สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัย) ภาษาไทย (การลดปริมาณไนไตรต์ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มโดยใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสร่วมกับการใช้สารทดแทนไนไตรต์ชนิดอื่น

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

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง กันยายน พ.ศ. 2553

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, essential oil

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ coagulase-negative staphylococci จากเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอนและแหนมจำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทย ซึ่งได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 403 ไอโซเลตและ Micrococcaceae จำนวน 250 ไอโซเลตนำมาศึกษาคุณลักษณะ จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 11 ชนิด ด้วยเทคนิค agar spot test นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลส จากนั้นนำมาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก 184 ไอโซเลต (ร้อยละ 45.66 ของ 403 ไอโซเลต) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และ 25 ไอโซเลตจาก 184 ไอโซเลต (ร้อยละ 13.59) สร้างไนเตรทรีดักเทสแต่ไม่สร้างอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลสซึ่งจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในอาหารหมัก แบคทีเรียกรดแลคติก 10 ไอโซเลตซึ่งมีความสามารถสูงในการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติกและเกลือน้ำดีได้ถูกคัดเลือกมาศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินโดยเทคนิค agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้บางชนิดมีจำนวน 4 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต B0410, S0602, T0903 และ T0904 เมื่อนำมาจำแนกชนิดพบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตนี้เป็น *Lactobacillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เลขทะเบียน 116091
วัน,เดือน,ปี - 2 พ.ค. 2554
RCH TX 572 .N5 ส867ก 2553 ฉ.1

b.12913658
i.

plantarum (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.6) *Lactobacillus plantarum* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.9) *Lactobacillus brevis* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 62.5) และ *Lactobacillus brevis* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.6) ตามลำดับ ส่วนเชื้อ coagulase-negative staphylococci ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลสได้ถูกจำแนกชนิดพบว่าเป็น *S. xylosus* (ร้อยละ 43.75 ของ 16 ไอโซเลตที่คัดเลือก) *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) แต่มีเพียง 1 ไอโซเลตจาก 16 ไอโซเลต คือ *S. xylosus* C0903 ที่ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส ดังนั้น *Staphylococcus* สายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์เดียวที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

ในการศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ 16 ชนิดโดยน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 8ชนิดได้แก่ เทียนสัตตบุษย์ (*Pimpinella anisum*) เร่ว (*Amomum xanthioides*) อบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) เทียนตาตั๊กแตน (*Anethum graveolens*) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ขมิ้นอ้อย *(Curcuma zedoaria)* พริกหอม (*Zanthoxylum limonella*) และกระทือ)*Zingiber zerumbet*) พบว่า น้ำมันอบเชยมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียที่มีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากที่สุด คือ *Bacillus cereus* ซึ่งมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันอบเชย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันพริกหอมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เชื้อราที่มีความไวต่อน้ำมันเหล่านี้ คือ *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus ochraceus* และ *Fusarium moniliforme* และเมื่อทดสอบหาค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ของน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ กับน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมพบว่าค่า FICI มีค่าอยู่ระหว่าง 0.38-0.32มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลเสริมฤทธิ์กันเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Salmonella* Rissen นอกจากนี้ยังได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันพริกหอมมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าน้ำมันทั้งสามชนิดนี้มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 5.66-0.29มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธี β-carotene bleaching ได้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 68.52-61.46วิธี FRAP สามารถเปลี่ยน Fe^{3+}-TPTZ ให้เป็น Fe^{2+}-TPTZ ได้ค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.1-0.221 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ในขณะที่น้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี superoxide anion-scavenging activity ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 84.30 และ 82.62 ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในปริมาณสูงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 140.9-51.540 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งแบคทีเรียก่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรค และแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารจำลองต่างชนิดกันได้แก่ starch agar, meat agar และ sausage agar ด้วยวิธี agar dilution พบว่าเชื้อ *Salmonella* Senftenberg, *Sal.* Rissen, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร sausage agar (มีค่า MIC เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหารชนิดอื่น ในขณะที่เชื้อ *Sal.* Senftenberg มีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร starch agar มากที่สุด (MIC 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าเชื้อ *Sal.* Rissen มีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศมากที่สุดในอาหาร sausage agar (MIC เท่ากับ 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ทดสอบ (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium*) พบว่ามีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศมากกว่าแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร sausage agar มากที่สุด แต่กลับมีความไวต่อน้ำมันอบเชยเมื่อทดสอบบนอาหารชนิดเดียวกัน

การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *S. xylosus* C0903 (10^6 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* S0602 (10^6 CFU ต่อกรัม) ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (50 ppm และ 500 ppm) และน้ำมันอบเชย (1008 ppm) ในฐานะของสารทดแทนไนไตรท์ต่อการลดลงของไนไตรท์ตกค้างและการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Salmonella* Schwarzengrund ในไส้กรอกอีสานระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสปรากฏว่า การใส่กล้าเชื้อมีผลทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงเฉพาะในไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 50 ppm แต่การใส่กล้าเชื้อหรือไม่ใส่กล้าเชื้อไม่มีผลทำให้ค่าพีเอชแตกต่างกัน และการเติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm ให้ผลในการลดจำนวน *S. aureus* ที่มีชีวิตในไส้กรอกอีสานได้ดีกว่าการไม่เติม ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันอบเชยมาใช้ทดแทนโซเดียมไนไตรท์ในไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The aims of this study were to screen lactic acid bacteria (LAB) and coagulase negative staphylococci (CNS) from 50 samples of raw beef, raw pork, bacon, Nham and Saigoyisan (Thai fermented pork sausage) to select the most suitable strains for use as starter cultures in Thai fermented meat products. A total of 403 LAB and 250 Micrococcaceae isolates were isolated and characterized. The isolates of LAB were screened for inhibitory activity against 11 bacterial species by agar spot test. The selected LAB and CNS isolated were tested for the production of enzymes such as catalase, nitrate and nitrite reductase and amino acid decarboxylase. They were identified by morphological and biochemical test. The 184 LAB isolates (45.66% of 403 isolates) were able to inhibit at least one of 11 indicator organisms by agar spot test. Twenty-five isolates (13.59% of 184 isolates) were nitrate reductase positive and amino acid decarboxylase negative which may not accumulate biogenic amine in fermented foods. Ten selected LAB had high ability to tolerate hydrochloric acid, lactic acid, sodium chloride and bile salts were selected for bacteriocin production. Only 4 isolates (the isolates B0410, S0602, T0903 and T0904) could produce bacteriocins to inhibit growth of some indicator bacteria by agar well diffusion technique. They were identified as *Lactobacillus plantarum* (99.6% similarity) *Lactobacillus plantarum* (99.9 similarity) *Lactobacillus brevis* (62.5% similarity) และ *Lactobacillus brevis* (99.6% similarity). The CNS which were catalase, nitrate and nitrite reductase and amino acid decarboxylase positive were identified as *S. xylosus* (43.75% of 16 selected CNS isolates) *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%). Only one CNS strain, *S. xylosus* (C0903) that could not produce the latter enzyme was the most suitable *Staphylococcus* strain to be use as meat starter culture.

Eight essential oils of anise (*Pimpinella anisum*), bastard cardamom (*Amomum xanthioides*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), dill (*Anethum graveolens*), mace (*Myristica fragrans*), zedoary *(Curcuma zedoaria*), *Zanthoxylum limonella* and *Zingiber zerumbet* were determined for their antimicrobial activity against 16 microorganisms. Of all, cinnamon oil had the highest antibacterial activity. The most sensitive bacterium was *Bacillus cereus* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mg/ml. Oils of anise, cinnamon, dill, mace and *Z. limonella* exhibited strong antifungal activity. The most susceptible fungal species to these oils were *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium moniliforme*. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of cinnamon oil mixed with mace oil, and cinnamon

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oil mixed with *Z. limonella* was in the range of 0.32-0.38 mg/ml, showing a synergistic effect against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Rissen. Antioxidant activity of these oils was studied. Compared to other oils, oils of cinnamon, mace and *Z. limonella* had stronger antioxidant activity with 0.29-5.66 mg/ml IC_{50} (by DPPH method), 61.46-68.52% antioxidant activity (by β-carotene bleaching method) and 0.22-2.11 mM/mg reducing capacity (by FRAP method), while oils of cinnamon and *Z. limonella* showed percentage of inhibition with 84.30% and 82.62% (by superoxide anion-scavenging activity), respectively. These oils also contained high amount of total phenolics (51.54-140.90 µg gallic acid/mg oil). In addition, antibacterial effect of cinnamon oil and mace oil on different food model media (starch agar, meat agar and sausage agar) against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria was evaluated by agar dilution. *Salmonella* Senftenberg, *Sal.* Rissen, *S. aureus* and *L. monocytogenes* were more sensitive to cinnamon oil on sausage agar (MIC 0.063 mg/ml) than the others. *Sal.* Senftenberg was the most resistant bacteria to cinnamon oil with MIC value of 14 mg/ml on starch agar, while *Sal.* Rissen was the most resistant bacteria to mace oil on sausage agar (MIC 22 mg/ml). All lactic acid bacteria tested (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*) were more resistant to cinnamon and mace oils than pathogenic bacteria. Among all food model media, most of lactic acid bacteria had the highest resistance to mace oil, but showed sensitivity to cinnamon oil on sausage agar.

The effect of starter culture (*S. xylosus* C0903 and *L. plantarum* S0602, 10^6 CFU/g each) combined with sodium nitrite (50 and 500 ppm) and cinnamon oil (1008 ppm) as nitrite substitute on decreasing of residual nitrite and inhibiting growth of pathogenic microorganisms in fermented pork sausages inoculated with *S. aureus* and *Salmonella* Schwarzengrund during fermentation at 30°C were studied. Addition of starter culture could reduce residual nitrite only in the sausages added with 50 ppm sodium nitrite, but it did not affect final pH of fermented sausages. In addition, cinnamon oil (1008 ppm) added in the sausages caused greater decrease of *S. aureus* viable cells, compared to the samples without cinnamon oil. Therefore, cinnamon oil could be used as nitrite substitute in the fermented pork sausage.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	49
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	81
บรรณานุกรม	82

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 มีความเป็นโพรไบโอติก (Leroy และคณะ, 2006) มีกิจกรรมสลายโปรตีนและไขมัน การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส (Holzapfel, 1998) เป็นต้น

การนำแบคทีเรียมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักที่ดีต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของแบคทีเรีย คือต้องสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายโดยสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วหรือสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (สารแบคเทอริโอซิน) ต้องมีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก (Ammor และ Mayo, 2007) ต้องสามารถทนต่อกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและทนต่อน้ำดีในลำไส้เล็กได้ (Goldin และ Gorbach, 1992) และต้องคำนึงถึงการสร้างไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ในอาหารซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ที่สามารถดีคาร์บอกซิเลชันกรดอะมิโนได้ ไบโอเจนิกเอมีนเป็นพิษก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกต้องสามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในวัตถุดิบและมีกิจกรรมเมแทบอลิกโดยสามารถเจริญและอยู่รอดในสภาวะการผลิตอาหารหมักได้ เช่น ต้องสามารถทนต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือสูง (Lücke และ Hechelmann, 1987 ; Montel, 1999) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียมาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตอาหารหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกและ Coagulase negative Staphylococci ก็มีคุณสมบัติหลายประการที่เหมาะแก่การเป็นกล้าเชื้อซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่มีคุณภาพและปลอดภัย (Huhas และ Monfort, 1997) โดยเฉพาะการมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและไนไตรท์รีดักเทส (Holzapfel, 1998)

เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสมีคุณสมบัติเร่งให้ไนเตรทที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนเป็น ไนไตรท์ก่อนจะเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ซึ่งเมื่อรวมตัวกับไมโอโกลบิน (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) ในอาหารและเมื่อไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับเอมีนจะทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Walters, 1991) ส่วนเอนไซม์ ไนไตรท์รีดักเทสพบว่ามีความสำคัญในการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างที่คงอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม(Gøtterup และคณะ, 2007)

การพยายามที่จะลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในเนื้อสัตว์บ่มเพื่อลดอันตรายจากสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่อาจเกิดขึ้นได้ การใช้แบคทีเรียที่สร้างไนไตรท์รีดักเทส อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพอย่างไรก็ตามไม่ควรงดการใช้ไนไตรท์ไปเสียเลยเนื่องจากไนไตรท์สามารถทำหน้าที่ได้ดีหลายประการเช่นทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีสีชมพูสวยและให้กลิ่นรสที่ดี ช่วยต้านออกซิเดชันของไขมัน และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตรายได้ดีเช่น *Clostridium botulinum*

แบคทีเรีย Coagulse-negative staphylococci (CNS) เป็นแบคทีเรียใน family Micrococcaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม สร้างคะตะเลส (gram-positive, catalase-positive cocci; GCC) (Jay และคณะ, 2005) CNS เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ มีบทบาทสำคัญในการสร้างสี กลิ่น และรสในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (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

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ coagulase negative staphylococciจากเนื้อสด และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่มีการเติมไนเตรตและไนไตรต์ ศึกษาคุณสมบัติ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติเหมาะสมและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้

2. เพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชันได้สูงเพื่อใช้เป็นสารทดแทนไนไตรท์

3. เพื่อทดลองนำแบคทีเรียที่มีสมบัติเหมาะสมที่คัดเลือกมาใช้ทดแทนหรือใช้ร่วมกับสารทดแทนไนไตรต์บางส่วนในการศึกษาการลดลงของไนไตรต์ตกค้างและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน

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 และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ อย่างเช่น *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

2.1.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มได้แก่ ไส้กรอกอีสาน แหนม ปลาร้า เป็นต้น ผ่านกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย แต่ในระยะหลังได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำกล้าเชื้อไปใช้ในการผลิตอาหารหลายชนิดรวมถึงในกลุ่มอาหารหมักพื้นเมือง (De Vuyst และ Vandamme, 1994 ; Hammes และ Knauf, 1994) ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพในเช่น ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติมักจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกพวก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ *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) ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ส่วนใหญ่จะใช้ไนเตรทเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing Micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians, Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus* หรือ *Staphylococcus piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสีเหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิด การหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย ลงไป (Marshall และ Bal'A, 2001)

2.2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมัก

2.2.1 คุณสมบัติของกล้าเชื้อจุลินทรีย์

2.2.1.1 การผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 เช่นในแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด อย่าง *Lb. curvatus* และ *Lb. plantarum* แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ใน *Lb. sake, S. carnosus* และ *S. piscifermentans* (Holzapfel, 1998)

2.2.1.5 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทและไนไตรท์รีดักเทส (nitrate and nitrite reductase)

การสร้างเอนไซม์ไนเตรทและไนไตรท์รีดักเทสอาจมีส่วนช่วยให้เกิดสีชมพูในผลิตภัณฑ์เนื้อเช่น 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)

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

2.2.1.7 มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่ถูกใช้ในร่างกายคนและสัตว์ ทำให้สุขภาพร่างกายดีเนื่องจากการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดีนิยมนำมาเป็นกล้าเชื้อทั้งในอาหารคนและสัตว์ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lb. sakei* Lb 3 และ *P. acidilactici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ส่วนรูปร่างและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรด แลคติกจัดเป็นแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียกรด แลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และ ฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะตะเลสและออกซิเจน แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดสร้างออกซิเจนเปอร์ออกไซด์จากการหมักน้ำตาลให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกจะพบในอาหารที่มีสารอาหารสูงเช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด จำพวกนม เนื้อสัตว์ เครื่องดื่ม และผัก แต่บางชนิดพบว่าเป็นจุลินทรีย์ในธรรมชาติเช่น จุลินทรีย์ที่พบในปาก ลำไส้ และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Axelsson, 2004)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกถึงระดับสกุลนั้นกล่าวถึงลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกคุณลักษณะและยังคงความสำคัญในการใช้อธิบายสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสามารถแบ่งได้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อน (rod) เช่น *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* และรูปกลม (cocci) ยกเว้นสกุล *Weissella* ที่สามารถรวมทั้งรูปกลมและรูปท่อน นอกจากนี้ยังมีการแบ่งเซลล์ทั้งสองระนาบซึ่งใช้จำแนกในแบคทีเรียรูปร่างกลม การเกิดรูปร่างเกาะกัน 4 เซลล์ ซึ่งพบในสกุล *Aerococcus, Pediococus* และ *Tetragenococcus* คุณลักษณะอีกประการหนึ่งที่ใช้จำแนกความแตกต่างของสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ บทบาทการหมักของน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะที่ไม่จำกัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต เช่นกรดอะมิโน วิตามิน และสารตั้งต้นของกรดนิวคลีอิกแต่ละจำกัดออกซิเจน นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในที่มีอุณหภูมิที่แตกต่างกันและความสามารถในการทนกรดและด่างก็สามารถใช้ในการจำแนกสกุลได้เช่นกัน (Axelsson, 2004)

