย้อมสีสปอร์ (spore stain) ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ประกอบด้วย การทดสอบคะตาเลส (catalase test) การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) และการทดสอบอินโดล (indole test) และบันทึกผลการทดลอง

1.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากน้ำกระเทียมดอง โดยเก็บตัวอย่างน้ำกระเทียมดองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่อง pH meter โดยวัดค่าตัวอย่างละ 2 ครั้ง และการบันทึกผลการทดลอง

1.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อพรีไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำกระเทียมดองปริมาตร 1 มิลลิลิตร หาปริมาณเชื้อพรีไบโอติกด้วยวิธีการ

เจือจางแบบมีลำดับขั้นหรือ serial dilution แล้วทำเทคนิค spread plate ลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน anaerobic jar บ่มเป็นระยะเวลา 24–48 ชั่วโมง นับจำนวนโคลินบนอาหาร MRS agar โดยทำตัวอย่างละ 2 ครั้ง และบันทึกผลการทดลอง

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกากกระเทียมด้วยเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

ปรับปริมาณเชื้อจากน้ำกระเทียมดองจากข้างต้นให้มีความเข้มข้น 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml ตามลำดับ แล้วนำไปหมักร่วมกับกากกระเทียมดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทำการหมักกากกระเทียมในสภาวะปิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกากกระเทียม โดยศึกษาด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงส่วนผสมการหมักหัวเชื้อน้ำกระเทียมดองร่วมกับกากกระเทียม

กลุ่มตัวอย่าง	ความเข้มข้นเชื้อ (CFU/ml)	กากกระเทียม (กรัม)	ข้าวสวยสุก (กรัม)	น้ำต้มสุก (มิลลิลิตร)
กลุ่มควบคุม	0	100	50	100
1	10^4	100	50	100
2	10^6	100	50	100
3	10^8	100	50	100
4	10^{10}	100	50	100

2.1 วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมหมักในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มา 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (mixer) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่อง pH meter วัดค่าตัวอย่างละ 2 ครั้ง

2.2 หาปริมาณกรดทั้งหมด

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมหมักในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มา 5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกที่มีฝาปิด เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นกรองเอาส่วนใสที่อยู่ข้างบนทั้งหมด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ หยด 1% phenolphthalein ลงไป 3 หยด ทำการไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ ซึ่งสีของ phenolphthalein จะเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีกลายเป็นสีชมพูจาง ๆ วิเคราะห์หาปริมาณกรดตัวอย่างละ 2 ครั้ง บันทึกปริมาตรของสารละลาย 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อโพรไบโอติกที่พบในกากกระเทียมหมัก

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมหมักในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มา 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดูดตัวอย่างน้ำกากกระเทียมมา 0.1 มิลลิลิตร spread plate ลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37

°C เป็นเวลา 1–2 วัน ตรวจสอบลักษณะโคลินของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า ขนาด สี และบันทึกผลการทดลอง ทำการย้อมติดสีแกรม (gram's staining) และย้อมสปอร์ (spore stain) ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ประกอบด้วย การทดสอบคะตาเลส (catalase test) การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) การทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) และการทดสอบอินโดล (indole test) ทำการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation test) โดยใช้ basal medium ที่มีคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด คือ กลูโคส แลคโตส ซูโครส แมนนิทอล และไซโลส โดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร fermentation carbohydrate medium บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการเปลี่ยนสีของอาหารและดูการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส และบันทึกผลการทดลอง

2.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกในกากกระเทียมหมัก

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมหมักในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มา 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรและหาปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในตัวอย่างกากกระเทียมหมักด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีการดังข้างต้นในข้อ 1.3 และบันทึกผลการทดลอง

2.5. ทดสอบหาเชื้อปนเปื้อน

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมหมัก 25 กรัม ผสมด้วย peptone water 225 มิลลิลิตร และนำไปเข้าเครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher) ดูดน้ำตัวอย่างกากกระเทียมหมักมาตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* ด้วยวิธีมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะแสดงอยู่ในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 11.0 ทดสอบโดย one-way ANOVA

ผลการศึกษา

1. การจำแนกเชื้อโพรไบโอติกและศึกษาการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

