สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย

พัชรี ตรีบวรกุศล
สุนิสา กิตติศรีโสภิต

วพ.
W5241
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83743
วัน,เดือน,ปี 15 ก.ย. 2551
b 11983450
i.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening and characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh pork and Thai fermented pork sausage

Patcharee Treebavonkusol

Sunisa Kittisrisopit

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Industrial Microbiology

Department of Applied Biology, Faculty of Science,

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย

(Screening and characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh pork and Thai fermented pork sausage)

นักศึกษา พัชรี ตรีบวรกุศล รหัสนักศึกษา 47050519

สุนิสา กิตติศรีโสภิต รหัสนักศึกษา 47050534

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	
กรรมการ	ดร.วรภัทร สงวนไชยไผ่วงศ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย

นักศึกษา พัชรี ตรีบวรกุศล รหัสนักศึกษา 47050519

สุนิสา กิตติศรีโสภิต รหัสนักศึกษา 47050534

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ตรวจคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน จำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่า เนื้อหมูสดมีค่าพีเอชเฉลี่ย 5.94 และค่า a_w เฉลี่ย 0.979 แหนม และไส้กรอกอีสานมีค่าพีเอชเฉลี่ย 5.19 และค่า a_w เฉลี่ย 0.958 เนื้อหมูสด แหนม และไส้กรอกอีสานเกือบทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์มีปริมาณไนเตรต์ตกค้างอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (น้อยกว่า 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ยกเว้นไส้กรอกอีสานเพียง 1 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณไนไตรต์ตกค้างเกินมาตรฐาน (131.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เนื้อหมูสดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.7×10^8 ถึง 2.0×10^{10} CFU ต่อกรัม ส่วนแหนมและไส้กรอกอีสานมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.2×10^7 ถึง 2.5×10^{10} CFU ต่อกรัม และทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar spot test พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวนทั้งหมด 73 ไอโซเลต จึงได้คัดเลือกไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทส ผลปรากฏว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนเตรตรีดักเทสมีจำนวน 4 ไอโซเลต และ 6 ไอโซเลต จากจำนวน 73 ไอโซเลต ตามลำดับ ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ P0201, P0804, P0805, T0201 และ T0702 นำมาทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต T0702 สามารถทนกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริกได้ดีที่สุด เพราะทนพีเอชได้ต่ำสุดถึง 2.0 และ 1.5 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต P0201, P0804, P0805 และ T0702 สามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และพบว่า ทุกไอโซเลตสามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 11.0 จากนั้นได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลมต่อกันเป็นสายสั้นหรือเป็นคู่ จากนั้นทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 เป็นแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* หรือ *Pediococcus* ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0804, P0805, T0201 และ T0702 เป็น *Enterococcus* หรือ *Pediococcus* และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 มาทำการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ด้วยชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) พบว่า เป็น *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Screening and characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh pork and Thai fermented pork sausage

Student Patcharee Treebavonkusol student ID. 47050519

Sunisa Kittisrisopit student ID. 47050534

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic Year 2007

Special Project Advisor Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat

Abstract

In this study, chemical and biological qualities of 32 fresh pork, nham and Thai fermented pork sausage samples were determined. Average water activity (a_w) and pH values of fresh pork were 0.979 and 5.94, respectively. Average a_w and pH of both nham and Thai fermented pork sausages were 0.958 and 5.19, respectively. Residual nitrite contents of almost all samples tested were in acceptable range (125 mg/kg sodium nitrite), except for a sample of Thai fermented pork sausage which contained high residual nitrite (131.56 mg/kg sodium nitrite). Total lactic acid bacteria in fresh pork and two types of Thai fermented pork sausage were in the range of 1.7×10^{8} - 2.0×10^{10} cfu/g and 1.2×10^{7} – 2.5×10^{10} cfu/g, respectively. Antimicrobial substance-producing lactic acid bacteria were screened by agar spot test. Seventy three isolates were found to inhibit growth of at least one indicator stain. They were determined for production of catalase, nitrate reductase and nitrite reductase. Four of seventy-three isolates possessed catalase activity, and six isolates showed nitrate reductase activity, whereas none of the isolates had nitrite reductase activity. Five isolates of lactic acid bacteria such as isolates P0201, P0804, P0805, T0201 and T0702 showing suitable properties to be meat starter cultures were selected to examine their tolerance to lactic acid, HCl, bile salts and NaCl. The isolate T0702 showed the highest resistant to lactic acid (pH 2.0) and HCl (pH 1.5). The isolates showing ability to tolerate the highest concentration of bile salts tested (1.5%) were isolates P0201, P0804, P0805 and T0702, and all isolates were able to resist the highest concentration of NaCl tested (11.0%). These five isolates were studied for their morphological characteristics. They were gram-positive cocci