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

2.2.2.2 แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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* ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (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 ได้แนะนำว่า *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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[6]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* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสไม่ได้เป็นแบคทีเรียก่อโรคเพราะไม่พบรายงานเกี่ยวข้องอย่างโรคอาหารเป็นพิษทั้งในนมและผลิตภัณฑ์นม แต่อย่างไรก็ตามการรายงานดังกล่าวต้องเปลี่ยนแปลงไปเพราะมีหลักฐานเพิ่มขึ้นที่แสดงให้เห็นว่า *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสทำให้เกิดโรคได้ในคนจากการสร้างสารเอนเทอโรทอกซิน (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 แต่การใช้เกลือในระดับสูงเกินไปนั้นอาจทำให้สารสีไมโอโกลบินเกิดการออกซิไดซ์ ทำให้เนื้อมีสีที่ไม่น่ารับประทาน (สัญชัย, 2543; Jay และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับไนไตรท์เช่นกรดซอร์บิกเพราะมีคุณสมบัติในการถนอมอาหาร (Jay และคณะ, 2005)

2.3.1 ไนเตรท (nitrate) และ ไนไตรท์(nitrite)

ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปของสารประกอบโซเดียมไนเตรทหรือโปแตสเซียมไนเตรท และสารประกอบโซเดียมไนไตรท์หรือโปแตสเซียมไนไตรท์ เป็นส่วนประกอบที่เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม เพื่อปรับหรือแปรสภาพรสชาติของผลิตภัณฑ์ ซึ่งนอกจากจะเป็นสารที่ช่วยปรุงแต่งรสชาติแล้ว ยังใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ ลักษณะทั่วไปของโซเดียมไนเตรทจะเป็นผงหรือ granule สีขาวไม่มีสี ส่วนโปแตสเซียมไนเตรทจะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือผงสีขาว สำหรับโซเดียมไนไตรท์นั้นจะดูดความชื้นและละลายได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง่าย ลักษณะสีขาวหรือสีเหลืองและอาจมีผลึกรูป cylindrical stick ปัจจุบันมีผงเพรค (praque powder) เป็นผงทางการค้าประกอบด้วยสารไนเตรทและไนไตรท์และfiller อื่น ๆ ที่เป็นส่วนผสมเพราะมีผลในการเร่งการแตกตัวของ ไนไตรท์ แล้วแตกตัวเป็นไนตริกออกไซด์เร็วขึ้นและมากขึ้น จึงเกิดสีได้เร็วและมีไนไตรท์ตกค้างเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์น้อยลง โดยอธิบายคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มรสชาติ (taste) และกลิ่นรส (flavor) แก่ผลิตภัณฑ์ให้มีกลิ่นเฉพาะตัวเป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภคมากกว่าการใช้เกลือเพียงอย่างเดียว (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 โดยพบว่าไนไตรท์สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีธาตุเหล็กเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเติมไนไตรท์จะทำให้เกิดไนตริกออกไซด์อิสระที่สามารถรวมกับอนุมูลอิสระเกิดเป็นสารที่มีความคงตัว ส่งผลยับยั้งการเกิดกลิ่นผิดปกติในผลิตภัณฑ์เพราะลดการเกิดเพอร์ออกไซด์ที่สลายให้สารประกอบแอลกอฮอล์ คีโตน และอัลดีไฮด์ที่เป็นสารให้กลิ่นผิดปกติ (บวร, 2547) และไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดง เนื้อผสมสารไนเตรทและไนไตรท์นั้นพบว่าการใช้ไนไตรท์จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าไนเตรท โดยในกระบวนการทางเคมีไนเตรทถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไตรท์และ ไนไตรท์สามารถออกซิไดซ์รงควัตถุในเนื้อสัตว์คือ ไมโอโกลบิน ซึ่งมีสีแดงม่วงและมีธาตุเหล็กในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ให้เป็นเมทไมโอโกลบินที่มีสีน้ำตาลซึ่งธาตุเหล็กอยู่ในรูปเฟอร์ริก (Fe^{3+}) และไนไตรท์ถูกรีดิวซ์กลายเป็นไนตริกออกไซด์ จากนั้นไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับเมทไมโอโกลบินเป็นไนโตรโซไมโอโกลบินทำให้เนื้อมีสีแดง เมื่อผ่านความร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส ไนโตรโซไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นไนโตรโซฮีโมโครมซึ่งเป็นสารที่ให้สีชมพูที่มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเค็ม (Dethmers และ Rock, 1975) ซึ่งสามารถอธิบายโดยกระบวนการต่อไปนี้ต่อไปนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

(NO). + (Mb) (NOMMb)

(4) ไนตริกออกไซม์ เมตไมโอโกลบิน (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 ออนซ์ต่อเนื้อบด 100 ปอนด์ กรณีการใช้ไนไตรท์ในเนื้อหมักให้ใช้เพียง 2 ปอนด์ต่อ 100 แกลลอนที่ระดับที่มีการฉีดเข้าเนื้อประมาณร้อยละ 10 หากใช้ไนเตรทร่วมกับไนไตรท์ต้องมี ไนไตรท์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายได้ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิน 125 ส่วนในล้านส่วนซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ หมักเมื่อผ่านความร้อน (thermal processing) ปริมาณสารไนไตรท์อิสระจะลดลงอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 20-80 และจะสูญหายระหว่างการเก็บรักษาด้วย (เยาวลักษณ์, 2536)

2.4 สารทดแทนไนไตรท์

ไนไตรท์สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เนื้อ ดังนั้นการนำสารอื่นมาใช้ทดแทนไนไตรท์ สารนั้นควรทำหน้าที่ทั้งสองประการได้เช่นเดียวกัน น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศเป็นสารที่น่าสนใจในการนำมาใช้ทดแทนไนไตรท์

2.4.1 น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

น้ำมันหอมระเหย เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของพืชซึ่ง เป็นสารประกอบที่มีความซับซ้อน ระเหยได้ มีกลิ่นแรง โดยปกติน้ำมันหอมระเหยจะได้จากการกลั่นด้วยน้ำหรือกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่งได้มีการพัฒนาเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อยุคกลางในประเทศอาหรับ น้ำมันหอมระเหยเป็นที่รู้จักกันดีในด้านของคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค เช่น ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา มีคุณสมบัติเป็นยา ทำน้ำหอม เป็นสารถนอมอาหาร สารต้านจุลินทรีย์ ยาบรรเทาปวด ยาระงับประสาท ต้านการอักเสบ ยาบรรเทากล้ามเนื้อ และรักษาอาการชาได้ ในธรรมชาติน้ำมันหอมระเหยมีบทบาทสำคัญในด้านการป้องกันพืชจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมถึงแมลงที่มาทำลายพืช อีกทั้งยังป้องกันพืชจากสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหารโดยทำให้ลดการอยากอาหารลงได้ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยยังดึงดูดแมลงบางชนิดเพื่อให้เกิดการแพร่กระจายของเกสรหรือเมล็ด หรืออาจเป็นการขับไล่แมลงอื่นๆที่ไม่ต้องการอีกด้วย น้ำมันหอมระเหยสกัดได้จากพืชหลากหลายชนิด โดยทั่วไปมักเป็นพืชที่อยู่ในประเทศในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศในเขตทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และประเทศเขตร้อนชื้น ลักษณะของน้ำมันหอมระเหย คือ เป็นของเหลว ระเหยได้ ใส ไม่ค่อยมีสี มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ ละลายได้ในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ น้ำมันหอมระเหยสามารถสร้างได้จากทุกส่วนของพืช เช่น ตา ดอก ใบ ลำต้น กิ่ง เมล็ด ผล ราก เปลือกไม้ และอาจถูกเก็บไว้ใน secretory cell ตามท่อหรือช่อง ในเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส (epidermis cell) หรือ glandular trichome (Bakkali และคณะ, 2008)

2.4.2. เครื่องเทศที่ใช้ในการทดลอง

2.4.2.1 กระทือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber zerumber* (L.) Smith ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE ชื่อท้องถิ่น กระทือป่า กะแวน กะแอน แสมดำ แฮวดำ เฮียวดำ (ภาคเหนือ) เฮียวแดง (แม่ฮ่องสอน) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินสีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบออกตรงข้ามสลับตั้งฉากกัน ใบยาวเรียวเขียวดกหนา ทึบ ซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันไปยืดยาว ช่อดอกโผล่ขึ้นจากหัวใต้ดิน อัดกันแน่นสีแดง ตอนปลายประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียวปนแดงจำนวนมาก ดอกสีขาวนวล มีลักษณะเป็นหลอดที่ปลายกลีบมีรูปร่างเหมือนปากอ้า

ส่วนที่ใช้เป็นยา หัวหรือเหง้าสด สารเคมีที่สำคัญ ในเหง้าพบน้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วยสารหลายตัว เช่น methylgingerol, zingerone และ citral เป็นต้น สรรพคุณทางยา แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อและปวดท้อง แก้บิด(ปวดเบ่งและมีมูกหรือ อาจมีเลือดปนด้วย) ใช้เหง้าสดขนาด 20 กรัม ย่างไฟพอสุก นำมาโขลกกับน้ำปูนใส ประมาณ 1/2 แก้ว (110 มิลลิลิตร) คั้นเอาน้ำมาดื่มเมื่อมีอาการ (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.2 ขมิ้นอ้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma Zedoaria* Rose. ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE ชื่อสามัญ Zedoary, Luya-Luyahan ชื่ออื่น ๆ ว่านเหลือง (กลาง) สากเบือ (ละว้า) ขมิ้นขึ้น (เหนือ) ละเมียด (เขมร) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ขมิ้นอ้อยเป็นพืชล้มลุกมีอายุได้หลายปี โดยมีความสูงราว 0.5-2.5 เมตร มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายขมิ้นชันมากแต่ต้นสูงกว่า ขนาดเหง้าและใบใหญ่กว่า เหง้ามักโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อย และมีเนื้อในสีเหลือง จัดเป็นพืชใบเดี่ยว รูปใบหอกกลับ ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ท้องใบจะมีขนอ่อนนุ่ม กลีบดอกสีนวล ใบประดับที่อยู่ส่วนล่างของช่อมีสีเขียว ปลายแกมชมพู ในฤดูแล้งใบจะแห้งลงหัวบางครั้งเรียกว่า ขมิ้นหัวขึ้น ขนาดใบกว้างราว 15-17 เซนติเมตร ยาวราว 40-50 เซนติเมตร

ดอก ออกเป็นช่อ ก้านดอกยาวแทงออกจากเหง้าที่อยู่ในดิน ช่อดอกมีใบประดับสีขาวเจือเขียว ปลายกลีบเป็นสีชมพู ใบประดับที่อยู่ส่วนบนรูปใบหอกสีแดงเข้ม กลีบดอกสีเหลืองนวลจะบานจากส่วนล่างขึ้นส่วนบน ดอกจะบานครั้งละ 2-3 ดอก ขยายพันธุ์ ด้วยเหง้า เจริญได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย ไม้พันธุ์นี้มีชื่อเรียกต่างออกไป เช่น ภาคกลางเรียก ว่านเหลือง ภาคเหนือเรียก ขมิ้นขึ้น

สรรพคุณ ส่วนที่ใช้ เหง้าที่อยู่ใต้ดิน ใช้ได้ทั้งสดและแห้ง ใช้หุงกับน้ำมันมะพร้าว นำมาใส่แผลจะทำให้แผลหายเร็ว เพราะหัวขมิ้นอ้อยนั้น มีรสฝาด (tannin) และใช้บรรเทาอาการฟกช้ำบวมได้ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหง้าสดนั้นนำมาบดแล้วนำมาผสมกับน้ำปูนใส สามารถนำมาดื่มรักษาโรคท้องร่วงได้ นอกจากนี้ยังนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.3 จันทน์เทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Myristica fragrans* Houtt. ชื่อวงศ์ MYRISTICACEAE ชื่อสามัญ ลูกจันทน์เทศ Nutmeg Tree หรือ Myristica ดอกจันทน์ Mace หรือ Macis ชื่อท้องถิ่น ลูกจันทน์ ลูกจันทน์เทศ ดอกจันทน์ ดอกจันทน์เทศ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จันทน์เทศเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่มีความสูงประมาณ 30 - 60 ฟุต ใบมีสีเขียวเข้ม รูปแบบปลายหอกใบยาวประมาณ 2 - 5 นิ้ว มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียเกิดแยกกันคนละต้น โดยดอกตัวผู้จะเกิดเป็นกลุ่ม ส่วนดอกตัวเมียจะเกิดเป็นดอกเดี่ยวๆ และมีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ ดอกสีเหลืองอ่อน กลีบเลี้ยงเชื่อมกันเป็นรูปคนโทคว่ำ ปลายแยกเป็น 3 แฉก ไม่มีกลีบดอก ต้นตัวเมียเท่านั้นที่ความสำคัญทางเศรษฐกิจ ส่วนต้นตัวผู้จะปลูกไว้สำหรับผสมเกสรกับต้นตัวเมีย ดอกจันทน์เทศจะผลิในราวเดือนมีนาคม ถึง เดือนมิถุนายน ผลมีรูปร่างเกือบกลมเป็นผลชนิดฉ่ำน้ำขนาดประมาณลูกหมาก มีสีเหลืองอมเขียว เมื่อผลสุกจะแตกออกเป็นสองส่วน ภายในมีรกหุ้มเมล็ดสีแดงสด เรียกว่า รกจันทน์ หรือ ดอกจันทน์ เมล็ดมีขนาดใหญ่ 1 เมล็ด มีเปลือกแข็งสีน้ำตาลเรียกว่า ลูกจันทน์ ต้นจันทน์เทศจะออกดอกและผลได้เมื่อต้นมีอายุราว 8-9 ปี

ส่วนที่นำมาใช้คือ "รกและเมล็ด" โดยเมล็ดที่ชาวบ้านเรียกกันว่าลูกจันทน์นั้นจะประกอบไปด้วยน้ำมันที่ไม่หอมระเหย (Fixed oil) ร้อยละ 25 – 40 ในอุณหภูมิห้องเป็นของแข็งเรียกว่า "Nutmeg butter" และมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 8 – 15 ประกอบด้วย Myristicin และ Safrole ส่วนดอกจันทน์เทศที่ชาวบ้านเรียกว่ารก (Mace) นั้นมีสารสำคัญคือ balsam ที่มีกลิ่นหอมร้อยละ 24.5และน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 4 – 7 ประกอบด้วย Terpene และจากสารสำคัญที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นทำให้มีการนำรกและเมล็ดไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการค้าและการรักษา (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.4 เทียนตาตั๊กแตน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Anethum graveolens* Linn. ชื่อวงศ์ UMBELLIFERAE ชื่อสามัญ Dill ชื่อพื้นเมือง เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตั๊กแตน (ภาคกลาง) ผักชี (ขอนแก่น และเลย) ผักชีตั๊กแตน ผักชีเทียน (พิจิตร) ผักชีเมือง (น่าน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ผักชีลาวเป็นพืชล้มลุกตระกูลเดียวกับผักชี ลำต้นมีสีเขียวเข้มขนาดเล็ก ลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบขนนกมีสีเขียวสดออกเรียงสลับกัน ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกมีลักษณะคล้ายกับซี่ร่ม ผลแก่เป็นรูปไข่แบนมีสีน้ำตาลอมเหลือง ถ้านำไปใช้เป็นเครื่องเทศจะเก็บได้ก็ต่อเมื่อดอกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่จะพบในรูปของการทานสดเป็นผักมากกว่า ซึ่งควรเก็บก่อนที่จะออกดอก ผักชีลาวมีสองชนิด คือ ชนิดที่มาจากยุโรป (Dill) และชนิดที่มีกำเนิดในเอเชียเขตร้อน (Indian Dill) ในประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ทานเป็นผักมากกว่าปลูกเพื่อใช้ผลมาทำเครื่องเทศ เพราะมีคุณภาพน้อยกว่าประเทศอินเดีย

สารสำคัญที่พบ ผลผักชีลาวมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งปริมาณน้ำมันที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูกและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวนอกจากนี้แล้วยังประกอบด้วย สารดิลลาโนไซด์ สารประเภทกรดฟีโนลิค โปรตีน ไขมัน เป็นต้น น้ำมันผักชีลาว (Dill seed oil) ได้จากการนำผลแก่แห้งไปกลั่นด้วยไอน้ำ สารสำคัญที่พบ คือ คาร์โวน ดี-ไลโมนีน และอัลฟ่า-เฟลเลนดรีน สารอื่นที่มีปริมาณรองลงมาคือ ไดไฮโดรคาร์โวน ยูจีนอล ไพนีน และอะนีโทล เป็นต้น

