รายงานวิจัย

ศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

Study on Acceptance of Nham Using Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria as Starter Culture

โดย

รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2548

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัย

ศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

Study on Acceptance of Nham Using Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria as Starter Culture

โดย

รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

RCH
ว.1
ค1 ๔๘๔
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....73025
วัน,เดือน,ปี.....27 มิ.ย. 2550

โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2548
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.11764912
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2548 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนให้ทุนวิจัยในหัวข้อดังกล่าว รวมทั้งอนุเคราะห์สถานที่วิจัยจนงานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และเจ้าหน้าที่จาก WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจแยกวินิจฉัยชนิดสายพันธุ์เชื้อซัลโมเนลล่าที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ นางสาว พรพิมล เทียนทอง นักศึกษาปริญญาโทสาขาอุตสาหกรรมเกษตร ของโครงการคณะอุตสาห-กรรมเกษตร ที่ช่วยให้งานวิจัยในหัวข้อดังกล่าวเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ร่วมให้ข้อแนะนำในการทำวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ดร.วริพัสย์ อารีกุล และ นาง อัสนี วิจิตระกะที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านสารเคมี อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ อุปกรณ์ เครื่องมือปฏิบัติการ และ ดูแลด้านปฏิบัติการให้กับนักศึกษาปริญญาโทในขณะที่ข้าพเจ้าปฏิบัติงานวิจัยที่ต่างประเทศ

ข้อมูลบางส่วนของงานวิจัยนี้ได้นำไปเผยแพร่ในรูปแบบ poster presentation ในงานประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตรครั้งที่ 7 ในหัวข้อ ที่ ไบเทค บางนา ระหว่างวันที่ จัดโดย ซึ่งผู้วิจัย ได้แนบเนื้อหาการนำเสนอที่ได้รับตีพิมพ์ลงใน Proceedings ในซีดี ของการประชุมนี้ แนบท้ายรายงานวิจัยนี้ไว้ด้วยแล้ว

รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	1.1 บทนำ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2	วารสารปริทัศน์	3
	2.1 แหนม	3
	2.2 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)	5
	2.3 กระเทียม	11
	2.4 เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*)	12
	2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร	14
3	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	20
	3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิต	20
	3.2 เชื้อจุลินทรีย์	20
	3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์	20
	3.4 สารเคมี	21
	3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ	21
	3.6 สถานที่ทำการทดลอง	22
	3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	22
	3.8 วิธีการทดลอง	22
4	ผลการทดลองและวิจารณ์	25
	4.1 ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม	25
	4.2 การผลิตแบคเทอริโอซินของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในระหว่างการหมักแหนม	29
	4.3 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของแหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น	30
5	สรุปผลการทดลอง	32
6	เอกสารอ้างอิง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียสามารถเติบโตในอาหารได้	15
2.2	ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water activity, A_w) ที่ต่ำสุดสำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร	17
2.3	อุณหภูมิต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดเติบโตได้	19
3.1	แสดงส่วนผสมในการผลิตแหนม	23
4.1	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนม	26
4.2	ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาระหว่างการหมักแหนม	28
4.3	เชื้อซัลโมเนลลาเซโรวาร์ต่างๆที่ตรวจพบจากตัวอย่างแหนมในช่วงการหมัก 0-3 วัน	29
4.4	แบคเทอริโอซินที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักแหนม	30
4.5	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีอยู่มากมายหลายชนิด อาทิเช่นอาหารหมักจากข้าว ได้แก่ ขนมจีน ข้าวหมาก ฯลฯ อาหารหมักจากเนื้อ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาร้า ฯลฯ และอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์อาหารหมักไทยโดยมากมักเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกอย่างจริงจัง แต่ในระยะสิบกว่าปีที่ผ่านมานี้ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักไทย (Lotong and Swetwiwathana, 1990) ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมใช้ในการผลิตเป็นกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ไทยให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น โดยมุ่งเน้นถึงการยอมรับในรสชาติ ลักษณะปรากฏหลังจากใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อควบคุมคุณภาพการหมัก และที่สำคัญอย่างยิ่งคือ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (Swetwiwathana et al., 2003) ซึ่งมุ่งเน้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในระหว่างการหมัก โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อหมักอาหารเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์หมักที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Swetwiwathana et al., 2002)

แหนม เป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทยที่พบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของซาลโมเนลลาสูง (อดิศร และ นภา, 2534; อดิศร และ อรุณ, 2539; อดิศร และคณะ, 2537) เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ เช่น หมู มักพบว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อดังกล่าวอยู่ก่อนในปริมาณที่สูง ทั้งนี้เนื่องจากการฆ่าและผ่าซากที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (Isaacson และคณะ, 1999; Fedorka-Cray และคณะ, 1995) การทำลายเชื้อซาลโมเนลลาที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ มักอาศัยองค์ประกอบในการผลิตแหนม เช่น เกลือ กระเทียม วัตถุเจือปน (ไนไตรท์) จุลินทรีย์ในกลุ่มแลกติกที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก ที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ไปเป็นกรดแลกติก โดยจากผลรวมขององค์ประกอบต่าง ๆ ทั้งหมดดังกล่าวในการผลิตแหนม จะมีผลต่อการยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้แหนมที่มีความเป็นกรดสูงและค่าพีเอชต่ำ ซึ่งการทำลายเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นโดยใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยลง ถ้ามีการใช้กล้าเชื้อ (starter cultures) ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการผลิต (อดิศร, 2533; Swetwiwathana *et al.*, 1999) แต่เนื่องจากเทคโนโลยีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่แพร่หลายในกลุ่มผู้ผลิตผลิตภัณฑ์แหนม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาการใช้เชื้อที่มีคุณสมบัติผลิตสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ ของไทย เช่น แหนม ด้วยเหตุนี้ ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงตั้งใจที่จะศึกษาหาข้อมูลของการใช้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์แหนมดังกล่าว มาทำการหมักแหนมเพื่อศึกษาหาความเป็นไปได้ของการใช้เชื้อเหล่านี้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม โดยดูคุณสมบัติทางเคมีบาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการ การยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่เป็นปัญหาของผลิตภัณฑ์ เช่น ซาลโมเนลลา รวมถึงการยอมรับของผู้บริโภคต่อการใช้เชื้อกลุ่มดังกล่าวเป็นกล้าเชื้อในการผลิต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากแหนมที่ทำการทดสอบแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน มาทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้ทำการใช้กล้าเชื้อในการหมัก ดังนี้

ก. ดูการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคที่เป็นปัญหาของผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่ *Salmonella* Anatum

ข. ดูการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและเปอร์เซ็นกรดแลกติกที่เชื้อสร้างขึ้น

ค. ทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้ที่ชอบบริโภคแหนมเพื่อศึกษาหาสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่มีมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตแหนมในอนาคต

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ก. ได้สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยสำหรับเป็นกล้าเชื้อผลิตแหนมและอาหารหมักไทยประเภทต่าง ๆ ให้มีคุณภาพและความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ในโอกาสต่อไป

ข. ได้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่เป็นปัญหาของผลิตภัณฑ์ในกลุ่มซาลโมเนลลา

ค. ข้อมูลจากงานวิจัยดังกล่าวช่วยกระตุ้นให้ผู้ผลิตสนใจที่จะใช้เชื้อกลุ่มดังกล่าวในการควบคุมการผลิตแหนมให้ปลอดภัย และมีรสชาติเป็นที่ยอมรับ ทั้งนี้เพื่อรองรับนโยบายของรัฐบาลในการที่จะให้ประเทศไทยเป็นหนึ่งในเรื่องครัวของโลก (Kitchen of the world) และรองรับนโยบายปีอาหารปลอดภัย (Food safety) ของประเทศในโอกาสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แหนม

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของประเทศไทย ในปัจจุบันนิยมบริโภคกันมาก โดยเฉพาะทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มาตราฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้ให้นิยามของแหนมว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมูส่วนสะโพกที่แยกไขมัน และเอ็นออกแล้ว ผสมกับหนังหมู อาจผสมหูหมูหรือจมูกหมูที่ต้มสุก และหั่นเป็นเส้นแล้ว เติมเกลือ ข้าวสุก กระเทียมบด น้ำตาลทราย ผสมให้เข้ากัน อาจเติมพริกสดด้วยก็ได้ ห่อเป็นมัด หรือบรรจุในภาชนะบรรจุลักษณะอื่นๆ หมักจนมีรสเปรี้ยว (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2546) สำหรับคุณลักษณะของแหนมนั้น ต้องมีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้ทำ ผสมกันอย่างทั่วถึง เนื้อแน่น ไม่มีโพรงอากาศ และมีน้ำจากการหมักได้เล็กน้อย มีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนม มีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมัก มีรสเปรี้ยวที่พอเหมาะซึ่งรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการหมักที่มีจุลินทรีย์เข้าเกี่ยวข้อง โดยเฉพาะจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลคติก ในระยะแรกของการหมักมักพบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อหมู ได้แก่ แบคทีเรียรูปท่อนและรูปกลม ติดสีแกรมบวก และแกรมลบ มีทั้งพวกที่สร้างกรดได้ และทำให้อาหารเน่าเสีย หลังการหมักประมาณ 24 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดี และเติบโตในที่ที่มีอากาศน้อย คือ เชื้อในกลุ่ม homofermentative cocci เช่น *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ที่เติบโตจำนวนมาก เชื้อชนิดนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างเป็นกรดแลคติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ทำให้ค่าพีเอชของแหนมลดลง ซึ่งค่าพีเอชของแหนมในวันที่ 4 ควรมีค่าต่ำกว่า 4.5 และมีปริมาณกรด แลคติกสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชที่ต่ำและปริมาณกรดที่สูงนี้ ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคอย่างซัลโมเนลลา ลดจำนวนลงด้วย (บุษกร, 2545)

ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแหนมในด้านต่างๆมากมาย ซึ่งส่วนมากจะเน้นถึงงานวิจัยในด้านการใช้กล้าเชื้อเพื่อความปลอดภัยในการผลิตแหนม รวมถึงคุณภาพที่ดีของแหนมเมื่อใช้กล้าเชื้อในการผลิต เพื่อปรับปรุงคุณภาพทั้งในแง่ของกระบวนการผลิต และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังเช่นงานวิจัยในต่อไปนี้

อรนุช (2530) ได้คัดเลือกและศึกษาวิธีการผลิตเชื้อผงแบคทีเรียแลคติค ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลา พบว่าจากแบคทีเรียแลคติกจำนวน 112 ไอโซเลท ได้แก่ *Pediococcus* spp. 78 ไอโซเลท *Lactobacillus* spp. 34 ไอโซเลท เชื้อแต่ละไอโซเลทให้ผลต่างกันในการยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ *S.* Anatum, *S.* Bovis-morbificans, *S.* Derby, *S.* Krefeld, *S.* Lexington, *S.* London, *S.* Weltevreden และ *S.* Newport และจากการพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาได้สูง การผลิตกรดได้ดี และการมีค่าความขุ่นของการเจริญต่างๆกัน สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท ได้แก่ *Pediococcus* spp. รหัส P_9, P_{18}, P_{33}, P_{39}, P_{42} และ TISTR 536 *Lactobacillus* spp. รหัส L_{23} และ TISTR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

539 งานวิจัยของอดิศร (2533) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม พบว่าแหนมที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติค *Pediococcus* spp. รหัส P_{55} และกล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส P_{55} และ *Lactobacillus* spp. รหัส L_1 ในการหมัก ให้ผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในขณะหมักได้ดีที่สุด และยังพบว่าการหมักแหนมโดยมีการเติมกล้าเชื้อทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากเชื้อซัลโมเนลลา เมื่อใช้เวลาในการหมัก 5 วัน ขณะที่การหมักโดยธรรมชาติต้องใช้ระยะเวลา 6 วัน เมื่อทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค โดยใช้แหนมที่มีแบคทีเรียแลกติคเป็นกล้าเชื้อในการหมักเทียบกับแหนมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ พบว่าผู้บริโภคมีความชอบในแหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส L_1 และเชื้อรหัส P_{55} มากที่สุด และในปี 1999 Swetwiwathana และคณะ ได้ทำการทดลองในทำนองเดียวกันโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lb. curvatus, Lb. sakei* และ *P. acidilactici* ร่วมกับ ไนเตรท ไนไตรท์ และกระเทียม ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ในแหนม พบว่า เมื่อใช้โซเดียมไนไตรท์ 125 ppm กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Anatum ได้ แต่ถ้าใช้ร่วมกับ *Lb. sakei* จะให้ผลในการยับยั้งดีที่สุด

Petchsing และ Woodburn (1990) ได้ศึกษาถึง *Staph. aureus* และ *E. coli* ในแหนม พบว่า แหนมที่ไม่ใส่กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นมีจำนวน *E. coli* เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ *Staph. aureus* มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อใส่กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไป 0.75เปอร์เซ็นต์ จะไม่พบเชื้อ *Staph. aureus* หลังการหมักผ่านไป 48 ชม. และ *E. coli* จะลดจำนวนลง 1 log หลังจาก 96 ชม. และเมื่อใส่กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จะไม่พบเชื้อ *Staph. aureus* และ *E. coli* หลังจากการหมัก 36 และ 96 ชม. ตามลำดับ ในขณะที่ Wiriyacharee และคณะ (1990) ได้ทดลองใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้นระหว่างเชื้อ *Lb. plantarum* (NHI 110), *P. cerevisiae* (NZDRI) และ *M. varians* (ATCC 15306) ในปริมาณ 10^3 10^6 และ 10^3 cfu / กรัม ตามลำดับ ในขั้นตอนของการผลิตแหนม และควบคุมสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 97 พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของแหนมทำให้การผลิตกรดเป็นไปได้อย่างดี ซึ่งทำให้คุณภาพของแหนมดีมากในแง่ของลักษณะเนื้อของแหนม และสีของแหนม ตลอดจนผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความปลอดภัยสูง

เรณู (2539) ได้ทำการทดลองโดยใส่เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม คือ *Micrococcus varians, Lb. plantarum* และ *P. cerevisiae* ในการหมักแหนม พบว่าสามารถลดเชื้อ *S.* Typhimurium ปริมาณเริ่มต้น 460 และ 2400 MPN/ กรัม ได้หมดในวันที่ 3 และ 4 ของการหมัก โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.60 และ 4.45 ปริมาณกรดแลคติก 0.94 เปอร์เซ็นต์ และ 1.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลดเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณ 330 และ 2800 MPN/ กรัม หมดในวันที่ 4 และ 5 มีค่าพีเอช 4.44 และ 4.37 ปริมาณกรดแลคติก 1.12 เปอร์เซ็นต์ และ 1.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ ศิพ์ตน์ (2539) ศึกษาถึงผลของการใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดเดียวกับเรณู เพื่อลดปริมาณ *Staph. aureus* พบว่า *Lb. plantarum* เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการทำลาย *Staph. aureus* ได้ดีกว่าเชื้ออีกสองชนิด แต่ถ้าใช้เชื้อทั้งสามชนิดร่วมกับ โซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนเตรท 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไนไตรท์ 0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายเชื้อ *Staph. aureus* ที่มีปริมาณ 240 และ 4600 MPN / กรัม ให้หมดภายใน 120ชั่วโมง หรือ 5 วัน มีค่าพีเอช 4.30