1.1 การจำแนกชนิดเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

เก็บตัวอย่างน้ำกระเทียมดองหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 วัน ทั้งอุณหภูมิ 25 และ 30 °C ทำการแยกเชื้อจากน้ำกระเทียมดองเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง MRS และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในน้ำกระเทียมดองเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ให้ลักษณะโคลินสีขาวขุ่น บางโคลินมีสีขาว

จุดเชื้อ ขอบเรียบ ผิวหนานูน มันวาว ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน การเรียงตัวแบบกระจาย ขนาดเซลล์ 0.1-0.3 ไมครอน และไม่มีการสร้างสปอร์ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการทดสอบ คีตาเลส การทดสอบออกซิเดส การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย และการทดสอบอินโดล พบว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบทุกการทดสอบ

1.2 การเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

เก็บตัวอย่างน้ำกระเทียมดองหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 วัน ทั้งอุณหภูมิ 25 และ 30 °C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าในวันที่ 3-5 ของน้ำกระเทียมดองบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C มีการเจริญของเชื้อค่อนข้างคงที่ และวันที่ 7-15 การเจริญของเชื้อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการเจริญของเชื้อระหว่าง 7.63×10^{10} - 2.06×10^{13} CFU/ml และที่อุณหภูมิ 30 °C ในวันที่ 3-5 พบการเจริญของเชื้อระหว่าง

1.51×10^9 - 6.80×10^9 CFU/ml และในวันที่ 7-15 พบการเจริญของเชื้อ 9.10×10^{11} - 1.97×10^{13} CFU/ml แต่เมื่อเปรียบเทียบในระยะเวลาของการบ่มที่เท่ากันที่อุณหภูมิ 30 °C ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้นได้ไวกว่าที่อุณหภูมิ 25 °C และในวันที่ 15 ของการบ่มกระเทียมดองที่ 30 °C พบว่าการเจริญของเชื้อเริ่มลดลง แสดงดังตารางที่ 2

1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างจากน้ำกระเทียมดองเก็บตัวอย่างน้ำกระเทียมดองหลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 วัน ทั้งอุณหภูมิ 25 และ 30 °C วัดค่าความเป็นกรด-ด่างจากน้ำกระเทียมดองแสดงดังตารางที่ 3 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 °C น้ำกระเทียมดองจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 4.59-3.46 และที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 4.82-3.62 จากผลการทดลองพบว่าความเป็นกรดจะแปรผันตามระยะเวลาของการบ่ม กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาของการบ่มน้ำกระเทียมดองเพิ่มขึ้นทำให้น้ำกระเทียมดองมีความเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเชื้อโพรไบโอติก (CFU/ml) จากน้ำกระเทียมดองบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C

อุณหภูมิ	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 13	วันที่ 15
25 °C	2.30×10^8 $\pm 3.05 \times 10^8$	8.43×10^8 $\pm 2.10 \times 10^8$	7.63×10^{10} $\pm 2.52 \times 10^9$	9.73×10^{12} $\pm 3.51 \times 10^{11}$	1.62×10^{13} $\pm 3.41 \times 10^{12}$	2.06×10^{13} $\pm 6.56 \times 10^{11}$
30 °C	1.51×10^9 $\pm 2.00 \times 10^7$	6.80×10^9 $\pm 3.00 \times 10^8$	9.10×10^{11} $\pm 2.00 \times 10^{10}$	2.08×10^{13} $\pm 9.54 \times 10^{11}$	2.22×10^{13} $\pm 1.01 \times 10^{12}$	1.97×10^{13} $\pm 1.53 \times 10^{11}$

หมายเหตุ จากตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำกระเทียมดองบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C

อุณหภูมิ	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 13	วันที่ 15
25 °C	4.59 $\pm$ 0.02	4.39 $\pm$ 0.09	3.93 $\pm$ 0.08	3.77 $\pm$ 0.07	3.57 $\pm$ 0.06	3.46 $\pm$ 0.01
30 °C	4.82 $\pm$ 0.08	3.96 $\pm$ 0.04	3.85 $\pm$ 0.04	3.79 $\pm$ 0.05	3.71 $\pm$ 0.03	3.62 $\pm$ 0.04

หมายเหตุ จากตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการหมักจากกระเทียมด้วยเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง

เก็บตัวอย่างกากกระเทียมที่หมักด้วยหัวเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดอง ในวันที่ 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 ทำการจำแนกชนิดเชื้อด้วยวิธีการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ศึกษาการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง หาปริมาณกรดแลคติก และทดสอบการปนเปื้อนจากกระเทียมหมักจากเชื้อก่อโรคโดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 การจำแนกชนิดของเชื้อโพรไบโอติกจากกากกระเทียมหมัก

เชื้อที่แยกได้จากกากกระเทียมหมักมีลักษณะโคโลนีสีขาวและสีขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้ามีลักษณะนูน มันวาว ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร แกรมบวก รูปร่างท่อน การเรียงตัวแบบกระจาย ขนาด 0.1-0.2 ไมครอน และไม่มีการสร้างสปอร์ ให้ผลลบกับการทดสอบคีตาเลส การ

ทดสอบออกซิเดส การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย การทดสอบอินโดล ทดสอบการสร้างแก๊ส และทดสอบการรีดักชันไนเตรท (nitrate reduction test) จากนั้นทำการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต 5 ชนิด คือ กลูโคส แลคโตส ซูโครส แมนนิทอล และไซโลส พบว่าให้ผลบวกกับการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส และแมนนิทอล แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสได้ ดังนั้นจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมด จึงสามารถจัดจำแนกเชื้อที่แยกจากกากกระเทียมหมักให้อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* sp.

2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างจากกากกระเทียมหมักผลการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อ การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อครบระยะเวลาการหมัก 10 วัน กลุ่มที่เติมหัวเชื้อโพรไบโอติกจากน้ำกระเทียมดองที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml พบว่าการเปลี่ยน

แปลงค่าความเป็นกรด-ด่างเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว คือ จากค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าสูงเปลี่ยนเป็นค่าที่ต่ำลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้น เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า กลุ่มกากกระเทียมหมักที่เติมเชื้อโปรไบโอติกมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ตั้งแต่วันที่แรกของระยะเวลาการหมัก.

2.3 ปริมาณกรดทั้งหมดจากกากกระเทียมหมัก
ปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมักกากกระเทียมร่วมกับเชื้อโปรไบโอติก แสดงค่าดังตารางที่ 5 พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้น ปริมาณกรดทั้งหมดจะเพิ่มมากขึ้นเช่นกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม (10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml) พบว่ากลุ่มทดลองมีปริมาณกรดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ตั้งแต่การหมักวันที่ 3 เป็นต้นไป ยกเว้นกลุ่มที่เติมเชื้อโปรไบโอติก 10^4 CFU/ml และในวันที่ 5 เป็นต้นไปพบว่าปริมาณกรดของกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่มมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่เติมเชื้อ 10^6 CFU/ml ให้ปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป

2.4 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกจากกากกระเทียมหมัก

ผลการทดลองในวันที่ 0-10 ของกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ไม่พบการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกแต่อย่างใด แต่พบการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคเป็นจำนวนมาก ส่วนในกลุ่มทดลองทั้ง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มกากกระเทียมหมักเติมเชื้อที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 1-3 ภายหลังจากนั้นการเจริญของเชื้อเริ่มคงที่ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง กากกระเทียมหมักที่เติมเชื้อ 10^4 CFU/ml พบว่ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ในวันที่ 10 ของระยะเวลาหมัก และกลุ่มทดลองที่เติมเชื้อ 10^6 CFU/ml พบว่ามีปริมาณการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกมีจำนวนมากที่สุดตั้งแต่วันที่ 5-10 และค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ในวันที่ 3-5 และ 10 ของกลุ่มทดลองที่เติมเชื้อ 10^8 CFU/ml ให้ค่าปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และกลุ่มทดลองที่เติมเชื้อ 10^{10} CFU/ml พบว่าเชื้อโปรไบโอติกเจริญได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม ในระหว่างวันที่ 2-10 ของระยะเวลาการหมัก แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของกากกระเทียมหมักบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง CFU/ml	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10
กลุ่มควบคุม	6.09 ±0.03	6.03 ±0.01	6.01 ±0.02	6.05 ±0.01	5.89 ±0.01	5.77 ±0.13	4.74 ±1.38
log 4	*6.01±0.01	*5.99±0.00	6.00 ±0.00	5.93 ±0.05	*3.59±0.23	*3.39 ±0.04	*3.26±0.08
log 6	*6.02±0.02	*5.96±0.02	*5.11±0.75	*3.72±0.10	*3.27±0.02	*3.24 ±0.00	*3.19±0.01
log 8	6.10 ±0.03	*5.62±0.01	*4.72±0.21	*3.89±0.07	*3.35±0.01	*3.29 ±0.01	3.33 ±0.01
log 10	6.07 ±0.01	*5.62±0.01	*5.23±0.07	*4.04±0.13	*3.38±0.03	*3.31 ±0.01	3.34 ±0.02