สรรพคุณทางยา นำผลแก่แห้งของผักชีลาวบดให้เป็นผง ชงกับน้ำดื่มวันละ 4-5 แก้ว แก้อาการปวดท้อง แน่นท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลมหรือใช้ต้นสดของผักชีลาวผสมกับนมให้เด็กอ่อนดื่มแก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้เช่นกัน ส่วนน้ำมันมักใช้ผสมในยาย่อยอาหาร ยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.5 เทียนสัตตบุษย์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pimpinella anisum* Linn. ชื่อวงศ์ UMBELLIFERAE ชื่อสามัญ Anise ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กสูง 30-60 เซนติเมตร ใบเป็นฝอยแบบขนนก ช่อดอกสีขาวรูปร่มคล้ายเทียนข้าวเปลือก เมล็ดคล้ายเทียนข้าวเปลือก แต่มีรอยยาวตลอดเมล็ด มาจากต่างประเทศ

สรรพคุณทางยา เมล็ด รสเผ็ดหอมหวานร้อนเล็กน้อย แก้ลมครรภรักษา แก้พิษระส่ำระสาย แก้ไข้ แก้หอบ แก้สะอึก ใช้ผสมร่วมกับชะเอมจีนทำยาอมแก้ไอ น้ำมัน ขับเสมหะ ฆ่าเชื้อโรค ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อในเด็ก ฆ่าแมลงเล็กๆ เช่น หมัด เหา ฆ่าเชื้อรา เป็นต้น (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.6 พริกหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zanthoxylum limonella* Alston ชื่อวงศ์ RUTACEAE ชื่ออื่น มะแขว่น (เหนือ) พริกหอม ดอกพริกหอม ใบพริกหอม ผลพริกหอม รากพริกหอม กำจัดต้น หมากมาศ มะข่วง ลูกระมาศ หมักข่วง หมากนาศ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ใบยาวรีหรือรูปขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม ดอกออกเป็นช่อที่บริเวณปลายยอด ดอกย่อยสีขาว ผลมีลักษณะแห้งกลม ผิวขรุขระสีน้ำตาล เมื่อแก่จะแตกจนเห็นเมล็ดกลมสีดำ ผิวเรียบมัน มีกลิ่นหอม และมีรสเผ็ดเล็กน้อย

สรรพคุณทางยา ผลใช้เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต บำรุงธาตุ แก้ลมภายในอุทร ช่วยให้เจริญอาหาร แก้วิงเวียนศีรษะ เนื้อไม้ เป็นส่วนผสมในยาต้ม แก้โลหิตเป็นพิษ และขับระดูพิการ (พัทรารินี, 2550)

2.4.2.7 เร่ว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum xanthioides* Wall. ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE ชื่อสามัญ Bastard Cardamom ชื่ออื่น หมากเหน่ง หมากเนิง มะอี้ หมากอี้ มะหมากอี้ หน่อเน่ง ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จัดเป็นพืชล้มลุกสูงประมาณ 2 –4 เมตร มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า "เหง้า" ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับรูปใบเรียวปลายแหลมกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 0.5 เมตร ก้านใบสั้นมาก ดอกออกเป็นช่อออกโดยตรงจากเหง้ากลีบดอกสีชมพูอ่อน ผลเป็นผลแห้งค่อนข้างกลมหรือรูปไข่สีน้ำตาลแดงมีหนามและจะมีขนยาวสีแดงปกคลุม ผลมีขนาดเล็กประมาณ 1.4 – 2 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาลมีกลิ่นคล้ายการบูร

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือ "เมล็ดแห้ง"โดยช่วงที่เก็บเป็นยาคือช่วงที่ผลแก่โดยมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่าเมล็ดเร่วมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในน้ำมันหอมระเหยจะพบสารคือ Borneol, Camphor, Bornyl acetate, Geraneol, Geranyl acetate, Palmitic acid และ vanillic acid ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้จะไปกระตุ้นลำไส้ก่อให้เกิดการขับลมจึงใช้รักษาอาการท้องอืดท้องเฟ้อแน่นจุกเสียดและอาการคลื่นไส้อาเจียนได้

2.4.2.8 อบเชยเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum zeylanicum* ชื่อวงศ์ LAURACEAE ชื่อสามัญ Cinnamon ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ อบเชยเป็นต้นไม้ขนาดกลางจัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae มีชนิดใหญ่ๆ 5 ชนิดคือ อบเชยศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลังกา (*Cinnamomum zeylanicum*) คนไทยเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "อบเชยเทศ" มีราคาแพงที่สุด อบเชยอินโดนีเซีย หรืออบเชยชวา (*Cinnamomum burmanii* Blume) ได้รับความนิยมสูงสุดในปัจจุบัน อบเชยญวน (*Cinnamomum loureirii* Nees) มีรสหวานแต่ไม่ค่อยหอม ปลูกได้ดีมากในประเทศไทย และประเทศไทยเราส่งออกอบเชยชนิดนี้ อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Nees ex. Blume) มีเปลือกหนาและเนื้อหยาบ อบเชยไทย (*Cinnamomum bejolghota*) หรืออบเชยต้น พบในป่าเขาที่ยังอุดมสมบูรณ์ในประเทศแต่ยังไม่ใช้นำมาปลูกเพื่อผลิตเปลือกอบเชย อบเชยไทยมีมากกว่า 16 สายพันธุ์ และยังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยด้านสรรพคุณ เปลือกอบเชยไทยจะหนากว่าอบเชยชนิดอื่น

สรรพคุณ อบเชยทำให้ท้องเป็นปกติดี แก้อาการจุกเสียด แน่นท้อง ขับลม ช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ ย่อยไขมัน (อาจเป็นเพราะไปช่วยกระตุ้นการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยไขมัน) ทำให้สดชื่น แก้อ่อนเพลีย มีสารต้านแบคทีเรีย และสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ อบเชยที่ใช้ปรุงอาหารจะใช้ชนิดหลอด (ม้วนเปลือกให้เป็นหลอด) ใช้ปรุงอาหารเช่นทำพะโล้ ใช้ทำยาไทยหลายตำรับ ตำราไทยระบุว่าอบเชยมีกลิ่นหอม มีรสสุขุม มีสรรพคุณใช้บำรุงจิตใจ แก้อ่อนเพลีย บำรุงกำลัง ขับลม บำรุงธาตุ แก้บิด แก้ไข้ สันนิบาต ใช้ปรุงยานัตถุ์แก้ปวดหัว นอกจากการใช้เปลือกตำราไทยยังระบุว่ารากและใบมีกลิ่นหอมรสสุขุม ใช้ต้มดื่มขับลมบำรุงธาตุ แก้ท้องอืดเฟ้อ (พัทรารินี, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การแยกเชื้อ ศึกษาคุณสมบัติและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกและสเตรปโตคอกคัส จากเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่มีการเติมไนเตรตและไนไตรต์

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม

เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด แหนม และเบคอน ชนิดละ 10 ตัวอย่างรวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากตลาดสดในเขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานครและจังหวัดสมุทรปราการ

1.1.2 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 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ *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

1.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Plate Count Agar (PCA), Mannitol Salt Agar (MSA), MRS Agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5, MRS Agar ที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.2, MRS broth, MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 1 กรัมต่อลิตร 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

116091

1.1.4 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) สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกและ Coagulase negative Staphylococci โดยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50CH และ API STAPH kit ตามลำดับ

1.1.5 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 ปิเปต ลูกยาง

1.2 วิธีการทดลอง

1.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

สุ่มตัวอย่างได้แก่ เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด แหนม และเบคอน ชนิดละ 10 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Testo 205)

1.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)

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

1.2.1.3 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 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

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

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 การบดวัตถุดิบให้เป็นเนื้อเดียวกันจะใช้ เครื่องบด ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ยังไม่ได้ปรุงให้รับทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง และวัตถุดิบที่ใช้สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 4 วันโดยเก็บไว้ในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นชั่งวัตถุดิบที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวแล้ว 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายบอเรกซ์ (สารข้อ ก(3))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ปีเปตสารที่กรองได้ 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 หลังจากนั้นปีเปตสารละลายที่ความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร(สารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ปฏิบัติตามขั้นตอนข้างต้นแต่เปลี่ยนแปลงเป็นสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แทน และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

1.2.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ การแยกแบคทีเรียแลคติก Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

1.2.2.1 การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และMicrococcaceae ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติก และMicrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม โดยชั่งตัวอย่างละ 25 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจางละ 10^{-1}) นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจางตัวอย่างต่อไปให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2}-10^{-5} ปีเปตตัวอย่างที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้าย ระดับความเจือจางละ 50 ไมโครลิตรโดยการใช้เทคนิค spiral plating ด้วยเครื่อง Spiral Plater รุ่น Autoplate 4000 ลงบนผิวหน้าอาหาร PCA และอาหาร MSA และใช้เทคนิค pour plate ที่ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมอาหาร MRS อุ่นๆ ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดบ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด พร้อมทั้งคำนวณหาจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และMicrococcaceae ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมของอาหาร)

1.2.2.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและ Micrococcaceae

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบนอาหารแข็ง MRS ในข้อ 3.2.2.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี ส่วน Micrococcaceae ให้เลือกโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง MSA ที่มีลักษณะนูน มีสีขาวขุ่นหรือครีมขุ่น แล้วนำลูปปราศจากเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาลากบนอาหารแข็ง MRS และ MSA ตามลำดับด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ในอาหารเหลว MRS และ BHI ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 15 ที่บรรจุในหลอดทนความเย็นและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

1.2.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ Micrococcaceae เพื่อการทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ Micrococcaceae แต่ละไอโซเลตที่แยกได้ลงในอาหารเหลว MRS และ 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 และ 2 ของเชื้อ Micrococcaceae และแบคทีเรียกรดแลคติกตามลำดับ

1.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการใช้ไปเป็นกล้าเชื้อต้องทดสอบการมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส การทดสอบกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี และโซเดียมคลอไรด์ การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity การศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ชีวเคมี ตลอดจนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.2.3.1 การศึกษากิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar spot test (Schillinger และ Lücк 1989) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากข้อ 1.2.2.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์เพื่อเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตตามข้อ 1.2.2.3 และปริมาตรสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 ซึ่งแต่ละจานเพาะเชื้อใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบได้ 6 ไอโซเลต ทำ 3 ซ้ำและไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 42112, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Vibrio parahaemolyticus* OYI, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ส่วนเชื้อ *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 (มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS Soft Agar (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ) หรือ TSYE Soft Agar (สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 ซึ่งได้บ่มไว้ข้างต้น และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกโดยสังเกตจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ เชื้อที่คัดแยกบนอาหารแข็ง MSA แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

1.2.3.2 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

ก) การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ตามวิธีของ (Chung และคณะ, 1999) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 5 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 จากนั้นปิเปตอาหารที่ปรับพีเอชแล้วในแต่ละระดับ ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และเติมสารแขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.2.2.3 ลงในทุกหลุมปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร (ร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ก่อนบ่มและหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้ โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นเพิ่มมากขึ้นสังเกตจากค่าดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นกว่าก่อนบ่ม

ข) การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

ค) การทดสอบการทนต่อกรดเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก ใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่เติม porcine bile ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8 และหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

ง) การทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้

1.2.3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

ในขั้นตอนแรกควรทำการกระตุ้นแบคทีเรียที่ทดสอบ (activity of microbial cultures) เพื่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์ก่อนการทดสอบจริง โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลตมาถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ในอาหารเหลว MRS ที่เติมกรดอะมิโนทั้งหมด 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 amion acid decarboxylase activity (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกตามวิธีการของ (Bover-Cid และ Holzapfel.1999) โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการกระตุ้นลากบนอาหารแข็ง 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 รวมทั้งกรดอะมิโนเช่น L-tyrosine,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (มี amino acid decarboxylase activity มากกว่า 350 มิลลิกรัมต่อกรดอะมิโนต่อลิตร)

1.2.3.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ก) การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสทำตามวิธีการของ Harrigan (1998) ซึ่งทำได้โดยเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตจากหลอดอาหาร MRS มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไป โดยใช้ dropper หรือ Pasteur pipette ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นทันทีให้ผลการทดสอบเป็นบวกแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบ

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 จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 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 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) แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกคือมีการใช้ไนไตรท์ซึ่งเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์ รีดักเทสของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

1.2.3.5 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion assay

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อคือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีได้สูง สร้างไนเตรทรีดักเทสและการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน) มาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion asssay (Schillinger และ Lücke 1989) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด) จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) นำส่วนใสที่ผ่านการกรองมากำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเติมเอนไซม์คะตะเลส (จาก bovine liver จากบริษัท Fluka) ลงไปในส่วนใสดังกล่าวปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (จนกว่าจะทำการทดลอง) จากนั้นเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2.3.1 และปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 เติมลงในอาหาร MRS Soft Agar ส่วนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นเติมลงในอาหาร TSYE Soft Agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสทำตามวิธีการของ Harrigan (1998) ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Gibson 's Semi Tomato Juice Medium ผสมให้เข้ากันรอจนอาหารแข็งตัวแล้วปิดทับด้วยอาหาร Nutrient agar ให้มีความหนาประมาณ 3 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงถ้ามีฟอง ก๊าซเกิดขึ้นในอาหารหรืออาหารแยกตัวออกเป็นสองชั้น แสดงว่ามีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลบวก) และถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นเกิดขึ้นในอาหารแสดงว่าไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลลบ)

ค) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (BioMérieux)

API 50 CH คือชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมด 50 การทดสอบ เพื่อศึกษาเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพื่อศึกษาการจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และสกุลที่ใกล้เคียง อุปกรณ์สำคัญที่จำเป็น ได้แก่

1. API 50 CHL medium

API 50 CHL medium เป็นอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโพลีเปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม Tween 80 1 มิลลิลิตร dipotassium phosphate 2 กรัม sodium acetate 5 กรัม diamonium citrate 2 กรัม magnesium sulfate 0.20 กรัม manganese sulfate 0.05 กรัม bromocresol purple 0.17 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.7-7.1

2. API 50 CHL strips

API 50 CHL strips ประกอบด้วย 50 microtube ที่ใช้ในการศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธุ์ของคาร์โบไฮเดรต (heterosides, polyalcohols และ uronic acids) ซึ่ง microtube ทั้งหมด 50 หลอดแบ่งออกเป็น 5 ชุดย่อย คือ 0 ถึง 9, 10 ถึง 19, 20 ถึง 29, 30 ถึง 39 40 ถึง 49 แต่ละชุดมี 10 microtube โดยสารคาร์โบไฮเดรตในแต่ละ strip มีดังนี้ Strip ที่ 1 (หลอดที่ 0-9) : หลอดควบคุม (ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต), glycerol (GLY), erythritol (ERY), D-arabinose (DARA), L-arabinose (LARA), D-ribose(RIB), D-xylose (DXYL), L-xylose (LXYL), D-adonital (ADO) และ methyl-BD-xylopyranosid (MDX), Strip ที่ 2 (หลอดที่ 10-19) : D-galactose (GAL), D-glucose (GLU), D-fructose (FRU), D-mannose (MNE), L-sorbose (SBE), L-rhamnose (RHA), dulsitol (DUL), inositol (INO), D-mannitol (MAN) และ D-sorbitol (SOR), Strip ที่ 3 (หลอดที่ 20-29) : methy-α D-manopyranoside (MDM), methyl-α D-glucopyranoside (MDG), N-acetylglucosamine (NAG), amyldalin (AMY), arbutin (ARB), esuculin ferric cireate (ESC), salicin (SAL), D-celibiose (CEL) และ D-moltose (MAL) และ D-lactose (bovine origin) (LAC), Strip ที่ 4 (หลอดที่ 30-39) : D-melibiose (MEL), D-sacharose (sucrose) (SAG), D-trehalose (TRE), insulin (INU), D-melizitose (MLZ), D-raffinose (LRF), amido (starch) (AMD), glucogen (GLYG), xylose (XLT) และ genitiobiose (GEN) และStrip ที่ 5 (หลอดที่ 40-49) : D-turanose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(TUR), D-lyxose (LYX), D-tagatose (TAG), D-fucose (DFUC), L-fucose (LFUC), D-arabinose (DARL), L-arabinose (LARL), potassium gluconate (GNT), potassium 2-ketogluconate (2KG) และ potassium 5-ketogluconate (5KG)

3. สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 2
4. Mineral oil
5. ถาดรังผึ้ง
6. โปรแกรม API Identification soft

วิธีการทดสอบ

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดลอง (Preparation of the inoculum)

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ตามวิธีการข้อ 1.2.2.3 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS นำมาปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง เติมสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้สารแขวนลอยเซลล์เข้มข้น จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นนี้เติมลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารแขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2 (บันทึกปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นที่ใช้ในการปรับความขุ่น สมมุติเท่ากับ V ไมโครลิตร) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นปริมาตร V ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร API 50 CHL ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2)

2) การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API 50 CH strips

การถ่ายเชื้อที่ทดลองทำได้โดยปิเปตอาหาร API 50 CH medium ที่เติมเชื้อที่ต้องทดสอบแล้ว นำมาใส่ลงในหลอด (cupule) ของแต่ละ strips ซึ่งได้แยกเป็น 5 strips ย่อยแล้วคือ strips ที่ 1 (หลอดที่ 0-9) strip ที่ 2 (หลอดที่ 10-19) strip ที่ 3 (หลอดที่ 20-29) Strip ที่ 4 (หลอดที่ 30-39) Strip ที่ 5 (หลอดที่ 40-49) โดยแตะปิเปตลงข้าง ๆ หลอด เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศเติมอาหาร API 50 CH ลงไปจนเต็มหลอด เติมจนครบทั้ง 50 หลอด จากนั้นหยอดด้วย mineral oil ให้เต็มหลอดเพื่อทำให้มีสภาพมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและนำ strip ใส่ลงในถาดรังผึ้งที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป (เตรียมไว้ล่วงหน้า) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3) การอ่านผลการทดสอบ

ทำการอ่านผลในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม โดยจดบันทึกลงในตารางการทดสอบ ถ้าให้ผลบวกแสดงว่า มีการสร้างกรด bromocresol purple ที่ใช้เป็น indicator จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ถ้าให้ผลลบอาหารจะไม่เปลี่ยนสี (สำหรับในหลอดที่ 25 เป็นการทดสอบ esculin ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกอาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นดำ) หลังจากนั้นนำผลการทดสอบที่บันทึกได้มาเข้าโปรแกรม API identification software เพื่อการแปลผลการทดสอบทำให้ทราบชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.4 การคัดเลือก coagulase-negative Staphylococci ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.2.4.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และ ไนไตรท์รีดักเทส ตามข้อ 1.2.3.4 ก), 1.2.3.4 ข) และ 1.2.3.4 ค) ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส และนำมาทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Miccrococcus* ในขั้นตอนต่อไป

1.2.4.2 การทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus*

ในการทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ทำได้โดยทดสอบ การผลิตกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน ความต้านทานต่อเบซิตราซิน และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยถ้าเป็น *Micrococcus* จะไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอลได้ ต้านทานต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่จะไวต่อเบซิตราซิน และสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ แต่ถ้าเป็น *Staphylococcus* สามารถสร้างกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอลได้ มีความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่จะต้านทานต่อเบซิตราซิน และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สามารถทดสอบได้ตามขั้นตอนดังนี้

ก) การผลิตกรดจากกลูโคส

การผลิตกรดจากกลูโคสตามวิธีการของ Facklam และ Smith (1976) 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

การผลิตกรดจากกลีเซอรอลตามวิธีการของ Schleifer และ Kloos (1975) 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่ลากไว้ แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกและถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่ออีกจนครบ 72 ชั่วโมงก่อนบันทึกผลการทดลองเป็นลบ

ค) การยับยั้งของฟูราโซลิโดน (furozolidone)

การทดสอบการยับยั้งของฟูราโซลิโดนตามวิธีการของ Facklam และ Smith (1976) โดยใช้ไม้พันลำสีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยที่ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง blood agar นำแผ่นดิสที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดของโซนที่เกิดจากการยับยั้งของฟูราโซลิโดนบริเวณรอบแผ่นดิส โดยฟูราโซลิโดนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus*

ง) ความต้านทานต่อแบซิตราซิน (bacitracin)

การทดสอบความต้านทานต่อแบซิตราซินตามวิธีการของ Facklam และ Smith (1976) โดยใช้ไม้พันลำสีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยที่ปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5 แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง blood agar นำแผ่นดิสที่มีแบซิตราซินความเข้มข้น 0.04 ยูนิต วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดของโซนที่เกิดจากการยับยั้งของฟูราโซลิโดนบริเวณรอบแผ่นดิส โดยแบซิตราซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus*

จ) ความไวต่อไลโซสตาฟิน (lysostaphin)

การทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟินตามวิธีการของ Facklam และ Smith (1976)โดยเขี่ยเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลตมา 1 ลูปลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายซาลีนร้อยละ0.85 กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายไลโซสตาฟิน ความเข้มข้น 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

1.2.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสตามวิธีการของ 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)

1.2.4.4 การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amono acid decarboxylase

การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amono acid decarboxylase ทำตามวิธีการข้อ 1.2.3.3

1.2.4.5 การจำแนกชนิดของสเตรปฟีโลคอกคัส โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

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 วินาที สำหรับชะล้างสีบนรอยสเมียร์และล้างออกด้วยน้ำ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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

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-สีม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก
- หยด NIT1 และNIT2 ลงในช่อง NIT อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ถ้าเป็นสีชมพูอ่อน ให้อ่านผลการทดลองเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หยด ZYM A และZYMB ลงในช่อง PAL อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วงให้บันทึกการทดลองเป็นผลบวก

ส่วนในหลอดอื่นที่มีสีของสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีแดง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก 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

<u>ตอนที่ 2</u> การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศเพื่อใช้เป็นสารทดแทนไนไตรท์

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 ตัวอย่างเครื่องเทศแห้งที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ กระทือ ขมิ้นอ้อย จันทน์เทศ เทียนตาตั๊กแตน เทียนสัตตบุษย์ พริกหอม เร่ว และอบเชย (ตารางที่ 3.1) โดยเครื่องเทศแห้งทั้งหมดซื้อมาจากร้านขายสมุนไพร ในกรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 3.1 เครื่องเทศที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของเครื่องเทศ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้
กระทือ	-	*Zingiber zerumbet*	เหง้า
ขมิ้นอ้อย	Zedoary	*Curcuma zedoaria*	เหง้า
จันทน์เทศ	Mace	*Myristica fragrans*	เปลือกหุ้มเมล็ด
เทียนตาตั๊กแตน	Dill	*Anethum graveolens*	เมล็ด
เทียนสัตตบุษย์	Anise	*Pimpinella anisum*	เมล็ด
พริกหอม	-	*Zanthoxylum limonella*	ผล
เร่ว	Bastard cardamom	*Amomum xanthioides*	ผล
อบเชยเทศ	cinnamon	*Cinnamomum zeylanicum*	เปลือก

2.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Senftenberg DMST 7113 และ *Salmonella* Rissen DMST 7097 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์ จุลินทรีย์ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (DMST Culture Collection: Medical Microbial Culture Collection, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand) และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 515, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 509, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) *Pediococcus pentosaceus* P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสด (พัชรีและสุนิสา. 2550) *Lactococcus lactis* 13IS3 แยกได้จากเนื้อปลากราย (นิระชา ศรีวงษ์. 2550) *Enterococcus faecalis* 4IS17 แยกได้จากกุ้งจ่อมและ *Enterococcus faecium* 1IS11 แยกได้จากหอยแมลงภู่สด (ฐิติรัตน์. 2552)

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Mueller Hinton Agar (MHA, Difco), Mueller Hinton Broth (MHB, Difco), de Man- Rogosa- Sharpe broth (MRS, Difco), Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlau), Potato Dextrose Broth (PDB, Biomark), Saboraud Dextrose Agar (SDA, Himedia), Plate Count Agar (PCA), Meat Model Agar (MMA), Starch Agar (SA), Beef Sausage Agar (SMA), และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

2.1.4 สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) กรดลิโน เลอิก (linoleic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) ทวีน 40 (tween 40) ทวีน 80 (tween 80) วิตามิน อี (alpha-tocopherol) กรดแอซิติก (acetic acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulphate) โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) มิกซ์ฟอสเฟต (mixed phosphate) เมทานอล (methanol) โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) โพแทสเซียมเทลลูไรท์ (potassium tellurite) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride), 2-thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric chloride hexahydrate, ferrous sulfate heptahydrate, sodium acetate trihydrate, 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Xanthine, Xanthine oxidase, Nitro-blue tetrazolium (NBT), sodium dodecyl sulfate (SDS), Butylated hydroxyltoluene (BHT), soluble starch, เพนนิซิลิน จี (penicillin G) ฟลูโคนาโซล (fluconazole) สารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(dimethylsulfoxide; DMSO) สารละลายแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำกลั่นผสม tween 80 ร้อยละ 0.5 สารละลายไดเมทิลซัล ฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และความเข้มข้น ร้อยละ 70

2.1.5 เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator รุ่น Heizbad HB-digit) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer รุ่น UV-1601) เครื่องวัดพีเอช (testo 205) เครื่องบดผสม (kitchenAid model 5K5SS) ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ตู้อบลมร้อน ตู้บ่มเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ desiccator

2.1.6 อุปกรณ์ทางจุลินทรีย์และเครื่องแก้วที่ใช้ ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ออโตปิเปตต์ (Autopipette) กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตรและ 10 มิลลิลิตร หลอดปั่นเหวี่ยง จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ปากคีบ ลูปเขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วงอ และอุปกรณ์เครื่องแก้วที่จำเป็นอื่นๆ

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

2.2.1.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยนำพืชสมุนไพรแห้งมาปั่นหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งพืชสมุนไพรแห้งปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น เติมน้ำให้ท่วมพืช จากนั้นให้ความร้อนประมาณ 3-4 ชั่วโมง รอจนกระทั่งปริมาณน้ำมันที่ได้นั้นคงที่จึงหยุดให้ความร้อน และจดบันทึกปริมาณน้ำมันที่ได้ เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชา จนกว่าจะนำไปใช้ทดสอบ

2.2.1.2 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ก) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิดได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ในอาหาร MHB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงยีสต์ 6 ชนิด ได้แก่ *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 515, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 509 และ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ในอาหาร PDB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เทส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเป็น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เป็น 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร

สำหรับการเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา 4 ชนิดได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อราบน PDA slant ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มที่และเกิดการสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นผสม Tween 80 ร้อยละ 0.5 ใส่ลงไปในหลอด PDA slant ที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อขูดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกมา จากนั้นกรองเอาเส้นใยออกโดยกรองผ่านกรวยกรองที่มีสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้สปอร์แขวนลอยแล้วให้นำไปนับสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ข) การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar disc diffusion

ทำการทดสอบตามวิธีของ Sahin และคณะ (2004) ซึ่งทำได้โดย ขั้นแรกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบ (แบคทีเรีย 6 ชนิด และยีสต์ 6 ชนิด) ที่เตรียมไว้โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และกดที่ด้านข้างของหลอด จากนั้นทำการ swab ลงบนผิวหน้าอาหาร MHA และ SDA สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ สำหรับเชื้อราจำนวน 4 ชนิดที่จะทดสอบ ทำการปิเปตต์สารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอปราศจากเชื้อ และทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ 1 ชิ้นลงบริเวณกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ ปิเปตต์น้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนกระดาษกรองนี้ สำหรับ negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน positive control สำหรับแบคทีเรีย ใช้เพนนิซิลิน จีความเข้มข้น 5000 IUต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบ และ positive control สำหรับเชื้อราและยีสต์ ใช้ฟลูโคนาโซลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับจานเพาะเชื้อที่มียีสต์และเชื้อรานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยของมิลลิเมตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำแล้วทำการหาค่าเฉลี่ย

ค) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี Agar dilution

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด โดยใช้วิธี agar dilution (Collins และคณะ, 2001) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 18 ระดับ (20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อและน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงไปในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยปริมาตรของสารละลายของน้ำมันหอมระเหยและปริมาตรของน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (MHA, SDB และ PDA) ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยเซลล์หรือสปอร์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด 16 ชนิดที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.1.2 ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมงสำหรับ ยีสต์และเชื้อรา ตามลำดับ โดย negative control ให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย และ positive control ของแบคทีเรียใช้เพนนิซิลิน จี (penicillin G) ที่ระดับความเข้มข้น 7.8-4000 IUต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์และเชื้อราใช้ฟลูโคนาโซล (fluconazole) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.156 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการประเมินผล โดยดูที่จานเพาะเชื้อที่ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

2.2.1.3 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

ก) การวัดความสามารถในการกำจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Singh และคณะ (2008) โดยนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย และใช้ alpha-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) เป็น postitive control เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้น จึงนำมาคำนวณหาการยับยั้ง DPPH radical (ร้อยละ) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\%I = (Ao-As)/Ao \times 100$$

โดย Ao คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย จากนั้นสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radicals กับน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถกำจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50

ข) β-carotene bleaching test

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Eyob และคณะ (2008) โดยใช้ β-carotene 2 มิลลิกรัมผสมกับคลอโรฟอร์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้เป็นสารละลายผสมของ β-carotene-chloroform จากนั้นปิเปตต์สารละลายผสมนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาสก์ก้นกลม (round-bottom rotary boiling flask) เติมกรดลิโนเลอิก 20 มิลลิกรัมและ tween 40 ปริมาณ 0.2 กรัมลงไป นำไประเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงค่อยๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไปอย่างช้าๆ และเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชั่น จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิเตอร์ (ค่าที่ได้นี้เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาที่ 0 นาที , t=0) จากนั้นนำหลอดทดลองไปบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 105 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 105 นาที (t=105) สำหรับ negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใช้เมทานอลปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน postitive control ใช้ alpha-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Antioxidative activity (AA%) ตามสูตร

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$

เมื่อ A^{0}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เวลาที่ 0 นาที (t=0)

A^{105}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที (t=105)

$A^{0}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เวลาที่ 0 นาที

$A^{105}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที

ค) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay เป็นวิธีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหย โดยหาความสามารถในเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Lado และคณะ (2004) สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ คือ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ สารละลาย Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร วิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยปิเปต FRAP reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับ blank ซึ่งใช้ FRAP reagent ที่ไม่มีตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหย และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ Fe^{2+}-TPTZ ในหน่วยมิลลิโมลาร์ต่อตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิกรัม

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ในช่วงความเข้มข้น 0 - 3 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้สารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆแทนน้ำมันหอมระเหย และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับระดับความเข้มข้นของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ Fe^{2+}-TPTZ

ง) Superoxide anion-scavenging activity

การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัด superoxide anion ทำตามวิธีการของ Sakanaka และคณะ (2005) โดยผสมสารละลาย xanthine ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร nitro-blue tetrazolium ความเข้มข้น 0.48 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปความให้ร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเอนไซม์ xanthine oxidase ความเข้มข้น 0.0026 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 18.8 ไมโครลิตรลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม sodium dodecyl sulfate ความเข้มข้น 69 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาการยับยั้ง superoxide anion (ร้อยละ) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\%I = [(C - S) / C] \times 100$$

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (บัฟเฟอร์แทนน้ำมันหอมระเหย)

S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample (น้ำมันหอมระเหย)

3.2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยทำตามวิธีการของ Dastmalchi และคณะ (2007) โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปีเปตน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultra pure water) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรและเติมสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผสมและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้นแต่ใช้สารละลายกรดแกลลิก แทนน้ำมันหอมระเหย เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้กราฟเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes*

2.2.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้อ 2.2.1.2 (ก) ให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ 1.0 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดสอบ

2.2.2.2 ทดสอบด้วยวิธี agar dilution checkerboard

ทำการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด คือ น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอม ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes* โดยวิธี checkerboard ตามวิธีการของ Rosato และคณะ (2007) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 จากนั้นทำการปิเปตต์ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นเพื่อทำให้ได้ระดับความเข้มข้น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 2.2.1 ทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ (1.0 x 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร) ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *P. fluorescens* จากนั้นทำการประเมินผลของน้ำมันหอมระเหยโดยคำนวณเป็นค่า fractional inhibitory concentration (FIC) ในการคำนวณค่า FIC index (FICI) จะมีสูตรดังนี้

$$\text{FIC index} = FIC_A + FIC_B$$

เมื่อ FIC_A = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด A (MIC_A combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด A เพียงอย่างเดียว (MIC_A alone)

FIC_B = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด B (MIC_B combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด B เพียงอย่างเดียว (MIC_B alone)

ซึ่งถ้าค่า $FIC \leq 0.5$ ถือว่ามีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect)

$0.5 < FIC < 1$ ถือว่า additive หรือ ไม่มีความแตกต่าง (indifferent effect)

$FIC > 1$ ถือว่าเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonistic effect)

2.2.3 การศึกษาผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบนี้ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีจากผลการทดลองในข้อ 2.2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก 4 ชนิด คือ *Pediococcus pentosaceus* P0805, *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17, *Enterococcus faecium* 1IS11 และแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *Salmonella* Senftenberg DMST 7113, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 บนอาหารจำลอง (food model media) 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar

2.2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้อ 2.2.1.2 (ก) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคปรับความขุ่นของเซลล์เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 2 และ Mcfarland Standard เบอร์ 5 ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งจะได้ปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตรสำหรับใช้ในการทดสอบ

2.2.3.2 อาหารจำลอง (food model media)

อาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar มีส่วนผสมและวิธีการเตรียมดังนี้

ก) starch agar ประกอบด้วย beef extract 3 กรัม soluble starch 10 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข) meat agar ประกอบด้วย beef extract 30 กรัม น้ำมันวัว 10 มิลลิลิตร วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ค) sausage agar ประกอบด้วย beef extract 30 กรัม น้ำมันวัว 10 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 กรัม โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต 3 กรัม กลูโคส 10 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกให้ได้ 5.5

โดยอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิดจะทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.3.3 วิธีการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันอบเชย และน้ำมันจันทน์เทศโดยใช้วิธี agar dilution (Collins และคณะ, 2001) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 19 ระดับ (22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock solution ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อและน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงไปในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยปริมาตรของสารละลายของน้ำมันหอมระเหยและปริมาตรของน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตรจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (starch agar, meat agar และ sausage agar) ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิดที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 2.2.1.2 ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีของ negative control ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ทดสอบ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตอนที่ 3</u> ผลของกล้าเชื้อจุลินทรีย์และน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในไส้กรอกอีสาน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ เนื้อหมูสด มันหมู ข้าวสุก กระเทียม รากผักชี โซเดียมไนไตรท์ เกลือป่น พริกไทย และน้ำมันอบเชย

3.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Salmonella* Schwarzengrund SAP 08906/02, *Staphylococcus xylosus* SC0903 ซึ่งแยกได้จากเนื้อวัวสด และ *Lactobacillus plantarum* C0602 ซึ่งแยกได้จากแหนม

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ได้แก่ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD, Difco), Baird-Parker Agar Base (BP, Difco) กรดแอซีติก (acetic acid) สารละลายกรดไทโอบาบิทูริก (2-thiobarbituric acid) และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองในขั้นนี้ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยผสมของน้ำมันอบเชยซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีเพื่อเติมลงในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Staphylococcus xylosus* SC0903 และ *Lactobacillus plantarum* C0602 รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Salmonella* Schwarzengrund SAP 08906/02 ระดับความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยที่ใช้ในการทดลองนี้พิจารณาจากการผลทดลองที่ได้จากการวิจัยตอนที่ 2

3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเพาะเชื้อ *Staphylococcus xylosus* SC0903 ซึ่งแยกได้จากเนื้อวัวสดและ *Lactobacillus plantarum* C0602 ซึ่งแยกได้จากแหนม (จากการวิจัยตอนที่ 1) ลงในอาหาร MRS broth สำหรับเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *Sal.* Schwarzengrund SAP 08906/02 เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *L. plantarum, S. aureus* TISTR 118 และ *Sal.* Schwarzengrund SAP08906/02 ให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเป็น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร

3.2.2 ผลของการใช้น้ำมันอบเชยและโซเดียมไนไตรท์ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Sal.* Schwarzengrand ในไส้กรอกอีสาน

ทำการเตรียมไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทั้งหมด 7 ส่วนส่วนละ 100 กรัม โดยแต่ละส่วนมีส่วนผสมที่เหมือนกันดังนี้ เนื้อหมูร้อยละ 56.72 มันหมูร้อยละ 19.5 ข้าวสุกร้อยละ 15.24 รากผักชีร้อยละ 1.52 เกลือร้อยละ 1.5 กระเทียมบดร้อยละ 4.0 พริกไทยร้อยละ 1.52 การผลิตไส้กรอกอีสานทำได้โดยนำเนื้อหมูและมันหมูมาล้างให้สะอาดหั่นและบดให้ละเอียด จากนั้นผสมเครื่องปรุงทั้งหมด คลุกเคล้าให้เข้ากัน ซึ่งจะเปรียบเทียบไส้กอกทั้งหมด 7 รูปแบบได้แก่ ส่วนที่ 1 ชุดควบคุม(ไม่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมน้ำมันอบเชย) ส่วนที่ 2 เติมโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) ส่วนที่ 3 เติมโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม (เติมกล้าเชื้อ *S. xylosus* และ *L. plantarum*) ส่วน 4 เติมโซเดียมไนไตรท์ที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็มและน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) ส่วนที่ 5 เติมโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 50 พีพีเอ็มและน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (เติมกล้าเชื้อ *S. xylosus* และ *L. plantarum*) ส่วนที่ 6 เติมโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) และส่วนที่ 7 เติมโซเดียมไนไตร์ทที่ระดับความเข้มข้น 500 พีพีเอ็มและน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (เติมกล้าเชื้อ *S. xylosus* และ *L. plantarum*) หลังจากที่ผสมเข้ากันดีแล้ว บรรจุส่วนผสมลงในถุงพลาสติก จากนั้นไส้กรอกทรีตเมนต์ที่ต้องเติมกล้าเชื้อ เติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อ *S. xylosus* และ *L. plantarum* ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 10^7 เซลล์ต่อกรัม *S. aureus* ปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัม และ *Sal.* Schwarzengrund ปริมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัมและมัดให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาจำนวน *S. aureus* และจำนวน *Sal.* Schwarzengrund วัดค่าพีเอช วัดสี วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้าง ตามวิธีการดังต่อไปนี้

ก) การวิเคราะห์หาจำนวน *S. aureus* และ *Sal.* Schwarzengrand ในไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไส้กรอกอีสานปริมาณ 25 กรัมใส่ลงไปในถุงตีป่นปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตรลงไปในถุงตีป่น ตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ในการหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ทำโดยใช้เทคนิค pour plate ซึ่งได้ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ เติมอาหาร MRS (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) ลงไปและผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจาน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการตรวจหาจำนวนเชื้อ *Sal.* Schwarzengrand และ *S. aureus* ทำโดยใช้เทคนิค spread plate โดยปิเปตตัวอย่างที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร Baird-parker agar ที่เติมโพแทสเซียมเทลลูไรท์ และไข่แดง สำหรับการตรวจหาจำนวน *S. aureus* และอาหาร XLD agar สำหรับการตรวจหาจำนวน *Sal.* Schwarzengrand เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหาร XLD agar และ 48 ชั่วโมงสำหรับอาหาร Baird-parker agar นับโคโลนีสีดำบนจานที่มีจำนวน 15-150 โคโลนี และคำนวณจำนวน *Sal.* Schwarzengrand และ *S. aureus* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของตัวอย่าง)

ข) วัดค่าพีเอช

ทำการวัดค่าพีเอชของไส้กรอกโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (testo 205)

ค) การวัดสี

ทำการวัดสีด้วยเครื่องวัดสีของมินอลต้า รุ่น CR-300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวิจัยตอนที่ 1

1.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของตัวอย่างเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสานรวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบว่าเนื้อสดมีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย โดยค่าพีเอชของเนื้อวัวสด (5.50 – 5.59) สูงกว่าค่าพีเอชของเนื้อหมูเล็กน้อย (5.30 – 5.52) ขณะที่ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มเช่น เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสานต่ำกว่าค่าพีเอชของเนื้อสด โดยเฉพาะไส้กรอกอีสานมีค่าพีเอชต่ำที่สุด (4.32 – 4.85) สำหรับค่า a_w ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของเนื้อสดพบว่ามีค่า a_w ค่อนข้างสูง โดยเนื้อหมูและเนื้อวัวสดมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.991 – 0.997 ซึ่งสูงกว่าค่า a_w ของเบคอน (a_w 0.979 – 0.989) แหนม (a_w 0.964 – 0.972) และ ไส้กรอกอีสาน (a_w 0.938 – 0.955) ส่วนปริมาณไนไตรท์ตกค้างพบว่าในเนื้อสดมีปริมาณไนไตรท์ตกค้างบ้างเล็กน้อยในช่วง 0.35 – 1.41 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งต่างกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มซึ่งพบว่าเบคอนมีปริมาณไนไตรท์ตกค้างมากที่สุดถึง 23.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งสูงกว่าปริมาณไนไตรท์ตกค้างที่พบในไส้กรอกอีสานและแหนมที่พบปริมาณ 4.93 และ 4.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะทางเคมีของเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ค่า a_w ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
เนื้อวัว	10	5.50 – 5.98	0.991 – 0.995	0.71 – 1.41
เนื้อหมู	10	5.30 – 5.52	0.992 – 0.997	0.35 – 1.06
เบคอน	10	4.98 – 5.56	0.979 – 0.989	0.35 – 23.26
แหนม	10	4.45 – 5.20	0.964 – 0.972	1.40 – 4.56
ไส้กรอกอีสาน	10	4.32 – 4.85	0.938 – 0.995	1.80 – 4.93
รวม	50	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การตรวจนับจุลินทรีย์ จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน และไส้กรอกอีสาน พบว่าเนื้อวัวและเนื้อหมูมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดถึง 1.8×10^9 CFU ต่อกรัม โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าแหนม เบคอน และไส้กรอกอีสาน ($1.2 \times 10^5 - 1.1 \times 10^8$ CFU ต่อกรัม) (ตารางที่ 4.2) ส่วนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดพบว่าในแหนมและเบคอน ($1.1 \times 10^6 - 6.7 \times 10^8$ CFU ต่อกรัม มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าในเนื้อวัวและเนื้อหมู ($7.0 \times 10^5 - 9.3 \times 10^7$ CFU ต่อกรัม) ส่วนไส้กรอกอีสานพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุด (1.7×10^4 CFU ต่อกรัม) แต่จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดที่พบในเนื้อวัวและเนื้อหมูสด ($1.8 \times 10^4 - 1.0 \times 10^7$ CFU ต่อกรัม) สูงกว่าในเบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน โดยแหนมและไส้กรอกอีสานมีจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดใกล้เคียงกันในช่วง $4.5 \times 10^3 - 2.9 \times 10^4$ CFU ต่อกรัม ขณะที่เบคอนมีจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดน้อยกว่า 2,500 CFU ต่อกรัม

จากการศึกษาได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดจำนวน 403 ไอโซเลต แล้วนำไปศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ส่วน Micrococcaceae ที่คัดแยกได้จำนวน 250 ไอโซเลต ถูกนำไปทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคส การผลิตกรดจากกลีเซอรอล การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟีน และความต้านทานต่อแบซิตราซิน เพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ต่อไป

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก และ Micrococcaceae ในเนื้อหมู เนื้อวัว เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก		จำนวน Micrococcaceae ที่คัดเลือกได้ (ไอโซเลต)
					คัดเลือก (ไอโซเลต)	สร้างสารยับยั้ง (agar spot test)	
เนื้อวัว	10	$1.2 \times 10^7 - 1.8 \times 10^9$	$7.8 \times 10^5 - 9.3 \times 10^7$	$2.2 \times 10^4 - 9.6 \times 10^6$	100	21	80
เนื้อหมู	10	$3.7 \times 10^6 - 1.7 \times 10^9$	$7.0 \times 10^5 - 4.0 \times 10^7$	$1.8 \times 10^4 - 1.0 \times 10^7$	70	43	90
เบคอน	10	$2.7 \times 10^6 - 5.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^5 - 1.2 \times 10^7$	< 2,500	100	40	0
แหนม	10	$3.2 \times 10^7 - 1.1 \times 10^8$	$2.5 \times 10^6 - 6.7 \times 10^8$	$5.0 \times 10^3 - 2.9 \times 10^4$	83	47	30
ไส้กรอกอีสาน	10	$1.2 \times 10^5 - 1.6 \times 10^7$	$1.7 \times 10^4 - 2.3 \times 10^7$	$4.5 \times 10^3 - 1.2 \times 10^4$	50	33	50
รวม	50	-	-	-	403	184	250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.3.1 การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี Agar spot test

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดได้ทั้งหมด 403 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งหมด 11 ชนิด ที่ทดสอบด้วยวิธี agar spot test พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 184 ไอโซเลต โดยเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบซึ่งถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มากที่สุด คือ *Enterococcus faecium* TISTR 1283 (คิดเป็นร้อยละ 73.37 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ 184 ไอโซเลต) ส่วนเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญรองลงมาคือ *Bacillus cereus* DMST 5040 ร้อยละ 63.69

1.3.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 184 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทส และการไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลตที่คัดเลือกไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ส่วนการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรทรีดักเทสพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 32 ไอโซเลต (ร้อยละ 17.39 ของแบคทีเรียกรดแลคติก 184 ไอโซเลต) สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และจากการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 114 ไอโซเลต (ร้อยละ 61.96 ของแบคทีเรียกรดแลคติก 184 ไอโซเลต)ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดสอบนี้จึงได้คัดเลือกไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase จำนวน 25 ไอโซเลตเพื่อนำไปศึกษาการทนต่อกรด เกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของตัวอย่าง	แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง (ไอโซเลต)	ไนเตรทรีดักเทส		การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
เนื้อวัว	21	10	C0403, C0501, C0503, C0604, C0605, C0608, C0609, C0610, C0708, C0904	8	C0403, C0604, C0605, C0608, C0609, C0610, C0708, C0709
เนื้อหมู	43	9	P0509, P0510, P0706, P0708, P0804, P0806, P0808, P0906, P0907	35	P0501, P0504, P0506, P0508, P0509, P0510, P0610, P0603, P0604, P0605 P0607, P0703, P0705, P0706, P0708, P0709, P0802, P0804, P0806, P0901, P0902, P0903, P0904, P0905, P0910, P1001, P1002, P1003, P1004, P1005, P1006, P1007, P1008, P1009
เบคอน	40	13	B0407, B0410, B0708, B0709, B0807, B0808, B0810, B0901, B0905, B0906, B1002, B1006, B1010	11	B0404, B0406, B0407, B0410, B0610, B0708, B0709, B0910, B1002, B1006, B1010
แหนม	47	0	-[a]	42	S0301, S0302, S0303, S0304, S0305, S0306, S0307, S0308, S0309, S0310, S0402, S0403, S0404, S0405, S0406, S0407, S0408, S0409, S0602, S0803, S0804, S0806, S0807, S0810, S0701, S0702, S0703, S0704, S0706, S0707, S0708, S0709, S0710, S0902, S0903, S0904, S0905, S0906, S0907, S0908, S0909, S0910
ไส้กรอกอีสาน	33	0	-[a]	18	T0101, T0102, T0201, T0202, T0204, T0205, T0402,T0405, T0701, T0703, T0704, T0705, T0802, T0901, T0902, T0903, T0904, T0905
รวม	184	32	-	114	-

[a] ไม่พบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

จากการศึกษาการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช 1.5 ถึง 5.0 ซึ่งปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุดถึง 1.5 คิดเป็นร้อยละ 80 ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกทั้งหมด (25 ไอโซเลต) รองลงมาคือพีเอช 2.0 คิดเป็นร้อยละ 8.0 และพีเอช 2.5 คิดเป็นร้อยละ 12.0 (ตารางที่ 4.4)

จากการศึกษาการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก (ตารางที่ 4.4) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุด 1.5 คิดเป็นร้อยละ 68 ส่วนที่ระดับพีเอช 2.0 คิดเป็นร้อยละ 16 รองลงมาคือที่ระดับพีเอช 3.0 คิดเป็นร้อยละ 12 และที่ระดับพีเอช 4.0 คิดเป็นร้อยละ 12

จากผลการศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดี (ตารางที่ 4.4) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดร้อยละ 11 จำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 60 ของจำนวน 25 ไอโซเลตที่ทดสอบ รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10, 7 และ 9 มีแบคทีเรียกรดแลคติกทนได้จำนวน 5, 2 และ 1 ไอโซเลตตามลำดับ นอกจากนี้การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (25 ไอโซเลต) ทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 5 และร้อยละ 2 ซึ่งมีจำนวน 9 ไอโซเลตเท่ากัน คิดเป็นร้อยละ 36 รองลงมาคือ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 4, 3 และ 1.5 ซึ่งมีจำนวน 3, 2 และ 1 ไอโซเลตเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

แหล่งของไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	สภาวะที่ใช้ทดสอบการทนแบคทีเรียกรดแลคติก			
		กรดไฮโดรคลอริก (pH)	กรดแลคติก (pH)[a]	โซเดียมคลอไรด์[b] (ร้อยละ)	เกลือน้ำดี[b] ที่ pH 8 (ร้อยละ)
เนื้อวัว	C0403, C0609	1.5	1.5	11.0	3.0
	C0604	1.5	1.5	11.0	5.0
	C0605	1.5	4.0	7.0	5.0
	C0608	1.5	1.5	11.0	1.5
	C0610	1.5	-[c]	-[c]	5.0
	C0708	1.5	3.0	7.0	5.0
เนื้อหมู	P0509, P0510, P0804, P0806	1.5	1.5	11.0	2.0
	P0706, P0708	2.5	2.0	10.0	2.0
เบคอน	B0407, B0410	1.5	1.5	11.0	5.0
	B0708	1.5	1.5	10.0	2.0
	B0709	2.5	1.5	10.0	2.0
	B1002	2.0	1.5	10.0	2.0
	B1010	2.0	1.5	9.0	2.0
แหนม	S0602	1.5	1.5	11.0	5.0
ไส้กรอกอีสาน	T0701, T0901, T0904	1.5	1.5	11.0	4.0
	T0704, T0903	1.5	1.5	11.0	5.0