Noonpakdee และคณะ (2003)ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในแหนมเพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน โดยสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 14,020 ชนิด หนึ่งในนั้น คือ *Lb. lactis* สายพันธุ์ WNC20 ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกใกล้เคียงแล้ว และยับยั้งการเจริญของ pathogens ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่ประกอบด้วย *Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Bacillus cereus* และ *Staph. aureus* ได้ด้วย ความสามารถของ *Lb. lactis* WNC 20ในการผลิตแบคเทอริโอซิน จึงน่าจะมีประโยชน์ในการปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ในขณะที่ Swetwiwathana และคณะ (2003) ได้ศึกษาการสร้าง แบคเทอริโอซิน ของแบคที่เรียแลคติดในแหนม พบว่ามี แบคเทอริโอซิน ที่ถูกสร้าง 14 strains และใน 6 strains คือ N10 N3 N60 N100 N190 และ TISTR 536 เป็นสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่เป็น indicator ได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ N100 และ N190 ให้ผลในการยับยั้งพวกแกรมบวกที่เป็น pathogens ในอาหาร ทั้ง *L. monocytogenes, Staph. aureus* และพวกแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้ดี นอกจากนี้ยังมี TISTR 536 ที่สามารถยับยั้งพวก pathogens ในอาหาร เช่น *E. coli* และ *L. monocytogenes* ได้ แต่ไม่สามารถใช้ได้กับ *Staph. aureus* และ *Staph. carnosus* ซึ่ง *Staph. carnosus* มักนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในไส้กรอกหมักหลายชนิดของชาวยุโรป เนื่องจากช่วยเพิ่มเรื่องของกลิ่น และ สีในผลิตภัณฑ์ ต่อมาในปี 2004, Swetwiwathana และคณะ ศึกษาถึงผลของกระเทียมและไนไตรท์ที่มีต่อการผลิต Pediocin PA-1 ของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ *S.* Anatum ในสภาวะการหมักแหนมจำลอง พบว่ากระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เจริญได้ดีทั้งในที่มีและไม่มีไนไตรท์ เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ใส่กระเทียม และเมื่อใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท์ 125 ppm และ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถลดจำนวนของ *S.* Anatum ได้ภายใน 30 ชั่วโมง

2.2 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียพวกนี้ คือ ความสามารถในการสลายน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้ส่วนมากเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย และจากสิ่งที่สร้างได้จากการหมักของแบคทีเรียประเภทนี้ทำให้สามารถแบ่งย่อยแบคทีเรียพวกนี้ได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เน้นสร้างแลคเตท (homofermentative) และกลุ่มที่สร้างแลคเตทร่วมกับสารอื่น (heterofermentative) โดยเชื้อในกลุ่มที่เน้นสร้างแลคเตทนั้นหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วจะสร้างกรดแลคติก 95 เปอร์เซ็นต์ อีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในกลุ่มที่สร้างแลคเตทร่วมกับสารอื่นจะหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติกออกมา 50 เปอร์เซ็นต์ อีก 25 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) เป็นต้น และอีก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ เชื้อในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกนี้เมื่อก่อนมีเพียง 4 สกุลเท่านั้น ได้แก่ *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แต่ในปัจจุบันเมื่อใช้ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) ได้จัดแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็นสกุลต่างๆเพิ่มขึ้น ได้แก่ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weisella* (บุษกร, 2545)

2.2.1 กระบวนการหมักที่เกิดจาก แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นกรดแลคติกในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้

แบคทีเรียแลคติก

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3$

น้ำตาล → กรดแลคติก

ในขณะที่ แบคทีเรียแลคติก เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ค่าพีเอช ของอาหารหมักดองลดลง พร้อมกับรสเปรี้ยวเพิ่มขึ้น ในสภาพเช่นนี้จะมีผลช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและก่อโรคได้

2.2.1.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative)

เป็นการหมักที่ได้แลคเตทอย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญ ขั้นตอนการสร้างแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphoenolpyruvate – dependent phosphotransferase system (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) อยู่ในรูป lactose-6-phosphate จากนั้นถูกเอนไซม์ phospho-ß-galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Emden – Meyerhof – Parnas glycolytic pathway หรือ EMP pathway จนได้เป็นแลคเตทในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวท โดยเอนไซม์ lactate dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate เข้าสู่กระบวนการต่างๆใน D-tagatose-6-phosphate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนไปเป็น dihydroxyacetone phosphate และถูกเปลี่ยนไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนไปเป็นแลคเตทในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็นแลคเตทในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดสสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เมมเบรนได้เลยหลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟต โดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น glucose-1-phosphate จากนั้นถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็นแลคเตทในที่สุด (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.2.1.2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทธานอล หรืออะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลส จึงเปลี่ยนรูปจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมไปเป็นเพนโตส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชันและดีคาร์บอกซิเลชันร่วมด้วยน้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟต (ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม) และอะเซทติลฟอสเฟตโดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) กลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตทเช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซีสในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (แต่เนื่องจากการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟมีกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุล จึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนอะเซทติลฟอสเฟตนั้นขึ้นกับมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่หรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอน อะเซทติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่ดังกล่าว ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทธานอล และได้ $2\ NAD^+$ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุล จากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นมาใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะเซทติลฟอสเฟตมีมากพอสำหรับการเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับสับสเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุล เป็น 2 โมเลกุลจากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นได้กับตัวรับออกซิเจนอื่นๆด้วย เช่น ฟรุกโตส ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิตอล (สุมณฑา, 2545)

2.2.2 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย แบคทีเรียแลคติก

2.2.2.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์หลายชนิดถูกนำมาใช้เติมในอาหาร แต่ไม่ได้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก กรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก ส่วนกรดซิตริก แคปไรลิค ฟูมาลิค และกรดอินทรีย์อื่นๆ มีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัด แต่ถูกนำมาใช้ในแง่ของรสชาติมากกว่า ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช กรดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะอยู่ในรูปที่ไม่มีการแตกตัว ดังนั้นการจะเลือกใช้กรดอินทรีย์ในการถนอมอาหารต้องพิจารณาถึงค่าพีเอช และ pKa ของกรดชนิดนั้น ๆ ซึ่งโดยปกติ กรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีพีเอชต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 5.0 สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์นั้น กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลเมมเบรนและผนังชั้นไขมัน (lipid bilayer) ได้ง่าย โดยปกติสภาพภายในเซลล์ กรดจะอยู่ในรูปที่แตกตัว เนื่องจากภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์มีค่าพีเอชสูงกว่าภายนอกเซลล์ แบคทีเรียจึงพยายามรักษาพีเอช ภายในเซลล์ให้มีค่าใกล้เคียงความเป็นกลาง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนรูปของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลิอิก และฟอสโฟลิปิด โดยโปรตอนจากกรดอินทรีย์จะทำให้ความเป็นกรดภายในไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้น จึงต้องมีการกำจัดกรดที่มากเกินไปออกสู่ภายนอกเซลล์ โปรตอนถูกขับออกภายนอกเซลล์ผ่านทางเมมเบรน โดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า เรียกว่า proton motive force (PMF)

การขับโปรตอนภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการไหลเข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่องของโปรตอน ทำให้พลังงานภายในเซลล์ถูกนำมาใช้ในการกำจัดโปรตอนจนหมด ขณะเดียวกันก็เกิดการรบกวนการผ่านเข้า – ออกของสารในเมมเบรน ทำให้แบคทีเรียขาดพลังงานและตายในที่สุด (Doyle และคณะ, 1997)

1) กรดแลคติก

กรดแลคติก มีค่า pKa = 3.79 เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักอาหารโดยแบคทีเรียแลคติก ซึ่งกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ และ *Staph. aureus* ซึ่งความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดแลคติก ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งมีเพียงบางรายงานเกี่ยวกับกลไกที่จำเพาะต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารของกรดแลคติกโดยกลไกหลักเหมือนกับกรดอินทรีย์ทั่วไปคือ มีผลต่อการขนส่งของโปรตอนผ่านไซ-โตพลาสมิกเมมเบรน (cytoplasmic membrane) (Doyle และคณะ, 1997)

2) กรดอะซิติก และ กรดโพรพิโอนิก

แบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างกรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกได้ในปริมาณน้อย กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิกมีค่า pKa สูงกว่ากรดแลคติก จึงมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลคติก กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก จะเหมือนกับกรดแลคติก คือรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรน โดยทำให้ความต่างศักย์ทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical potential) เป็นกลาง นอกจากนี้กรดอะซิติกยังเป็นสาเหตุที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง และยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนได้ด้วย (Wood, 1992)

2.2.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดสแต่ขาดเอนไซม์คะทะเลส แบคทีเรียแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น เหตุที่แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้จึงทำให้แบคทีเรียแลคติกทนสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และได้รับอนุญาตโดย FDA ให้ใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบที่จะใช้ผลิตเนยแข็ง โดยใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมลงในไข่ขาว ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะมีความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้ สำหรับการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อยืดอายุการเก็บน้ำนมดิบอาศัยระบบแล็คโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase system) ซึ่งเป็นกระบวนการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในน้ำนมดิบ โดยมีกลไกคือ ไธโอไซยาเนท (thiocyanate) ถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้ได้สารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ อนุมูลของไฮโปไธโอไซยาเนท (hypothiocyanate radical) และกรดไธโอไซยานัส (thiocyanous acid) ซึ่งประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ พีเอช ไอออนของสารอนินทรีย์ ระยะเวลาในการสัมผัส และปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่มีผลต่อจุลินทรีย์ เช่น ความร้อน รังสี หรือ สารกันเสียอื่นๆ (Wood, 1992)

2.2.2.3 แบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

แบคเทอริโอซิน คือสารประกอบประเภทโปรตีน ที่สามารถซึมผ่านเยื่อของเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายได้ ทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อเซลล์และเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบเซลล์ตามมา กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน คือสร้างภาวะที่ไม่สมดุลของไอออนให้เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เซลล์ต้องสูญเสียสมดุลศักย์ไฟฟ้าและเกรเดียนต์ความเป็นกรดด่างไป (สาโรจน์, 2547) กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะแตกต่างกันไปแล้วแต่สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lb. fementum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* ทำให้แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการเป็นสารถนอมอาหารได้

ในปัจจุบันสารกลุ่มนี้เป็นสารนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจอยู่ เนื่องจากเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นสารปฏิชีวนะ เช่น ไนซิน (nisin) ซึ่งตอนนี้ในประเทศไทยก็มีผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้อยู่หลายท่าน เช่น Swetwiwathana และ Lotong (1999) ได้คัดเลือกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหนม มี 3 สายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. คือ TISTR 419, 530, 536 และสายพันธุ์จาก *Lactobacillus* spp. คือ TISTR 543 พบว่าสายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. เท่านั้นที่มีผลในการยับยั้ง *L. innocua* ที่ใช้เป็นเชื้อ ทดสอบในการทดลอง และในปี 2004, Swetwiwathana และคณะ พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แรกที่ผลิต Pediocin PA-1 ที่แยกได้จากแหนม

2.2.2.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล หรือ 2, 3-butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ไพรูเวท โดยแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวทออกมาในปริมาณมาก ซึ่งจะเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetoin โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และมีผลในการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ รา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซิทิลจะขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับโปรตีน

โสภา (2541) ได้นำเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นสองชนิด คือ *Lb. plantarum* และ*P. cerevisiae* มาใช้ในการลดปริมาณของ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth จากการศึกษาพบว่า เชื้อเริ่มต้นทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการทำลาย *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum เท่าเทียมกันโดยใช้ระยะเวลา 28 ชั่วโมง ในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสองชนิดที่มีปริมาณเริ่มต้น 10^2 cfu/มิลลิลิตร และใช้เวลา 32 ชั่วโมง ในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่มีปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ มิลลิลิตร

ในปี 1990, Scharner ได้ทดลองใส่เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น Reodema SSHK 76 ลงในไส้กรอกหมัก " Hausschiachtene Knackwurst" ที่มีการปนเปื้อนของ *S.* Dublin ซึ่งพบว่าภายในระยะเวลา 7 วัน จำนวนของเชื้อซัลโมเนลลาจะลดลง 1-3 ส่วนจาก 10 ส่วน ต่อมา Hugas และคณะ (1995) ได้นำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. sake* CTC494 ที่แยกได้จากไส้กรอกหมักแบบธรรมชาติ มาใส่ในไส้กรอกหมักแบบแห้ง พบว่าสามารถหยุดการเจริญเติบโตของ *Listeria* และลดจำนวนเซลล์ลงได้ 1.25 $\log_{10}$ cfu/ กรัม จากการวิเคราะห์เชื้อแลคติกชนิดนี้สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ ที่เรียกว่า "sakacin K." Savic และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองโดยใส่และไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์ Sremska salami พบว่า การเติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นจะทำให้ค่าพีเอช และค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของไส้กรอกลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกของการหมัก แต่ค่าพีเอชและค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ในวันสุดท้ายของการหมักต่ำกว่าที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้น และการใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นจะทำให้ได้ไส้กรอกที่มีสีและความแน่นเนื้อสม่ำเสมอ โดยใช้เวลาสั้นกว่าที่ไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้น Nassu และคณะ (2002) ได้ทำการผลิตไส้กรอกหมักจากเนื้อแพะ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นต่างชนิดกัน คือ (1.) *Staph. xylosus* และ *P. pentosaceus* (2.) ใช้เชื้อผสมของ *Pediococcus* spp. 2 สายพันธุ์ ในอัตราส่วน 50:50 (3.) *Lb. farciminis, Staph. aureus* และ *Staph. carnosus* ในระหว่างการหมักเพื่อดูความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าไส้กรอกที่ใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ต่างกันก็จะทำให้ค่าพีเอช ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้และการผลิตกรดแลคติคที่ต่างกันด้วย แต่เมื่อนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าไม่แตกต่างกัน และเมื่อนำไปทดสอบในเรื่องความปลอดภัย โดยพิจารณาถึงระยะเวลาในการลดลงของเชื้อ *Staph. aureus* ผลปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นทุกชนิดสามารถลดปริมาณของ *Staph. aureus* ลงได้ จึงสามารถที่จะใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นทั้งหมดในการทำไส้กรอกหมักจากเนื้อแพะได้ ในขณะที่ Tantillo และคณะ (2002) ศึกษาถึงเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ทั้งหมด 152 ชนิด เพื่อหาสายพันธุ์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่าเชื้อ *Lb. sakei* สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes, L. seeligeri, L. innocua, Lb. alimentarius* และ *Lb. bavaricus* ได้ ซึ่งเชื้อ *Lb. sakei* สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้จึงใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในไส้กรอกแบบแห้งได้ ต่อมา Mataragas และคณะ (2003) ได้นำเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นที่แยกได้จากไส้กรอกหมักแบบแห้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Leuconostoc mesenteroides* L124 และ *Lb. curvatus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L442 มาใส่ในเนื้อหมูปรุงสุก เพื่อต่อต้านเชื้อ *L. monocytogenes* พบว่าสามารถลดจำนวนประชากรของ Listeriae ได้ 1.5 $\log_1$ cfu/กรัม และถ้านำเอาสารแบคเทอริโอซินที่ได้จากเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นนี้มาใส่ในตัวอย่างก็สามารถที่จะลดจำนวน Listeriae ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ได้ (10^2 cfu/ กรัม)

2.3 กระเทียม (*Allium sativum* L.)