หมายเหตุ จากตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดทั้งหมด (กรัม/กรัม) จากการหมักกากกระเทียมบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง CFU/ml	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10
กลุ่มควบคุม	0.08 ±0.04	0.04 ±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.13±0.11
log 4	0.06±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	*0.23±0.04	*0.28±0.06	*0.35±0.03
log 6	0.06±0.01	0.06±0.02	0.08±0.02	*0.22±0.01	*0.31±0.02	*0.34±0.01	*0.39±0.04
log 8	0.04±0.01	0.05±0.02	0.07±0.01	*0.14±0.02	*0.23±0.04	*0.27±0.06	*0.32±0.02
log 10	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.00	*0.13±0.04	*0.20±0.01	*0.28±0.02	*0.34±0.02

หมายเหตุ จากตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณเชื้อ (CFU/ml) จากการหมักกากกระเทียมบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน

กลุ่มทดลอง CFU/ml	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10
กลุ่มควบคุม	0	0	0	0	0	0	0
log 4	0	0	8.53×10^5 $\pm 1.48 \times 10^5$	1.22×10^7 $\pm 6.18 \times 10^5$	3.41×10^8 $\pm 2.82 \times 10^8$	5.1×10^8 $\pm 8.83 \times 10^8$	$*1.33 \times 10^9$ $\pm 1.16 \times 10^8$
log 6	0	$*2.16 \times 10^6$ $\pm 1.1 \times 10^6$	$*1.00 \times 10^8$ $\pm 8.66 \times 10^7$	2.97×10^8 $\pm 1.71 \times 10^6$	$*1.79 \times 10^9$ $\pm 7.59 \times 10^7$	$*1.19 \times 10^{10}$ $\pm 6.24 \times 10^9$	$*1.98 \times 10^{10}$ $\pm 3.42 \times 10^8$
log 8	0	1.05×10^5 $\pm 1.10 \times 10^4$	1.45×10^7 $\pm 7.32 \times 10^5$	$*9.2 \times 10^8$ $\pm 6.63 \times 10^7$	$*1.31 \times 10^9$ $\pm 6.56 \times 10^7$	1.49×10^9 $\pm 3.42 \times 10^7$	$*5.43 \times 10^9$ $\pm 2.5 \times 10^8$
log 10	0	1.92×10^5 $\pm 2.2 \times 10^3$	$*1.65 \times 10^8$ $\pm 3.42 \times 10^6$	$*1.57 \times 10^9$ $\pm 3.83 \times 10^8$	$*5.43 \times 10^9$ $\pm 4.86 \times 10^6$	$*7.65 \times 10^9$ $\pm 1.86 \times 10^9$	$*1.35 \times 10^{10}$ $\pm 5.92 \times 10^6$

หมายเหตุ จากตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.5 ทดสอบการหาเชื้อปนเปื้อน

ผลการทดลองในวันที่ 5 ของระยะเวลาการหมักกากกระเทียมพบเชื้อ *S. aureus* เกิดขึ้นในกลุ่มควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) และกลุ่มทดสอบที่เติมเชื้อความเข้มข้น 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml และในวันที่ 7-10 ยังพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* ในกลุ่มควบคุมและในวันที่ 5 พบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดสอบกากกระเทียมที่เติมเชื้อ 10^4 CFU/ml จากการทดลองไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และ *Clostridium perfringens*