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and occurred in short chains or in pairs. They were further identified by biochemical test. The results showed that the isolate P0201 was belonging to the genus *Lactococcus* or *Pediococcus* and the isolates P0804, P0805, T0201 and T0702 were *Enterococcus* or *Pediococcus*. Only isolate P0201 was identified to species level using API 50 CH test kit and was found to be *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุม รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นในด้านต่างๆที่เป็นประโยชน์ตลอดจนความช่วยเหลือ คำชี้แนะและแก้ไขให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ และ ดร.วรภัทร สงวนไชยไผ่วงศ์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบหัวข้อโครงงานพิเศษที่ให้คำชี้แนะในการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงาน

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ และเพื่อนในภาควิชาคณิตศาสตร์และวิทยาการคอมพิวเตอร์ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ

และที่สำคัญ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวตรีบวรกุศลและครอบครัวกิตติศรีโสภิต ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านกำลังทรัพย์

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบให้แด่ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฏ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ
2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสด.....4
2.1.1 แหล่งของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสด.....4
2.1.2 ชนิดของจุลินทรีย์ในเนื้อสด.....5
2.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....7
2.2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก.....9
2.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส.....12
2.3 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....15
2.3.1 การใช้กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....17
2.3.2 ลักษณะสำคัญของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....19
2.3.2.1 คุณลักษณะทั่วไป.....19
2.3.2.2 คุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก.....20
2.4 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....21
2.4.1 เนื้อสัตว์.....21
2.4.2 ไขมัน.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.3 กลูโคโนแลคโตน....22
2.4.4 แอสคอร์เบท....22
2.4.5 ฟอสเฟต....23
2.4.6 เกลือ....23
2.4.7 คาร์โบไฮเดรต....23
2.4.8 เครื่องเทศ....24
2.4.9 ไนไตรต์และไนเตรต....24
2.5 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในอาหารหมัก....27
2.5.1 การหมักคาร์โบไฮเดรต....27
2.5.2 กระบวนการย่อยโปรตีน....28
2.5.3 กระบวนการย่อยไขมัน....29
2.5.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์และไนเตรตรีดักเทส....30
2.5.5 กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส....31
2.6 กิจกรรมและกลไกการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น....33
2.6.1 กรดอินทรีย์....33
2.6.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์....33
2.6.3 คาร์บอนไดออกไซด์....34
2.6.4 ไดอะซิติล....34
2.6.5 รูทีริน....35
2.6.6 แบคเทอริโอซิน....35
2.6.6.1 คุณลักษณะของแบคเทอริโอซิน....35
2.6.6.2 ประเภทของแบคเทอริโอซิน....36
2.6.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน....37
2.6.6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (Activity) ของแบคเทอริโอซิน....37
2.6.6.5 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน....38
2.6.6.6 การใช้ประโยชน์จากแบคเทอริโอซิน....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์....41

3.1.1 ตัวอย่างอาหารที่ใช้....41

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้....41

3.1.3 สารเคมี....41

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์....41

3.2 วิธีการทดลอง....42

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี เนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน....42

3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)....42

3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)....42

3.2.1.3 การหาปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในเนื้อหมูสด แหนม และไส้กรอกอีสาน....42

3.2.2 การแยกเชื้อและจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก....44

3.2.2.1 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก....44

3.2.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น....45

3.2.2.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก....46

3.2.2.4 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์....48

3.2.2.5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติก....48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์หาคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน....52