[a] ค่าพีเอชต่ำสุดของกรดแลคติกหรือกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

[b] ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์หรือเกลือน้ำดีในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

[c] ไม่พบการเจริญ

1.3.4 การทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion assay

จากผลทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านมาได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจำนวน 10 ไอโซเลต นำไปทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion assay ได้แก่ ไอโซเลต B0407, B0410, B0708, S0602, C0604, T0701, T0704, T0901, T0903 และ T0904 พบว่ามีเพียง 4 ไอโซเลตที่สามารถทำให้เกิดโซนการยับยั้ง (inhibition zone) แต่ไอโซเลตซึ่งที่สามารถทำให้เกิดโซนการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 เพียงชนิดเดียวได้แก่ ไอโซเลต S0602

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 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 ไอโซเลตนี้ถูกคัดเลือกมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอก กลูเลสพบว่า แบคทีเรียนี้จำนวน 73 ไอโซเลต (49.66%) จาก 147 ไอโซเลตไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (coagulase-negative cocci; GNC) จากนั้นจึงได้แยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* พบว่า57 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)

1.5 การคัดเลือกและจำแนกชนิดของ coagulase-negative staphylococci

แบคทีเรีย *Staphylococcus* ทุกไอโซเลตได้ถูกนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส 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* SC0903) ที่สร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสและไม่สร้างและเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในอาหารหมัก ดังนั้น *S. xylosus* C0903 จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 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]	SC0204	SP0204, SP0205	SS0902	SS0301, SC0209	SC0608	SS0804,C0206	SS0802, SC0609, SC0903, SC0904, SC0907, SP0202 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: รหัสที่ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวที่สอง C, แยกได้จากเนื้อวัวสด; P, แยกได้จากเนื้อหมูสด; S, แยกได้จากแหนม [b] *S. xylosus* SC0903 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) ของกรดอะมิโนโพลีเอมีน (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 ปวดหัวไมเกรน เพิ่มความดันโลหิตและอื่นๆ (Shalaby, 1996) ปัจจุบันไบโอเจนิกเอมีนเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะผู้บริโภคจำนวนมากแพ้สารไบโอเจนิกเอมีนเนื่องจากในร่างกายของผู้บริโภคเหล่านั้นขาดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (amine oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการขจัดความเป็นพิษของสารเหล่านี้ (Suzzi และ Gardini, 2003)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้สร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและไนไตร์ตรีดักเทสจึงเหมาะสมเพราะอาจทำให้เกิดการพัฒนาสีที่ดีและช่วยลดปริมาณไนไตร์ตตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยตอนที่ 2

2.1 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี Agar disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิดคือ น้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันพริกหอม (ตารางที่ 4.1) โดยเฉพาะน้ำมันอบเชยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีที่สุด เนื่องจากมีขนาดของบริเวณการยับยั้งกว้างที่สุด (21-42 มิลลิเมตร) สำหรับน้ำมันกระทือ น้ำมันเร่ว และน้ำมันขมิ้นอ้อยพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยมาก โดยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *L. monocytogenes* และ *Sal.* Rissen ได้ และเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าไวต่อน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดคือ *B. cereus* และ *S. aureus* โดยพบว่า *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากที่สุด ซึ่งสามารถวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 42 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. cereus* ซึ่งวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 38.25 มิลลิเมตร น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีเช่นกัน โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีขนาดของบริเวณการยับยั้งกว้างกว่าเชื้ออื่น คือ 22.5 และ 20.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันจันทน์เทศมีผลทำให้เชื้อ *S. aureus* มีการเจริญของเชื้อน้อยมากจนไม่สามารถวัดบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นได้

น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดี ได้แก่ น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันพริกหอม และน้ำมันอบเชย โดยเฉพาะน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุดเพราะมีผลทำให้เชื้อยีสต์ทั้งหมดไม่มีการเจริญเกิดขึ้นเลย สำหรับน้ำมันอบเชย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน และน้ำมันจันทน์เทศนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยน้ำมันจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum*, *P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum* และ *R. glutinis* ได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกัน สำหรับน้ำมันพริกหอมพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ค่อนข้างดีโดยยีสต์ที่มีความไวต่อน้ำมันชนิดนี้มากที่สุด คือ *R. glutinis* ซึ่งวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 42.3 มิลลิเมตร

สำหรับในกลุ่มของเชื้อรา น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ ได้แก่ น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันพริกหอม และน้ำมันอบเชย ซึ่งน้ำมันที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ เนื่องจากน้ำมันชนิดนี้มีผลทำให้เชื้อรา *A. flavus*, *A. ochraceus* และ *A.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

parasiticus ไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย และยังมีผลทำให้เชื้อ *F. moniliforme* มีการเจริญที่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญแบบสภาวะปกติซึ่งเป็นผลให้ไม่สามารถวัดบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นได้ สำหรับน้ำมันจันทน์เทศมีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *A. ochraceus* และ *A. parasiticus* เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอเช่นกัน แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ได้ดีโดยไม่พบการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย เช่นเดียวกับน้ำมันอบเชยที่ทำให้เชื้อ *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น ในขณะที่น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยเชื้อที่มีความไวต่อน้ำมันชนิดนี้มากที่สุด คือ *F. moniliforme* โดยวัดขนาดบริเวณการยับยั้งได้ 47.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *A. ochraceus* วัดขนาดบริเวณการยับยั้งได้ 41.5 มิลลิเมตร โดยเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ยังมีการเจริญที่เบาบางมากเมื่อเทียบกับการเจริญในสภาวะปกติอีกด้วย เชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบมีความต้านทานต่อน้ำมันกระทือ น้ำมันเร่ว และน้ำมันขมิ้นอ้อย เนื่องจากไม่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งเลย

เชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อเพนนิซิลิน จี มากที่สุดคือ *S. aureus* วัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 46.5 มิลลิเมตร ในขณะที่เพนนิซิลิน จี ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราได้ สำหรับฟลูโคนาโซลที่ระดับ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้ง การเจริญของยีสต์ได้ 3 ชนิด คือ *Z. rouxii*, *C. lipolytica* และ *P. membranaefaciens* วัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 34, 16 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ฟลูโคนาโซลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้เนื่องจากไม่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.7) โดยน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *E. coli* ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ได้อย่างสมบูรณ์ และยีสต์ที่ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด คือ *S. pombe* (ค่า MIC เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ในขณะที่เชื้อ *C. lipolytica*, *H. uvarum*, *P. membranaefaciens*, *R. glutinis* และ *Z. rouxii* ถูกยับยั้งได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า คือ มีค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เช่น น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนและน้ำมันพริกหอมพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเร่วและน้ำมันจันทน์เทศมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *R. glutinis* ได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น นอกจากนี้น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 4 ชนิด โดยระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์จะมีระดับความเข้มข้นในช่วง 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนและน้ำมันพริกหอมในระดับความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ต้องใช้ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมขึ้นไปจึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ สำหรับน้ำมันเร่ว กระทือ และขมิ้นอ้อยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ได้เลยในทุกระดับความเข้มข้น

สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด พบว่าเพนนิซิลิน จี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 31.25 ถึงมากกว่า 4000 IUต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียที่ไวต่อเพนนิซิลิน จี มากที่สุด คือ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen (ค่า MIC เท่ากับ 31.25 IUต่อมิลลิลิตร) ยกเว้น *P. fluorescens* ยีสต์และเชื้อราที่มีความต้านทานต่อเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นสูงสุด (4000 IUต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่การเจริญของ *C.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipolytica, *H. uvarum*, *P. membranaefaciens*, *S. pombe* และ *Z. rouxii* สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยฟลูโคนาโซลซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.01 ถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย *Z. rouxii* มีความไวต่อฟลูโคนาโซลมากที่สุด (MIC เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สำหรับ *R. glutinis* ต้านทานต่อฟลูโคนาโซล เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียและเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion และ agar dilution พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นที่ทดสอบ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ Gupta และคณะ (2008) ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp., *E. coli* and *L. monocytogenes* นอกจากนี้ Senanayake และคณะ (1978) ยังได้รายงานว่าในน้ำมันอบเชยที่สกัดได้จากเปลือกอบเชยมีสารประกอบทั้งหมด 72 ชนิด ได้แก่ cinnamaldehyde ร้อยละ 75 cinnamyl acetate ร้อยละ 5 caryophyllene ร้อยละ 3.3 linalool ร้อยละ 2.4 eugenol ร้อยละ 2.2 1:8-cineole ร้อยละ 2 *p*-cymean ร้อยละ1.1 α-terpinesol ร้อยละ 0.7 coumarin ร้อยละ 0.7 benzylbenzoate ร้อยละ 0.7 α-phellandrene ร้อยละ 0.6 α-humulene ร้อยละ 0.6 limonene ร้อยละ 0.5 และสารประกอบอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย โดยสารในน้ำมันอบเชยที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากที่สุดคือ cinnamaldehyde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศโดยการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion

จุลินทรีย์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)[a]									
	น้ำมันหอมระเหย								ยาปฏิชีวนะ	
	กระทือ	ขมิ้นอ้อย	ขิง	เทียนตาตั๊กแตน	เทียนสัตตบุษย์	พริกหอม	เร่ว	อบเชย	เพนนิซิลิน จี (5000 IU/ml)	ฟลูโดนาโซล (2 มก./มล.)
แบคทีเรีย										
Bacillus cereus	10.5	10	22.5	12.75	13.5	20.5	13.25	38.25	13.5	-
Escherichia coli	-[b]	-	8.75	8.25	8	15	-	24.5	10	-
Listeria monocytogenes	-	-	8.25	8	7.5	13.25	-	20.75	17.5	-
Pseudomonas fluorescens	-	7	7.5	8	8	12.5	7	21	-	-
Salmonella Rissen	-	-	8	8.25	8	14.5	-	22.5	18.5	-
Staphylococcus aureus	11.5	8.75	PI	22.75	-	21.5	10.25	42	46.5	-
ยีสต์										
Candida lipolytica	8.5	-	13	33.75	CI	32.5	10.25	69.5	-	16
Hanseniaspora uvarum	9.25	-	CI	CI	CI	33.25	13	CI	-	-
Pichia membranaefaciens	7	7	CI	41	CI	19.75	9	48	-	10
Rhodotorula glutinis	10.25	9.75	CI	CI	CI	42.3	25	77.5	-	-
Schizosaccharomyces pombe	9.75	8	25.5	27.25	CI	34	15.25	CI	-	-
Zygosaccharomyces rouxii	9	7	14	20.75	CI	23	11	55	-	34
เชื้อรา										
Aspergillus flavus	-	-	CI	24.5	CI	17	-	58	-	-
Aspergillus ochraceus	-	-	PI	41.5	CI	25.75	-	CI	-	-
Aspergillus parasiticus	-	-	PI	14.75	CI	11.75	-	59.75	-	-
Fusarium moniliforme	-	-	16.75	47.5	PI	23.5	-	CI	-	-

[a]ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

[b]ไม่เกิดโซนการยับยั้ง

PI = เกิดการยับยั้งการเจริญได้บางส่วน (Partially Inhibition)

CI = เกิดการยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ (Completely Inhibition)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibition concentration) ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)									
	ชนิดของน้ำมันหอมระเหย								ยาปฏิชีวนะ	
	กระทือ	ขิงป่าย้อย	จันทน์เทศ	เทียนสัตตบุษย์	เทียนสัตตบุษย์	พริกหอม	เร่ว	อบเชย	เพนนิซิลิน จี (IU/มล.)	ฟลูโคนาโซล (มก./มล.)
แบคทีเรีย										
Bacillus cereus	> 20	> 20	12	6	6	6	12	0.5	250	> 1
Escherichia coli	> 20	> 20	18	10	10	16	> 20	2.0	125	> 1
Listeria monocytogenes	> 20	> 20	18	18	> 20	20	> 20	1.0	62.5	> 1
Pseudomonas fluorescens	> 20	> 20	20	10	16	16	> 20	2.0	> 4000	> 1
Salmonella Rissen	> 20	> 20	20	16	> 20	20	> 20	2.0	31.25	> 1
Staphylococcus aureus	> 20	> 20	8	6	> 20	6	12	2.0	31.25	> 1
ยีสต์										
Candida lipolytica	> 20	> 20	4	2	4	2	6	0.25	> 4000	0.02
Hanseniaspora uvarum	12	> 20	6	2	6	1	6	0.25	> 4000	0.04
Pichia membranaefaciens	> 20	> 20	6	2	6	2	14	0.25	> 4000	0.04
Rhodotorula glutinis	12	14	2	1	1	1	1	0.25	> 4000	> 1
Schizosaccharomyces pombe	> 20	14	6	2	6	2	6	0.063	> 4000	0.08
Zygosaccharomyces rouxii	> 20	18	6	2	6	2	6	0.25	> 4000	0.01
เชื้อรา										
Aspergillus flavus	> 20	> 20	6	2	4	6	> 20	0.031	> 4000	> 1
Aspergillus ochraceus	> 20	> 20	4	1	1	1	> 20	0.015	> 4000	> 1
Aspergillus parasiticus	> 20	> 20	6	2	4	6	> 20	0.031	> 4000	> 1
Fusarium moniliforme	> 20	> 20	6	1	1	1	> 20	0.031	> 4000	> 1

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันพริกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh และคณะ (2005b) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium graminearum*, *A. flavus* และ *Penicillium citrinum* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยังได้รายงานไว้ว่าในน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีสารประกอบทั้งหมด 35 ชนิด โดยสารประกอบหลักคือ carvone ร้อยละ 55.2 limonene ร้อยละ 16.6 dill apiole ร้อยละ 14.4 linalool ร้อยละ 3.7 *trans*-dihydrocarvonene ร้อยละ 2.8 *cis*-dihydrocarvonene ร้อยละ 2.6 สำหรับในการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jirovetz และคณะ (2003) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* และมีประสิทธิภาพน้อยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบได้ดีซึ่งเห็นได้จากการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสาร volatile oil ในปริมาณสูง Tabanca และคณะ (2006) ได้รายงานว่าในน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสารประกอบหลายชนิด ได้แก่ anethole ร้อยละ 94.2 methyl chavicol ร้อยละ 2.0 γ-himachalene ร้อยละ 1.4 pseudoisoeugenyl-2-methyl butyrate ร้อยละ 0.7 และสารประกอบอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย Kosalec และคณะ (2005) ได้รายงานด้วยว่าน้ำมันเทียนสัตตบุษย์สามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยให้บริเวณการยับยั้งที่ใหญ่ คือ 21-30 มิลลิเมตร โดยสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันเทียนสัตตบุษย์นี้อาจเป็นผลมาจากสารประกอบสำคัญที่เป็นสารประกอบหลัก คือ anethol สำหรับน้ำมันจันทน์เทศพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ซึ่ง Singh และคณะ (2005a) ได้รายงานว่าน้ำมันจันทน์เทศสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และยังพบว่าในน้ำมันจันทน์เทศมีสารสำคัญทั้งหมด 49 ชนิด ได้แก่ sabinene ร้อยละ 20.22 terpinen-4-ol ร้อยละ 12.08 safrole ร้อยละ 10.32 α-pinene ร้อยละ 9.7 β-phellandrene ร้อยละ 6.56 γ-terpinene ร้อยละ 5.93 β-pinene ร้อยละ 5.5 และอื่นๆ โดยสารประกอบรองเช่น eugenol ร้อยละ 1.88 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าสารประกอบหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

2.3.1 การหาความสามารถในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

จากผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลของ DPPH เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ α-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลของ DPPH ดีที่สุด คือน้ำมันอบเชยโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลของ DPPH ดีรองลงมา คือ น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.93 และ 5.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) สำหรับน้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันกระทือ น้ำมันเทียนเร่วและน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนพบว่าต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมในการที่จะกำจัดอนุมูลของ DPPH ได้ร้อยละ 50 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 47.85, 86.88, 110.43, 119.8 และ 128.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารมาตรฐาน α-tocopherol และ BHT ยังคงเป็นสารที่มีสมบัติในการกำจัด DPPH radical ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.05 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.2 β-carotene bleaching test

จากผลการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β-carotene bleaching test เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ α-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) พบว่าน้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชย และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดี (รูปที่ 4.2) โดยน้ำมันจันทน์เทศมีสมบัติในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เท่ากับร้อยละ 68.52 แต่ยังคงมีสมบัติดีไม่เท่ากับสารมาตรฐาน α-tocopherol และ BHT ซึ่งมีค่า antioxidant activity สูงถึงร้อยละ 89.94 และ 87.18 ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติดีรองลงมาคือ น้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชย และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับร้อยละ 66.16, 61.46 และ 60.91 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันกระทือ และน้ำมันเร่วมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ไม่ดีเท่ากับน้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันพริกหอมและน้ำมันอบเชย โดยมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 4.2.1)

2.3.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

เอกสารนี้ [illegible] นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี FRAP พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดีที่สุด คือ น้ำมันอบเชย โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 2.11 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 4.3) ซึ่งหมายความว่าน้ำมัน 1 มิลลิกรัมสามารถเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ในปริมาณ 2.11 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิดที่ใช้ทดสอบ (α-tocopherol และ BHT) พบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกับ BHT คือ 2.41 มิลลิโมลาร์ แต่ยังดีไม่เท่ากับ α-tocopherol ซึ่งมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีมากที่สุด โดยสามารถทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ได้ถึง 7.44 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม สำหรับน้ำมันพริกหอม น้ำมันจันทน์เทศ มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดีใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ได้ 0.26 และ 0.22 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม น้ำมันที่มีสมบัติในการเป็นรีดิวซ์ที่ดีรองลงมา คือ น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันกระทือ และน้ำมันเร่ว โดยเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ เท่ากับ 0.17, 0.15, 0.14 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ และพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ต่ำที่สุด คือ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ เพียง 0.02 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม

2.3.4 Superoxide anion-scavenging activity method

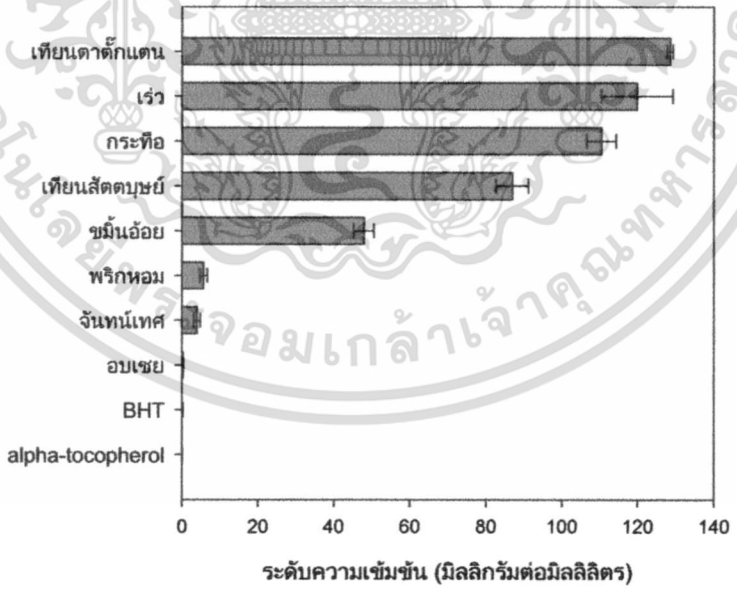
จากผลการทดสอบความสามารถในการกำจัด superoxide anion ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำมันอบเชยมีความสามารถในการกำจัด superoxide anion ได้ดีที่สุดโดยมีความสามารถในการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 84.30 (รูปที่ 4.4) รองลงมา คือ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ซึ่งมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 82.62 ซึ่งน้ำมันทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการกำจัด superoxide anion ได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิก (ร้อยละ 82.40) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สำหรับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆพบว่ามีสามารถในการกำจัดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 80.83 รองลงมา คือ น้ำมันเร่ว น้ำมันกระทือ น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันพริกหอม และน้ำมันจันทน์เทศ โดยมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 80.55, 79.95, 79.46, 79.07 และ 78.28 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) สำหรับค่าการกำจัดอาจมีค่าเพิ่มขึ้นได้ถ้ามีการเพิ่มระดับความเข้มข้นซึ่งจะเห็นได้จากกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าการกำจัดที่แตกต่างกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าการกำจัดที่มากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ร้อยละ 97.03 ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการกำจัดเท่ากับ 82.40 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอาจมีผลต่อค่าการกำจัด superoxide anion โดยเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นจะทำให้ค่าร้อยละของการกำจัดเพิ่มขึ้น

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

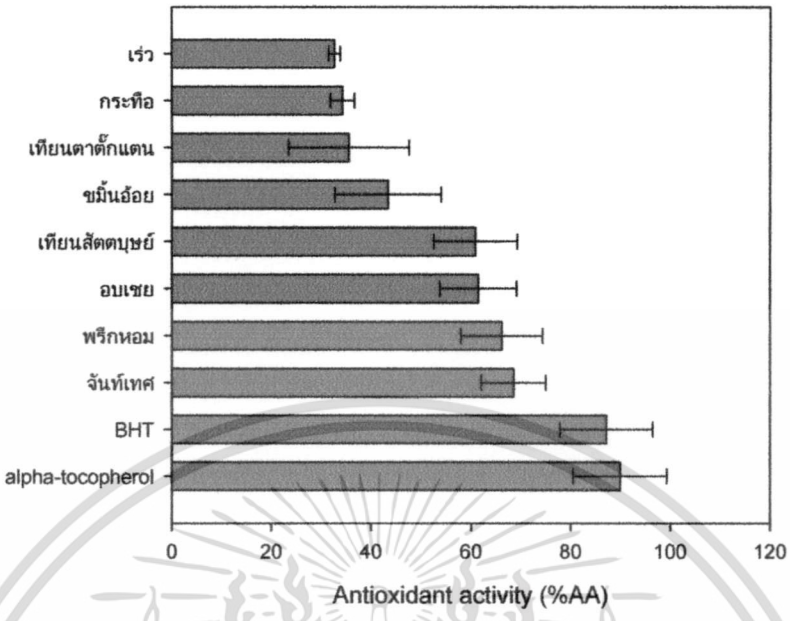
จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด คือ น้ำมันอบเชย รองลงมาคือ น้ำมันพริกหอม น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันขมิ้นอ้อย (รูปที่ 4.5) ซึ่งมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 140.9, 75.2, 51.54, 22.53 และ 15.26 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ สำหรับน้ำมันกระทือ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน และน้ำมันเร่วพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเพียง 7.11, 2.96 และ 2.29 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ



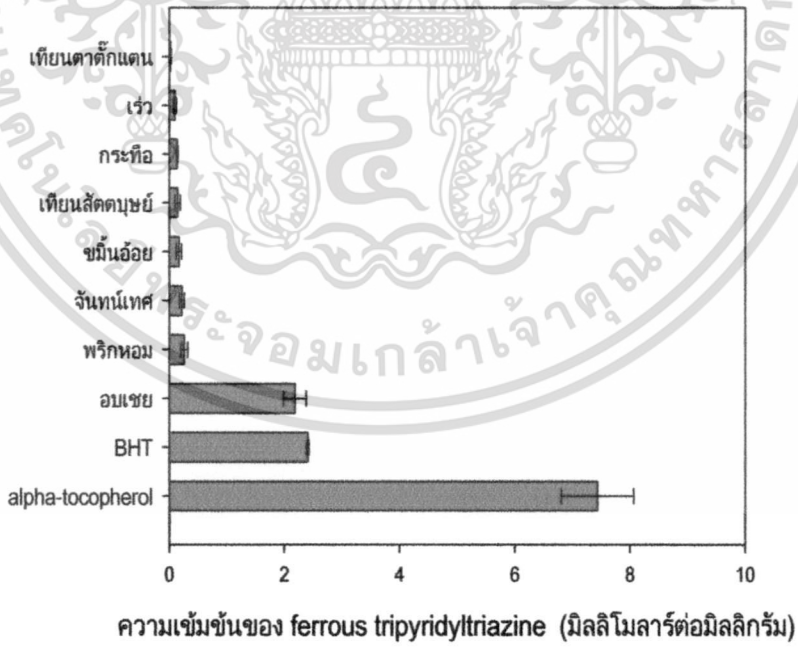
รูปที่ 4.1 ค่า Inhibition concentration 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



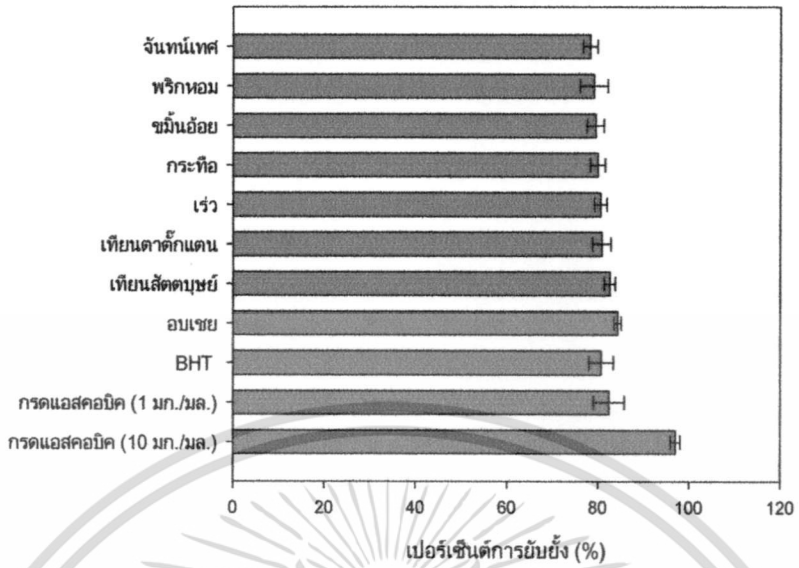
รูปที่ 4.2 ค่า Antioxidant activity (%) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศด้วยวิธี β-carotene bleaching test



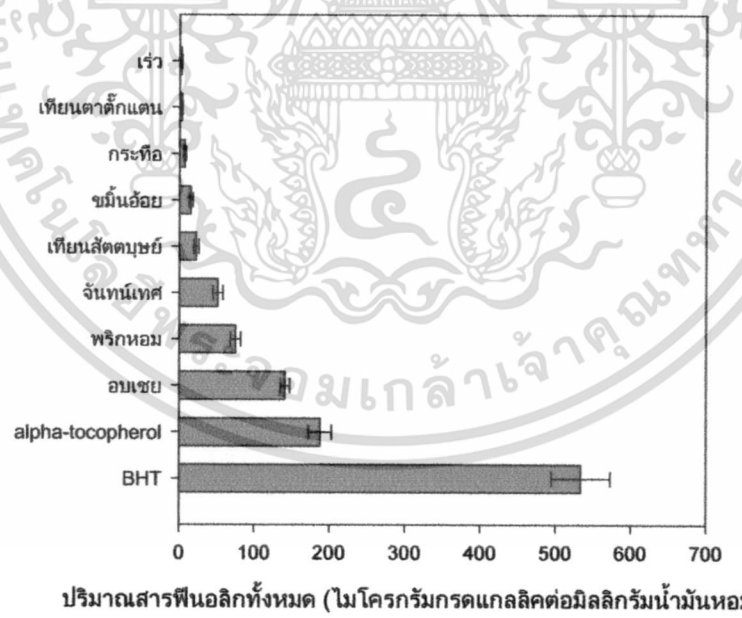
รูปที่ 4.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศซึ่งวิเคราะห์ด้วย

วิธี Ferric reducing antioxidant power assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Superoxide anion-scavenging activity



รูปที่ 4.5 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดพบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (รูปที่ 4.5) ในงานวิจัยของ Singh และคณะ (2007) ได้รายงานว่า cinnamaldehyde และ eugenol ซึ่งเป็นสารฟีนอลิกในกลุ่มของ volatile oil มีสมบัติในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical เช่นเดียวกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันจันทน์เทศซึ่งอาจเป็นผลมาจากสาร methy eugenol ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเป็นส่วนประกอบใน volatile oil ที่พบในปริมาณน้อย (Singh และคณะ, 2005a) สำหรับน้ำมันพริกหอมซึ่งมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีอาจเป็นเพราะสารสำคัญในน้ำมันพริกหอมที่ทำให้สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยพบว่าในน้ำมันพริกหอมมีสารประกอบทั้งหมด 33 ชนิดซึ่งสารประกอบหลักได้แก่ limonene ร้อยละ 31.09 terpin-4-ol ร้อยละ 13.94 และ sabinene ร้อยละ 9.13 (Itthipanichpong และ Ruangrungsi, 2002)

2.5 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes*

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า คู่น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens*, *Sal.* Rissen และ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้ โดยเฉพาะเชื้อ *P. fluorescens*, *Sal.* Rissen และ *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันผสมชนิดนี้ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FIC index ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.5 (ตารางที่ 4.8) ให้ผลเป็น synergistic effect มีความหมายว่าเมื่อใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศทดสอบการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้จะให้ผลในการยับยั้งได้ดีเป็นทวีคูณกว่าการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันจันทน์เทศเพียงชนิดเดียว ในขณะที่เชื้อ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อน้ำมันผสมชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 ให้ผลเป็น additive หรือ indifferent effect มีความหมายว่าการใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* นั้นให้ผลได้ดีกว่าเพียงเล็กน้อย หรืออาจไม่มีความแตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันจันทน์เทศเพียงชนิดเดียว

สำหรับคู่น้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens*, *Sal.* Rissen และ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้เช่นเดียวกันกับน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จันทน์เทศ โดยเฉพาะเชื้อ *P. fluorescens*, *Sal.* Rissen และ *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันผสมชนิดนี้ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FIC index ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.5 ในขณะที่เชื้อ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อน้ำมันผสมชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 แสดงว่าน้ำมันอบเชยเมื่อผสมกับน้ำมันพริกหอมให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว และสำหรับคู่น้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอมพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้อาจบอกได้ว่าน้ำมันที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดมากที่สุด คือ น้ำมันอบเชย เนื่องจากคู่น้ำมันผสมที่มีน้ำมันอบเชยผสมอยู่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้และใช้ระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อทำการทดลองโดยผสมน้ำมันอบเชยลงไป คือคู่ของน้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอมกลับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้เลย

จากการทดลองนี้น้ำมันอบเชยจัดว่าเป็นน้ำมันที่มีประสิทธิภาพและให้ผลดีในการผสมกับน้ำมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าน้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม ซึ่งสารสำคัญที่มีในน้ำมันอบเชยที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ซึ่งได้มีรายงานว่าสารสำคัญนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeroginosa* (Singh และคณะ, 2007) และ *L. monocytogenes* (Gill และ Holly, 2004) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญชนิดนี้จะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อทำการผสมกับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เช่น น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมอาจส่งเสริมให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันอบเชย จันทน์เทศ และพริกหอม

	Listeria monocytogenes				*Pseudomonas fluorescens*				*Salmonella* Rissen				*Staphylococcus aureus*			
	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI
อบเชย - จันทน์เทศ																
อบเชย	1	0.5	0.5	0.57	2	0.5	0.25	0.38	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32
จันทน์เทศ	18	1.13	0.07		20	2.5	0.13		20	1.25	0.07		8	0.5	0.07	
อบเชย – พริกหอม																
อบเชย	1	0.5	0.5	0.57	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32
พริกหอม	20	1.25	0.07		16	1	0.07		20	1.25	0.07		6	0.38	0.07	
จันทน์เทศ-พริกหอม																
จันทน์เทศ	18	-*	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	8	-	-	-
พริกหอม	20	-	-		16	-	-		20	-	-		6	-	-	

*ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

MIC_a = MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว MIC_c = MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC = ค่า MIC ของตัวอย่างน้ำมันระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว

FICI = FIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 + FIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองนี้ได้คัดเลือกน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศเพื่อนำมาศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิด ในอาหารจำลอง 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 ชนิดมีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากกว่าน้ำมันจันทน์เทศโดยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันอบเชยในอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด (0.015-14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันจันทน์เทศ 14-22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9) สำหรับผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยน้ำมันอบเชยในอาหารต่างชนิดกันพบว่า *Sal.* Rissen, *Sal.* Senftenberg, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อการถูกยับยั้งในอาหาร sausage agar มากที่สุด (MIC 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ *Sal.* Rissen, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar (MIC 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหาร starch agar และ sausage agar ในขณะที่ *P. fluorescens* มีความต้านทานในอาหาร starch agar มากกว่าในอาหารชนิดอื่น โดยเฉพาะ *S.* Senftenberg มีค่า MIC ในอาหาร starch agar สูงถึง 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาผลของน้ำมันจันทน์เทศในอาหารจำลองต่างชนิดกันจะเห็นได้ว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันกับน้ำมันอบเชยโดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร sausage agar (MIC 14-22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหารอีกสองชนิด โดยแบคทีเรียที่มีความต้านทานมากที่สุดในอาหาร sausage agar คือ *S.* Rissen เนื่องจากมีค่า MIC สูงถึง 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับในอาหาร meat agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่า MIC เท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *S. aureus* ที่มีความต้านทานมากที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในอาหาร starch agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเนื่องจากมีค่า MIC ที่ใกล้เคียงกัน (MIC 6-8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาค่า MIC ของน้ำมันอบเชยในอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะ *L. lactis* และ *E. faecalis* ค่อนข้างมีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar มากที่สุด (MIC 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ *P. pentosaceus* และ *E. faecium* มีความต้านทานสูงสุดต่อน้ำมันอบเชยใน starch agar ในกรณีของน้ำมันจันทน์เทศพบว่า *P. pentosaceus, E. faecalis* และ*E. faecium* มีความต้านทานมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ค่า Minimum inhibitory concentration ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศใน starch agar, meat agar และ sausage agar

