สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการภาษาไทย: การลดปริมาณไนไตรต์ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มโดยใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสร่วมกับการใช้สารทดแทนไนไตรต์ชนิดอื่น

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ: Decreasing of residual nitrite in cured meat products using nitrite reductase producing microorganisms and other nitrite substitutes

ชื่อผู้วิจัย: นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

RCH
TX
572
.N5
ส86ร
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 115866
วัน,เดือน,ปี -4 ส.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2552

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b 10225144 x
i

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การลดปริมาณไนไตรต์ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มโดยใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสร่วมกับการใช้สารทดแทนไนไตรต์ชนิดอื่น

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Decreasing of residual nitrite in cured meat products using nitrite reductase producing microorganisms and other nitrite substitutes

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจะปีงบประมาณ 2552 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 190,200 บาท

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง กันยายน พ.ศ. 2552

หัวหน้าโครงการวิจัย: รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

หน่วยงานต้นสังกัด: สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อีเมลล์: knsuree@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords): coagulase-negative staphylococci, Micrococcaceae, cured meat product, nitrite reductase, nitrate reductase

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ coagulase-negative staphylococci จากเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอนและแหนม เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสม จากการวิเคราะห์จำนวนเชื้อ Micrococcaceae ทั้งหมดในตัวอย่างเหล่านี้ปรากฏว่ามีจำนวนอยู่ในช่วง 5.0×10^3 - 1.0×10^7 CFU/g โดยได้แยกเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จำนวน 147 ไอโซเลตเพื่อนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส เพื่อที่จะแยก *Micrococcus* out ออกจาก *Staphylococcus* จึงได้คัดเลือก Micrococcaceae ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสจำนวน 73 ไอโซเลตเพื่อนำมาทดสอบการสร้างกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดน ความต้านทานต่อแบซิตราซินและไลโซสตาฟีนและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส แบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 16 ไอโซเลต (ร้อยละ 21.92 ของ 73 ไอโซเลต) เป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* จากนั้นจึงได้ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียเหล่านี้ต่อไป โดยศึกษาสมบัติการสร้างเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสและเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลส ผลปรากฏว่า *Staphylococcus* ทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และได้จำแนกชนิดถึงระดับชนิดโดยใช้ API staph test พบว่าเป็น *S. xylosus* (ร้อยละ 43.75) *S. saprophyticus* (ร้อยละ 12.50), *S. lentus* (ร้อยละ12.50), *S. cohnii* ssp. *urealyticum* (ร้อยละ12.50), *S. cohnii* ssp. *cohnii* (ร้อยละ 6.25), *S. haemolyticus* (ร้อยละ 6.25) และ *S. lugdunensis* (ร้อยละ 6.25) อย่างไรก็ตามมีเพียง 1 ไอโซเลตจาก 16 ไอโซเลต คือ *S. xylosus* C0903 ที่สร้างเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนไตรท์รีดักเทสและไม่สร้างและเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในอาหารหมัก ดังนั้น *Staphylococcus* สายพันธุ์นี้อาจเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ

Abstract

The aims of this study were to screen coagulase-negative staphylococci from raw pork, raw beef, bacon and nham (a Thai fermented-pork sausage) with suitable property to be used as starter cultures. Total Micrococcaceae counts of these samples were in the range of 5.0×10^3 - 1.0×10^7 CFU/g. Catalase-positive, gram-positive cocci (147 isolates) were tested for coagulase production. To differentiate *Micrococcus* out of *Staphylococcus*, 73 isolates of coagulase-negative Micrococcaceae were examined for acid production from glucose and glycerol, susceptibility to furazolidone, resistance to bacitracin and lysostaphin, and ability to produce oxidase. Sixteen isolates (21.92% of 73 isolates) were classified as the genus *Staphylococcus*. These isolates were further characterized by testing ability to produce nitrate reductase, nitrite reductase and amino acid decarboxylase. All *Staphylococcus* isolates were able to produce nitrate reductase. They were identified to species by API staph test, and shown to be *S. xylosus* (43.75%), *S. saprophyticus* (12.50%), *S. lentus* (12.50%), *S. cohnii* ssp. *urealyticum* (12.50%), *S. cohnii* ssp. *cohnii* (6.25%), *S. haemolyticus* (6.25%), and *S. lugdunensis* (6.25%). However, only one isolate (*S. xylosus* C0903) of 16 isolates could produce nitrite reductase and could not produce amino acid decarboxylase which may not cause accumulation of biogenic amine in fermented food. Thus, this *Staphylococcus* strain could be suitable for use as meat starter culture.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	26
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กล้าเชื้อ (starter culture) เป็นจุลินทรีย์ที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพราะช่วยพัฒนาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Leroy และคณะ, 2006) มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Jiménez-Colmenero และคณะ. 2001) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการ (Huhas และ Monfort, 1997) โดยกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักมักมีคุณสมบัติหลายประการเช่น ความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน มีความเป็นโพไบโอติก (Leroy และคณะ, 2006) มีกิจกรรมสลายโปรตีนและไขมัน การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส (Holzapfel, 1998) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกและ Coagulase negative Staphylococci ก็มีคุณสมบัติหลายประการที่เหมาะแก่การเป็นกล้าเชื้อซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่มีคุณภาพและปลอดภัย (Huhas และ Monfort, 1997) โดยเฉพาะการมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและไนไตรท์รีดักเทส (Holzapfel, 1998)

เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสมีคุณสมบัติเร่งให้ไนเตรทที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ก่อนจะเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ซึ่งเมื่อรวมตัวกับไมโอโกลบิน (myoglobin) จะกลายเป็นไนโตรโซไมโอโกลบิน ($MbFe^{II}NO$) ซึ่งผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู-แดง (Adams และ Moss, 2008) ในประเทศไทยมีการควบคุมปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ที่เติมลงไปในอาหารโดยให้ใช้สารประกอบไนเตรทไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและสารประกอบไนไตรท์ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มอก. 848-2532 UDC 637.525) ทั้งนี้การเติมสารประกอบไนเตรทและไนไตรท์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดไนไตรท์ตกค้าง (residual nitrite) ในอาหารและเมื่อไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับเอมีนจะทำให้เกิดสารไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Walters, 1991) ส่วนเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสพบว่ามีความสำคัญในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างที่คงอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (Gøtterup และคณะ, 2007)

การพยายามที่จะลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในเนื้อสัตว์บ่มเพื่อลดอันตรายจากสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่อาจเกิดขึ้นได้ การใช้แบคทีเรียที่สร้างไนไตรท์รีดักเทส อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพอย่างไรก็ตามไม่ควรงดการใช้ไนไตรท์ไปเสียเลยเนื่องจากไนไตรท์สามารถทำหน้าที่ได้ดีหลายประการเช่นทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีสีชมพูสวยและให้กลิ่นรสที่ดี ช่วยต้านออกซิเดชันของไขมัน และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายได้ดีเช่น *Clostridium botulinum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย Coagulse-negative staphylococci (CNS) เป็นแบคทีเรียใน family Micrococcaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม สร้างคะตะเลส (gram-positive, catalase-positive cocci; GCC) (Jay และคณะ, 2005) CNS เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ มีบทบาทสำคัญในการสร้างสี กลิ่นและรสในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (cured meat products) (Gøtterup และคณะ, 2007) แบคทีเรีย staphylococci บางชนิดพบในว่าเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสัตว์ (Jay และคณะ, 2005) มีรายงานว่า *S. saprophyticus* และ *S. xylosus* เคยถูกพบในไส้กรอกหมักของอิตาลี (Coppola และคณะ, 2000) แบคทีเรียเหล่านี้ปกติใช้เป็นกล้าเชื้อทางการค้า (commercial starter) การคัดเลือกสายพันธุ์ของ CNS ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสมบัติที่สำคัญได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทสและการไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase) ดังนั้นจุดประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ก็เพื่อคัดเลือกเชื้อ CNS สายพันธุ์ใหม่จากเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม นำมาศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดเพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

2.1.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบอาหารที่เกิดการเน่าเสียได้ง่าย หลังจากที่สัตว์ถูกฆ่าและเอาอวัยวะภายในออกแล้ว เนื้อสัตว์ยังคงมีสภาวะทางจุลินทรีย์เหมือนกับในช่วงก่อนฆ่า บริเวณผิวนอกของสัตว์ เช่น ขน หนัง ตามปกติจะมี ดิน ทราย และน้ำซึ่งมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ และในลำไส้และกระเพาะ จะปรากฏว่าพบจุลินทรีย์ค่อนข้างสูงถึงแม้ว่าในสัตว์ที่มีสุขภาพอนามัยแข็งแรงสมบูรณ์เป็นปกติดีนั้น อาจมีจุลินทรีย์ในตับ ไต ต่อมต่าง ๆ และม้าม ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเข้าสู่กล้ามเนื้อได้จากระบบหมุนเวียนโลหิต แต่ส่วนใหญ่ที่พบในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจเริ่มเกิดขึ้นจากกระบวนการฆ่าตั้งแต่กระบวนการแทงคอเอาเลือดออก โดยจุลินทรีย์จากอวัยวะภายในและจากระบบหมุนเวียนโลหิตถูกกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นต้นว่า ขั้นตอนในการดำเนินการ เครื่องมือ ผู้ดำเนินการ เป็นต้น (สัญชัย, 2543)