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก....54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน และการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น 54
4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 57
4.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 60
4.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน 62
4.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 62
4.2.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส 62
4.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์ 66
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 69
เอกสารอ้างอิง 71
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทำเจือจาง 76
ภาคผนวก ข คำนวณ 79
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง 81
ภาคผนวก ง รูปผลการทดลอง 96
ภาคผนวก จ วิธีการใช้เครื่องมือ 98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์....6
2.2 คุณลักษณะที่แตกต่างของแบคทีเรียกรดแลคติก.... 11
2.3 การจัดเรียงของจีนัส *Lactobacillus*....15
2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักในกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิต่างกัน....16
2.5 ผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย.... 18
2.6 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ.... 32
2.7 การผลิตแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก....39
4.1 คุณลักษณะทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน....52
4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น.... 57
4.3 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้ง.... 59
4.4 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์.... 60
4.5 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน.... 62
4.6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน.... 63
4.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต P0201 ในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH).... 68
ค.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ค่าปริมาณน้ำอิสระ และค่าพีเอช ของเนื้อหมูสด แหนม และไส้กรอกอีสาน....81
ค.2 ปริมาณไนไตรต์ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่าง เนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน....82
ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้....83
ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก....91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่

2.1 ขั้นตอนการย่อยโปรตีน....29
2.2 ขั้นตอนการย่อยไขมัน....30
4.1 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201....64
4.2 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0804....64
4.3 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805....65
4.4 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต T0201....65
4.5 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต T0702....66
4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 ในระดับสปีชีส์ โดยใช้ชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH)....67
ง.1 โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างโซนใสบนอาหาร MRS agar....96
ง.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร BSM....96
ง.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส....97
ง.4 การทดสอบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก....97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักคือ การทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นผลมาจากสร้างสารยับยั้งต่างๆ เช่น กรดแลคติก กรดอินทรีย์ เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิติลและแบคเทอริโอซิน (Caplice และ Fitzgerald, 1999) Jone และคณะ (2008) ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียจากเนื้อสด Papamamoli และคณะ (2003) ได้ทำศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกหมักแห้งของกรีก ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกล้าเชื้อที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเพื่อทำให้การหมักเกิดเร็วขึ้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสที่ดี อย่างไรก็ตาม กล้าเชื้อควรมีคุณสมบัติคือ ต้องทนเกลือได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 และทนไนไตรต์ได้ที่ 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 27-43 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ประมาณ 32 องศาเซลเซียส ไม่ผลิตสารประกอบที่ทำให้กลิ่นรสผิดปกติและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ถ้าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกควรเป็นประเภทโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Smith และ Palumbo, 1983) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ คือ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส เนื่องจากเอนไซม์นี้จะไปช่วยย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีในผลิตภัณฑ์และควรสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทส เนื่องจากการมีเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส จะมีส่วนช่วยในการลดปริมาณไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้กล้าเชื้อยังควรมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกด้วยเนื่องจากโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อสุขภาพยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้และยังป้องกันโรคท้องเสีย จากรายงานของ Fuller (1989) ซึ่งได้กล่าวว่าโพรไบโอติกจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพเมื่อได้รับในปริมาณที่พอเพียงจะช่วยป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตราย โดยการผลิตสารอินทรีย์และสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้กล้าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการสำหรับนำมาใช้ในการผลิตอาหารเนื้อหมักที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและยังให้ประโยชน์ในแง่ของโพรไบโอติก ผู้ทดลองจึงได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นและมีคุณสมบัติที่เหมาะสมอื่นๆ เช่น สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสได้ และมีความสามารถในการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ดี และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกถึงระดับสปีชีส์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน ได้แก่ พีเอช ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และปริมาณไนไตรต์ตกค้าง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานที่สร้างสารยับยั้ง เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทส จากนั้นศึกษาการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ และจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกจนถึงระดับสปีชีส์

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การศึกษาคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมูสด 10 ตัวอย่าง แหนม 9 ตัวอย่างและไส้กรอกอีสาน 2 ตัวอย่าง จากตลาดในกรุงเทพมหานครและสมุทรปราการ และตัวอย่างที่ผลิตเอง ได้แก่ แหนม 7 ตัวอย่าง และไส้กรอกอีสาน 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีคือ พีเอช ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และปริมาณไนไตรต์ตกค้าง

2. การแยกเชื้อศึกษาคุณลักษณะและการจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

2.1 ทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน นำมาวิเคราะห์จำนวนและแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยวิธี agar spot test

2.3 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ นำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทส

2.4 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งและสร้างเอนไซม์จำนวน 5 ไอโซเลต มาทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์

2.5 จำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกชนิดถึงระดับจีนัสโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทำการคัดเลือกมา 1 ไอโซเลต เพื่อจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงคุณภาพของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานที่นำมาทดสอบว่าเหมาะสมต่อการบริโภคหรือไม่

2. ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการสำหรับนำมาใช้ในการผลิตอาหารเนื้อหมักที่มีความปลอดภัยและยังให้ประโยชน์ในแง่โพรไบโอติกอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสด

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกล้ามเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารอาจเกิดการปนเปื้อนโดยตรงจากการฆ่าสัตว์และการตัดแต่งซากสัตว์ จุลินทรีย์หลายชนิดจากหลายๆ แหล่งจะปนเปื้อนลงบนผิวที่ชื้นของเนื้อสัตว์ที่เป็นแหล่งที่มีสารอาหารสูง มีการถกเถียงกันว่ามีจุลินทรีย์เพียงส่วนน้อยเท่านั้น (ร้อยละ10) ที่สามารถอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ในระหว่างการเก็บรักษา การจำหน่ายและการตัดแบ่งขายปลีกเนื้อสัตว์ นอกจากนี้จะมีจุลินทรีย์เพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่จะเจริญเด่นและทำให้เนื้อสัตว์เสีย การอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับผิวของเนื้อสัตว์ และความสามารถในการทนต่อสภาวะในกระบวนการผลิต การเก็บรักษาและความสามารถในการใช้ประโยชน์จากสารอาหารที่มีอยู่อย่างเหมาะสมในกล้ามเนื้อสัตว์โดยผ่านการย่อยหรือสลายโปรตีนโมเลกุลที่ซับซ้อนไปเป็นสับสเตรทที่จะเอาไปใช้ได้ (Marshall และ Bal' A, 2001)

2.1.1 แหล่งของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสด (Jay และคณะ, 2005)

1) มีดที่ใช้แทงคอ หลังจากการทำให้สลบและการแขวนซาก ตัวอย่างเช่น การฆ่าวัวหนุ่ม (steers) จะใช้มีดแทงคอเอาเลือดออก หากมีดที่ใช้แทงคอไม่สะอาด จุลินทรีย์จะปนเปื้อนในกระแสเลือดและกระจายไปทั่วซากสัตว์

2) หนังสัตว์ จุลินทรีย์ที่ลอยอยู่ในอากาศจะปนเปื้อนที่บริเวณหนังสัตว์ในขณะที่ยังมีชีวิตและสามารถปนเปื้อนหลังการตัดแต่งซาก และจะปนเปื้อนเข้าไปในซากสัตว์โดยผ่านทางมีดที่ใช้แทงคอ

3) ทางเดินอาหารของสัตว์ การเจาะแทงสัตว์จะทำให้องค์ประกอบในลำไส้สัตว์ที่มีจุลินทรีย์จำนวนมากเกิดการปนเปื้อนบริเวณที่ผิวซากในขั้นตอนการตัดแต่งซากโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณกระเพาะหรือลำไส้ของสัตว์ 4 กระเพาะ จะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อกรัม

4) มือของผู้ที่ทำการฆ่าและการตัดแต่งซาก แหล่งของการปนเปื้อนมาจากมือมนุษย์ที่อาจเป็นโรคและปนเปื้อนไปยังเนื้อสัตว์ที่ถูกฆ่าใหม่ๆ แม้ว่าจะมีการสวมถุงมือแต่จุลินทรีย์ก็สามารถปนเปื้อนจากซากหนึ่งไปยังอีกซากหนึ่งได้

5) ภาชนะที่ใส่ ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดออกและวางลงในภาชนะที่ไม่สะอาดจะทำให้เนื้อสัตว์เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในภาชนะได้ จึงต้องมีการควบคุมต้นเหตุของแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนไม่ให้ปนเปื้อนข้ามไปยังเนื้อบดหรือเนื้อที่ถูกสับแล้ว

6) สภาวะแวดล้อมในการขนส่งและเก็บรักษา อากาศที่หมุนเวียนจะเป็นแหล่งที่ทำให้จุลินทรีย์เกิดการปนเปื้อนที่บริเวณผิวของเนื้อสัตว์ที่ถูกฆ่าทุกชนิด

7) ต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ในกรณีของเนื้อแดง (red meat) ต่อมน้ำเหลืองซึ่งถูกฝังอยู่ในไขมัน มักจะมีจุลินทรีย์อยู่ภายในเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะแบคทีเรีย ถ้าตัดโดนหรือเติมในเนื้อสัตว์ที่ถูกบดอาจทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในเล็ดลอดออกมาปนเปื้อนซากสัตว์ได้