จัดอยู่ในวงศ์ Alliaceae มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของทวีปยุโรปถึงตอนกลางของทวีปเอเชีย และแพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก นำมาปลูกในประเทศไทยมากทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเพื่อเป็นอาหารและเครื่องเทศ โดยใช้ทั้งต้นเป็นอาหาร หัวกระเทียมสด แห้ง และน้ำมันกระเทียมใช้เป็นเครื่องเทศแต่งกลิ่นอาหารหลายชนิด อาหารเสริมสุขภาพ และยาพื้นบ้านซึ่งใช้มานานหลายร้อยปี โดยใช้บำบัดอาการไอหวัด หลอดลมอักเสบเรื้อรัง ปวดฟัน ปวดหู ปวดท้อง อาหารไม่ย่อย โรคความดันโลหิตสูง เส้นเลือดเปราะ ขับลม ขับเสมหะ ขับปัสสาวะ ขับประจำเดือน ขับพยาธิ ลดอาการอักเสบบวม ฆ่าเชื้อ แก้โรคผิวหนัง น้ำมันกระเทียมใช้ทาแก้แมลงกัดต่อย มีรายงานทางเภสัชวิทยาของกระเทียม และน้ำมันกระเทียมว่า ทำให้น้ำตาลในเลือดของกระต่ายลด ลดไขมันในกระต่ายและคน ลดความดันโลหิตในสัตว์และคน ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ฆ่าแมลง ขับเสมหะ ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ ฤทธิ์ต่างๆเหล่านี้เนื่องมาจากสาร allicin, diallyl disulphide และ diallyl trisulphide นอกจากนี้สารต่างๆดังกล่าวยังทำให้เกิดผิวหนังอักเสบ และแสบร้อนเมื่อสัมผัส (กัลยา, 2548)

กระเทียมสดประกอบด้วยน้ำมันระเหยง่ายประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็น allicin, เอนไซม์ โปรตีน ไขมัน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 กรดอะมิโน แร่ธาตุ และสารอื่นๆอีกหลายชนิด ในน้ำมันระเหยง่ายประกอบด้วยสารเคมีประเภทสารประกอบของกำมะถันที่เป็นสารหลัก คือ allicin, diallyl disulphide, diallyl trisulphide, allylpropyl disulphide และที่พบเป็นส่วนน้อยคือ dimethyl sulphide, dimethyl disulphide, dimethyl trisulphide, diethyl disulphide, diallyl sulphide, methyl allyl trisulphide, diallyl polysulphide, methanethiol และสารประกอบอื่นๆของกำมะถันอีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารระเหยได้ชนิดอื่นอีกคือ citral, geraniol, linalool และ α – and β- phellandrene สาร allicin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีกลิ่นนั้นเกิดจากปฏิกริยาของเอนไซม์ allinase เปลี่ยน alliin ให้เป็น allicin ความร้อนและด่างทำให้ allicin เสื่อมสลายได้ แต่กรดเจือจางไม่ทำให้ allicin เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นกระเทียมดองในน้ำส้มจึงยังมีกลิ่นอยู่ (กัลยา, 2548)

2.3.1 การยับยั้งจุลินทรีย์ของกระเทียม

สารอัลลิซินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ยูรีเอส (Urease) ปาเปน (Papain) ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนส (Succinic dehydrogenase) ไตรโอสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Triosephosphate dehydrogenase) เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจหรือการเจริญของเซลล์ เป็นผลทำให้จุลินทรีย์ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำลาย อัลลิซินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนสและไตรโอสฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเซลล์จุลินทรีย์ที่เจริญโดยใช้ออกซิเจนมากกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญโดยไม่ใช้ออกซิเจน สำหรับเอนไซม์ที่ถูกทำลายโดยอัลลิซินส่วนมากจะมี sulfhydryl group (SH) อยู่ด้วย หมู่ SH นี้จะสามารถรวมกับหมู่ thiosulfinate ในโครงสร้างของอัลลิซินได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นผลให้กิจกรรมที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ถูกทำลาย (Willis, 1956) โดยหมู่ SH มีความสำคัญต่อเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นตัวกระตุ้นที่จำเพาะในการเพิ่มจำนวนของเซลล์และยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ด้วย

มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับผลของกระเทียมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังเช่น อดิศร (2542) ศึกษาผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทางการค้า 3 สายพันธุ์คือ *Lb. curvatus*, *Lb. sake* และ *P. acidilactici* พบว่า กล้าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถทนต่อการทำลายของสาร allicin ที่มีในน้ำสกัดกระเทียมได้ดี สามารถเจริญได้ดีใน MRS broth ที่มีน้ำสกัดกระเทียมความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่น้ำสกัดกระเทียมความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อลดปริมาณลงไปเพียงเล็กน้อย ในขณะที่เชื้อก่อโรคอย่าง *S.* Anatum และ *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่ไวต่อการถูกทำลายด้วยสาร allicin โดยเชื้อจะถูกทำลายและลดจำนวนลงที่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำสกัดกระเทียมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าน้ำสกัดกระเทียมมีความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีผลในการลดปริมาณเชื้อให้หมดเร็วขึ้น Ankri และ Mirelman (1999) ศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของ allicin จากกระเทียม พบว่า allicin เป็นสารสำคัญที่พบเมื่อกระเทียมถูกทำให้แตก สาร allicin บริสุทธิ์นี้แสดงฤทธิ์เป็นสารต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถใช้เป็นส่วนประกอบของยาที่ใช้ต้านโรคเกี่ยวกับลำไส้ที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ใช้เป็นสารต้านเชื้อรา เช่น *Candida albicans* เป็นสารต้านปรสิต รวมถึงโปรตัวซัวที่เป็นปรสิตในลำไส้ของมนุษย์ เช่น *Entamoeba histolytica* และ *Giardia lamblia* และพบว่ายังเป็นสารต้านไวรัสอีกด้วย สารต้านจุลินทรีย์ที่เป็นผลมาจากสาร allicin นี้ เนื่องมาจากสารนี้ทำปฏิกริยากับกลุ่ม thiol ของเอนไซม์ต่างๆ เช่น alcohol dehydrogenase, thioredoxin reductase และ RNA polymerase ที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเผาผลาญที่จำเป็นของจุลินทรีย์ Sallam และคณะ (2004) ศึกษาผลของสารต้านแบคทีเรียซึ่งเป็นผลมาจากกระเทียมในไส้กรอกไก่ โดยใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่มาจากกระเทียมสด (fresh garlic) กระเทียมผง (garlic powder) และน้ำมันกระเทียม (garlic oil) พบว่า เมื่อใส่กระเทียมสด 30 กรัม/กิโลกรัม หรือกระเทียมผง 9 กรัม/กิโลกรัม สามารถลดปริมาณเชื้อที่มีปริมาณเริ่มต้นจาก 4.41 $\log_{10}$CFU/ กรัม ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเติมน้ำมันกระเทียมพบว่าปริมาณเชื้อที่พบไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

2.4 เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

เชื้อซัลโมเนลลาจัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคเทอริซิอี (Family Enterobacteriaceae) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะที่ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญ พีเอชที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.0-9.0 สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่จะไม่ย่อยแล็กโทส หรือซูโคส มีการแยกชนิดโดยการใช้วิธีทางซีโรโลยี (serology) เพราะเชื้อมีคุณสมบัติเป็น แอนติเจน (antigen)

เชื้อซัลโมเนลลาเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า โรคซัลโมเนลโลซีส(Salmonellosis) เนื่องจากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป ผ่านทางเดินอาหาร โดยความรุนแรงของอาการจะแตกต่างกันไปตามปริมาณของเชื้อ สายพันธุ์ และความต้านทานของผู้บริโภค ระยะฟักตัวของโรคนี้ประมาณ 12-36 ชั่วโมง อาการที่สำคัญ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสีย แต่ถ้าผู้ป่วยได้รับเชื้อสายพันธุ์ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ และไข้รากสาดน้อย จัดเป็นเชื้อซัลโมเนลลาที่มีความรุนแรงมากที่สุด มีอัตราการตายสูงสุดในบรรดาเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหลายในผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อซัลโมเนลลาแพร่กระจายในอาหารหลายชนิดที่มี เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนประกอบในอาหาร สัตว์ปีกก็เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอีกหนึ่งแหล่งหนึ่ง ซึ่งในประเทศไทยเอง ก็เคยพบว่าเชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อนอยู่ในเนื้อไก่ที่เป็นสินค้าส่งออกของประเทศด้วย (Bangtrakulnonthและคณะ, 1993)

สำหรับรายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม อดิศร (2533) ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในแหนม 56 ตัวอย่าง พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสิ้น 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมากได้แก่ *S.* Derby และ *S.* Anatum พบถึง 20.50 และ14.72 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่ตรวจตามลำดับ และพบว่า *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด ต่อมา อดิศร และอรุณ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพฯ จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์)

Abbar และ Tahir (1989) รายงานว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในประเทศอิรัก จากตัวอย่างไส้กรอกเนื้อ 80 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 35 เซโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่พบได้แก่ *S.* Anatum, *S.* Typhimurium และ *S.* Molade สำหรับในเนื้อสดที่บรรจุขาย 70 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนจาก *S.* Anatum 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่, Schmidt (1989) รายงานว่าในตัวอย่างไส้กรอก bratwurst (frying sausage) 872 ตัวอย่าง จากร้านขายเนื้อ 6 ร้าน และในซุปเปอร์มาร์เก็ต 4 แห่ง ในเมืองบาวาเรียน ประเทศเยอรมัน ถ้านำไส้กรอกชนิดนี้ไปเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าซัลโมเนลลาจะลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเก็บไส้กรอกที่ 10 องศาเซลเซียส เชื้อจะโตหลังจาก 24 ชั่วโมง ขณะเก็บที่ 15 องศาเซลเซียส เชื้อจะโตหลังจาก 12 ชั่วโมง เมื่อเราทอดไส้กรอกที่ 130 องศาเซลเซียส อุณหภูมิใจกลาง 75 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จะสามารถฆ่าเชื้อซัลโมเนลลาได้ Escartin และคณะ (1995) ได้ตรวจหาเซโรวาร์ของซัลโมเนลลาจากร้านขายเนื้อในเม็กซิโก โดยเก็บตัวอย่างเนื้อหมูดิบมา 61 ตัวอย่าง อุณหภูมิในการเก็บตัวอย่างอยู่ในช่วง 12-16 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนซัลโมเนลลาอยู่ในช่วง 0.03-9000 ซึ่งถ้าเฉลี่ยแล้วมีค่าประมาณ 13 MPN/ กรัม มีเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้อยกว่า 0.03 MPN/ กรัม ในขณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 28 54 และ 74 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยกว่า0.9 9 และ 23 MPN/ กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้10 เซโรวาร์ที่พบมากประกอบด้วย *S.* Agona, *S.* Derby, *S.* Anatum, *S.* Meleagridis, *S.* Enteritidis, *S.* Worthington, *S.* Give, *S.* Manhattan, *S.* Typhimurium และ *S.* Brandenburg ถ้านับจำนวนซัลโมเนลลาแบบ aerobic plate count (APC) มีค่าเฉลี่ย 6.1 $\log_{10}$ cfu/ กรัม ซึ่งมีการปนเปื้อนในระหว่างการฆ่า และการเก็บที่อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม

2.5 **ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร** (ลัดดาวัลย์, 2536)

ปัจจัยต่าง ๆ ภายในเนื้ออาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้แก่ พีเอช (pH) ปริมาณความชื้น (moisture content) ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียล และอุณหภูมิ เป็นต้น ปัจจัยแต่ละชนิดมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังนี้

2.5.1 พีเอช (pH)

พีเอชของอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญและอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปยีสต์และราจะทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรีย อาหารแต่ละชนิดจะมีพีเอชแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) แต่ส่วนใหญ่มักจะเป็นกลางจนถึงเป็นกรด อาหารที่มีพีเอชต่ำจึงมักเก็บได้นานกว่าอาหารที่มีพีเอชเป็นกลาง อาหารบางชนิดมีพีเอชต่ำตามธรรมชาติ เช่น ผลไม้ที่เปรี้ยว ในขณะที่อาหารบางชนิดมีพีเอชต่ำจากกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ส่วนแบคทีเรียมักชอบเจริญในอาหารที่มีพีเอชเป็นกลางแต่บางชนิดที่ผลิตกรดก็จะชอบขึ้นในอาหารที่มีพีเอชเป็นกรด บางชนิดเช่น โปรทีโอไลติกแบคทีเรีย (proteolytic bacteria) เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชเป็นด่าง ดังที่พบในไข่ขาวที่เก็บไว้นาน

อาหารบางชนิดมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับค่าพีเอชได้มากกว่าอาหารอื่น เนื่องจากมี buffer capacity (บัฟเฟอร์เป็นสารที่ทำให้ระดับพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยหรือแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงแม้จะมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลง) ในเนื้อสัตว์มี buffering capacity มากกว่าผัก เนื่องจากเนื้อสัตว์มีโปรตีนสูงกว่าผัก โปรตีนจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ดี ทำให้การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเกิดขึ้นเล็กน้อย แม้ว่าในอาหารนั้นจะมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นก็ตาม ผักมีโปรตีนต่ำจึงขาด buffering capacity ทำให้อาหารประเภทผักที่มีจุลินทรีย์เติบโตและใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผัก แล้วมีการสร้างกรดออกมาเล็กน้อย พบว่าผักจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชได้ง่าย ธรรมชาติของกรดที่อยู่ในอาหารจะช่วยทำให้เนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ปลอดภัยต่อการถูกจุลินทรีย์ทำลาย ผลไม้ที่มีค่าพีเอชต่ำจึงมักเน่าเสียยากกว่าปกติ โครงสร้างของผลไม้ก็เป็นสิ่งที่สามารถป้องกันอันตรายแก่ผลไม้จากการทำลายด้วยจุลินทรีย์ ในขณะที่ค่าพีเอชของสัตว์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่นั้นมีความเหมาะสมต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียจำนวนมาก โดยมีปัจจัยอื่นๆ ภายในเนื้ออาหารที่มีบทบาททำให้เชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิต และเติบโตได้ในสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับพีเอชมีผลต่อจุลินทรีย์ 2 ประการ ได้แก่

- ผลต่อการทำงานของเอนไซม์

- ผลต่อการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์เยื่อบุเซลล์ (cell membrane) ของจุลินทรีย์ ซึ่งเยื่อบุเซลล์ค่อนข้างจะไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่านมากนัก ความเข้มข้นของสารเหล่านี้ในไซโทพลาซึมจึงยังคงที่ ถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมรอบเซลล์ จะมี H^+ และ OH^- ปริมาณมากก็ตาม

นอกจากค่าพีเอชจะมีผลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ยังมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บ การฆ่าเชื้อ การทำแห้ง ฯลฯ และถึงแม้ว่าค่าพีเอชในตอนเริ่มต้นจะเหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์และมีการหมักเกิดขึ้นหรือมีการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันชนิดอื่น ก็อาจจะทำให้ค่าพีเอชเปลี่ยนไปในทางที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญอีกต่อไปก็ได้

ตารางที่ 2.1 ค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียสามารถเติบโตในอาหารได้

แบคทีเรีย	พีเอชต่ำสุดที่เชื้อเติบโต
Alicyclobacillus acidocaldarius	2.0
Bacillus cereus	4.9
Clostridium botulinum, Group I	4.6
Clostridium botulinum, Group II	5.0
Clostridium. perfringens	5.0
Escherichia coli O157:H7	4.5
Gluconobacter spp.	3.6
Lactobacillus brevis	4.3
Listeria monocytogenes	4.1
Plesiomonas shigelloides	4.5
Pseudomonas fragi	5.0
Salmonella spp.	4.1
Shewanella putrefaciens	5.4
Shigella flexneri	5.5
Shigella sonnei	5.0
Staphylococcus aureus	4.0
Vibrio parahaemolyticus	4.8
Yersenia enterocolitica	4.2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jay (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ปริมาณความชื้น (moisture content)