การสำรวจสภาวะที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์ขณะถูกฆ่าและเนื้อสัตว์ที่ขายตามท้องตลาดจากสุขภาพสัตว์ หนัง อวัยวะภายใน มูล และจุลินทรีย์ในปาก พบว่าซากสัตว์ที่อาจเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการตัดแต่งซาก สำหรับวัวและแกะนั้น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์เริ่มตั้งแต่หนังและขนของสัตว์ซึ่งมักพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิด และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์อย่างเช่น *Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, C. perfringens, S. aureus, Salmonella* spp., *E. coli, Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica, L. monocytogenes* และ *A. hydrophila* (Gill และ Jones, 1995) และสามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามชนิดที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์ได้ดังนี้

ก) แบคทีเรีย ได้แก่ *Pseudomonas, Alcaligenes, Micrococcus, Streptococcus, Sarcina, Leuconostoc, Lactobacillus, Proteus, Flavobacterium, Bacillus, Clostridium, Escherichia* และ *Salmonella* เป็นต้น

ข) ยีสต์ ได้แก่ *Candida, Debaryomyces, Rhodotorula* และ *Torulopsis* เป็นต้น

ค) เชื้อรา ได้แก่ *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Geotrichum, Monilia, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sporotrichum* และ *Thamnidium* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มได้แก่ ไส้กรอกอีสาน แหนม ปลาร้า เป็นต้น ผ่านกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย แต่ในระยะหลังได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำกล้าเชื้อไปใช้ในการผลิตอาหารหลายชนิดรวมถึงในกลุ่มอาหารหมักพื้นเมือง (De Vuyst และ Vandamme, 1994 ; Hammes และ Knauf, 1994) ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพในเช่น ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติมักจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกพวก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะ *L. plantarum, L. brevis, L. alimentarius* และ *L. carvatus* ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักไส้กรอกที่มีการเติมซูโครสและนมผงร่วมด้วยและบ่อยครั้งที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้เป็นกล้าเชื้อซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีและช่วยในการถนอมอาหาร โดย *L. sake* และ *L. curvatus* เจริญได้ดีที่ค่า a_w ต่ำ โดยจะพบว่าเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส พบ *L. plantarum* เจริญในไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติ (Kröckel, 1995) ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิมส่วนใหญ่จะใช้ไนเตรทเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing Micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians, Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus* หรือ *Staphylococcus piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสีเหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิด การหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียลงไป (Marshall และ Bal'A, 2001)

2.2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมัก

2.2.1 คุณสมบัติของกล้าเชื้อจุลิทรีย์

2.2.1.1 การผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

สารแบคเทอริโอซินเป็นเปปไทด์ที่ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นหรือผลิตโดยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเจริญแข่งขันกันกับสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งแบคทีเรียก่อโรคที่มักถูกยับยั้งได้แก่ *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* (Holzapfel, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้จึงนำแบคทีเรียที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่เป็นการป้องกันอาหารโดยธรรมชาติ แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเช่น *Lb. sakei, Lb. curvatus, Lb plantarum Lb. brevis Lb. plantarum* ซึ่งมักพบการผลิตสารแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมี *Enterococcus faecium* ที่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งและไส้กรอก (Leroy และคณะ, 2006)

2.2.1.2 กิจกรรมการสลายโปรตีน (proteolytic activity)

ในแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมการสลายโปรตีน แต่มีในปริมาณน้อย แต่อาจจะพบปริมาณสูงในกิจกรรมแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ของเอนไซม์เปปติเดสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์ นอกจากนี้สามารถแยก *Lactococcus lactis* ที่ผลิตได้ในผลิตภัณฑ์นม ส่วนในแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* ทราบกันดีว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเนสได้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงกิจกรรมการสลายโปรตีน (Holzapfel, 1998)

2.2.1.3 กิจกรรมการสลายไขมัน (lipolytic activity)

ในแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมการสลายไขมัน แต่มีในปริมาณน้อย พบในแบคทีเรียกลุ่ม mesophilic และ thermophilic Lactobacilli ซึ่งเป็นกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส สำหรับแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* เช่น *S. piscifermentans* และ *S. carnosus* ที่นิยมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในไส้กรอกพบว่ามีกิจกรรมดังกล่าวเช่นกัน (Holzapfel, 1998)

2.2.1.4 การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase)

การมีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลสของแบคทีเรียจะทำให้เกิดการสะสมของไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ซึ่งถ้ามีสารไบโอเจนิกเอมีนในปริมาณสูงก็ทำให้เกิดสารพิษในอาหาร เช่นการเน่าเสีย การทำให้อาหารมีคุณลักษณะที่ไม่ต้องการ เช่นในแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดอย่าง *Lb. curvatus* และ *Lb. plantarum* แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ใน *Lb. sake, S. carnosus* และ *S. piscifermentans* (Holzapfel, 1998)

2.2.1.5 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทและไนไตรท์รีดักเทส (nitrate and nitrite reductase)

การสร้างเอนไซม์ไนเตรทและไนไตรท์รีดักเทสอาจมีส่วนช่วยให้เกิดสีชมพูในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Weissesell* ที่สามารถสร้างได้ทั้งเอนไซม์ทั้งสอง หรือพบเพียงเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส *Lb. farciminis, Lb. suebicus, Lb. sake* และ *W. viridescens* ที่สร้างได้ นอกจากนี้ยังพบในกล้าเชื้อ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* spp. (Holzapfel, 1998)

2.2.1.6 กิจกรรมของเอนไซม์ตะตะเลส (catalase activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์คะตะเลสจะทำหน้าที่ในการยับยั้งหรือไฮโดรไลท์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น การสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมีกลิ่นหืนและสีที่เปลี่ยนแปลงไป แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้แก่ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* spp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ เพราะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสสูง โดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาในการหมักไส้กรอก ส่วนในแบคทีเรียกรดแลคติกจะพบกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสได้น้อย (Holzapfel, 1998)

2.2.1.7 มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่ถูกใช้ในร่างกายคนและสัตว์ ทำให้สุขภาพร่างกายดี เนื่องจากการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดีนิยมนำมาเป็นกล้าเชื้อทั้งในอาหารคนและสัตว์ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lb. sakei* Lb 3 และ *P. acidilactici* PA-2 ซึ่งนิยมใช้กันในทางการผลิต สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ และยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด (Leroy และคณะ, 2006)

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหาร

2.2.2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (stickly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Frazier และ Westhoff, 1979) แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่จัดเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ ส่วนรูปร่างและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียกรดแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และ ฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะตะเลสและออกซิเจน แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดสร้างออกซิเจนเปอร์ออกไซด์จากการหมักน้ำตาลให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกจะพบในอาหารที่มีสารอาหารสูงเช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดจำพวกนม เนื้อสัตว์ เครื่องดื่ม และผัก แต่บางชนิดพบว่าเป็นจุลินทรีย์ในธรรมชาติเช่น จุลินทรีย์ที่พบในปาก ลำไส้ และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Axelsson, 2004)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกถึงระดับสกุลนั้นกล่าวถึงลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกคุณลักษณะและยังคงความสำคัญในการใช้อธิบายสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสามารถแบ่งได้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อน (rod) เช่น *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* และรูปกลม (cocci)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยกเว้นสกุล *Weissella* ที่สามารถรวมทั้งรูปกลมและรูปท่อน นอกจากนี้ยังมีการแบ่งเซลล์ทั้งสองระนาบ ซึ่งใช้จำแนกในแบคทีเรียรูปร่างกลม การเกิดรูปร่างเกาะกัน 4 เซลล์ ซึ่งพบในสกุล *Aerococcus, Pediococcus* และ *Tetragenococcus* คุณลักษณะอีกประการหนึ่งที่ใช้จำแนกความแตกต่างของสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ บทบาทการหมักของน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะที่ไม่จำกัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต เช่นกรดอะมิโน วิตามิน และสารตั้งต้นของกรดนิวคลีอิคแต่ละจำกัดออกซิเจน นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกันและความสามารถในการทนกรดและด่างก็สามารถใช้ในการจำแนกสกุลได้เช่นกัน (Axelsson, 2004)

การจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์ สามารถจำแนกตามคุณลักษณะดังนี้เช่น การทนเกลือและกรด การเจริญที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ และแบบ (confriguration) ของกรดแลคติกที่ผลิตคุณลักษณะที่แตกต่างกัน ได้แก่ คุณสมบัติทางชีวเคมีของสายพันธุ์จุลินทรีย์เช่น การหมักคาร์โบไฮเดรต การไฮโดรไลซ์อาร์จินีน การสร้าง acetoin การทนน้ำดีชนิดฮีโมไลซีส การสร้างพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ ความต้องการสารที่จำเป็นในการเจริญและการสร้างเอนไซม์บางชนิด ได้แก่ เบต้ากาแลคโตซิเดส เบต้ากลูโคโลนิเดส ลักษณะการเจริญในนมและชนิดของซีโรไทป์

2.2.2.2 แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* ลักษณะรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร พบทั้งที่อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มไม่สม่ำเสมอ (คล้ายพวงองุ่น) ติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ดำรงอยู่ได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) โคโลนีลักษณะขุ่น อาจเป็นสีขาว ครีม หรือเป็นสีเหลืองถึงส้ม สร้างเอนไซม์คะตะเลส เซลล์ถูกทำให้แตกโดยไลโซสตาฟิน (lysostaphin) แต่ไม่ถูกทำให้แตกโดยไลโซไซม์ (lysozyme) เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 มักแยกเชื้อได้จากผลิตภัณฑ์อาหาร ฝุ่น และน้ำ บางชนิดเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสทั้งในมนุษย์และสัตว์ สามารถผลิตสารภายนอกเซลล์ได้ (Holt และคณะ. 1994) และยังมีคุณสมบัติอื่นดังตารางที่ 2.1

แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (coagulase-negative) ซึ่งสามารถทนต่อเกลือและกรดได้ดีโดยพบปริมาณมากในช่วงแรกของการบ่มเนยแข็งคิดเป็นร้อยละ 5-25 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ผิวเนยแข็งและถูกแทนที่ด้วยด้วย coryneform bacteria หลังจากบ่มได้ 15 วัน โดย *S. equorum* มักพบบ่อยว่าเกี่ยวข้องกับการบ่มในเนยแข็งหลายชนิด แต่แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ชนิดอื่นเช่น *S. caprae, S. vitulinus, S. xylosus, S. saprophyticus, S. lentus, S. sciuri* และ *S. succinus* supsp. *casei* สามารถเกี่ยวข้องกับการบ่มเนยแข็งด้วยเช่นกัน จากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนะนำว่า *S. equorum* โดยเฉพาะ *S. equorum* subsp. *linens* และ *S. succinus* subsp. *casei* สามารถนำมาทำเป็นกล้าเชื้อสำหรับ smear ripened cheeses และ typical Swiss semi-hard cheeses (Irlinger, 2008)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของแบคทีเรีย Gram-positive, Catalase-positive

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	โมดิไฟล์ออกซิเดส	Aerotolerance	ความต้านทานต่อ		
				เบซิตราซิน (0.04U)[a]	ฟูราโซลิโดน (100 µg)[a]	ไลโซสตาฟิน (200 µg)
Staphylococcus	+[b]	-[c]	FA	R	S	S
Micrococcus	+	+	A[d]	S	R	R[e]
Rothia	±	-	FA	R/S	R/S	R
Aerococcus	-[f]	-	FA[g]	S	S	R
Enterococcus	-[f]	-	FA	R	S	R

A คือ strict aerobe, FA คือ facultative anaerobe, R คือ resistant, S คือ sensitive

[a] สำหรับเบซิตราซิน คือ มีโซนใสขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร (susceptible) สำหรับฟูราโซลิโดน คือ มีโซนใสขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร (susceptible)

[b] *S. aureus* subsp. *anaerobius* และ *S. saccharolyticus* เป็น catalase-negative และเจริญในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น

[c] *S. sciuri, S. lentus* และ *S. vitulus* จัดเป็น microdase-positive

[d] *Kocuria (Micrococcus) Kristinae* เจริญในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe)

[e] บางสายพันธุ์ของ *Micrococcus, Arthrobacter agilis* และ *Kocuria* ที่ไวต่อไลโซสตาฟิน

[f] เจริญได้ดีในสภาวะ reduced oxygen tension และจะไม่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ที่มา : Forbes และคณะ (2007)

ในด้านการแพทย์พบว่าแบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* บางชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคกระบือและเป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ ขณะที่ *S. epdermidis* เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่มีปัจจัยการเกิดโรคเนื่องจากการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เช่น ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ แต่เดิมแบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ชนิดที่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (cogulase-positive) เพราะได้ถูกพิจารณาว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ฉวยโอกาส ขณะที่แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสไม่ได้เป็นแบคทีเรียก่อโรคเพราะไม่พบรายงานเกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างโรคอาหารเป็นพิษทั้งในนมและผลิตภัณฑ์นม แต่อย่างไรก็ตามการรายงานดังกล่าวต้องเปลี่ยนแปลงไปเพราะมีหลักฐานเพิ่มขึ้นที่แสดงให้เห็นว่า *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสทำให้เกิดโรคได้ในคนจากการสร้างสารเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ดังนั้นจึงมีการคัดแยกแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อตรวจสอบและพบว่า *S. lugdunensis* และ *S. caprae* เป็นแบคทีเรียก่อโรค ส่วนชนิดอื่นที่คัดแยกได้น้อยหรือจำแนกชนิดได้ยาก*เช่น S. cohnii, S. saccharolyticus, S. simulans, S. pasteuri, S. warneri, S. xylosus และ S. equorum* และบางชนิดเช่น *S. xylosus, S. equorum, S. caprae* และ *S. sciuri* เป็นที่ทราบกันดีว่าใช้ในการผลิตเนยแข็งและใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหาร (Irlinger, 2008)

2.3 การบ่ม (curing)

การบ่มเป็นการถนอมหรือยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ที่ทำกันมาตั้งแต่โบราณ ปัจจุบันทำเพื่อช่วยพัฒนาเรื่องกลิ่นรส (flavor) และส่วนผสม (cure ingredients) ที่ใช้ในเนื้อประกอบด้วยที่เกลือไนเตรทหรือไนไตรท์ และน้ำตาล เป็นส่วนประกอบในการสร้างสีและเครื่องปรุง (seasoning) ในเนื้อสัตว์เพื่อทำให้เกิดสมบัติพิเศษของผลิตภัณฑ์ การหมักนิยมใช้เกลือในระดับที่ระดับความเข้มข้นสูงพอสำหรับการเก็บรักษาเนื้อ โดยเกลือจะทำหน้าที่ชะลอการเน่าเสียในการลดปริมาณน้ำที่แบคทีเรียนำไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่การใช้เกลือในระดับสูงเกินไปนั้นอาจทำให้สารสีไมโอโกลบินเกิดการออกซิไดซ์ทำให้เนื้อมีสีที่ไม่น่ารับประทาน (สัญชัย, 2543; Jay และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับไนไตรท์เช่นกรดซอร์บิก เพราะมีคุณสมบัติในการถนอมอาหาร (Jay และคณะ, 2005)

2.3.1 ไนเตรท (nitrate) และ ไนไตรท์(nitrite)

ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปของสารประกอบโซเดียมไนเตรทหรือโปแตสเซียมไนเตรท และสารประกอบโซเดียมไนไตรท์หรือโปแตสเซียมไนไตรท์ เป็นส่วนประกอบที่เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม เพื่อปรับหรือแปรสภาพรสชาติของผลิตภัณฑ์ ซึ่งนอกจากจะเป็นสารที่ช่วยปรุงแต่งรสชาติแล้ว ยังใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ ลักษณะทั่วไปของโซเดียมไนเตรทจะเป็นผงหรือ granule สีขาวไม่มีสี ส่วนโปแตสเซียมไนเตรทจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือผงสีขาว สำหรับโซเดียมไนไตรท์นั้นจะดูดความชื้นและละลายได้ง่าย ลักษณะสีขาวหรือสีเหลืองและอาจมีผลึกรูป cylindrical stick ปัจจุบันมีผงเพรค (praque powder) เป็นผงทางการค้าประกอบด้วยสารไนเตรทและไนไตรท์และfiller อื่น ๆ ที่เป็นส่วนผสมเพราะมีผลในการเร่งการแตกตัวของ ไนไตรท์ แล้วแตกตัวเป็นไนตริกออกไซด์เร็วขึ้นและมากขึ้น จึงเกิดสีได้เร็วและมีไนไตรท์ตกค้างเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์น้อยลง โดยอธิบายคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มรสชาติ (taste) และกลิ่นรส (flavor) แก่ผลิตภัณฑ์ให้มีกลิ่นเฉพาะตัวเป็นที่ยอมรับสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้บริโภคมากกว่าการใช้เกลือเพียงอย่างเดียว (เยาวลักษณ์, 2536) นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และป้องกันการงอกของสปอร์ *Clostridium botulinum* ที่สร้างสารพิษโบทูลิน (botulin) หรือโบทูลินัสทอกซิน (botulinum toxin) ซึ่งมีพิษร้ายแรงอาจทำให้ผู้บริโภคตายได้ มีรายงานการเป็นพิษของอาหารอันเนื่องมาจากสารโบทูลินในต่างประเทศ โดยเฉพาะอาหารจำพวกไส้กรอกแห้งและซาลามีที่มีขั้นตอนในการหมักช้าจึงเปิดโอกาสให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ แต่สารพิษโบทูลินสามารถถูกทำลายได้เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาทีหรือ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (สัญชัย, 2543) จากการศึกษาคุณสมบัติของสารไนไตรท์พบว่ามีผลต่อจุลินทรีย์มากเมื่อสภาพความเป็นกรดสูง โดยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นเกิดขึ้นได้หลายแบบด้วยกันและเชื่อว่าไนตรัสสามารถเข้ารวมกับโครงสร้างของโมเลกุลน้ำย่อยพวก dehydrogenases และยังมีปฏิกิริยากับพวก monophenal เช่น tyrosine ทำให้องค์ประกอบของเซลล์เปลี่ยนไปรวมตัวกับพวก heam pigments และไซโตรโครมของเซลล์ด้วยปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพราะทำให้เกิด heam containing respiratory catalysts (Fiddler และคณะ, 1972) ช่วยป้องกันการเกิดกลิ่นที่ผิดปกติเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยพบว่าไนไตรท์สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในผลิตภัณฑ์เนื่องจากมีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเติมไนไตรท์จะทำให้เกิดไนตริกออกไซด์อิสระที่สามารถรวมกับอนุมูลอิสระเกิดเป็นสารที่มีความคงตัว ส่งผลยับยั้งการเกิดกลิ่นผิดปกติในผลิตภัณฑ์เพราะลดการเกิดเพอร์ออกไซด์ที่สลายให้สารประกอบแอลกอฮอล์ คีโตน และอัลดีไฮด์ที่เป็นสารให้กลิ่นผิดปกติ (บวร, 2547) และไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดง เนื้อผสมสารไนเตรทและไนไตรท์นั้นพบว่าการใช้ไนไตรท์จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าไนเตรท โดยในกระบวนการทางเคมีไนเตรทถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไตรท์และ ไนไตรท์สามารถออกซิไดซ์รงควัตถุในเนื้อสัตว์คือ ไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงม่วงและมีธาตุเหล็กในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ให้เป็นเมทไมโอโกลบินที่มีสีน้ำตาลซึ่งธาตุเหล็กอยู่ในรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) และไนไตรท์ถูกรีดิวซ์กลายเป็นไนตริกออกไซด์ จากนั้นไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับเมทไมโอโกลบินเป็นไนโตรโซไมโอโกลบินทำให้เนื้อมีสีแดง เมื่อผ่านความร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส ไนโตรโซไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นไนโตรโซฮีโมโครมซึ่งเป็นสารที่ให้สีชมพูที่มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเค็ม (Dethmers และ Rock, 1975) ซึ่งสามารถอธิบายโดยกระบวนการต่อไปนี้ต่อไปนี้

(1) ไนเตรท $\xrightarrow{\text{จุลินทรีย์ที่รีดิวซ์ไนเตรท}}$ ไนไตรท์

(2) ไนไตรท์ $\xrightarrow{\text{สภาวะที่เหมาะสม}}$ ไนตริกออกไซด์+น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ไนตริกออกไซด์ + ไมโอโกลบิน $\xrightarrow{\text{สภาวะที่เหมาะสม}}$ ไนตริกออกไซม์เมตไมโอโกลบิน

(NO). + (Mb) (NOMMb)

(4) ไนตริกออกไซม์เมตไมโอโกลบิน (NOMMb) $\xrightarrow{\text{สภาวะที่เหมาะสม}}$ ไนโตรโซไมโอโกลบิน (NOMb)

(5) NOMMb+ความร้อน +ควันไฟ $\longrightarrow$ ไนโตรโซฮีโมโกลบิน

2.3.1.1 อันตรายจากการใช้ไนเตรทและไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การบริโภคไนไตรท์มากกว่า 4 กรัมต่อวัน ในผู้ใหญ่มีอาการอาเจียนและอุจจาระเป็นเลือด เนื่องจากเกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะ ลำไส้ และเยื่อบุทางเดินอาหาร ในเด็กทำให้เกิดโรคเมทฮีโมโกลไบนีเมีย (methemoglobinemia) หรือโรคเบบี้บลู โดยไนไตรท์รวมตัวกับอีโมโกลบิน(hemoglobin) เกิดเป็นเมทฮีโมโกลบินทำให้ขาดร่างกายออกซิเจน ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแกมเทาโดยเริ่มจากริมฝีปาก นิ้วมือ นิ้วเท้า หน้า และลำตัว ถ้ามีอาการขั้นรุนแรงอาจเสียชีวิตได้ ทั้งนี้การบริโภคไนไตรท์มากกว่า 8 กรัมต่อวัน สามารถเสียชีวิตได้อย่างเฉียบพลัน ไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับเอมีนเป็นสารประกอบไนโตรซามีนที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์ สารประกอบไนโตรซามีนที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักคือ ไนโตรโซไดเมทิลลามีน (nitrosodimethylamine) ไนโตรโซไดเอทิลลามีน (nitrosodiethylamine) ไนโตรโซไพร์โรลิดีน (nitrosopyrrolidine) และไนโตรโซพิเพอริดีน (nitrosopiperidine) ส่วนใหญ่ไนโตรโซไดเมทิลลามีนจะพบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและไนโตรโซไพร์โรลิดีนจะพบในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันสูง การเกิดสารไนโตรซามีนอาจเกิดจากกรดไนตรัสที่เกิดจากการแตกตัวของไนเตรท ดังนั้นการใช้ไนเตรทเติมลงในผลิตภัณฑ์แล้วก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ในผู้บริโภค ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไป (บวร, 2547)

ปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ที่เหมาะสม ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 20 (2517) อนุญาตให้ใช้ไนเตรทได้ในปริมาณที่ไม่เกิด 500 ส่วนในล้านส่วน และไนไตรท์ให้ใช้ได้ในปริมาณที่ไม่เกิน 125 ส่วนในล้านส่วน สำหรับ Federal meat inspection regulation ของอเมริกาอนุญาตให้ใช้คือ กรณีการใช้ไนเตรทในเนื้อหมักให้ใช้เพียง 7 ปอนด์ต่อ 100 แกลลอน สำหรับเนื้อสัตว์ที่หมักแบบแห้งใช้ไนเตรท 3 ออนซ์ต่อเนื้อบด 100 ปอนด์ และถ้าเป็นเนื้อบดที่มีการเติมไนเตรทควรใช้ 2 ออนซ์ต่อเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บด 100 ปอนด์ กรณีการใช้ไนไตรท์ในเนื้อหมักให้ใช้เพียง 2 ปอนด์ต่อ 100 แกลลอนที่ระดับที่มีการฉีดเข้าเนื้อประมาณร้อยละ 10 หากใช้ไนเตรทร่วมกับไนไตรท์ต้องมี ไนไตรท์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายได้ไม่เกิน 125 ส่วนในล้านส่วนซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ หมักเมื่อผ่านความร้อน (thermal processing) ปริมาณสารไนไตรท์อิสระจะลดลงอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 20-80 และจะสูญหายระหว่างการเก็บรักษาด้วย (เยาวลักษณ์, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม

เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด แหนม และเบคอน ชนิดละ 10 ตัวอย่างรวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากตลาดสดในเขตลาดกระบัง กรุงเทพ ฯ และจังหวัดสมุทรปราการ

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งมีจำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 42112, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Vibrio parahaemolyticus* OYI แยกได้หอยนางรม *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Enterococcus faecium* TISTR 1283 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Plate Count Agar (PCA), Mannitol Salt Agar (MSA), Media ที่เติมกรดอะมิโนร้อยละ 0.1 (ประกอบด้วย L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L–ornithine monohydrochloride และ L–lysine monohydrochloride, บริษัท Merck), Brain Heart Infusion (BHI, พีเอช 7.4±0.2) broth, Gibson 's Semi Tomato Juice Medium, Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft Agar, 7.1±0.2), Nutrient Agar (NA), API 50 CHL Medium และ API STAPH PLUS 25 MEDIA 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 สารละลายและสารเคมี

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่าง ได้แก่ สารละลายเปปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กลีเซอรอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลือน้ำดี (porcine bile salt) สารละลาย NIT 1 (กรดซัลฟานิลิค 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความ เข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารละลาย NIT 2 (ไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัม ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารเคมีสำหรับย้อมแกรมได้แก่ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แกรมไอโอดีน (Gram 's iodine) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และซาฟรานีน (safranin) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้างได้แก่ โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] ซิงค์อะซิเตท [$(CH_3COO)_2$ $Zn \cdot 2H_2O$] กรดอะซิติก ไดโซเดียมเตตระบอเรต [$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$] ซัลฟานิลามายด์ ($C_6H_8N_2O_2S$) N-1-naphthylenediamine dihydrochloride และโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) และสารเคมีสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase test) ได้แก่ โคแอกูเลสพลาสมา สารเคมีสำหรับการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (ได้แก่ pyridoxal-5-phosphate, thiamine และ bromocresol purple)