การปนเปื้อนของเนื้อสัตว์เกิดขึ้นในระหว่างการฆ่าสัตว์และการตัดแต่งเนื้อสัตว์ ซึ่งสุขภาพของสัตว์ ผิวหนังสัตว์ อุจจาระ จุลินทรีย์ที่ปากและการจับสัมผัสซาก สิ่งเหล่านี้ล้วนอาจเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามมายังเนื้อสัตว์ที่ปราศจากเชื้อในระหว่างการตัดแต่งซาก หนังสัตว์ประเภทโคกระบือและแกะ เป็นแหล่งของการปนเปื้อนหลักๆ ซึ่งปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากดิน อุจจาระ น้ำและจุลินทรีย์ที่ปากในระหว่างการเลี้ยงดูสัตว์ ซึ่งการทำความสะอาดหนังสัตว์และขนสัตว์ก่อนการทำการตัดแต่งซากอาจช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ แต่หลายการศึกษาก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ได้จริง แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้น้ำร้อนกับหมูสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยที่แบคทีเรียแกรมบวกยังมีชีวิตรอดอยู่ได้ ภายหลังการกำจัดขนออกจากซากหมูจะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมลบอีกซึ่งปนเปื้อนมาจากเศษซากและน้ำที่ถูกหมุนเวียนมาใช้อีก หนังสัตว์นอกจากจะพบจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย เช่น *Pseudomonas, Acinetobacter* และ *Moraxella* นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *E. coli, Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica Listeria monocytogenes* และ *Aeromonas hydrophila* อีกด้วย (Marshall และ Bal' A, 2001)

2.1.2 ชนิดของจุลินทรีย์ในเนื้อสด

เนื้อสัตว์จะถูกปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดในระหว่างกระบวนการต่างๆ (ตารางที่ 2.1) จุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *C. perfringens, S. aureus, Salmonella spp., E. coli* ที่ก่อโรค, *Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica, L. monocytogenes* และ *A. hydrophila* จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในเนื้อสัตว์สามารถก่อโรคที่เกี่ยวกับลำไส้ซึ่งเกิดเฉพาะกับคนหรือหากติดเชื้อในระบบภูมิคุ้มกันจะมีอันตรายถึงชีวิต เกิดได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ซึ่งมีภูมิคุ้มกันที่ไม่ดีพอง่ายต่อการติดเชื้อ การเน่าเสียของเนื้อสัตว์ขึ้นอยู่กับคุณภาพทางจุลินทรีย์เริ่มต้นและสภาวะภายหลังการเก็บรักษา ซึ่งจะพบเชื้อ *Pseudomonas* spp. เจริญเป็นจำนวนมากในเนื้อสัตว์แช่เย็น Enterobacteriaceae จะพบในเนื้อที่บรรจุในสภาพที่ใช้วัตถุกันเสีย และ *Brochothix thermosphacta* พบในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศและสภาพปรับบรรยากาศ (Marshall และBal'A, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์

ชนิดของจุลินทรีย์	การติดสีแกรม	เนื้อสด	ชนิดของจุลินทรีย์	การติดสีแกรม	เนื้อสด
แบคทีเรีย			*Pseudomonas*	-	XX
Achromobacter	-	X	*Psychrobacter*	-	XX
Acinetobacter	-	XX	*Salmonella*	-	X
Aeromonas	-	XX	*Serratia*	-	X
Alcaligenes	-	X	*Shewanella*	-	X
Alteromonas	-	X	*Staphylococcus*	+	X
Bacillus	+	X	*Weissella*	+	X
Brochothix	+	X	*Yersinia*	-	X
Campylobacter	-	X	**ยีสต์**		
Carnobacterium	+	X	*Candida*		XX
Citrobacter	-	X	*Cryptococcus*		X
Clostridium	+	X	*Debaryomyces*		X
Corynebacterium	+	X	*Hansenula*		X
Enterobacter	-	X	*Pichia*		X
Enterococcus	+	XX	*Rhodotorula*		X
Escherichia	-	X	*Torulopsis*		XX
Flavobacterium	-	X	*Trichosporon*		X
Hafnia	-	X	**เชื้อรา**		
Klebsiella	-	X	*Acremonium*		X
Kluyvera	-	X	*Alternaria*		X
Kocuria	+	X	*Aspergillus*		X
Kurthia	+	X	*Aureobasidium*		X
Lactobacillus	+	X	*Chrysosporium*		X
Lactococcus	+	X	*Cladosporium*		XX
Leuconostoc	+	X	*Fusarium*		X
Listeria	+	X	*Geotrichum*		XX
Microbacterium	+	X	*Monascus*		X
Micrococcus	+	X	*Monilia*		X
Moraxella	-	XX	*Mucor*		XX
Paenibacillus	+	X	*Neurospora*		X
Pentoea	-	X	*Penicillium*		X
Pediococcus	+	X	*Rhizopus*		XX
Proteus	-	X	*Sporotrichum*		XX
Providencia	-	X	*Thamnidium*		XX