ความชื้นจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญได้หากอาหารนั้นไม่มีความชื้นอยู่เลย ปริมาณของความชื้นที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการจะแตกต่างกัน ความชื้นดังกล่าวนี้คือ น้ำที่เป็นอิสระ (water activity, A_w) ของอาหารซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยเท่าของค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่แสดงออกมาเป็นค่าร้อยละ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์รอบ ๆ อาหารต่ำกว่าในอาหารจะทำให้ ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ที่ผิวของอาหารลดลง หรืออีกนัยหนึ่งค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ที่ผิวหน้าของอาหารจะเพิ่มขึ้นหากความชื้นสัมพัทธ์รอบๆอาหารสูงกว่าในอาหาร ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของอาหารมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น อาหารแต่ละชนิดประกอบด้วยสารอาหารแตกต่างกันที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ต่างกัน (ตารางที่2.2) ซึ่งค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของอาหารสดส่วนใหญ่มีค่าสูงกว่า 0.99 จุลินทรีย์ทุกชนิดจะมีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ที่เหมาะสม หากค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ลดลงต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม อัตราการเจริญและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของจุลินทรีย์จะลดลง โดยทั่วไปแบคทีเรียต้องการค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ในการเติบโตสูงกว่าเชื้อรา แบคทีเรียแกรมลบต้องการค่าวอเตอร์แอคติวิตี้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทำให้อาหารเน่าเสียไม่สามารถเติบโตในที่ที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ต่ำกว่า 0.91 ในขณะที่เชื้อราที่ทำให้อาหารเสียไม่สามารถเติบโตในที่ที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ต่ำกว่า 0.80 แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staph. aureus* สามารถเติบโตได้ในที่ที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ 0.86 ในขณะที่เชื้อ *C. botulinum* ไม่เติบโตในที่ที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ต่ำกว่า 0.94

2.5.3 ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียล

มีผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหาร การเกิดออกซิเดชันและรีดักชัน ในขณะเดียวกันจะเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียลของอาหาร ขึ้นอยู่กับ 1) ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียลตามธรรมชาติหรือกำลังการรีดิวซ์และออกซิไดส์ (reducing and oxidizing power) ของอาหารนั้น 2) ความดันย่อยของออกซิเจนรอบ ๆ อาหาร (oxygen tension) 3) การมีออกซิเจนจากอากาศแทรกซึมเข้าไปในอาหาร และ 4) ความสามารถในการคงสภาพ (poising capacity) หรือความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของโพเทนเชียล อาจจำแนกจุลินทรีย์ตามความสามารถในการใช้ออกซิเจนอิสระได้เป็น 3 พวก คือ

1. แอโรบ (aerobes) เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนอิสระในการเจริญและเกิดกิจกรรมต่าง ๆ
2. แอนแอโรบ (anaerobes) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน
3. ฟาคัลเททีฟแอนแอโรบ (facultative anaerobes) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและที่ไม่มีออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 2.2 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water activity, A_w) ที่ต่ำสุดสำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร

Organism	Minimum ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้
Most spoilage bacteria	0.90-0.91
Acinetobacter	0.95-0.98
Aeromonas	0.95-0.98
Alcaligenes	0.95-0.98
Arthrobacter	0.95-0.98
Bacillus	0.90-0.99
B. cereus	0.92-0.95
Citrobacter	0.95-0.98
Clostridium botulinum	0.90-0.98
Type A	0.95
Type B	0.94
Type E	0.97
Corynebacterium	0.95-0.98
Enterobacter	0.95-0.98
Escherichia coli	0.94-0.97
Flavobacterium	0.95-0.98
Klebsiella	0.95-0.98
Lactobacillus	0.90-0.94
Leuconostoc	0.96-0.98
Micrococcus	0.90-0.95
M. roscus	0.90-0.93
Pseudomonas aeruginosa	0.96-0.98
P. fluorescens	0.95-0.97
Salmonella	0.93-0.96
Staphylococcus albus	0.88-0.92
Staph. aureus	0.84-0.92

ที่มา: ดัดแปลงจาก Banwart (1983)

73025
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชและเนื้อสัตว์สด ส่วนใหญ่จะมีค่าออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียลต่ำ และไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีตัวรีดิวซ์อยู่ เช่น มีกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และน้ำตาลที่อยู่ในพืช ส่วนเนื้อสดจะมีหมู่ซัลฟีไฮดริล (sulfhydryl group) และตัวรีดิวซ์อื่น ๆ อยู่ ตราบใดที่เซลล์ของพืชหรือสัตว์ยังไม่ตาย จะคงสภาพของออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียลให้ต่ำอยู่ตลอดเวลาแม้ว่าจะมีออกซิเจนจากภายนอกแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ก็ตาม เหตุนี้พืชสดและเนื้อสัตว์จะมีออกซิเจนเฉพาะที่ผิว ๆ เท่านั้น พวกแบคทีเรียมีสารเมือกหรือพวกที่ทำให้เกิดกรดจะเจริญบนเนื้อสัตว์เฉพาะที่ผิวหรือใกล้ ๆ ผิวเท่านั้น ในขณะที่โปรทีโอไลติกแบคทีเรียจะเจริญอยู่ภายในชิ้นเนื้อนั้นที่ไม่มีออกซิเจน สภาวะเช่นนี้จะมีผลเกี่ยวข้องกับวิธีการในการผลิตอาหาร การให้ความร้อนจะลดความสามารถในการคงค่าโพเทนเชียลของอาหารได้ โดยไปทำลายหรือเปลี่ยนแปลงตัวรีดิวซ์และตัวออกซิไดส์ เป็นผลทำให้ออกซิเจนแพร่เข้าไปข้างในได้อย่างรวดเร็ว กระบวนการผลิตอาหารก็อาจเปลี่ยนแปลงตัวออกซิไดส์หรือตัวรีดิวซ์เช่นเดียวกัน

2.5.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการและทนต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3) อุณหภูมิที่เก็บอาหารจะเป็นตัวกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญและควบคุมอัตราการเจริญจำนวนจุลินทรีย์ที่จะรอดชีวิตอยู่และการเกิดกิจกรรมต่างๆ พบว่าอุณหภูมิต่ำที่สุดในการเติบโตของจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิต่ำกว่า -34 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่จุลินทรีย์สามารถเติบโตได้ คือ อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส แบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามระดับอุณหภูมิที่เชื้อสามารถเติบโตได้ ดังนี้

1. ไซโครฟายล์ (psychrophile) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ชอบเติบโตในที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส และยังสามารถเติบโตได้บ้างในที่มีอุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส

2. มีโซฟายล์ (mesophiles) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ชอบเติบโตในที่มีอุณหภูมิระหว่าง 20 – 45 องศาเซลเซียส แต่มีเชื้อบางชนิดสามารถเติบโตได้ในที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส

3. เทอร์โมฟายล์ (thermophile) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ชอบเติบโตในที่มีอุณหภูมิสูง โดยสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 อุณหภูมิต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดเติบโตได้

จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	ต่ำสุด (minimum) ที่เชื้อเติบโต	เหมาะสม (optimum) ที่เชื้อเติบโต	สูงสุด (maximum) ที่เชื้อเติบโต
Bacillus cereus	10	-	47-50
Clostridium botulinum	3-10	30-40	42-45
Clostridium perfringens	15-20	30-40	45-51
Escherichia coli	3-10	37-41	48-50
Lactobacillus	5	30-40	53
Leuconostoc	10	20-30	40
Micrococcus	10	25-30	45
Proteus	10	37	43-45
Pseudomonas	-7-4	20-30	31-43
Salmonella	5-10	35-37	46-49
Staphylococcus aureus	5-10	35-39	44-48
Vibrio	-	10-37	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก Banwart (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิต

3.1.1 เนื้อหมูส่วนสะโพก (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.2 หนังหมู (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.3 ข้าวสุก (ข้าวหอมมะลิ ตราหงษ์ทอง)

3.1.4 กระเทียม (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.5 เกลือ (ตราชฎา)

3.1.6 น้ำตาล (ตรามิตรผล)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหนมและได้รับการยืนยันว่าผลิต pediocin PA-1 (Swetwiwathana, 2005) บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว MRS broth (Merck) เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และใช้ MRS agar + 1.0 % $CaCO_3$ เป็นอาหารแข็งสำหรับเก็บเชื้อแบบ deep tube

3.3.2 *S.* Anatum ได้รับความอนุเคราะห์จาก FAO/WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง TSAYE [Trypticase soy agar (Merck) + 0.6 % yeast extract (Merck)] นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE [Trypticase soy broth (Merck) + 0.6 % yeast extract] เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

3.3.3 *Listeria innocua* LTH 3096 จาก Hohenheim University, Stuttgart, Germany สำหรับใช้ตรวจสอบการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติค *P. pentosaceus* TISTR 536 เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง TSAYE [Trypticase soy agar (Merck) + 0.6 % yeast extract (Merck)] นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE [Trypticase soy broth (Merck) + 0.6 % yeast extract] เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 MRS broth (Merck, USA)

3.3.2 MRS agar (Merck, USA)

3.3.3 Salmosyst broth base,SB (Merck, USA)

3.3.4 Salmosyst selective supplement tablet ,SBST (Merck, USA)

3.3.5 XLD agar (Scharlau, Spain)

3.3.6 Rambach agar (Merck, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 Triple Sugar Iron (TSI) agar slant (Merck, USA)

3.3.8 Lysine Indole Motility (LIM) medium (Difco, USA)

3.3.9 Trypticase soy agar (TSA) slant, plate (Merck, USA)

3.3.10 Agglutinating antiserum (polyvalent) A-67, A-I (S&A Reagent Lab, Thailand)

3.3.11 Antisera O group B, C, D, E (S&A Reagent Lab, Thailand)

3.3.12 KOVAC (Merck, USA)

3.3.13 Meat extract (Merck, USA)

3.3.14 Tryptone (Merck, USA)

3.3.15 Glucose (SP Scientific,Thailand)

3.3.1.6 Lactobacilli agar AOAC (LAA) (Difco, USA)

3.4 สารเคมี

3.4.1 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, USA)

3.4.2 โซเดียมไนไตรท์ (Merck, USA)

3.4.3 โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต(Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.4 โซเดียมแอสคอเบท (Fluka, Switzerland)

3.4.5 กลีเซอรอล (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.6 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading Ltd.; Part., Thailand)

3.4.7 ฟีนอฟทาลีน 1 (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, USA)

3.4.9 แอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 (องค์การสุรากรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.5.1 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow Clean Air Type 460 EC, Belgium)

3.5.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Memmert , Germany)

3.5.3 ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)

3.5.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy SS-325, Japan)

3.5.5 เครื่องวัดค่าพีเอช (inolab pH Level I, Germany)

3.5.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัดชั่ง 3100 กรัม (Sartorius; BP 3100S, Germany)

3.5.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดชั่ง 210 กรัม (A&D Company Ltd., Japan)

3.5.8 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer VM-300)

3.5.9 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH 30, Japan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.10 ไมโครเวฟ (LG intellowave, China)

3.5.11 เตาไฟฟ้า (Kando, Germany)

3.5.12 เครื่องปั่นผสมอาหาร (Turbora TRK 72, Thailand)

3.5.13 เครื่องผสมอาหาร (Kitchen Aid รุ่น K5SS, USA)

3.5.14 เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Sammic S.A.)

3.5.15 เครื่องบรรจุ

3.5.16 เครื่องบดเนื้อ (Seven Five OC 572, Thailand)

3.5.17 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

3.5.18 ถุงพลาสติกสุญญากาศ ขนาด 9x14 นิ้ว (บริษัท กิจถาวรพลาสติก จำกัด)

3.5.19 Cellulose casing (Type Cell FP, Cal 21, Shirred, Fa, Viscofarn, 31007 Pamplona, Spain)

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ตุลาคม 2547 – กันยายน 2548

3.8 วิธีการทดลอง

3.8.1 ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

3.8.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติค *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในMRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

3.8.1.2 การผลิตแหนม

ผลิตแหนมโดยแบ่งเป็น 2 สูตร คือ สูตรที่มีการเติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น และ ไม่เติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น ซึ่งในแต่ละสูตรนั้นจะทำการผลิตแหนมที่มีหนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2x3x20 มิลลิเมตร และหนังหมูบดที่ผ่านรูตะแกรงขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เตรียมส่วนผสมในแต่ละสูตรตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 3.1ในสูตรที่ไม่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นให้นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมในเครื่องผสม(Kitchen Aid) นวดจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 3 นาที) แต่ถ้าเป็นสูตรที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดก่อนประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไป นวดต่อจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 2 นาที) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบรรจุโดยใช้ไส้บรรจุแบบเซลลูโลส (Cellulose casing) ให้แต่ละแท่งมีความยาวประมาณ 6 นิ้ว จากนั้นรีดเอาอากาศออก มัดหัว-ท้ายให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แน่น นำไปบรรจุในถุงสุญญากาศ ปิดผนึกให้เป็นแบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่องบรรจุแบบสุญญากาศ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุกๆวัน เป็นเวลา 3วัน

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมในการผลิตแหนม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมู	650
หนังหมู	350
ข้าวสุก	60
กระเทียม	50
เกลือ	25
น้ำตาล	5
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต	3
โซเดียมแอสคอร์เบท	0.5
โซเดียมไนไตรท์	0.100

ที่มา: Swetwiwathana และคณะ (1999)

3.8.1.3 วิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของตัวอย่างแหนม

1) วิเคราะห์หาปริมาณกรด แลคติค (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

2) การวัดค่าพีเอช (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

3) การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

4) การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง NAVASINA EEJA-3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

การทดลองในข้อ 1-4 วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยการวางแผนการทดลอง แบบสุ่มภายในบล็อกสมบูรณ์ (Random Complete Block Design : RCBD)นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan New' s Multiple Range Test (DMRT)

5) วิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของตัวอย่างแหนม

ตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาที่มีอยู่ในตัวอย่างแหนม โดยใช้วิธี Salmosyst (Weber, 1988; Ossmer, 1992; อดิศร และอรุณ, 2539) โดยนำตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ลงใน salmosyst broth base (SB) 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อจาก SB 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม salmosyst selective supplement tablet (SBST) 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เม็ด เขย่าให้เม็ด SBST ละลายใน SB จนหมด บ่มหลอดที่มี SBST + SB ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม. แล้วนำไปเขี่ยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็งโดยใช้ XLD agar และ RAM agar บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม. นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลามาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางเซโรโลยี จากนั้นนำตัวอย่างส่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข เพื่อตรวจหาเซโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลา

3.8.2 การผลิตแบคเทอริโอซินของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเทียบกับตัวอย่างควบคุม