ชุดทดสอบ (Kit) สำหรับการจำแนกชนิดของ Coagulase negative Staphylococci โดยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API STAPH kit

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher masticator, บริษัท IUL instrument) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLAB, รุ่น Series 3 TE) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, บริษัท Cyberscan, รุ่น 2000) เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (Testo, รุ่น 205) เครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex mixer) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV 1601 Shimadzu) เครื่อง spiral plater รุ่น Autoplate 4000 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (บริษัท tommy, รุ่น SS-325) เครื่องหมุนเหวี่ยง (บริษัท Harmle, รุ่น Z383K) ตู้ถ่ายเชื้อ (บริษัท Astec Microflow, รุ่น ABS 1200) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, บริษัท Labsystems, รุ่น iEM Reader MF) เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวงและอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อใช้สำหรับตีป่น ลูปเขี่ยเชื้อ จานเพาะเชื้อ ปีเปต ลูกยาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

สุ่มตัวอย่างได้แก่ เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด แหนม และเบคอน ชนิดละ 10 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีได้แก่

3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Testo 205)

3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวัดเพื่อหาค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัด water activity (AquaLAB Series 3 TE)

3.2.1.3 การหาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์มาและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ตกค้างโดยวิธีของ Kirk และ Sawyer (1991)

ก) สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณไนไตรท์

1. ชั่ง potassium ferrocyanide trihydrate จำนวน 109 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. ชั่ง zinc acetate dehydrate จำนวน 220 กรัม ละลายน้ำแล้วเติม glacial acetic acid 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. ชั่ง disodium tetraborate decahydrate จำนวน 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

4. ชั่ง sulphanilamide จำนวน 2 กรัม ละลายในน้ำอุ่น 800 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วกรอง ต่อจากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คนตลอดเวลา) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5. ชั่ง N-1-naphthylene diamine dihydrochloride 0.25 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ใส่ในขวดสีชาและแช่ตู้เย็นเก็บไว้ได้ประมาณ 1 อาทิตย์

6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 445 มิลลิลิตร เจือจางและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข) การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์ (stock) เตรียมโดยชั่งโซเดียมไนไตรท์ 1.0 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ใช้ในการทดลอง ควรเตรียมใหม่ทุกวัน โดยสามารถเตรียมได้ดังนี้ ปิเปตสารละลาย stock ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำมาเจือจางอีกครั้ง ปิเปตสารละลายปริมาตร 5, 10 และ 20 มิลลิลิตรลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์เป็น 2.5, 5.0 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ค) การเตรียมวัตถุดิบสำหรับวิเคราะห์โซเดียมไนไตรท์ตกค้าง

เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบโดยทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน การบดวัตถุดิบให้เป็นเนื้อเดียวกันจะใช้เครื่องบด ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ยังไม่ได้ปรุงให้รับทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง และวัตถุดิบที่ใช้สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 4 วันโดยเก็บไว้ในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นชั่งวัตถุดิบที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวแล้ว 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายบอเรกซ์ (สารข้อ ก(3)) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 70 มิลลิลิตร (อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส) ลงในบีกเกอร์ แล้วผสมให้เข้ากันและถ่ายใส่ลงในฟลาสก์สำหรับปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำร้อน 75 มิลลิลิตร และบ่มในอ่างน้ำร้อนนาน 30 นาทีพร้อมทั้งมีการเขย่าสม่ำเสมอรอให้เย็น แล้วเติมสารเคมีข้อ ก (1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมกับสารเคมีข้อ ก (2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้พีเอช 8.3 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ หลังจากปรับพีเอชให้ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 30 นาที แล้วกรองเอาสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากไนเตรทและไนไตรท์

ง) การวัดสี

ปิเปตสารที่กรองได้ v มิลลิลิตร (ไม่เกิน 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายข้อ ก (4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและสารเคมีในข้อ ก (6) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่มืด 5 นาที จากนั้นเติมสารเคมีในข้อ ก (5) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่มืด 3 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร พร้อมทั้งทำกราฟมาตรฐานโดยนำสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่เตรียมไว้ ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร(สารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ปฏิบัติตามขั้นตอนข้างต้นแต่เปลี่ยนแปลงเป็นสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แทน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.2.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

3.2.2.1 การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และMicrococcaceae ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ และMicrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม โดยชั่งตัวอย่างละ 25 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจางละ 10^{-1}) นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างต่อไปให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}-10^{-5} ปิเปตตัวอย่างที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย ระดับความเจือจางละ 50 ไมโครลิตรโดยการใช้เทคนิค spiral plating ด้วยเครื่อง Spiral Plater รุ่น Autoplate 4000 ลงบนผิวหน้าอาหาร PCA และอาหาร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดพร้อมทั้งคำนวณหาจุลินทรีย์ทั้งหมด และMicrococcaceae ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมของอาหาร)

3.2.2.2 การแยกแบคทีเรีย Micrococcaceae

การแยกเชื้อ Micrococcaceae ให้เลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง MSA ที่มีลักษณะนูน มีสีขาวขุ่นหรือครีมขุ่น แล้วนำลูปปราศจากเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาลากบนอาหารแข็ง MSA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ในอาหารเหลว BHI ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 15 ที่บรรจุในหลอดทนความเย็นและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.2.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย Micrococcaceae เพื่อการทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย Micrococcaceae แต่ละไอโซเลตที่แยกได้ลงในอาหารเหลว BHI นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งให้เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีก เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 0.5

115866

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

การทดสอบแบคทีเรียกรดเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการใช้ไปเป็นกล้าเชื้อ ต้องทดสอบการมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส การคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity การศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ชีวเคมี

3.2.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

ในขั้นตอนแรกควรทำการกระตุ้นแบคทีเรียที่ทดสอบ (activity of microbial cultures) เพื่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์ก่อนการทดสอบจริงโดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลตมาถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ในอาหารเหลวที่เติมกรดอะมิโนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-orithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride แต่ละความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ pyridoxal-5-phosphate ร้อยละ 0.005 หลังจากการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในขั้นตอนที่สองทำการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน) ของแบคทีเรียที่คัดเลือกตามวิธีการของ (Bover-Cid และ Holzapfel.1999) โดยนำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการกระตุ้นลากบนอาหารแข็ง Decarboxylase Medium (ประกอบด้วย ทริปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เนื้อสกัด 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 2.5 กรัม กลูโคส 0.5 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $MgSO_4$ 0.2 กรัม $MnSO_4$ 0.05 กรัม $FeSO_4$ 0.004 กรัม ammonium citrate 2 กรัม triamine 0.01 กรัม K_2PO_4 2 กรัม $CaCO_3$ 0.1 กรัม pyridoxal-5-phosphate 0.005 กรัม bromocresol purple 0.06 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม รวมทั้งกรดอะมิโน ได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-orithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride แต่ละความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปรับพีเอชให้ได้ 5.3 ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) สังเกตการตกตะกอนรอบ ๆ โคโลนี เปรียบเทียบกับ Decarboxylase Medium ที่ไม่เติมกรดอะมิโน (ชุดควบคุม) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ตรวจผลการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์เป็นสีม่วงหรือเกิดบริเวณใสรอบ ๆ รอยลาก แสดงว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (มี amino acid decarboxylase activity มากกว่า 350 มิลลิกรัมต่อกรดอะมิโนต่อลิตร)

3.2.3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ก) การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสทำตามวิธีการของ Harrigan (1998) ซึ่งทำได้โดยเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตจากหลอดอาหาร MRS มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไป โดยใช้ dropper หรือ Pasteur pipette ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นทันทีให้ผลการทดสอบเป็นบวกแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ

ข) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสโดยวิธี agar plate method

ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสตามวิธีการของ Miralles และคณะ (1996) ซึ่งทำได้โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโพแทสเซียมไนไตรท (KNO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งแล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมนั้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยหยดสารละลาย NIT 1 (เตรียมได้จากกรดซัลฟานิลิก 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) และ สารละลาย NIT 2 (เตรียมได้จากไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีไนเตรทจะเกิดสีแดงรอบหลุมที่ใส่สารแขวนลอยของเซลล์ซึ่งได้แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส

ค) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสอาศัยวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative test) ตามวิธีการของ Salome และคณะ (2009) ดังนี้