X เชื้อที่เคยพบในเนื้อสด

XX เชื้อที่แยกได้บ่อยที่สุดในเนื้อสด

ที่มา : Marshall และBal'A (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อเกิดขึ้นในน้ำที่ล้อมรอบผลิตภัณฑ์ เนื่องจากในน้ำนี้มีสารอาหารที่มีคุณค่าซึ่งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่เป็นกลูโคสและไกลโคเจนจะพบในชั้นน้ำน้อยกว่าโปรตีน หลังจากที่กลูโคสถูกใช้หมดจุลินทรีย์จะเริ่มใช้กรดอะมิโนเพื่อสร้างพลังงานและเกิดสารประกอบที่ระเหยได้ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเน่าเสีย แบคทีเรียที่สร้างแอมโมเนียในระหว่างการย่อยสลายกรดอะมิโน ได้แก่ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้พีเอชเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เน่าเสีย ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะพบการเน่าเสียในสภาพมีอากาศและปกติจะทำให้เกิดกลิ่นเน่าบูดและกลิ่นกำมะถัน แบคทีเรียชนิดอื่นนอกจาก *Pseudomonas* จะสร้างสารประกอบที่สามารถระเหยได้และมีกลิ่นเหม็น ได้แก่ *Shewanella (Alteromonas) putrefaciens, Proteus, Citrobacter, Hafnia* และ *Serratia* กลิ่นเน่าเสียที่พบในเนื้อสัตว์จากการสลายของกรดอะมิโนสามารถทำให้เกิดช้าลงได้โดยการเติมกลูโคสลงไปในเนื้อ กลูโคสจะช่วยชะลอการใช้กรดอะมิโนของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้เนื้อสัตว์เกิดการเปลี่ยนแปลงช้าลงในด้านคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของการเน่าเสีย (sensory spoilage characteristics) แบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Pseudomonas* ตัวอย่างเช่น *P. fragi, P. fluorescence* และ *P. lundensis* จะพบในเนื้อวัว เนื้อแกะและเนื้อหมู นอกจากนี้อาจจะพบ *Acinetobacter, Psychrobacter, Moraxella* และจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ ตัวอย่างเช่น *Hafnia alvei, Serratia liquefaciens* และ *Enterobbacter agglomerans* แต่พบในจำนวนที่ต่ำกว่า *Pseudomonas* (Marshall และ Bal'A, 2001)

2.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ความหลากหลายของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักหรือกระบวนการบ่ม ทำให้มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักคือแบคทีเรียกรดแลคติกและอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย เช่น ยีสต์ โดยปกติไส้กรอกหมักที่ไม่ได้ผ่านความร้อนจะมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ 10^8- 10^9 เซลล์ต่อกรัม และ micrococci ประมาณ 10^5- 10^7 เซลล์ต่อกรัม ส่วนในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านความร้อนจะมีแบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง 10^2- 6.5 x 10^6 เซลล์และจุลินทรีย์ที่ย่อยไขมันจะพบประมาณ 1 x 10^7- 2 x 10^7 เซลล์ (Kröckel, 1995)

เนื้อบดที่หมักทำเป็นไส้กรอกหลายชนิด จะต้องมีการเติมเกลือไนเตรตหรือไนไตรต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างกรดแลคติกในการหมักเพื่อให้เกิดการหมักที่เหมาะสม โดยช่วยกำจัดและลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ช่วยยืดอายุการเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ต้องการอย่างเช่น สีแดงหรือชมพูของเนื้อบ่ม มีกลิ่นแรงและลักษณะเนื้อสัมผัสมีความคงตัว มีลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นๆ การเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอชต่ำกว่า 6.0 ค่า a_w 0.96 เนื่องจากมีเกลือร้อยละ 2.5-3.0 โซเดียมไนไตรต์ 100 ส่วนในล้านส่วน และกลูโคสร้อยละ 3 เมื่อนำมายัดใส่ไส้ทำให้ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (redox potential) ลดลงซึ่งจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก (Marshall และ Bal'A, 2001)

ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติ มักจะพบแบคทีเรียกรดแลคติกพวก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ *L. plantarum, L. brevis, L. alimentarius* และ *L. carvatus* มีความสำคัญในกระบวนการหมักไส้กรอกซึ่งมีการเติมซูโครสและนมผงร่วมด้วย และบ่อยครั้งที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้เป็นกล้าเชื้อซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีและช่วยในการถนอมอาหาร *L. sake* และ *L. curvatus* เจริญได้ดีที่ค่า a_w ต่ำ (0.91) โดยจะพบว่าเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียสจะพบ *L. plantarum* เจริญในไส้กรอกหมักที่หมักตามธรรมชาติ (Kröckel, 1995) ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ชอบความเย็นและสามารถสร้างกรดแลคติกได้ เช่น *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Weissella* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่ทนเกลือได้น้อย (ยกเว้น *Weissella nalotolerans*) หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส เช่น *Lactobacillus pentosus, L. plantarum, Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* (Marshall และ Bal'A, 2001) ส่วน *Leuconostoc* spp. และ lactobacilli ที่อยู่ในกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) จะพบปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 10 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากสามารถสร้างก๊าซเปอร์ออกไซด์และเมือกได้ *L. plantarum* บางไบโอไทป์สามารถปรับตัวให้เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำและมีบทบาทในอาหารทะเล นอกจากนี้ *Lactobacillus* บางชนิดที่อยู่ในกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เช่น *L. viridescens* ทำให้เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสียโดยเปลี่ยนเป็นสีเขียว (Kröckel, 1995) ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิมส่วนใหญ่ใช้ไนเตรตเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* หรือ *S. piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสีที่เหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงลงไป (Marshall และ Bal'A, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

เดิมแบคทีเรียกรดแลคติกใช้เรียกจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยว สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ชนิดแรกของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ *Bacterium lactis* (อาจเป็น *Lactococcus lactis*) การพัฒนาที่สำคัญในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นเมื่อพบความคล้ายคลึงกันระหว่าง แบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชนิดอื่นจากแหล่งอื่น อย่างไรก็ตาม ต่อมามีผู้ใช้คุณลักษณะพื้นฐานในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปกลมหรือท่อน) การหมักน้ำตาลซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) หรือเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) การเจริญที่อุณหภูมิที่สำคัญ เช่น 10 และ 45 องศาเซลเซียส และช่วงการใช้ประโยชน์จากน้ำตาล หลังจากนั้นได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* (Axelsson, 2004)

ก) การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม ไม่ต้องการอากาศในการเจริญแต่สามารถอยู่รอดได้ในสภาพที่มีอากาศ จู้จี้ (Fastidious) ทนกรดและเกิดการหมักที่แน่นอน หมักน้ำตาลให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกจะพบในอาหารที่มีสารอาหารสูง เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดคือ นม เนื้อสัตว์ เครื่องดื่มและผัก แต่บางชนิดจะพบเป็นจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ที่พบในปาก ลำไส้และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Axelsson, 2004)

ข) การจำแนกชนิดถึงระดับจีนัส

การอ้างถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถใช้จำแนกคุณลักษณะของแบคทีเรียและยังคงสำคัญในการใช้อธิบายจีนัสของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้น แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งได้เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อน (rod) เช่น *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* และรูปกลม (cocci) เช่น จีนัสอื่นๆทั้งหมด ยกเว้นจีนัส *Weissella* ที่สามารถจัดให้รวมอยู่ทั้งรูปกลมและรูปท่อน นอกจากนี้การแบ่งเซลล์ทั้งสองระนาบก็สามารถใช้เป็นคุณลักษณะที่แตกต่างในการจำแนกของแบคทีเรียรูปร่างกลม การเกิดรูปร่างเกาะกัน 4 เซลล์ (tetrad) ซึ่งจะพบในจีนัส *Aerococcus, Pediococcus* และ *Tetragenococcus* (Axelsson, 2004)