สุ่มตัวอย่างแหนมทุก ๆ 12 ชั่วโมงในแต่ละวันของแต่ละการทดลองที่หมักในช่วง 0 – 3 วัน มาตัวอย่างละ 2 หน่วย ทำการผสมตัวอย่างแต่ละการทดลองให้เข้ากัน จากนั้นสุ่มชั่งตัวอย่างมาตัวอย่างละ 10 กรัม ลงในถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher นาน 1 นาที แยกเอาส่วนน้ำของแหนมในแต่ละการทดลองมาใส่หลอดทดลองสำหรับเหวี่ยงปั่น (Centrifuge) จากนั้นทำการเหวี่ยงปั่นที่ 2,700 x g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่แยกได้จากแหนมของแต่ละการทดลองไปทำการปรับค่าพีเอชให้ได้พีเอช 6.0 – 6.1 ด้วย 5 N NaOH จากนั้นนำส่วนใสของแหนมแต่ละการทดลองไปกรองผ่าน 0.20 µm pore-size polysulfone membrane filter เพื่อให้ส่วนใสของแหนมในแต่ละการทดลองที่ได้เป็นส่วนใสที่ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตได้ในแต่ละวันของการหมัก โดยดูการยับยั้งของส่วนใสปลอดเชื้อที่ทำการปรับพีเอชต่อเชื้อ *Listeria innocua* LTH 3096 เทียบกับตัวอย่าควบคุมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อโดยใช้วิธี spot-on lawn (Mayr-Harting และคณะ, 1972) ค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่วัดได้เทียบเป็นหน่วย Arbitary Unit ต่อกรัมของตัวอย่างแหนม (AU/กรัม)

3.8.3 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของแหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ทำการผลิตและหมักแหนม 4 ตัวอย่าง ดังนี้ คือ 1. แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (M) 2. แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ เซล/ กรัม (MS) 3. แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (S) และ 4. แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ เซล/ กรัม (SS) ทำการหมักแหนมที่ผลิตทั้งสี่ตัวอย่างจนครบ 3 วัน จากนั้นนำไปทดสอบประเมินผลความชอบแหนมในด้านต่าง ๆ โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ดำเนินการทดสอบโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) การทดสอบจะให้ผู้ชิมประเมินผลในด้าน สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ซึ่งแบ่งเป็น 9 ระดับ คือ 9 = ชอบมากที่สุด และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (9-point hedonic scale) นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยโดย Duncan New 's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1. ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

4.1.1 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนม

กระบวนการหมักแหนมโดยธรรมชาตินั้นมักเกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ซึ่งมักจะมีทั้งที่สร้างกรดได้ และทำให้อาหารเน่าเสีย จุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้ดี และพบในระยะแรกของการหมัก มักเป็นพวก homofermentative coccoi เช่น *P. cerevisiae* , *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งเชื้อประเภทนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างเป็นกรดแลคติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ทำให้ค่าพีเอชของแหนมลดลง (บุษกร , 2545) และจากการทดลองผลิตแหนมโดยแบ่งลักษณะของหนังหมูที่ใช้เป็น 2 ลักษณะ คือ หนังหมูแบบบดผ่านรูตะแกรงขนาด 5 มิลลิเมตร และหนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2x3x20 มิลลิเมตร ทำการหมักโดยใช้แบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* T1STR 536 เป็นกล้าเชื้อในการหมักโดยเติมลงไปประมาณ 10^6 เซล / กรัม ในส่วนผสมก่อนทำการหมักเปรียบเทียบกับการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่าค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของแหนมแต่ละสูตรมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 4.1) กล่าวคือ ในวันที่ 0 ของการหมัก ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากกระบวนการหมักยังไม่เกิดขึ้น แต่หลังจากที่หมักแหนมได้ 1 – 3 วัน พบว่าการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อจะทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น และค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยเฉพาะในวันที่ 1 ของการหมัก จะพบการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.1) และการลดลงของพีเอชอย่างรวดเร็ว ในวันต่อมาจะสังเกตได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และค่าพีเอชไม่มากนัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า แหนมที่มีการหมักโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงไป ทำให้จำนวนของแบคทีเรียแลคติกมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น สามารถเปลี่ยนแหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกได้ในจำนวนมากกว่า จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วและต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่เมื่อการหมักใช้ระยะเวลานานขึ้น กรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นและทำให้ค่าพีเอชลดลง ทำให้การเจริญของแบคทีเรียแลคติกช้าลงด้วย จึงทำให้ในระยะการหมักช่วงหลังมีการเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรด และค่าพีเอชน้อยกว่าในช่วงระยะเวลาในตอนแรก เมื่อพิจารณาผลของลักษณะหนังหมูที่ใช้ คือ หนังหมูบด และ หนังหมูหั่นเส้น ร่วมกับการหมักแหนมที่เติม และไม่เติมกล้าเชื้อ (รูปที่ 4.1) พบว่าทั้งการหมักแบบที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อให้ผลของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และค่าพีเอชในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ ในการผลิตแหนมที่ใช้หนังหมูบด มีแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงกว่าและค่าพีเอชที่ต่ำกว่าแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูหั่นเส้น แต่ในทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า การใช้หนังหมูบดนั้นจะทำให้แหนมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ลดช่องว่างระหว่างเนื้อหมู และหนังหมูได้มากกว่าการใช้หนังหมูเส้น จึงทำให้กระบวนการหมัก เกิดขึ้นได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนม

หมักเวลา (วัน)	ปริมาณกรดแลคติก (เปอร์เซ็นต์)			
	M	S	MS	SS
0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
1	0.6 ± 0.1^{b}	0.6± 0.0^{b}	0.8 ± 0.1^{a}	0.7 ± 0.1^{ab}
2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1
3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1

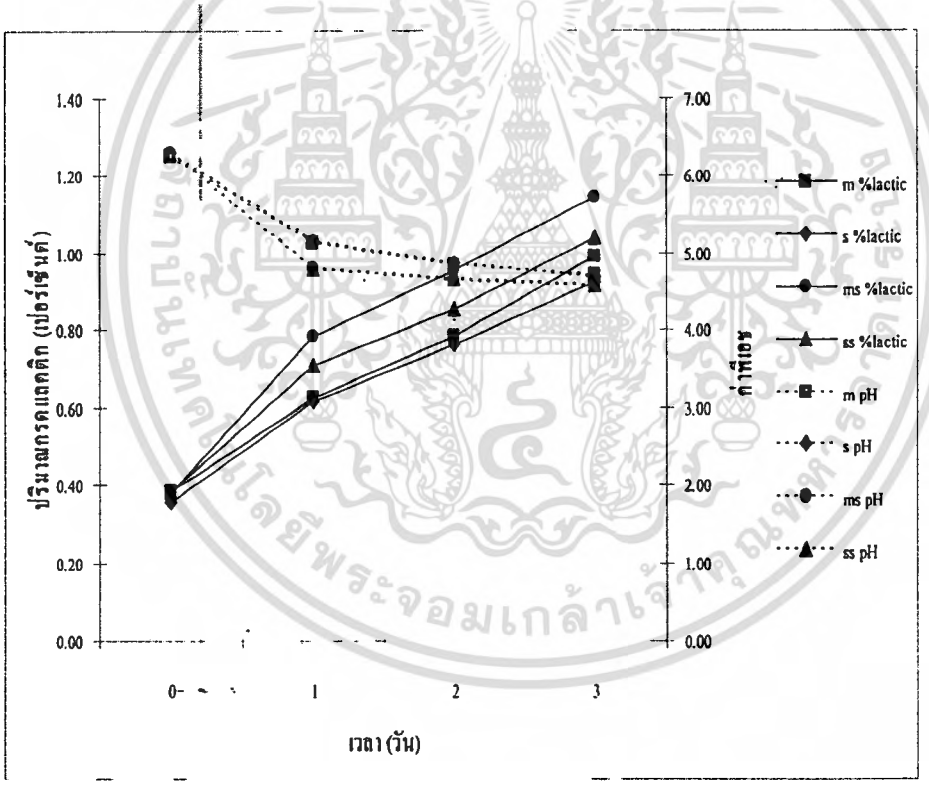
หมายเหตุ a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 2x10^{6} เซล/ กรัม

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 2x10^{6} เซล/ กรัม



รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม

หมายเหตุ M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 2x10^{6} เซล/ กรัม

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 2x10^{6} เซล/ กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้น ของผลิตภัณฑ์แหนม

ผลของการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น (ตารางที่ 4.2) พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากไส้บรรรจุที่ใช้นั้นเป็นไส้บรรจุแบบพลาสติกซึ่งยอมให้อากาศและน้ำผ่านเข้าออกได้ เมื่อทำการบรรจุแหนมในไส้พลาสติกแล้ว จึงนำไปบรรจุในถุงพลาสติกสุญญากาศ แล้วทำการดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ เพื่อให้เกิดการหมักแบบไม่มีอากาศ เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นเนื้อหมูและส่วนผสมต่าง ๆ เกาะตัวกัน ทำให้มีน้ำที่เกิดจากกระบวนการหมักบางส่วนซึมผ่านไส้บรรจุออกมา เนื่องจากไส้บรรจุที่ใช้เป็นแบบพลาสติกที่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ ทำให้น้ำดังกล่าวออกมาอยู่ในถุงพลาสติกที่ยังคงอยู่ในสภาวะสุญญากาศ เกิดสมดุลของน้ำภายในถุงพลาสติก ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น จึงทำให้แหนมทุกสูตรมีค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้นที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.1.3 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แหนม

เนื่องจากเนื้อหมูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตแหนม พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาสูง (Phan-Urai, 1978; อดิศร และคณะ,2538) และเป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. Anatum* ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อที่พบมากในแหนม และทนความเป็นกรดสูง (อรนุช,2530; อดิศร, 2533) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการหาวิธีการที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ โดยนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* T1STR 536 ซึ่งเป็นเชื้อที่พบว่าสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ (Swetwiwathana และคณะ, 2004) มาใช้ในการผลิตแหนมโดยให้มีเชื้อเริ่มต้นก่อนการหมักในปริมาณ $2x10^6$ cfu/ กรัม เปรียบเทียบกับแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ จากการทดลอง (ตารางที่4.2) พบว่า ตัวอย่างที่ตรวจ จำนวน 6 ตัวอย่าง แหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) ตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก (0 วัน) จนถึงวันที่ 2 แต่ในวันสุดท้ายของการหมัก (3 วัน) ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง ตัวอย่าง (66.7 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในวันสุดท้ายของการหมักนั้นมีค่าพีเอชที่ต่ำมาก จึงทำให้เชื้อซัลโมเนลลามีจำนวนลดลงซึ่งใน 2 ตัวอย่างจะตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา แต่เมื่อดูผลของแหนมที่ผลิตโดยมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า ช่วงแรกของการหมักตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) แต่จำนวนตัวอย่างการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาลดลงมากกว่าแหนมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ กล่าวคือ ในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ตรวจพบเชื้อ 4 ตัวอย่าง (66.7 เปอร์เซ็นต์) และ 2 ตัวอย่าง (33.3 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปนั้น มีผลทำให้กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้น มีกรดแลคติกถูกสร้างมากขึ้น มีผลทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เติมลงไปยังสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ จึงมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้ การตรวจพบในวันสุดท้ายจึงลดลงมากกว่าแหนมที่ผลิตโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับ อดิศร (2533) ที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* spp. รหัส P_{55} และกล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส P_{55} และ *Lactobacillus* spp. รหัส L_1 ในการหมัก ที่มีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาระหว่างการหมักแหนม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	การตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา			
		แหนมที่ไม่ใส่กล้าเชื้อ		แหนมที่ใส่กล้าเชื้อ	
		จำนวน	เปอร์เซ็นต์	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
0	6	6	100	6	100
1	6	6	100	6	100
2	6	6	100	4	66.7
3	6	4	66.7	2	33.3

หมายเหตุ * หมายถึง เปอร์เซ็นต์ของการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนม

เชื้อซัลโมเนลลาจะถูกยับยั้งโดยสารต่าง ๆ ที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นได้มากหรือน้อยเพียงใดนั้น ทั้งนี้มักขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณที่เชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อนอยู่ด้วย (อรนุช , 2530) จากการทดลองครั้งนี้ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมด 11 เซโรวาร์ (ตารางที่ 4.3) โดยเซโรวาร์พบมากที่สุด 4 อันดับ คือ *S.* Panama (24.7 เปอร์เซ็นต์) *S.* Rissen (21.7 เปอร์เซ็นต์) *S.* Anatum (21.7 เปอร์เซ็นต์) และ *S.* Stanley (18.65 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนซัลโมเนลลา เซโรวาร์อื่นนั้นพบเพียง 1 – 3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เมื่อดูช่วงเวลาการหมักที่ตรวจพบว่า เชื้อซัลโมเนลลานั้นตรวจพบได้ทุกวันของการหมัก โดยเฉพาะเชื้อที่พบ 4 อันดับแรก ซึ่งหมายความว่าเชื้อทั้ง 4 นั้น (*S.* Panama, *S.* Rissen *S.* Anatum และ *S.* Stanley) สามารถทนต่อสารที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นและค่าพีเอชที่ลดลงของผลิตภัณฑ์แหนมได้ดี จึงตรวจพบเชื้อเหล่านี้ได้ ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อเซโรวาร์อื่นๆ นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบว่า *S.* Anatum ยังคงเป็นสายพันธุ์ที่มีโอกาสปนเปื้อนมากในผลิตภัณฑ์แหนม โดยสามารถตรวจพบได้หลังจากหมักแหนมครบ 3 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อดิศร (2533) ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีรายงานการตรวจพบมากในเนื้อหมูดิบที่จำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด (อดิศร และคณะ, 2548) และเป็นสายพันธุ์ที่พบว่าถูกยับยั้งโดยสารต่างๆที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนม (อรนุช, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.3 เชื้อซัลโมเนลลาเซโรวาร์ต่างๆที่ตรวจพบจากตัวอย่างแหนมในช่วงการหมัก 0-3 วัน

เซโรวาร์	จำนวนตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์	ช่วงที่พบ (วัน)
S. Rissen	21	21.7	0-2
S. Anatum	21	21.7	0-3
S. Panama	24	24.7	0-3
S. Stanley	18	18.6	0-3
S. Kedougou	2	2.1	0-1
S. Orion	3	3.1	0-3
S. Lexington	1	1.0	0-2
S. Saintpaul	1	1.0	0-2
S. Weltevreden	2	2.1	0-2
S. Krefeld	3	3.1	0-2
S. Senftenberg	1	1.0	0-3
รวม	97	100	

4.2 การผลิตแบคเทอริโอซินของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในระหว่างการหมักแหนม

จากการตรวจสอบการผลิตแบคเทอริโอซินของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในระหว่างการหมักแหนมเทียบกับตัวอย่างแหนมควบคุมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อในการหมักทั้งหนังหมูบดและหนังหมูเส้น (ตารางที่ 4.4) พบว่า กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ในระหว่างการหมักแหนม โดยเชื้อดังกล่าวผลิตสารยับยั้งที่มีผลต่อ *L. innocua* LTH 3096 ได้ 100 AU/กรัม ในหนังหมูเส้น และ 200 AU/กรัม ในหนังหมูบด เมื่อหมักแหนมไปได้ 12 ชั่วโมง และผลิตสารยับยั้งแบคเทอริโอซินได้สูงถึง 3,200 AU/ กรัม ในแหนมทั้งสองลักษณะที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ เมื่อหมักแหนมไปได้ 48 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตได้ในระหว่างการหมักแหนมหนังหมูบดและหนังหมูเส้นนี้จะมีค่าสูงสุดที่ 3,200 AU/ กรัม ไปจนครบ 3 วันของการหมักแหนม ในขณะที่แหนมควบคุมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อนั้น ตรวจไม่พบการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* LTH 3096 ในส่วนใสปลอดเชื้อที่สกัดจากตัวอย่างแหนมทั้งหนังหมูสดและหนังหมูเส้นในทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบตลอดการหมักทั้งสามวัน ซึ่งแสดงว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระหว่างการหมักแหนมและแบคเทอริโอซินที่ผลิตนี้เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความคงทนอยู่ในสภาพการหมักนี้ได้นาน ไม่สลายหรือถูกทำลายประสิทธิภาพจากกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) ที่มักพบมากในเนื้อสัตว์ ซึ่งมีรายงานว่าสารนี้จะสามารถสลายและทำลายประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในกลุ่มไนซินได้ดี (Rose และคณะ, 1999; Wierzbickaและคณะ, 1989) ดังนั้น เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินนี้ จึงเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม เพื่อให้เกิดทั้งคุณภาพและความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.4 แบคเทอริโอซินที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักแหนม

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/กรัม) ที่พบในระหว่างการหมักแหนม			
	แหนมควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ		แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536	
	หนังหมูบด	หนังหมูเส้น	หนังหมูบด	หนังหมูเส้น
0	0	0	0	0
12	0	0	200	100
24	0	0	800	400
36	0	0	1,600	1,600
48	0	0	3,200	3,200
60	0	0	3,200	3,200
72	0	0	3,200	3,200

4.3 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของแหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ผลการทดลองหมักแหนมโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง และทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนมากับเนื้อหมู โดยเปรียบเทียบกับการหมักแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ซึ่งพบว่า การหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น จะสามารถลดเชื้อซัลโมเนลลาได้มากกว่าการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ รวมถึงการยืนยันผลการลดลงของ *S.* Anatum ที่พบมากในผลิตภัณฑ์แหนม และเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าทนต่อสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด เมื่อใช้แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อในรูปแบบจำลองการหมักแหนม (Nham Model broth, NMB) จึงพอสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะนำ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยจากเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลา ด้วยเหตุนี้จึงทำการทดลองผลิตแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยใช้สูตรหนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูบด และหนังหมูเส้น ผ่านการหมักครบ 3 วัน มาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 ท่าน ให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (ตารางที่ 4.5) พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับแหนมหนังหมูบดที่หมักโดยมีการเติมกล้าเชื้อมากที่สุดในด้านเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมมากที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่นทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า แหนมหนังหมูบดมีลักษณะของเนื้อสัมผัสที่เป็นเนื้อเดียวกัน มากกว่าหนังหมูเส้น และเมื่อมีการเติมกล้าเชื้อลงไปทำให้การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักเกิดขึ้นได้ดีกว่า ลักษณะเนื้อสัมผัสจึงแน่นกว่าสูตรอื่น ๆ สำหรับความเปรี้ยวและกลิ่นรสพบว่าแหนมทุกสูตรที่ทำการทดลองไม่มีความแตกต่างกันกันทางสถิติ ($p > 0.05$) และสำหรับสีของผลิตภัณฑ์ในการทดลองพบว่าสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อได้รับคะแนนความชอบน้อยกว่าในสูตรที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ซึ่งสีของผลิตภัณฑ์แหนมเกิดจากสารไนไตรท์แตกตัวให้สารไนตริกออกไซด์ โดยมีแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวช่วย สารนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน เกิดเป็นสารไนโตรโซไมโอโกลบิน ซึ่งเป็นสารที่ให้สีชมพู นอกจากนี้ยังพบว่า แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อได้รับคะแนนความชอบมากกว่าการใช้หนังหมูเส้น ที่เป็นแหนมแบบดั้งเดิม

ตารางที่4.5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม

ตำรับ	คะแนนเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน					
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่นรส	ความเปรี้ยว	เนื้อสัมผัส	การยอมรับโดยรวม
M	6.9 ± 1.1^{a}	6.6 ± 1.3^{a}	6.0 ± 1.6	5.3 ± 1.4	5.7 ± 1.8^{b}	6.2 ± 1.0^{a}
S	6.4 ± 1.4^{ab}	6.8 ± 1.3^{a}	5.3 ± 1.8	5.3 ± 1.8	4.5 ± 1.8^{c}	5.4 ± 1.5^{b}
MS	6.5 ± 1.3^{a}	6.2 ± 1.7^{ab}	5.6 ± 2.1	6.1 ± 2.0	6.6 ± 1.4^{a}	6.4 ± 1.8^{a}
SS	5.6 ± 1.7^{b}	5.8 ± 1.7^{b}	5.6 ± 1.4	6.1 ± 1.7	5.3 ± 2.0^{cb}	5.9 ± 1.7^{ab}

หมายเหตุ a,b,c,d หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($p>0.05$)

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^{6}$ เซล/ กรัม

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^{6}$ เซล/ กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่มีต่อการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา ในระหว่างการหมักแหนมสูตรหนังหมูบด และหนังหมูเส้น เทียบกับแหนมทั้งสองสูตรที่เติมกล้าเชื้อ พบว่า ในผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูง และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชให้ต่ำลงอย่างรวดเร็วกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อในทุกสูตร เมื่อดูประสิทธิภาพในการลดจำนวนของเชื้อซัลโมเนลลา พบว่าเมื่อหมักครบ 3 วัน แหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ยังคงตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาถึง 66.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง 33.3 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เชื้อซัลโมเนลลา 4 อันดับแรกที่พบมาก คือ *S.* Panama (24.7 เปอร์เซ็นต์) *S.* Rissen (21.7 เปอร์เซ็นต์) *S.* Anatum (21.7 เปอร์เซ็นต์) และ *S.* Stanley (18.6 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในระหว่างการหมักแหนมหนังหมูบดและแหนมหนังหมูเส้น เทียบกับแหนมควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า แหนมทั้งสองลักษณะที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อจะมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้ในระหว่างการหมักแหนม โดยแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้สูงสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 3,200 AU/ กรัม เมื่อหมักได้ 48 ชั่วโมง และความเข้มข้นของแบค-เทอริโอซินที่กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ผลิตนี้จะคงอยู่ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจนครบ 3 วัน ของการหมักแหนม

เมื่อนำผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมู 2 ลักษณะคือ หนังหมูบดและหนังหมูเส้นหมักทั้งที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ เมื่อนำไปทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค พบว่า ผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดที่หมักโดยการเติมกล้าเชื้อมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือ แหนมหนังหมูบดที่หมักโดยธรรมชาติ จึงกล่าวได้ว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหนมสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 นี้ สามารถนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเพื่อให้ได้แหนมที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้ที่นิยมบริโภคแหนม อีกทั้งแบคเทอริโอซินที่สายพันธุ์นี้ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักแหนมนั้นมีความคงทน ไม่สลายในระหว่างการหมัก ซึ่งมีผลช่วยในการลดปริมาณเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่ปนเปื้อนมาในระหว่างการผลิตแหนม ทำให้แหนมที่หมักด้วยกล้าเชื้อนี้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา ภราไดย. 2548. กระเทียม. อนุกรมวิธานพืช ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. อักษร ก : 100-101.

นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ.สงขลา. 425 หน้า.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. แหนม มผช. 145/2546. 7 หน้า.

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลชีววิทยาทางอาหาร. มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

ศิพัตน์ รักษ์เผ่า. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2518. การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยา. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 470 หน้า.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 326 หน้า.

โสภา ลีชอล์ค. 2541. ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมเริ่มต้น โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และโซเดียมไนไตรต์ต่อการลดลงของ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำสกัดกระเทียมต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแหนม(ในหลอดทดลอง). อาหาร. 29(2) : 107-115

อดิศร เสวตวิวัฒน์ ปรีชา จึงสมานุกูล และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2538. ซาลโมเนลลาในอาหารพร้อมบริโภค. วารสารเทคนิคการแพทย์. 23(2): 153-160.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ วราวุฒิ ครูส่ง ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2548. เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1) : 1-13.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34 ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272-279.

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา และการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้ในการหมักแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abbar, F.M., and M.M. Tahir. 1989. Beef casings aad finished beef sausages a souce of *Salmonella* in Iraq. J. Food Protection. 52(4) : 254-255

Ankri, S., and D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection. 1 (2) : 12-129.

Association of Officail Analytical Chemist. 1984. Official methods of Analysis 14 th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA. 1,140p.

Bangtrakulnonth, A., P. Tongra-ard, and M. Kusum. 1993. Contamination of *Salmonella* in exported frozen chicken. Food. (Thai) 23: 255-263.

Banwart, G.J. 1983. Basic food microbiology. AVI Publishing Com., Inc. Westport, Connecticut.

Banwart, G.J. 1989. Basic food microbiology. 2nd. ed. Chapman & Hall. USA.

Doyle, M. P., L. R. Beuchat, and T. J. Montville. 1997. Food microbiology : Fundamentals and frontiers. Washington D. C. : American Society for Microbiology.

Escartin, EF., JS. Lozano, O. Rodriguez, NM. Gonzales, and JA. Torres. 1995. Incidence and level of *Salmonella* serovars in raw pork obtained from Maxican butcher shops. Food Microbiology. 12: 435-439.

Hugas, M., M. Garriga, M.T. Aymerich, and J.M. Monfort. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. J. Appl. Bacteriology. 79(3): 322-330.

Jay, J.M. 2000. Modern Food Microbiology. 6th. ed. Chapman & Hall. London.

Mataragas, M., E.H. Drosinos, and J. Metaxopoulos. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum of modified atmosphere at 4 ± 2 °C. Food Microbiology. 20(2): 259-265.

Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., and Berkeley, R. C. W. 1972. Methods for studying bacteriocins. Method in Microbiol. 7A : 315 - 422.

Nassu, R. T., L.A.G. Goncalves, and F.J. Beserra. 2002. Use of different starter culture in processing of goat meat fermented sausages. Ciencia-Rural. 32(6): 1051-1055.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto, and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactobacillus lactic* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage. Int. J. Food Microbiology. 81(2): 137-145.

Ossmer, R. 1992. Salmosyst and RAMBACH Agar. A rapid alternative for the detection of Salmonella. Congress-Poster-Salmonella and Salmonellosis-Ploufragan/Saint-Brieux-France.

Petchsing, U. and M.J. Woodburn. 1990. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli in nham* (Thai- style fermented pork sausage). Int. J. Food Microbiology. 10(3-4): 183-192.

Phan-Urai, R. 1978. Occurrence of Salmonella in common food stuffs in Bangkok. Gastrointestinal Infect. SEA 3: 59-63.

Rose, N.L., Sporns, P., Stiles, M.E., and McMullen, L.M. 1999. Inactivation of Nisin by Glutathione in Fresh Meat. J. Food Sci. 64 : 759 - 762.

Sallam, Kh. I., M. Ishioroshi, and K. Samejima. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chichen sausage. Lebenamittel – Wissenshaft und – Technologie. 37(8) : 849-855.

Savic, S., O. Buncic, B. Uzelac, and J. Tripkovic. 2001. Microflora of " Sremska salami" produced with and without starter culture. Tehnologija-Mesa. 42(1-2): 71-74.

Scharner, E. 1990. The suppression of *Salmonella* by starter cultures in dry sausage. Fleischwirtschaft. 70 (10): 1183-1186.

Schmidt, U. 1989. *Salmonella* in fine bratwurst. Fleischwirtschaft. 69(8): 1251-1257.

Swetwiwathana, A., U. Leutz and A. Fischer. 1998. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. Fleischwirtschaft. 78: 294-298.

Swetwiwathana, A., and N. Lotong. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat). Proceeding of International Conference on ASEAN NETWORK on Microbial Reserch, November 29-December 1, 1999, Chiangmai, Thailand. P-III/16: 543-548.

Swetwiwathana, A., U. Leutz, N. Lotong, and A. Fischer. 1999. Controlling the growth of *Salmonella anatum* in nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic. Fleischwirtschaft. 79(9): 124-128.

Swetwiwathana, A., T. Zendo, N. Lotong, J. Nakayama, and K. Sonomoto. 2003. Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in nham (Traditional Thai fermented meat). 49th International Congress of Meat Science and Technology 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama, and K. Sonomoto. 2004. Effect of garlic and nitrite on Pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth of *Salmonella* Anatum in stimulated nham fermentation. Proceedings of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. August 25-26 2004. Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tantillo, M. G., A. Pinto., L. Novello, and A. di-Pinto. 2002. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sake* as starter culture in dry sausages. Microbiologica. 25(1): 45-49.

Vuyst, L.DE., and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial Potential of Lactiv Acid Bacteria . In: Bacterocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. Vuyst, L.DE., and E.J. Vandamme esd. 1st ed. Blackie Academic and Professional New York. N.Y. pp: 91-142.

Weber, A. 1988. Uber die Brauchbarkeit von Salmosyst zur Anreicherung von Salmonellen aus Kotproben von Tieren. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 101: 57-59.

Willis, E. D. 1956. Enzyme inhibition by alliin, the active principle of garlic. Biochemical Journal. 63 : 514-519.

Wierzbicka, G.T., Hagen, T.M., and Jones, D.P. 1989. Glutathione in Food. J. Food. Comp. Anal. 2 : 327 – 337.

Wiriyajaree, P., L.D. Brooks, M.D. Earle, and G. Page. 1990. The improvement of a traditional thai fermented pork sausage by use of mixed starter cultures. In Fermentation Technologies: Industrial Applications Conference, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Wood, B. J. B. 1992. The lactic acid acid bacteria. Elsvier applied science. London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ULTY OF ENGINEERING AND AGRO-INDUSTRY, MAEJO UNIVERSITY

ครั้งที่ 7

าสารุการประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร

ครั้งที่ 7

ก้าวไกลสู่ครัวโลก

วันที่ 22-24 มิถุนายน 2548

ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ ไบเทค บางนา กรุงเทพมหานคร

THE 7TH AGRO-INDUSTRIAL CONFERENCE

ADVANCING FOOD TECHNOLOGY : BRINGING THAILAND INTO THE WORLD'S KITCHEN JUNE 22-24, 2005 BITEC, BANGKOK

สนับสนุนโดย

P1-10 การศึกษาการสุกของกล้วยน้ำว้า (*Musa* spp.) ที่เหมาะสมในการทำกล้วยตาก

นุชฤดี ศิริบุญ และประภาพรรณ บรรลือศิลป์

P1-11 การศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากมะพูด

รุจิรา ตาปราบ และ พรพิมล เลิศพานิช

P1-12 การศึกษารสฝาดุเฝื่อนในมะไฟจีนโดยเทคนิคการวัดความเข้มในแต่ละช่วงเวลา

Pratheung Chokeprasert, Chintana Oupadisskoon, Tzou-Chi Huang and Sombat Khotavivattana

P1-13 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ซอสข้นจากสับปะรด

สุภกาญจน์ พรหมขันธ์, หทัยรัตน์ ริมคีรี, วิษฐิดา จันทราพรชัย และสุมนรัตน์ ชื่นพุฒิ

P1-14 ผลของสารจับโลหะร่วมกับการประยุกต์ใช้ความร้อนต่ำต่อคุณภาพของน้ำส้ม

อัญชลี ศรีวิไล

P1-15 ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำและตัวถูกละลายในกระบวนการออสโมซิสพลับพันธุ์ฝาดที่ใช้สารละลายผสมของน้ำตาลทรายและโซเดียม

คลอไรด์ วิชมณี, ยืนยง พุทธกาล, ไพศาล วุฒิจำนงค์ และKeshavan Niranjan

ภาคโปสเตอร์ (POSTER PRESENTATION)

หมวด P2 : ความปลอดภัยของอาหาร

P2-1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฟติคและทริปซินอินฮิบิเตอร์ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง

สุมนต์ทิพย์ คงตัน

P2-2 การยับยั้ง Escherichia coli ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมโดยเอนไซม์ทางอาหาร

เยาวภา ไหวพริบ, พิมลรัตน์ ศรีประพัฒน์ และอนันต์ ทองทา

P2-3 การยับยั้ง Escherichia coli ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมโดยการย่อยไคตินและไคโตซานด้วยกรด