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	Minimum inhibitory concentration (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	น้ำมันอบเชย			น้ำมันจันทน์เทศ		
	Starch agar	Meat agar	Sausage agar	Starch agar	Meat agar	Sausage agar
แบคทีเรียก่อโรค						
Salmonella Rissen	0.063	1	0.063	8	6	22
Salmonella Senftenberg	14	1	0.063	6	6	18
Staphylococcus aureus	0.25	1	0.063	6	10	14
Listeria monocytogenes	0.063	1	0.063	6	6	18
Pseudomonas fluorescens	0.063	0.015	ND	8	6	ND
แบคทีเรียแลคติก						
Pediococcus pentosaceus	4	2	1	4	6	22
Lactococcus lactis	0.063	2	0.063	4	6	8
Enterococcus faecalis	0.125	2	0.5	6	20	22
Enterococcus faecium	4	2	2	4	6	22

ND = not detected (ตรวจไม่พบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุดในอาหาร sausage agar โดยมีค่า MIC สูงถึง 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ยังมีความต้านทานมากที่สุดในอาหาร meat agar โดยมีค่า MIC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความไวต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร starch agar มากที่สุด (4-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อพิจารณาผลของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศใน sausage agar ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะเห็นได้ว่า *P. pentosaceus* และ *E. faecium* ค่อนข้างมีความต้านทานสูงต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดนี้ ฉะนั้นจึงเป็นผลดีหากนำเชื้อทั้งสองชนิดนี้มาเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ แต่เชื้อ *P. pentosaceus* มีความเหมาะสมกว่า เนื่องจากเป็นเชื้อที่ปกตินิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมัก (Jessen, 1995) สำหรับเชื้อ *E. faecium* ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (Devriese และ Pot, 1995) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *P. pentosaceus* สำหรับเป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยในการทดลองขั้นต่อไป

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar แสดงให้เห็นว่า *Sal.* Rissen, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. lactis* และ *E. faecalis* ค่อนข้างมีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชย อาจเป็นเพราะในอาหารชนิดนี้ประกอบด้วย beef extract ซึ่งเป็นส่วนผสมอาหารที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก และมีสัดส่วนที่สูงกว่าประกอบกับไม่มีสารยับยั้งชนิดอื่นเป็นส่วนผสมเช่นเดียวกับใน sausage agar ซึ่ง Jay และคณะ (2005) กล่าวว่าเนื้อวัวประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 19.5 ไขมันร้อยละ 11 เถ้าร้อยละ 1.0 และน้ำร้อยละ 69 โดยโปรตีนอาจมีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์จากการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Juven และคณะ (1993) ที่พบว่า การเติม bovine serum albumin ลงในอาหาร nutrient agar และ minimal medium จะช่วยป้องกัน *Salmonella* Typhimurium จากการถูกยับยั้งโดย thymol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันไทม์ได้ โดยปกติสารประกอบฟีนอลิกในน้ำมันหอมระเหยจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่เมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง การเติม bovine serum albumin ซึ่งเป็นโปรตีนลงไปในอาหารจะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนที่เซลล์เมมเบรนได้ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเข้าจับกับหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิลเอมีนของ bovine serum albumin ที่เติมลงไปจึงช่วยให้เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียรอดชีวิต จากน้ำมันหอมระเหยได้ นอกจากนี้บางครั้งยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดที่ใช้ทดสอบมีความต้านทาน ต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยของน้ำมันจันทน์เทศใน sausage agar มากที่สุด อาจเป็นเพราะใน sausage agar มีไขมันเป็นส่วนประกอบมากกว่าในอาหารอีกสองชนิด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Singh และคณะ (2003) ซึ่งได้รายงานว่าน้ำมันไทม์ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตรสามารถลดจำนวนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในฮอทดอกที่ไม่มีไขมันและฮอทดอกที่มีไขมันต่ำ แต่กลับมีประสิทธิภาพต่ำในฮอทดอกที่มีไขมันสูง เช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่า 1.3 log CFU ต่อกรัมในฮอท ดอกที่ไม่มีไขมัน แต่กลับมีประสิทธิภาพน้อยในการยับยั้งในฮอทดอกที่มีไขมันต่ำและฮอท ดอกที่มีไขมันสูง

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร sausage agar โดยน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ พบว่าค่า MIC ของน้ำมันจันทน์เทศต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีค่าค่อนข้างสูง แต่ในน้ำมันอบเชยกลับให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะสาร active components ที่เป็นองค์ประกอบหลักในอบเชย คือ cinnamaldehyde (ร้อยละ 75) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิจัยตอนที่ 3

3.1 ผลของกล้าเชื้อจุลินทรีย์และน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและการลดปริมาณไนไตรท์ตกค้างในไส้กรอกอีสาน

จากการศึกษาผลของกล้าเชื้อ *S. xylosus* C0903 (10^6 CFU ต่อกรัม) และ *L. plantarum* S0602 (10^6 CFU ต่อกรัม) ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (50 ppm และ 500 ppm) และน้ำมันอบเชย (1008 ppm) ในฐานะของสารทดแทนไนไตรท์ต่อการลดลงของไนไตรท์ตกค้างและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในไส้กรอกอีสานที่เติม *S. aureus* and *Salmonella* Schwarzengrund ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ถูกประเมิน ผลปรากฏว่า หลังจากหมัก 48 ชั่วโมงค่าพีเอชของไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์เพียง 50 ppm ลดลงมากที่สุด (จาก 5.33-5.36 เหลือ 4.39) ซึ่งต่ำกว่าค่าพีเอชของไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 50 ppm ร่วมกับน้ำมันอบเชย 1008 ppm (จาก 5.32-5.34 เหลือ 4.38-4.40) ขณะที่ค่าพีเอชของไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 500 ppm (ทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมันอบเชย) มีค่าพีเอชลดลงน้อยที่สุด (จาก 5.53-5.52 เหลือ 4.47-4.49) อย่างไรก็ตามการใส่กล้าเชื้อหรือไม่ใส่ไม่มีผลทำให้ค่าพีเอชแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.10) และเมื่อพิจารณาปริมาณไนไตรท์ตกค้างในไส้กรอกหลังจากหมัก 48 ชั่วโมงพบว่า ไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 500 ppm มีปริมาณไนไตรท์ตกค้างมากที่สุด (29.2-43.8 ppm) แต่ไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 500 ppm มีปริมาณไนไตรท์ตกค้างปริมาณน้อยกว่า (0.6-2.3 ppm) การใส่กล้าเชื้อมีผลทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงเฉพาะในไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 50 ppm ส่วนค่าสีของไส้กรอก พบว่าเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า L* (ค่าความสว่าง) ของไส้กรอกเกือบทุกตัวอย่างเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับค่า a* และค่า b* ส่วนผลของการเติมโซเดียมไนไตรท์และน้ำมันอบเชยต่อการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรค พบว่าการเติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm ให้ผลในการลดจำนวน *S. aureus* ได้ดีกว่าการไม่เติม เช่นเดียวกันการเติมโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 500 ppmให้ผลในการลดจำนวน *S. aureus* ได้ดีกว่าการเติมโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 50 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช สี ปริมาณไนไตรท์ตกค้างและจำนวน *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Schwarzengrund ในไส้กรอกอีสานระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30°C

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	ไนไตรท์ตกค้าง (ppm)	ค่าสี			จำนวน *S. aureus* (CFU/g)	จำนวน *Salmonella* (CFU/g)
				L*	a*	b*		
1) CONTROL	0	5.36	0.6	58.78	+7.09	+7.00	3.4×10^7	1.4×10^7
	48	4.37	0.6	66.65	+5.39	+8.81	1.8×10^6	1.7×10^4
2) $N50_{NO\ ST}$	0	5.33	21.0	61.95	+5.90	+5.48	1.6×10^6	1.4×10^7
	48	4.39	1.1	62.65	+9.34	+7.17	1.4×10^6	1.5×10^6
3) $N50_{WITH\ ST}$	0	5.33	21.6	56.81	+6.45	+6.41	8.1×10^6	1.4×10^7
	48	4.39	1.8	63.92	+8.92	+6.97	1.2×10^6	5.5×10^3
4) $CON50_{No\ ST}$	0	5.34	24.0	61.26	+4.92	+5.05	6.3×10^6	1.4×10^7
	48	4.40	2.3	64.66	+7.42	+7.67	4.3×10^3	5.6×10^3
5) $CON50_{WITH\ ST}$	0	5.32	23.4	58.33	+6.27	+7.24	6.6×10^6	1.4×10^7
	48	4.38	0.6	65.04	+7.67	+8.48	1.8×10^4	4.5×10^3
6) $N500_{No\ ST}$	0	5.53	127	60.35	+5.74	+3.87	6.9×10^6	1.4×10^7
	48	4.47	29.2	64.71	+5.80	+10.08	6.7×10^3	3.2×10^3
7) $CON500_{WITH\ ST}$	0	5.52	150.8	55.35	+7.25	+7.26	4.5×10^6	1.4×10^7
	48	4.49	43.8	61.81	+7.81	+10.80	5.2×10^3	3.6×10^2

1) Control คือ ไส้กรอกที่ไม่ใส่ไนไตรท์ ไม่ใส่กล้าเชื้อ; 2) $N50_{NO\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 50 ppm ไม่ใส่กล้าเชื้อ; 3) $N50_{WITH\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 50 ppm ใส่กล้าเชื้อ ***Staphylococcus xylosus*** **SC0903 และ** ***Lactobacillus plantarum*** **C0602;** 4) $CON50_{No\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 50 ppm ไม่ใส่กล้าเชื้อ เติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm; 5) $CON50_{WITH\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 50 ppm ใส่กล้าเชื้อ เติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm, 6) $N500_{No\ ST\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 500 ppm ไม่ใส่กล้าเชื้อ; 7) $CON500_{WITH\ ST}$ คือไส้กรอกที่ใส่ไนไตรท์ 500 ppm ใส่กล้าเชื้อ เติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้พบว่ามี *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสเพียง 1 ไอโซเลต คือ *S. xylosus* C0903 ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมได้แก่ สร้างเอนไซม์ไนไตรทรีดักเทสซึ่งอาจช่วยทำให้เกิดการพัฒนาสีที่ดี สร้างไนไตรท์รีดักเทสซึ่งช่วยลดปริมาณไนไตท์ตกค้างและไม่สร้างและเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสซึ่งอาจจะไม่ทำให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ดังนั้น *Staphylococcus* สายพันธุ์นี้อาจเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อมี 4 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต B0410, S0602, T0903 และ T0904 ซึ่งเป็น *Lactobacillus plantarum* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.6) *Lactobacillus plantarum* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.9) *Lactobacillus brevis* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 62.5) และ *Lactobacillus brevis* (ความคล้ายคลึงร้อยละ 99.6) เชื้อ *S. xylosus* C0903 และ *L. plantarum* S0602 ที่คัดเลือกได้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน นอกจากนี้การเติมน้ำมันอบเชย 1008 ppm ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์บางส่วนยังให้ผลในการลดจำนวน *S. aureus* ที่มีชีวิตในไส้กรอกอีสานได้ดี ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันอบเชยมาใช้ทดแทนโซเดียมไนไตรท์ในไส้กรอกอีสาน สำหรับการทดแทนไนไตรท์ในด้านที่ทำให้เกิดสีชมพูสวยควรจะมีการวิจัยกันต่อไป สิ่งที่น่าสนใจก็คือ ควรทำการวิจัยเกี่ยวกับการนำสารสกัดจากผลไม้ที่มีหลายคุณสมบัติในตัวเองมาใช้เป็นสารทดแทนไนไตรท์ในไส้กรอกอีสานหรือแหนมเช่น ให้สีแดงหรือสีชมพูสวย รวมทั้งมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์และการต้านออกซิเดชันด้วยเป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ฐิติรัตน์ ใจฉลาด. 2552. "การพัฒนากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัทรารินี มุนิลโท. 2550. **การสกัดพืชหอมน้ำมันหอมระเหย.** นนทบุรี : พิมพ์ทอง.

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.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. "Biological effects of essential oils-A review." **Food and Chemical Toxicology.** 46 : 446-475.

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/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

Buntin, N., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T. 2008. "Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics." **Songklanakarin Journal Science Technology**. 30 (1) : 141-148.

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.

Collin, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. 2001. **Collin and Lyne's Microbiology Methods**. New York : Oxford University.

Cowan, M.M. 1999. "Plant products as antimicrobial agents." **Clinical Microbiology Reviews.** 12 : 564-582.

Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Laakso, I. and Hiltunen, R. 2007. "Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts." **LWT-Food Science and Technology.** 40 : 1655-1663.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Devriese, L.A. and Pot. B. 1995. The genus *Enterococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (pp.327-367). London. Blackie Academic and Professional.

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

Eyob, S., Martinsen, B.K., Tsegaye, A., Appelgren, M. and Skrede, G. 2008. "Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen)." **African Journal of Biotechnology.** 7 (15) : 2585-2592.

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, A.O. and Holley, R.A. 2004. "Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*." **Applied and Environmental Microbiology.** 70 : 5750-5755.

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.

Goldin, B.R. and Gorbach S.L. 1992. "Probiotics for Humans." 356-376. in Fuller, R. **Probiotics the Scientific Basis.** London : Chapman and Hall.

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

Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C. and Kumari, A. 2008. "Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens." **African Journal of Microbiology Research.** 2 : 258-261.

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.

Itthipanichpong, C. and Ruangrungsi, N. 2002. "Chemical compositions and pharmacological effects of essential oil from the fruit of *Zanthoxylum limonella*." **Journal of the Medical Association of Thailand.** 85 : S344-S354.

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.

Jessen, B. 1995. Starter cultures for meat fermentation. In G. Campbell-Platt and P.E. Cook, **Fermented Meats** (pp. 130-159). Glasgow : Blackie Academic and Professional.

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

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V. and Damianova, S.T. 2003. "Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 51 : 3854-3857.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1993. "Factors that interact with antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents." **Journal of Applied Bacteriology.** 76 : 626-631.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S. and Kustrak, D. 2005. "Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*)." **Acta Pharmaceutica.** 55 : 377-385.

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.

Lado, C., Then, M., Varga, I., Szoke, E. and Szentmihályi, K. 2004. "Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability." **Zeitschrift für Naturforschung.** 56c : 354-358.

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.

Lücke, F.K. and Hechelmann, H. 1987. "Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect." **Fleischwirtschaft.** 67 : 307-314.

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.

Montel, M.C. 1999. "Fermentation Meat Products." 744-753. in Batt, C.A. and Patel, P.D. **Encyclopedia of Food Microbiology : Fermented Foods.** London : Academic press.

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.

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D. and Milillo, M.A. 2007. "Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin." **Phytomedicine.** 14 : 727-732.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rattanachaikunsopon, P., Saito, T. and Nitisinprasert, S. 2003. "Detection and partial characteriazation of bacteriocin produced by *Leuconostoc* isolated from thai fermented food." **Journal of Science Technology and Humanities.** 1(2) : 149-158.

Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, A. and Polissiou, M. 2004. "Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey." **Food Control.** 15 : 549-557.

Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. 2005. "Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)." **Food Chemistry.** 89 : 569-575.

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.

Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N and Traore, A.S. 2004. "Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk." **Pakistan Journal of Nutrition.** 3(3) : 174-179.

Senanayake, U.M., Lee, T.H. and Wills, R.B.H. 1978. "Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 26 : 822-824.

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.

Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. 2003. "Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs." **Lebensmittel Wiss. u.-Technology.** 36 : 787-794.

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C.S. and Catalan, C. 2005a. "Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (aril part)." **Journal of Food Science.** 70 : M141-M148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. 2005b. "Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxdative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52." **Journal of Food Science.** 70 (4) : M208-M215.

Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. 2007. "A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatiles oils, oleoresins and their constituents." **Food and Chemical Toxicology.** 45 : 1650-1661.

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

Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Bedir, E., Khan, I.A. and Wedge, D.E. 2006. "Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey." **Journal of Chromatography A.** 1117 : 194-205.

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