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

น้ำกระเทียมต้องเป็นแหล่งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ หากมีการนำหัวเขื่อน้ำกระเทียมต้องมาหมักร่วมกับกากกระเทียมในสภาวะที่เหมาะสมจะได้กากกระเทียมหมักที่อุดมไปด้วยเชื้อโพรไบโอติก เนื่องจากกากกระเทียมมีอนุลินเป็นองค์ประกอบประมาณ 15-20% ซึ่งมีโครงสร้างเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีต้า 1, 2 glycosidic จัดเป็นโพรไบโอติก โดยที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยอนุลินได้ ดังนั้น เมื่ออนุลินเข้าสู่ลำไส้ใหญ่จะกลายเป็นอาหารของเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ (Kaur & Gupta, 2002) ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการหมักกากกระเทียม นอกจากเชื้อโพรไบโอติก คือ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และแบคทีเรียโอซิน เป็นต้น จากการบ่มน้ำกระเทียมต้องที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ 3 กลุ่ม คือ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Eubacterium* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้นบนอาหาร MRS agar พบโคโลนีที่มีสีเขียว เพราะบนอาหาร MRS agar มี bromocresol green เป็นสี indicator เมื่อเชื้อเจริญเติบโต

จะสร้างกรดแล้วทำปฏิกิริยากับสี indicator จะทำให้ได้โคโลนีมีสีเขียว เมื่อนำมาย้อมสีแกรมพบเซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน การเรียงตัวของเซลล์กระจายตัวกัน ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ คุณสมบัติของเชื้อกลุ่มนี้คือ ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และออกซิเดส ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ ปิ่นมณี และ วิเชียร (2546) ได้รวบรวมแหม่มจำนวน 60 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อจากแหม่ม พบเชื้อมีลักษณะรูปร่างและรูปกลม เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์พบ *Lactobacillus jonsionii* เป็นมากที่สุดในตัวอย่งแหม่ม รองลงมา คือ *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดพบได้ในอาหารหมักและนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และสอดคล้องกับรายงานของ ธนากร และบวรศักดิ์ (2554) ทดลองแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจากหน่อไม้ดอง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ผสม bromocresol purple (BCP) 0.04 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) 1% เริ่มจากการคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสโดยรอบ และเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลืองพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต จากนั้นนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์มีรูปร่างลักษณะเป็นแบบกลมหรือรูปท่อน สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย และคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ไม่เคลื่อนที่โดยใช้ชุดทดสอบระบบ API 50 CH เมื่อจำแนกในระดับสกุลและสปีชีส์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากหน่อไม้ดองมี 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* ดังนั้นเชื้อโพรไบโอติกที่พบในอาหารหมักต้องเป็นส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทำน้ำกระเทียมต้องพบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C บ่มเป็นระยะเวลา 15 วัน พบว่าทั้ง 2 อุณหภูมิ มีเชื้อโพรไบโอติกตั้งต้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

มีความสัมพันธ์กันคือเมื่อค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงมีค่าอยู่ระหว่าง 4.82-3.46 ตามลำดับ และการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกเมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อก็จะเจริญเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ 10^5 - 10^{13} CFU/ml เนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Eubacterium* เป็นเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลกติก โดยการหมักในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีปริมาณออกซิเจนน้อย กรดไพรูวิกจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลกติก ดังนั้น จึงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง ในสภาวะที่เป็นกรดนั้นมีประโยชน์ เช่น ความเป็นกรดจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร การบ่มนํ้ากระเทียมดองที่อุณหภูมิ 30°C มีการเจริญเติบโตของเชื้ออย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียสเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกจากกากกระเทียมหมัก โดยปรับปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml หมักร่วมกับกากกระเทียม ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่มควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ) พบว่าการหมักกากกระเทียมร่วมกับเชื้อโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม พบการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกสูงกว่าที่ความเข้มข้น 10^4 , 10^8 และ 10^{10} CFU/ml ซึ่งมีการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก 1.19×10^{10} - 1.97×10^{10} CFU/ml ในช่วงวันที่ 7-10 ของการหมักกากกระเทียม มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.72-3.19 ปริมาณกรดได้ 0.31-0.39 (กรัม/กรัม) เชื้อที่พบในกากกระเทียมหมัก คือ *Lactobacillus* sp. มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *B. cereus* ในช่วงวันที่ 5 ของการหมัก ปริมาณหัวเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเอง เช่น เมื่อเติมเชื้อปริมาณมากลงไป ในแหล่งอาหารที่จำกัด การเจริญเติบโตของเชื้อจะอยู่ในสภาวะที่แข่งขัน และแย่งอาหารกัน ทำให้มีผลกระทบการเจริญของเชื้อเอง ดังนั้น ในกระบวนการหมักอัตราส่วนระหว่างอาหารและปริมาณเชื้อควรจะมีความสมดุลกัน โดยการศึกษาของ Siriporn Riebroy และคณะ (2008) เกี่ยวกับการหมักปลาหมึกโดยใช้หัวเชื้อความเข้มข้น 10^4 และ 10^6 CFU/ml พบว่าความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 10^6 CFU/ml คือ ทำให้ได้ปลาหมึกที่มีรสชาติเป็นที่น่าสนใจ ให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.60 ใช้เวลาหมัก 24-36 ชั่วโมง ปัจจัยสำคัญในการควบคุมการเน่าเสียและลดจำนวนเชื้อก่อโรคได้ คือ เชื้อสามารถสร้างกรดและสร้างได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ และจากการวิจัยของ Antonio de Castro และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาการหมักกระเทียมต้มด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* เป็นหัวเชื้อ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับกระเทียมที่ไม่ได้ต้ม พบว่าในการหมักวันที่ 7 กระเทียมต้ม

สามารถผลิตกรดและมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.8 แต่เชื้อสามารถยับยั้งการเจริญได้ในกระเทียมที่ไม่ต้ม เนื่องจากกระเทียมสารต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้น กากกระเทียมที่นำมาใช้ในการหมักด้วยเชื้อโพรไบโอติก จะเห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้นได้ดี เนื่องจากได้กำจัดส่วนของน้ำมันกระเทียมซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียออกไปแล้ว อีกทั้งองค์ประกอบของกระเทียมมีอินูลินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจัดเป็นโพรไบโอติกเป็นอาหารของเชื้อโพรไบโอติก จึงเป็นการสนับสนุนให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี กากกระเทียมหมักที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปเป็นวัตถุดิบในการพัฒนาสูตรในการทำนํ้าจิ้มสุกต่อไป ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกากกระเทียมอีกทางหนึ่ง การพบเชื้อปนเปื้อนระหว่างการหมักอาจจะมีสาเหตุมาจาก มีการปะปนเชื้อมากับอากาศ หรือผิวหนังซึ่งเชื้อ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียปนเปื้อนที่สามารถพบทั่วไปในธรรมชาติในดิน นํ้าปะปนมากับอาหารแห้ง ข้าวสวย จึงสามารถปนเปื้อนได้ง่ายในระหว่างการหมักกากกระเทียม แต่ในระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลกติกเกิดขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง และเกิดการสร้างกรดแลกติกทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอื่น ๆ ลดลงด้วย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ จากการหมักกากกระเทียมร่วมกับเชื้อโพรไบโอติกสามารถจัดจำแนกเชื้อโพรไบโอติกที่ได้จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Lactobacillus* sp. จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative เป็นเชื้อโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส และแมนนิทอลได้ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สภาวะของการหมักกากกระเทียมเพื่อให้ได้การเจริญของเชื้อมากที่สุด คือ หัวเชื้อความเข้มข้น 10^6 CFU/ml หมักที่อุณหภูมิห้อง และ ระยะเวลาของการหมัก คือ 7 วันเป็นต้นไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเครือข่ายบริหารการวิจัยภาคเหนือตอนบน (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

ไชยวัฒน์ ไชยสุต, ศศิธร ศิริสุน, สาร์ทจิน ภีระจันทร์ และ นภัทรสร กุมาร. (2554). *คู่มือหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค (ฉบับชาวบ้าน)* (พิมพ์ครั้งที่ 1). ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ธนากร บำรุงภักดี และบรรศักดิ์ สีนานนท์. (2554) . การแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ต้อง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมัก. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น : การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2546). การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่าง แหนมของไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, 108-115.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). จุลชีววิทยาทั่วไป (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Antonio de Castro, Alfredo Montan, Antonio H. Sa'nchez & Luis Rejano. (1998). *Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. International Journal of Food Microbiology*, 39, 205-211.

Siriporn Riebroy Siriporn Riebroya, Soottawat Benjakula, Wonnop Visessanguan. (2008). Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters. *LWT – Food Science and Technology*, 41(4), 569-580.

Kaur N. & Gupta AK. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, 27, 703-714.