เยาวภา ไหวพริบ, วิกานดา ปิ่นทองคำ และอนันต์ ทองทา

P2-4 คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของข้าวหมากที่วางจำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์, พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์, เปมิกา ขำวีระ และวิญญู จิตสัมพันธเวช

P2-5 การศึกษาความเหมาะสมในการใช้ Chromogenic Substrate เพื่อตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* ในอุตสาหกรรมอาหาร

ศุภอักษร รัตนไชยานนท์

P2-6 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของดอกไม้ที่รับประทานได้

วันวิสาข์ กระแสร์ดุปต์ และอารียา คงการชนะทิพ

P2-7 ผลของการใช้กระเทียม และกล้าเชื้อเริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่มีต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนมหนังหมูบดและหนังหมูเส้น

พรพิมล เทียนทอง, เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, วราวุฒิ ครูส่ง, อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และดิศร เสวดวิวัฒน์

ภาคโปสเตอร์ (POSTER PRESENTATION)

หมวด P3 : ผลิตภัณฑ์จากข้าวและแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการใช้กระเทียม และกล้าเชื้อเริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่มีต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนมหนังหมูบดและหนังหมูเส้น

(Effect of garlic and *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture on Salmonellae during Nham with shredded and minced pork skin fermentation)

พรพิมล เทียนทอง[1], เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์[1], วราวุฒิ ครุฑง่[1], อรุณ บ่างตระกูลนนท์[2] และ อดิศร เสวตวิวัฒน์[1]

1. โครงการคุณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2. WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อการเปลี่ยนแปลงในด้านความเป็นกรด ค่าพีเอช และการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูหั่นและหนังหมูบด เทียบกับแหนมที่หมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า ในตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น จะมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงและค่าพีเอชที่ต่ำกว่าตัวอย่างแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และพบว่าตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น มีจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา (33.33%) น้อยกว่าตัวอย่างแหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (66.67%) ที่ระยะเวลาการหมัก 3 วัน โดยเชื้อซัลโมเนลลาที่ตรวจพบจากแหนมที่ทำการทดลองทั้งหมดพบถึง 11 เซโรวาร์ เซโรวาร์ที่พบมาก 3 อันดับแรก คือ *S.* Panama (24.74เปอร์เซ็นต์), *S.* Rissen และ *S.* Anatum (21.65 เปอร์เซ็นต์), *S.* Stanley (18.56 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ จากการศึกษาผลของกระเทียมและกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 เพื่อยืนยันการลดจำนวนของเชื้อ *S.* Anatum ซึ่งมีรายงานการทนกรดมากที่สุดในผลิตภัณฑ์แหนม โดยการจำลองรูปแบบการหมักแหนมในหลอดทดลอง (Nham model broth, NMB) พบว่าใน NMB ที่มีการเติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/ml สามารถลดจำนวนของเชื้อ *S.* Anatum ในปริมาณเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ได้ดีที่สุด (ใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง) เมื่อเทียบกับ NMB ที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก หรือกระเทียมเพียงอย่างเดียว

Abstract

The effect of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture on the fermentation properties (pH, % lactic acid, and the growth of salmonellae) during 2 types of Nham fermentation (Nham produced using shredded cooked pork skin and Nham produced using minced cooked pork skin) compared to naturally fermented products (without using starter culture) has been investigated. It was found that all Nham samples with starter cultures exerted a higher percentage of lactic acid and led to more rapid in pH reduction than those samples without starter cultures. Moreover, Nham fermented with starter culture revealed the better inhibitory effect on the naturally contaminated salmonellae during Nham fermentation than those of naturally fermented samples (percentage of salmonellae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

positive samples after 3 days of Nham fermentation was 33.33 % and 66.66 % respectively). Serovariety typing of cultures isolated from both of Nham produced with and without *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter culture showed that they belonged to 11 serovar. The most common ones were *S.* Panama (24.74 %), *S.* Rissen and *S.* Anatum (21.65 %), and *S.* Stanley (18.56 %) respectively. In order to investigate whether the rapid reduction of salmonellae concerned to the use of starter culture or the synergistic inhibitory effect between starter culture and garlic on salmonellae during Nham fermentation, an inhibitory effect of *P. pentosaceus* TISTR 536 and 5 % of sterile fresh garlic on the most common contaminated and aciduric salmonellae in Nham product (*Salmonella* Anatum) has been studied in the sterile condition of Nham model broth (NMB). The results confirmed that NMB fermented with 5 % fresh garlic and 10^6 cfu/ml of *P. pentosaceus* TISTR 536 exhibited the best diminishment of 10^4 cfu/ml of *S.* Anatum when compared to NMB with 5 % fresh garlic or fermented with 10^6 cfu/ml of *P. pentosaceus* TISTR 536 alone.

บทนำ

แหนม อาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทย ซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมต่อการบริโภคของประชาชนชาวไทยทั่วทุกภาคของประเทศ และการบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมักจะบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อนหลังจากการหมักส่วนผสมของแหนมดิบได้ 2-3 วัน โดยมีระดับพีเอชและค่าปริมาณกรดที่คิดเป็นร้อยละของกรดแลกติกที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสูตรส่วนผสมของการผลิต รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักแหนมก่อนจำหน่ายสู่ผู้บริโภค เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการผลิตทั้งในรูปแบบอุตสาหกรรมครัวเรือนและอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ มีการรับหมูที่มาทำการแปรรูปจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีการสุขาภิบาลของโรงฆ่าที่แตกต่างกัน อีกทั้งการควบคุมคุณภาพจนถึงสุขลักษณะการผลิตของการผลิตในรูปแบบของอุตสาหกรรมทั้งสองที่มีความแตกต่างกัน จึงเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น ซาลโมเนลลา และ เชื้อโรคอื่นเป็นจำนวนมาก (ดวงดาว และคณะ, 2537; อดิศร และ อรุณ, 2539; อดิศร และคณะ, 2538)

การหมักแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่นั้นยังคงอาศัยแบคทีเรียแลคติคที่มีอยู่ในธรรมชาติจากเนื้อสัตว์ เครื่องปรุงต่างๆ เพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยวและกลิ่นเฉพาะตัวของแหนม ซึ่งถ้าเราอาศัยแต่แบคทีเรียแลคติคที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้น จะทำให้ไม่สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการที่ทำให้เกิดการหมักได้ จึงมักเกิดปัญหาในการผลิต เช่น แหนมที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากสภาวะในการหมักแตกต่างกันตามแต่ละฤดูกาล ดังนั้นการนำเชื้อแลคติคบริสุทธิ์มาใส่ในตอนเริ่มต้น จะช่วยให้สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้มากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตมั่นใจได้ว่าจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอ (อดิศร, 2533; ไพโรจน์, 2534) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* และเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลาที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของผลิตภัณฑ์แหนม (อดิศร, 2533; เรณู, 2539; ศิพัฒน์, 2539; Swetwiwathana และคณะ, 1999 และ2003) ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างสารในกลุ่มแบคเทอริโอซินจากแหนม (Noonpakdee และคณะ, 2003; Swetwiwathana, 2005) และนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนม เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาของผลิตภัณฑ์ เช่น ซัลโมเนลลา ในระหว่างการหมักแหนม (Swetwiwathana, 2005) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษานี้จึงได้ทำการทดลองนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการตรวจสอบยืนยันแล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่ม pediocin PA-1 สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 มาทดลองหมักแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูหั่นและหนังหมูบด เทียบกับแหนมที่ไม่ใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิต เพื่อดูการยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลาที่พบปนเปื้อนตามธรรมชาติ รวมถึงศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น เปอร์เซ็นต์กรดแลคติค ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์ความชื้น และ ค่า water activity (A_w) ในระหว่างการหมักแหนม และได้ทำการตรวจสอบยืนยันผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ดังกล่าวต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบว่าทนกรดและพบปนเปื้อนมากในผลิตภัณฑ์แหนม (อดิศร, 2533) ในรูปแบบจำลองการหมักแหนมในหลอดทดลอง (Nham model broth, NMB) ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมที่มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในโอกาสต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. จุลินทรีย์ การเก็บและการเพาะเลี้ยงเชื้อ

- *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหนมและได้รับการยืนยันว่าผลิต pediocin PA-1 (Swetwiwathana, 2005) บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว MRS broth (Merck) เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และใช้ MRS agar + 1.0 % $CaCO_3$ เป็นอาหารแข็งสำหรับเก็บเชื้อแบบ deep tube
- *Salmonella* Anatum ได้รับความอนุเคราะห์จาก FAO/WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง TSAYE [Trypticase soy agar (Merck) + 0.6 % yeast extract (Merck)] นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE [Trypticase soy broth (Merck) + 0.6 % yeast extract] เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจาก Merck ซึ่งได้แก่ MRS broth, MRS agar, Salmosyst broth base (SB), Salmosyst selective supplement tablet (SBST), XLD agar, Rambach agar, Triple Sugar Iron (TSI) agar slant, Lysine Indole Motility (LIM) medium, Trypticase soy agar (TSA), Meat extract, Tryptone, Glucose
- Nham model broth (NMB) กระเทียม (5 %) และ โซเดียมไนไตรท์ (100 ppm) ปลอดเชื้อเตรียมตามคำแนะนำของ Swetwiwathana และคณะ (1999)
- สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ KOVAC, โซเดียมคลอไรด์, โซเดียมไนไตรท์, โซเดียมไดโพลีฟอสเฟต, โซเดียมแอสคอเบท, กลีเซอรอล, น้ำมันพาราฟิน, สารละลายฟีนอฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1, สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล, แอลกอฮอล์ ร้อยละ 95, Agglutinating antiserum (polyvalent) A-67, A-1, Antisera O group B, C, D, E

3. วิธีการทดลอง

3.1 ศึกษาผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

3.1.1 การผลิตแหนม

ผลิตแหนมโดยแบ่งเป็น 2 สูตร คือ สูตรที่มีการเติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น และไม่มีการเติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งในแต่ละสูตรนั้นจะทำการผลิตแหนมที่มีหนังหมู 2 ลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ หนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2*3*20 mm และหนังหมูบดที่ผ่านรูตะแกรงขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm เตรียมส่วนผสมคัดแปลงจากสูตรของ Swetwiwathana และคณะ (1999) [หมูเนื้อแดงบด 650 กรัม, หนังหมู 350 กรัม, ข้าว ข้าวสุก 60 กรัม, กระเทียมสับ 50 กรัม, เกลือ 25 กรัม, น้ำตาล 5 กรัม, Sodium tripolyphosphate 3 กรัม, Sodium ascobate 0.5 กรัม, Sodium nitrite 0.1 กรัม] ในสูตรที่ไม่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นให้นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมในเครื่องผสม (Kitchen Aid) นวดจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 3 นาที) แต่ถ้าเป็นสูตรที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดก่อนประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไปในปริมาณ 10^6 cfu/กรัม นวดต่อจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 2 นาที) จากขั้นตอนนี้ไปจะมีขั้นตอนที่เหมือนกัน คือ นำไปบรรจุโดยใช้ cellulose casing ให้แต่ละแท่งมีความยาวประมาณ 6 นิ้ว จากนั้นรีดเอาอากาศออก มัดหัว-ท้ายให้แน่น นำไปบรรจุในถุงสูญญากาศ ปิดผนึกให้เป็นแบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่อง Vacuum Pack นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรด แลคติค ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์ความชื้น และ ค่า water activity (A_w) (อดิศร, 2533) ทุกวัน เป็นเวลา 3วัน

3.1.2 ตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม

การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาที่มีอยู่ในตัวอย่างแหนม โดยใช้ Salmosyst (อดิศร และคณะ, 2539) โดยนำตัวอย่างแหนม 25 กรัมใส่ลงใน salmosyst broth base (SB) 225 มล. นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 6-8 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อจาก SB 10 มล. ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม salmosyst selective supplement tablet (SBST) 1 เม็ด เขย่าให้เม็ด SBST ละลายใน SB จนหมด บ่มหลอดที่มี SBST + SB ที่อุณหภูมิ 35-37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 18-24 ชม. แล้วนำไปเขี่ยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็งโดยใช้ XLD agar และ RAM agar บ่มเชื้อที่ 35-37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซัลโมเนลลาจากอาหารแข็งชนิดละ 3 โคโลนีมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีใน TSI slant agar และ LIM medium ตรวจยืนยันเชื้อที่สงสัยว่าเป็นซัลโมเนลลาด้วย antiserum polyvalent และ antisera O group จากนั้นนำตัวอย่างเชื้อที่ทดสอบว่าเป็นซัลโมเนลลาไปทำการตรวจหาซนิคเซโรวาร์ ที่ WHO Salmonella-Shigella Center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.2 ศึกษาผลของการใช้ กระเทียม และกล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นที่มีต่อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nham model broth (NMB) จำนวน 4 ขวด ให้มีปริมาณโซเดียมไนไตรท์ปลอดเชื้อ 100 ppm โดยมีปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

ขวดที่ 1 ใส่เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ g

ขวดที่ 2 ใส่ เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ g และกระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 %

ขวดที่ 3 ใส่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 10^6 cfu/ g และ *S.* Anatum 10^4 cfu/ g

ขวดที่ 4 ใส่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 10^6 cfu/ กรัม *S.* Anatum 10^4 cfu/ gและกระเทียมสับปลอดเชื้อร5%

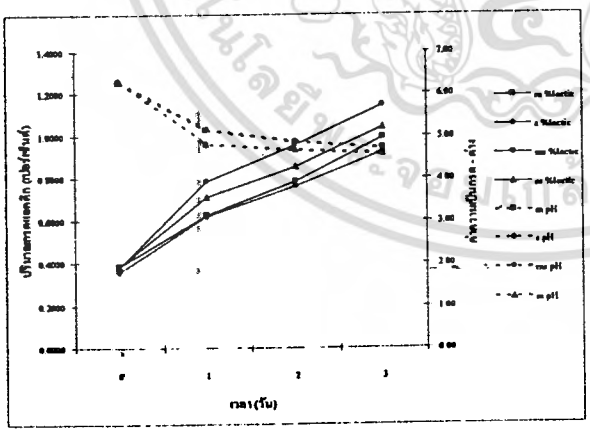
เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย paraffin oil ทุกขวด เพื่อให้เกิดสภาพการหมักที่ไร้อากาศ นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศา สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจหาปริมาณของเชื้อ *S.* Anatum ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รวมทั้งวัดค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นต่อคุณสมบัติทางเคมีของแหนม