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS (หรือ BHI กรณีเป็น *Micrococcaceae*) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มแล้วของแต่ละแต่ละไอโซเลตใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด สำหรับหลอดที่ 1 ปิเปตสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรและเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Griess assay ทันทีโดยนำส่วนใสที่ได้มาเติม Griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร [เตรียมได้โดยผสมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้ากับสารละลาย N-naphthylethylenediamine ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง] สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ส่วนหลอดที่ 2 หลังจากเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่ได้ มาเติม Griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและนำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 1 ถ้าหากสีชมพูจางลง (ค่าการดูดกลืนแสงลดลง) แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกคือมีการใช้ไนไตรท์ซึ่งเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

3.2.3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี

ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. การย้อมแกรม

ทำการย้อมแกรมโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ สเมียร์เชื้อเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน แล้วหยดคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ให้ท่วมลงบนรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์อีกครั้งและทิ้งไว้อีก 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำ หยดสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 นาน 30 วินาทีสำหรับชะล้างสีบนรอยสเมียร์และล้างออกด้วยน้ำ หลังจากนั้นหยดซาฟรานีน (Safranin) ให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างด้วยน้ำอีกครั้ง ทิ้งให้แห้งแล้วส่อง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษาการเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรีย

3.2.4 การคัดเลือก coagulase-negative staphylococci ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.2.4.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส และนำมาทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ในขั้นตอนต่อไป

3.2.4.2 การทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus*

ในการทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ทำได้โดยทดสอบ การผลิตกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน ความต้านทานต่อเบซิตราซิน และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยถ้าเป็น *Micrococcus* จะไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคสและ กลีเซอรอลได้ ต้านทานต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่จะไวต่อเบซิตราซิน และสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ แต่ถ้าเป็น *Staphylococcus* สามารถสร้างกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอลได้ มีความไวต่อฟูรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่จะต้านทานต่อเบซิตราซิน และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สามารถทดสอบได้ตามขั้นตอนดังนี้ (Baker, 1984)

ก) การผลิตกรดจากกลูโคส

การผลิตกรดจากกลูโคส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ที่ประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม bromocresol purple 0.04 กรัม กลูโคส 10 กรัม วุ้น 2.2 กรัม ปรับพีเอช 7.0 และใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ก่อนจะผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่จะทดสอบประมาณ 1-2 ลูปลงในอาหารที่เตรียมไว้ และเททับด้วย mineral oil บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองหากอาหารบริเวณรอบ ๆ เชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมองผ่านใต้ก้นหลอดทดลองแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อจนครบ 5 วัน ก่อนจะบันทึกผลการทดลองเป็นลบ

ข) การผลิตกรดจากกลีเซอรอล

การผลิตกรดจากกลีเซอรอล โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย $NH_4H_2PO_4$ 1 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_20$ 0.2 กรัม ยีสต์สกัด 2 กรัม กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร bromcresol purple 0.04 กรัม วุ้น 9 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรก่อนผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม erythromycin ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 0.04 กรัม จากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลากเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองจากการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองบริเวณรอบ ๆ เชื้อที่ลากไว้แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกและถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่ออีกจนครบ 72 ชั่วโมงก่อนบันทึกผลการทดลองเป็นลบ

ค) การยับยั้งของฟูราโซลิโดน (furozolidone)

การทดสอบการยับยั้งของฟูราโซลิโดน โดยใช้ไม้พันลำสีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยที่ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง blood agar นำแผ่นดิสที่มีฟูราโซลิโดน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดของโซนที่เกิดจากการยับยั้งของฟูราโซลิโดนบริเวณรอบแผ่นดิส โดยฟูราโซลิโดนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง) ความต้านทานต่อแบซิตราซิน (bacitracin)

การทดสอบความต้านทานต่อแบซิตราซิน โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยที่ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง blood agar นำแผ่นดิสที่มีแบซิตราซิน ความเข้มข้น 0.04 ยูนิต วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดของโซนที่เกิดจากการยับยั้งของฟูราโซลิโดนบริเวณรอบแผ่นดิส โดยแบซิตราซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus*

จ) ความไวต่อไลโซสตาฟิน (lysostaphin)

การทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟิน โดยเขี่ยเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโลเลตมา 1 ลูปลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายซาลีนร้อยละ0.85 กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายไลโซสตาฟินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าความขุ่นในของผสมหายไปแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้ายังขุ่นอยู่ถือว่าให้ผลการทดลองเป็นลบ

ฉ) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสตามวิธีการของ Bennett และ Lancette (2001) โดยลากเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลตลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylenediamine ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตผลการทดลองภายใน 30 วินาที ถ้ากระดาษกรองที่มีเชื้ออยู่เปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม แสดงว่าให้การทดลองเป็นบวก แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาทีแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นลบ

3.2.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส ตามวิธีการของ Bennett และ Lancette (2001) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีของ *Staphylococcus* ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว BHI ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมเชื้อให้เข้ากันดีกับอาหารเหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมโคแอกกูเลสพลาสมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร BHI ที่มีเชื้ออยู่ แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตการจับตัวเป็นลิ่มของพลาสมา (ให้ผลบวก) แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ให้ผลลบ) และคัดเลือกเฉพาะ *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase-negative)

3.2.4.4 การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amono acid decarboxylase ทำตามวิธีการข้อ 3.2.3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.5 การจำแนกชนิดของสเตรปฟิโลคอกคัสโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การย้อมแกรม

ทำการย้อมแกรมโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ สเมียร์เชื้อเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์ ตรึงเซลล์ด้วยความร้อน แล้วหยดคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ให้ท่วมลงบนรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอย สเมียร์อีกครั้งและทิ้งไว้อีก 1 นาที และล้างออกด้วยน้ำ หยดสารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 นาน 30 วินาทีสำหรับชะล้างสีบนรอยสเมียร์และล้างออกด้วยน้ำ หลังจากนั้นหยดซาฟรานีน (Safranin) ให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างด้วยน้ำอีกครั้ง ทิ้งให้แห้งแล้วส่อง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษาการเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรีย

ข) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API staph (BioMérieux)

API staph เป็นชุดทดสอบใช้จำแนกแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Kocuria* โดยอาศัยหลักชีวเคมีทั้งหมด 20 การทดสอบ ซึ่ง Strip ของ API staph ประกอบหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถอ่านผลโดยเทียบกับ Analytical profile index หรือ Identification software โดยมีอุปกรณ์ดังนี้

1. API staph medium ประกอบด้วยยีสต์สกัด 0.5 กรัม bactopeptone 10 กรัม NaCl 5 กรัม แร่ธาตุ 10 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอช 7.0-7.4 กรัม

2 API staph strip ประกอบด้วยหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ได้แก่ ไม่มีซับสเตรท (0), D-glucose (GLU), D-fructose (FRU), D-mannose (MNE), D-maltose (MAL), D-lactose (LAC), D-trehalose (TRE), D-mannitol (MAN), xylitol (XLT), D-melibiose (MEL), potassium nitrate (NIT), ß-naphthyl phosphate (PAL), sodium pyruvate (VP), D-raffinose (RAF), D-xylose (XYL), D-saccharose (SAC), methyl-αD-glucopyranoside (MDG), N-acetyl-glucosamine (NAG), L-arginine (ADH) และ urea (URE)

3. Mineral oil

4. สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 0.5

5. Reagent kit ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 สาร VP1 และVP2

5.2 สาร NIT1 และNIT2

5.3 สาร ZYM A และZYM B

6. ถาดรังผึ้ง

7. โปรแกรม Identification software หรือ API staph analytical profile index

วิธีการทดสอบ

1) การเตรียม Strip

เตรียมถาดรังผึ้งที่มาพร้อมชุดทดสอบโดยเติมน้ำกลั่นหรือน้ำ demineralized หรือน้ำที่ไม่มีสารเคมีเจือปนที่อาจจะปล่อยแก๊สเช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำ strip วางลงบนถาด

2) การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร Columbia blood agar หรือ P agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปิดฝา ampoule API staph medium เขี่ยเชื้อลงในอาหาร เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5

3) การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API staph strip

นำเชื้อที่ต้องทดสอบมาใส่ในหลอด (cupule) โดยเอียงถาดตั้งขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ แล้วใช้ปิเปตหยดสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้ข้างต้นตรงด้านข้างของหลุมทดสอบและเติมให้ครบทุกหลุม หยด Mineral oil ลงในช่องที่ขีดเส้นใต้ คือ ADH และ URE แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4) การอ่านและแปรผล

หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ให้หยดสารเคมีตามลำดับดังนี้

- หยด VP1 และVP2 ลงในช่อง VP อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพู-สีม่วง ให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก
- หยด NIT1 และNIT2 ลงในช่อง NIT อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ถ้าเป็นสีชมพูอ่อน ให้อ่านผลการทดลองเป็นลบ
- หยด ZYM A และZYMB ลงในช่อง PAL อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วง ให้บันทึกการทดลองเป็นผลบวก