จากการทดลองผลิตแหนมโดยแบ่งลักษณะของหนังหมูที่ใช้เป็น 2 ลักษณะ คือ หนังหมูแบบบดผ่านรูตะแกรงขนาด 5 มิลลิเมตร และหนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2*3*20 มิลลิเมตร ทำการหมักโดยใช้แบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* T1STR 536 เป็นกล้าเชื้อในการหมักโดยเติมลงไปประมาณ 10^6 เซล / กรัม ในส่วนผสมก่อนทำการหมักเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ซึ่งพบว่าค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของแหนมแต่ละสูตรมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 1) กล่าวคือ ในวันที่ 0 ของการหมัก ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากกระบวนการหมักยังไม่เกิดขึ้น แต่หลังจากที่หมักแหนมได้ 1 – 3 วัน พบว่าการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อจะทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น และค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยเฉพาะในวันที่ 1 ของการหมัก จะเห็นได้ว่ามีการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ซึ่งในทางสถิติจะพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) .(ตารางที่ 1) และการลดลงของพีเอชอย่างรวดเร็ว ในวันต่อมาจะสังเกตได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และค่าพีเอชไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า แหนมที่มีการหมักโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงไปนั้น จะทำให้จำนวนของแบคทีเรียแลคติกมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น สามารถเปลี่ยนแหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกได้ในจำนวนมากกว่า จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วและต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่เมื่อการหมักใช้ระยะเวลานานขึ้น กรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นและทำให้ค่าพีเอชลดลงนั้น จะเป็นตัวที่ทำให้การเจริญของแบคทีเรียแลคติกช้าลงด้วย จึงทำให้ในระยะการหมักช่วงหลังมีการเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรด และค่าพีเอชน้อยกว่าในช่วงระยะเวลาในตอนแรก เมื่อดูผลของลักษณะหนังหมูที่ใช้ คือ หนังหมูบดและหนังหมูหั่นเส้น จะพบว่าทั้งการหมักแบบที่มีการเติม และไม่เติมกล้าเชื้อ จะให้ผลของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และค่าพีเอชในลักษณะเดียวกัน กล่าวคือ ในการผลิตแหนมที่ใช้หนังหมูบดนั้น จะมีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงและค่าพีเอชที่ต่ำกว่าแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูหั่นเส้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า การใช้หนังหมูบดนั้นจะทำให้แหนมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ลดช่องว่างระหว่างเนื้อหมู และหนังหมูได้มากกว่าการใช้หนังหมูเส้น จึงทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ดีกว่า



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม

M = แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต

S = แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต

MS = แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 เซล/ กรัม

SS = แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 เซล/ กรัม

สำหรับผลของการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น (ตารางที่ 2) พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากไส้บรรจุที่ใช้นั้นเป็นไส้บรรจุแบบพลาสติกซึ่งยอมให้อากาศและน้ำผ่านเข้าออกได้ เมื่อทำการบรรจุแหนมในไส้พลาสติกแล้ว จากนั้นจึงนำไปบรรจุในถุงพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุญญากาศ แล้วทำการดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ เพื่อให้เกิดการหมักแบบไม่มีอากาศ เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นเนื้อหมูและส่วนผสมต่าง ๆ รวมตัวกันแน่นขึ้น ทำให้มีน้ำบางส่วนถูกปล่อยออกมา จากการที่ใช้ไส้บรรจุแบบพลาสติกทำให้น้ำที่ถูกขับออกมานั้น ผ่านไส้บรรจุออกมาได้ และถูกเก็บอยู่ภายในถุงพลาสติกสุญญากาศ ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น จึงทำให้แหนมทุกสูตรมีค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้นที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนม

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณกรดแลคติก (มิลลิกรัม)			
	M	S	MS	SS
0	0.3814 ± 0.07	0.3544 ± 0.05	0.3765 ± 0.05	0.3832 ± 0.05
1	0.624 ± 0.08[b]	0.6146 ± 0.03[b]	0.7824 ± 0.10[a]	0.7072 ± 0.07[ab]
2	0.7845 ± 0.11	0.7628 ± 0.07	0.9535 ± 0.16	0.8555 ± 0.05
3	0.9925 ± 0.20	0.9236 ± 0.21	1.1448 ± 0.18	1.0409 ± 0.10

[ab] หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และค่าความชื้น ของผลิตภัณฑ์แหนม

ระยะเวลาหมัก (วัน)	วอร์เตอร์แอคติวิตี้				ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)			
	M	S	MS	SS	M	S	MS	SS
0	0.969 ± 0.011	0.971 ± 0.001	0.962 ± 0.006	0.965 ± 0.003	69.71 ± 0.007	71.09 ± 0.449	69.87 ± 0.856	71.19 ± 0.612
1	0.969 ± 0.002	0.967 ± 0.002	0.963 ± 0.002	0.959 ± 0.002	71.18 ± 0.124	70.15 ± 0.375	69.86 ± 0.810	70.28 ± 0.311
2	0.962 ± 0.005	0.966 ± 0.004	0.962 ± 0.004	0.963 ± 0.004	70.19 ± 0.340	70.06 ± 0.099	69.96 ± 0.407	70.05 ± 0.166
3	0.962 ± 0.005	0.958 ± 0.004	0.964 ± 0.001	0.96 ± 0.001	69.46 ± 0.753	70.26 ± 0.414	70.06 ± 0.654	70.43 ± 0.449

M = แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต, S = แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต

MS = แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 เซล/ กรัม

SS = แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 เซล/ กรัม

ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นต่อคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของแหนม

จากการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติค *P. pentosaceus* T1STR 536 ซึ่งเป็นเชื้อที่พบว่าสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Swetwiwathana และคณะ, 2003) มาใช้ในกระบวนการผลิตแหนม เปรียบเทียบกับแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ จากการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่า ตัวอย่างที่ตรวจ จำนวน 6 ตัวอย่าง แหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อจะตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) ตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก (0 วัน) จนถึงวันที่ 2 แต่ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 3) ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง 4 ตัวอย่าง (66.67 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าในวันสุดท้ายของการหมักนั้นมีค่าพีเอชที่ต่ำมาก จึงทำให้เชื้อซัลโมเนลลามีจำนวนลดลงซึ่งใน 2 ตัวอย่างจะตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลาเลย เมื่อดูผลของแหนมที่ผลิตโดยมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติค พบว่า ช่วงแรกของการหมักตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) แต่การหมักในวันที่ 2 และ 3 ตรวจพบเชื้อน้อยลง คือ 4 (66.67 เปอร์เซ็นต์) และ 2 ตัวอย่าง (33.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไปนั้น มีผลทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้น มีกรดแลคติกถูกสร้างมากขึ้น มีผลทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เติมลงไปยังสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ จึงอาจมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้ ทำให้การตรวจพบในวันสุดท้ายลดลงมากกว่าแหนมที่ผลิตโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับอดิศร (2533) ที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococeus* spp. รหัส P_{55} และกล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส P_{55} และ *Lactobacillus* spp. รหัส L_1 ในการหมัก ที่มีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมัก

ตารางที่3 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาระหว่างการหมักแหนม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	การตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา			
		แหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ		แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ	
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ
0	6	6	100	6	100
1	6	6	100	6	100
2	6	6	100	4	66.67
3	6	4	66.67	2	33.33

จากการทดลองครั้งนี้ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาจากตัวอย่างแหนมที่ทำการศึกษาทั้งหมด 11 เซโรวาร์ (ตารางที่ 4) โดยเซโรวาร์ที่พบมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ *S.* Panama 24.74 % รองลงมา คือ *S.* Rissen และ *S.* Anatum ตรวจพบ 21.65 % และ *S.* Stanley 18.65 % ตามลำดับ และเชื้อทั้ง 4 เซโรวาร์ดังกล่าวนั้นจะตรวจพบในทุกวันของการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S.* Anatum ซึ่งเป็นเชื้อที่มีรายงานการพบมากในเนื้อหมูสามารถทนต่อสารที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น และค่าพีเอชที่ลดลงของผลิตภัณฑ์แหนมได้ดี จึงตรวจพบเชื้อเหล่านี้ได้ ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อเซโรวาร์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอรนุช (2530) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาโดยใช้สารต่าง ๆ ที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น พบว่า *S.* Anatum ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุด

ผลของกระเทียม และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่มีผลต่อการเจริญของ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth , NMB)

จากการศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ใน NMB พบว่า NMB ที่มีการเติมกระเทียมและกล้าเชื้อ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นไปได้ว่า การเติมกระเทียมนั้นทำให้กล้าเชื้อมีการเจริญดีขึ้นเป็นผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์แลคติกที่สูงขึ้นและค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 3) ซึ่งเปอร์เซ็นต์กรดที่เพิ่มสูงขึ้นรวมกับสาร allicin ที่มีในกระเทียมจะส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาได้ดียิ่งขึ้น (Swetwiwathana และคณะ, 1999) อีกทั้งกล้าเชื้อชนิดนี้ยังสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม pediocin PA – 1 (Swetwiwathana และคณะ, 2003) จึงส่งผลทำให้สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Anatum ให้หมดไปได้ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Swetwiwathana และคณะ (2004) ที่พบว่าการใช้กระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ nitrite 125 ppm และกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 สามารถทำลายเชื้อ *S.* Anatum ให้หมดไปได้ภายในระยะเวลา 30 ชั่วโมง โดยที่ NMB ที่มีการเติมกระเทียมอย่างเดียว พบว่า มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาแค่ในระยะแรก หลังจากนั้นเชื้อสามารถเจริญต่อได้ แต่ก็จะสามารถเจริญได้น้อยกว่า NMB ที่ไม่มีการเติมปัจจัยอื่นเลย สำหรับ NMB ที่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียวนั้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ในช่วงท้ายของการหมัก ทั้งนี้เนื่องการเจริญของกล้าเชื้อนั้นทำให้มีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้นและทำให้ค่าพีเอชต่ำลง ซึ่งกรดแลคติคที่ผลิตมากขึ้นอาจมีผลร่วมกับสารแบคเทอริโอซินที่เชื้อชนิดนี้สร้างขึ้นในระหว่างการหมักใน NMB จึงมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum

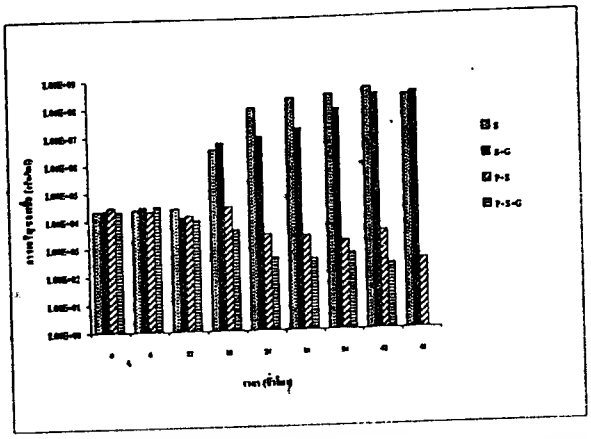
ตารางที่ 4 เชื้อซัลโมเนลลาเซโรวาร์ต่างๆที่ตรวจพบจากตัวอย่างแหนมในช่วงการหมัก 0-3 วัน

ชนิด	จำนวนตัวอย่าง	ร้อยละ	ระยะที่ตรวจพบ วัน
S. Rissen	21	21.65	0-2
S. Anatum	21	21.65	0-3
S. Panama	24	24.74	0-3
S. Stanley	18	18.56	0-3
S. Kedougou	2	2.06	0-1
S. Orion	3	3.09	0-3
S. Lexington	1	1.03	0-2
S. Saintpaul	1	1.03	0-2
S. Weltevreden	2	2.06	0-2
S. Krefeld	3	3.09	0-2
S. Senftenberg	1	1.03	0-3
รวม	97	100	

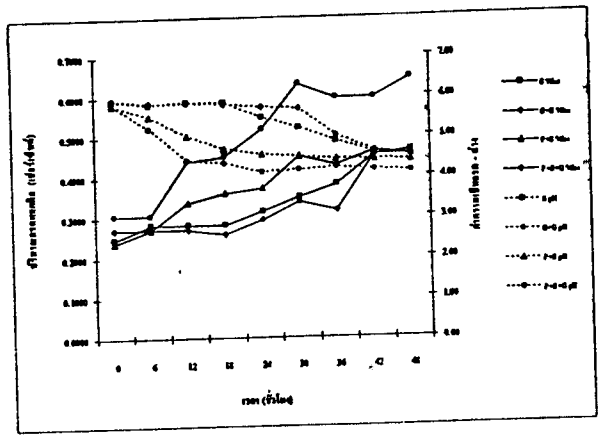
สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ พบว่า แหนมที่มีการผลิตโดยใช้หนังหมูบด มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการหมัก เป็นสูตรที่มีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด (1.14 เปอร์เซ็นต์) และค่าพีเอชต่ำสุด (4.56) เมื่อทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม เปรียบเทียบกันระหว่างมีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า แหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นจะสามารถตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาได้มากกว่าที่มีการเติมกล้าเชื้อ (66.67 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยซัลโมเนลลาที่ตรวจพบจากตัวอย่างทั้งหมดมีมากถึง 11 เซโรวาร์ มี 4 เซโรวาร์ที่พบมากเป็น 3 อันดับแรก คือ *S.* Panama (24.74 %), *S.* Rissen และ *S.* Anatum (21.65 %), *S.* Stanley (18.56 %) ตามลำดับ และจากการศึกษาผลของกระเทียมและการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย *P. pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth, NMB) พบว่า NMB ที่มีการเติมกระเทียมและกล้าเชื้อแบคทีเรียแลค- คิด มีผลในการยับยั้งและทำลายการเจริญ ของเชื้อ *S.* Anatum ได้มากที่สุด โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ซึ่งการศึกษาสรุปได้ว่า แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้าง pediocin PA-1 นี้ สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์แหนมที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2 แสดงการเจริญของ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth)



รูปที่3 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth) ที่มีการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum

S หมายถึง Nhan model broth ที่มีเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ ml

S+G หมายถึง Nhan model broth ที่มีเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ ml +กระเทียม 5 %

P+S หมายถึง Nhan model broth ที่มีเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ ml +*P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 cfu/ ml

P+S+G หมายถึง Nhan model broth ที่มีเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ ml +*P. pentosaceus* TISTR 536 10^6 cfu/ ml +กระเทียม 5 %

เอกสารอ้างอิง

ควงดาว วงศ์สมมาตร, นุงคราญ เรืองประพันธ์, จุรีภรณ์ บุญวงศ์วิโรจน์, น้อย ทองสกุลพานิชย์ และ ฐไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2537. "พยาธิและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแหนม". วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 36(3) : 167-171.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2534."การพัฒนาอาหารหมักพื้นบ้านโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น". อุตสาหกรรมเกษตร. 2(1): 36-40.

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. "ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum*". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิพัตน์ รักษ์เผ่า. 2539. "ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. "ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. "ประสิทธิภาพของ salmosyst และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม". ใน : การประชุมวิชาการครั้งที่ 34 สาขา สัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 272-279.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, ปรีชา จึงสมานุกูล และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2538. "ซาลโมเนลลาในอาหารพร้อมบริโภค". วารสารเทคนิคการแพทย์. 23(2) : 153-160.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, วรางคณา ครูส่ง, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2548. "เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก". (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารเกษตรพระจอมเกล้าปี 2548)

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. "การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา และการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้าเชื้อผงเพื่อใช้ในการหมักแหนม". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Noonpakdee, W., C. Santivarangkna., P. Jumriangrit., K. Sonomoto., and S. Panyim. 2003. "Isolation of nisin-producing *Lactobacillus lactic* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage". **Int. J. Food Microbiology**. 81(2): 137-145.

Swetwiwathana, A. 2005. "Microbiological Quality Enhancement of Thai Fermented Meat Product (Nham) Using Nham Associated Pediocin-producing Lactic Acid Bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)". Ph.D. Thesis of Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, Japan.

Swetwiwathana, A., N. Lotong., J. Nakayama., and K. Sonomoto. 2004. "Effect of garlic and nitrite on Pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth of *Salmonella* Anatum in stimulated nham fermentation". **Proceedings of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. August 25-26 2004.** Bangkok, Thailand.

Swetwiwathana, A., U. Leutz., N. Lotong., and A. Fischer. 1999. "Controlling the growth of *Salmonella anatum* in Nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic". **Fleischwirtschaft**. 79(9): 124-128.

Swetwiwathana, A., T. Zendo., N. Lotong., J. Nakayama., and K. Sonomoto. 2003. "Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in nham (Traditional Thai fermented meat)". **49th International Congress of Meat Science and Technology. 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้