ส่วนในหลอดอื่นที่มีสีของสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีแดง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ ส่วนในหลอด ADH และ URE ซึ่งมีสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีเหลือง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง-ส้มหรือสีแดง-ม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ แล้วอ่านค่าแล้วแปรผลต่อไป

การแปรผลโดยใช้โปรแกรม Identification software หรือ API Staph Analytical Profile Index โดยใส่เป็นเครื่องหมายบวกหรือลบ หรือใส่เป็นตัวเลข 7 ตัว (numerical profile) ซึ่งตัวเลขสามารถคำนวณได้ดังนี้คือ ในกระดาษบันทึกผลจะแบ่งการทดสอบเป็นกลุ่ม ๆ โดยใน 1 กลุ่มจะประกอบด้วย 3 การทดสอบ ให้ค่าเป็น 1, 2 และ 4 เหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นให้นำเลขของผลการทดสอบในช่องที่เป็นบวกมารวมกัน 1 แถบ strip จะได้ 7 หมายเลขด้วยกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 คุณภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์ของเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ค่า a_w ของตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อวัวสดอยู่ในช่วง 0.991-0.997 (ตารางที่ 4.1) ในบรรดาตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ แหนมมีค่า a_w ต่ำที่สุด (0.964) ตัวอย่างเนื้อหมูและเนื้อวัวสดค่อนข้างมีพีเอชเป็นกรดคือมีค่าพีเอชเฉลี่ย 5.75 และ 5.80 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตัวอย่างแหนมและเบคอนมีค่าพีเอชต่ำกว่า (ค่าพีเอชเฉลี่ย 4.64 และ 5.46 ตามลำดับ) ปริมาณไนไตรท์ตกค้างในแหนมและเบคอนพบว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (0.35-23.26 mg/kg) แต่ตรวจไม่พบไนไตรท์ตกค้างในเนื้อหมูและเนื้อวัวสด จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อหมูและเนื้อวัวสดพบว่ามีปริมาณมาก (สูงถึง 10^9 CFU/g) กว่าในแหนมและเบคอน (ตารางที่ 4.1) โดยมีจำนวน Micrococcaceae สูงถึง 10^7 CFU/g แต่จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน Micrococcaceae ในแหนมและเบคอนมีปริมาณต่ำกว่าซึ่งสัมพันธ์กับค่า a_w และค่าพีเอชที่ต่ำกว่าของเนื้อหมูและเนื้อวัวสด ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Micrococcaceae (แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม) จำนวน 200 ไอโซเลตไปทำการศึกษาคุณลักษณะต่อไป

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย Micrococcaceae

แบคทีเรีย Micrococcaceae จำนวน 147 จาก 200 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) ขณะที่แบคทีเรีย Micrococcaceae จำนวน 53 จาก 200 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (gram-positive, catalase-positive cocci; GCC) จำนวน 147 ไอโซเลตนี้ถูกคัดเลือกมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสพบว่า แบคทีเรียนี้จำนวน 73 ไอโซเลต (49.66%) จาก 147 ไอโซเลตไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase-negative cocci; GNC) จากนั้นจึงได้แยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* พบว่า 57 ไอโซเลต (78.08%) จาก 73 GNC isolates เป็น coagulase-negative *Micrococcus* ขณะที่ 16 ไอโซเลต (21.92%) จาก 73 GNC isolates เป็น coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 คุณภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์ของเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ชนิดของตัวอย่าง (จำนวนตัวอย่าง)	Physicochemical characteristics			Microbiological characteristics		
	ค่า a_w	ค่า pH	ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง (mg/kg)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g)	จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมด (CFU/g)	Micrococcaceae ที่คัดเลือก (ไอโซเลต)
เนื้อวัวสด (10)	0.991-0.995	5.50-5.98	0	$1.2X10^7$-$1.8X10^9$	$2.2X10^4$-$9.6X10^6$	80
เนื้อหมูสด (10)	0.992-0.997	5.30-6.18	0	$3.7X10^6$-$1.7X10^9$	$1.8X10^4$-$1.0X10^7$	90
แหนม (10)	0.964-0.972	4.45-5.20	1.40-4.56	$3.2X10^7$-$1.1X10^8$	$5.0X10^3$-$2.9X10^4$	30
เบคอน (10)	0.979-0.989	4.98-6.02	0.35-23.26	$2.7X10^6$-$5.4X10^7$	<2500	0
ทั้งหมด (40)	-	-	-	-	-	200

4.3 การคัดเลือกและจำแนกชนิดของ coagulase-negative staphylococci

แบคทีเรีย *Staphylococcus* ทุกไอโซเลตได้ถูกนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสไนไตรท์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส ผลปรากฏว่า แบคทีเรีย *Staphylococcus* ทุกไอโซเลตสร้างไนเตรทรีดักเทสได้ จากนั้นจึงได้ทำการจำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบ *Staphylococcus* ทุกไอโซเลต API Staph พบว่าเป็น *S. xylosus* (43.75%), *S. saprophyticus* (12.50%), *S. lentus* (12.50%), *S. cohnii* ssp. *urealyticum* (12.50%), *S. cohnii* ssp. *cohnii* (6.25%), *S. haemolyticus* (6.25%) และ *S. lugdunensis* (6.25%) (ตารางที่ 4.2) มีเพียง 1 ไอโซเลตจาก 16 ไอโซเลต คือ (*S. xylosus* C0903) ที่สร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสและไม่สร้างและเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในอาหารหมัก ดังนั้น *S. xylosus* C0903 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การคัดเลือกและจำแนกชนิดของ coagulase-negative staphylococci

คุณลักษณะ	ไอโซเลตของแบคทีเรีย Coagulase-negative *Staphylococcus*						
	S. cohnii ssp. *cohnii*	*S. cohnii* ssp. *urealyticum*	*S. haemolyticus*	*S. lentus*	*S. lugdunensis*	*S. saprophyticus*	*S. xylosus*
รหัสไอโซเลตของแบคทีเรีย[a]	C0204	P0204, P0205	S0902	S0301, C0209	C0608	S0804,C0206	S0802, C0609 C0903, C0904 C0907, P0202 P0207
Nitrate reductase	+	+	+	+	+	+	+
Amino acid decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+ (6 isolates), - (1 isolate)[b]
Identity (%)	98.5%	77.1%, 86.1%	62.9%	99.6%, 97.6%	93.9%	94.4%, 97.6%	83.8-99.9%

[a] แหล่งที่มาของเชื้อ: รหัสที่ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวแรก C, แยกได้จากเนื้อวัวสด; P, แยกได้จากเนื้อหมูสด; S, แยกได้จากแหนม [b] *S. xylosus* C0903 แยกได้จากเนื้อวัวสดซึ่งสร้างไนไตรท์รีดักเทสและไม่สร้างอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส

ในการศึกษานี้พบแบคทีเรีย Micrococcaceae จำนวนมากในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มเชื้อ Micrococcaceae รวมถึง *Micrococcus* และ *Staphylococcus* มักจะพบบ่อยในเนื้อ (Jay และคณะ, 2005) เนื้อสดมักจะปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียนี้จากอากาศ ดิน หนังสัตว์และทางเดินอาหารของสัตว์ (Holzapfel, 1998) ส่วนใหญ่แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือเข้มข้นสูง (Banwart, 1989) แบคทีเรีย Micrococcaceae จำนวนมากพบในเนื้อเค็มและเนื้อสดเนื่องจากเชื้อนี้ไม่ถูกยับยั้งโดยโซเดียมคลอไรด์ ความดันออสโมติกและการทำแห้งบางส่วน (Carrascosa and Cornejo, 1991) จากการศึกษานี้มีเพียง *S. xylosus* C0903 ซึ่งได้จากเนื้อวัวสดที่สร้างไนไตร์ตรีดักเทส แต่ไม่สร้างอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในอาหารหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine) เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีโครงสร้างเป็น aliphatic, aromatic หรือ heterocyclic ซึ่งพบได้ในอาหารหลายชนิด (Suzzi และ Gardini, 2003) เช่น ปลา ผลิตภัณฑ์ปลา ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ไข่ เนยแข็ง ผักดอง ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง เบียร์และไวน์ (Shalaby, 1996) ซึ่งส่วนใหญ่สารเหล่านี้ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโน โพลีเอมีน (polyamine) (Suzzi และ Gardini, 2003) ไบโอเจนิกเอมีนที่สำคัญที่สุดซึ่งเกิดขึ้นในอาหาร ได้แก่ ฮีสตามีน (histamine) พิวตริซีน (putrescine) คาดาวารีน (cadavarine) ไทรามีน (tyramine) ทริปตามีน (tryptamine) บีต้าเฟนิลเอทิลเอมีน (β-phenylethylamine) สเปอร์มีน (spermine) และสเปอมิดีน (spermidine) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไบโอเจนิกเอมีนในอาหารได้แก่ การมีกรดอะมิโนอิสระ การมีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถดีคาร์บอกซิเลตกรดอะมิโนและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์นั้น (Shalaby, 1996) ได้มีผู้รายงานการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในอาหาร เช่นไส้กรอกแห้งโดยจะต้องมี precursor (เช่น กรดอะมิโน) และสภาวะที่เหมาะสม เช่นมีจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสได้ (amino acid decarboxylase) ซึ่งอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการดึงหมู่คาร์บอกซิล (Bover-Cid และคณะ, 2001) ถึงแม้ว่าเอมีนมักจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสลายหรือการเน่าเสียซึ่งก่อให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนอิสระจากกระบวนการย่อยโปรตีนร่วมกับการผลิตเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสและการกระทำของเอนไซม์ชนิดนี้แต่ก็อาจเกิดฮีสตามีนปริมาณมากก่อนที่จะเห็นว่าอาหารเกิดการเน่าเสียหรือลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับ (Shalaby. 1996) นอกจากนี้การมีโปรตีนและเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระหว่างการบ่มจะทำให้เกิด precursor สำหรับปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยกล้าเชื้อจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ประจำถิ่นเช่นกัน (Bover-Cid และคณะ, 2001) ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเพราะเป็นพิษ อาจทำให้เกิดอาการแพ้ ปวดหัว ไมเกรน เพิ่มความดันโลหิตและอื่นๆ (Shalaby, 1996) ปัจจุบันไบโอเจนิกเอมีนเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะผู้บริโภคจำนวนมากแพ้สารไบโอเจนิกเอมีนเนื่องจากในร่างกายของผู้บริโภคเหล่านั้นขาดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (amine oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการขจัดความเป็นพิษของสารเหล่านี้ (Suzzi และ Gardini. 2003)

การมีกรดอะมิโนอิสระและการมีจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสได้สามารถก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมันได้ (Ammor และ Mayo, 2007) ดังนั้น *S. xylosus* C0903

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งไม่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมัก ยิ่งกว่านั้นการที่แบคทีเรียนี้สร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและไนไตร์ตรีดักเทสจึงเหมาะสมเพราะอาจทำให้เกิดการพัฒนาสีที่ดีและช่วยลดปริมาณไนไตร์ตตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้พบว่ามี *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสเพียง 1 ไอโซเลต คือ *S. xylosus* C0903 ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมได้แก่ สร้างเอนไซม์ไนไตรทรีดักเทสซึ่งอาจช่วยทำให้เกิดการพัฒนาสีที่ดี สร้างไนไตรท์รีดักเทสซึ่งช่วยลดปริมาณไนไตท์ตกค้างและไม่สร้างและเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ดังนั้น *Staphylococcus* สายพันธุ์นี้อาจเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ อย่างไรก็ตาม ควรคัดเลือกเชื้อชนิดอื่นเช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมนำมาใช้ร่วมกัน และทดลองใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักร่วมกับสารทดแทนไนไตรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

บวร ศาตะนิมิ. 2547. "ผลของโกลบินหมู แอลฟาโทโคเฟอรอล และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อคุณภาพไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ลดไนไตรท์." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เยาวลักษณ์ สุพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** กรุงเทพ ฯ : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มอก. 848-2532. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแฮม.** กรุงเทพ ฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ภัณฑ์อุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม.

เศรษฐศิลป์ อัมมวรรธน์. 2546. **ผลของปริมาณไนไตรท์ต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2543. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์.** เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Adams, M.R. and Moss, M.O. 2008. "**Food Microbiology**. " 3rd ed. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as function starter cultures in dry sausage production: An update." **Meat Science**. 76: 138-146.

Axelsson, L. 2004. "Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology." 1-66. in Salminen, S., Wright, A. V. and Ouweland, A. **Advance in Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects.** New York : Marcel Dekker.

Baker, J.S. 1984. "Comparison of various methods for differentiation of Staphylococci and Micrococci." **Journal of Clinical Microbiology**. 19: 875-879.

Bennett, R. W., Lancette, G. A. 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manual (BAM). Available from: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm

Banwart, G. 1989. "**Basic Food Microbiology**". New York : Van Nostrand Reinhold.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." **International Journal of Food Microbiology**. 53 : 33-41.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. 2001. "Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality." **Journal of Food Protection.** 64 : 367-373.

Carrascosa, A.V. and Carnejo, I. 1991. "Characterization of *Micrococcaceae* strains selected as potential starter cultures to Spanish dry cured ham process". **Fleishwirtsch.** 71: 1187-1180.

Chung, H.S. Kim, Y.B., Chun, S.L. and Ji, G.E. 1999. "Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. " **International Journal of Food Microbiology.** 49 : 25-32.

Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G. and Villani, F. 2000. "Microbial succession during ripening of Naple-type salami, a southern Italian fermented sausage." **Meat Science.** 56: 321-329.

Dethmers, A.E. and Rock, H. 1975. "Effect of added sodium nitrite and sodium nitrate on sensory quality and nitrosamine formation in Thuringian sausage." **Journal of Food Science.** 40 : 491.

De Vuyst, L. and Vandammo, E.J. 1994. "**Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Application.**" London : Blackie Academic and Professional Publishers.

Fiddler, W.I., Piotroorsk, E.G., Pensabene, J., Doerr, W. and Wesserman, A.E. 1972. " Effect of sodiumnitrite concentration on n-nitrosodimethylamine formation in frankfurter." **Journal of Food Science.** 37 : 668.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1979. "**International Journal of Food Microbiology**". New York. : McGraw-Hill

Forbes, B.A., Sahm. D.F. and Weissfeld, A.S. 2007. "**Diagnostic Microbiology**". 12st ed. St. Louis : Mosby Elsevier

Gill, C.O. and Jones, T. 1995. "The presence of *Aeromonas, Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants." **International Journal of Food Microbiology.** 12 : 135-141.

Gøtterup, J., Olsen, K., Knøchel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H. and Møller, J.K.S. 2007. "Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system." **International Journal of Food Microbiology.** 120: 303-310.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hammes, W.P. and Knauf, H.J. 1994. "Starters in the processing of meat products." **Meat Science.** 36 : 155-168.

Harrigan, W.F. 1998. **"Labboratory Method in Food and Dairy Microbiology."** 3rd ed. Great Britain : WBC Book.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. **"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology."** 9rd ed. Maryland, USA. William & Wilkins.

Holzapfel, W.H. 1998. " The gram-positive bacteria associated with meat and meat products." 35-74. in Davies, A. and Board, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London : Blackie Academic & Professional.

Huhas, M. and Monfort, J.M. 1997. " Bacterial starter cultures for meat fermentaion. " **Food Chemistry.** 59 : 547-554.

Irlinger, F. 2008. " Saftey assessment of dairy microorganism:Coagulase-negative staphylococci. " **International Journal of Food Microbiology.** 126 : 302-310

Jay, M.J., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. "**Modern Food Microbiology.**" New York : AVI Book.

Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. 2001. "Healthier meat and meat products: their role as functional foods." **Meat Science** 59 : 5-13.

Kirk, R. S. and Sawyer, R. 1991. **"Pearson's Composition and Analysis of Foods."**Essex, England: Longman Scientific & Technical.

Kröckel, L. 1995. "Bacteria Fermentation of Meats." 69-101. in Campbell-Platt, G. and Cook, P. E. **Advances in fermented meats.** Great Britain : Blackie Academic and Professional.

Leroy, F., Verluyten, J. and Vuyst, L. D. 2006. "Funtionnal meat stater cultures for improved sausage fermention." **International Journal of Food Microbiology.** 106 : 270-285.

Marshall, D.L. and Bal' A, M.F. 2001. "Microbiology of Meat." 151-152. in Hui, Y. H., Nip, W. K., Roger, R. W. and Young, O. A. **Advantsces in meat science and applications.** New York : Marcel Dekker.

Miralles, M. C., Flores, J. and Perez-Martinez, G. 1996. "Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures." **Food Microbiology.** 13: 227-236.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salome, J.P., Amuta, R., Jagannathan, P., Josiah, J.J.M. and Berchmans, S and Yegnaraman, V 2009. "Electrochemical assay of nitratrate and nitrite reductase activities of Rhizobium japonicum." **Biosensors and Bioelectronics.** 24 : 3487-3491.

Schillinger, U. and Lücke F.K. 1989. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology.** 55(8) : 1901-1906.

Shalaby, A.R. 1996. "Significant of biogenic amines to food industry and human health." **Food Research International** . 29 (7) : 675-690

Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. "Biogenic amines in dry fermented sausages : a review." **International Journal of Food Microbiology.** 88 : 41–54.

Walters, C.L. 1991. "Nitrate and nitrite in food" 93-107. in Hill, M.J. **Nitrates and Nitrites in Food and Water**. West Sussex, England : Ellis Horwood Limited

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้