คุณลักษณะสำคัญอีกชนิดที่ใช้จำแนกความแตกต่างของจีนัสคือ บทบาทการหมักของน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาวะมาตรฐานโดยไม่จำกัดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและสารอาหารที่ใช้ในการเจริญ เช่น กรดอะมิโน วิตามินและสารตั้งต้นของกรดนิวคลีอิกแต่จำกัดออกซิเจนที่ใช้ ซึ่งภายใต้เงื่อนไขนี้สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น 2 กลุ่มคือ โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ หมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ หมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติก เอทานอล กรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ (Axelsson, 2004)

ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ใช้แยกความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียรูปกลม โดย enterococci เจริญได้ทั้ง 2 อุณหภูมิคือ 20 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส lactococci และ vagococci เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส streptococci ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในขณะที่ความสามารถในการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ส่วนการทนเกลือ (NaCl ร้อยละ 6.5) อาจใช้แยกความแตกต่างใช้ระหว่างจีนัส enterococci, lactococci/vagococci และ streptococci และการทนเกลือในระดับสูง (NaCl ร้อยละ 18) จะพบในจีนัส *Tetragenococcus* ที่สามารถเจริญได้ การทนกรดและ/หรือด่างสามารถใช้เป็นประโยชน์ในการจำแนกได้เช่นกัน พบว่า aerococci, carnobacteria, enterococci, tetragenococci และ vagococci จะเจริญได้ที่ค่าพีเอชสูงถึงแม้ว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ทั้งหมดจะไม่สามารถเจริญที่ระดับพีเอช 9.6 รูปแบบไอโซเมอร์ของกรดแลคติกที่เกิดระหว่างการหมักกลูโคสจะใช้เป็นข้อแตกต่างระหว่าง leuconostocs และ lactobacilli ที่เป็นเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟส่วนใหญ่ซึ่งจะผลิตเฉพาะ D-lactic acid และ DL-lactic acid สรุปความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัสได้ดังตารางที่ 2.2 (Axelsson, 2004)

ค) การจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์

คุณลักษณะบางชนิดในตารางที่ 2.2 สามารถใช้ในการจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์ได้ เช่น การทนเกลือและกรด การเจริญที่อุณหภูมิหนึ่งๆและรูปแบบ (configuration) ของกรดแลคติกที่ผลิต คุณลักษณะอื่นที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ คุณสมบัติทางชีวเคมีของสายพันธุ์จุลินทรีย์ เช่น การหมักคาร์โบไฮเดรต การไฮโดรไลซ์อาร์จินีน การสร้าง acetoin (Vogas-Proskauer test) การทนน้ำดีชนิดของฮีโมไลซีส (hemolysis) การสร้างพอลิแซคคาไรด์ภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide) ความต้องการสารที่จำเป็นในการเจริญ การมีเอนไซม์บางชนิด ได้แก่ เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) และเบต้ากลูโคโลนิเดส (β-glucuronidase) ลักษณะการเจริญในนมและชนิดของซีโรไทป์ (Axelsson, 2004)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณลักษณะขั้นต่อไปที่รวมไปถึงวิธีการศึกษาทางโมเลกุล/การจัดจำแนกทางเคมี (molecular/chemotaxonomic) ซึ่งรวมถึงชนิดของกรดไดอะมิโน (diamino acid) ในเปปติโดไกลแคน ชนิดและการมีกรดเตโคอิค (teichoic acid) และมีนาคิวโนน (menaquinones) อัตราส่วนของกวานีน (guanine) กับไซโตซีน (cytosine) ของดีเอ็นเอส่วนประกอบของกรดไขมัน และการวัดอัตราการเคลื่อนที่ขณะอยู่ภายในสนามไฟฟ้า (electrophoretic) ของเอนไซม์แลคเตทดีไฮไดรจีเนส (lactate dehydrogenase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 คุณลักษณะที่แตกต่างของแบคทีเรียกรดแลคติก

คุณลักษณะ	รูปท่อน		รูปกลม							
	Carnob.	*Lactob.*	*Aeroc.*	*Enteroc.*	*Lactoc. Vagoc.*	*Leucon. Oenoc.*	*Pedioc.*	*Streptoc.*	*Tetragenoc.*	*Weissella*[a]
การเกิดรูปร่างเกาะกัน 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO_2 จากกลูโคส[b]	-[c]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
การเจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
การเจริญใน NaCl ร้อยละ 6.5	ND[d]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
การเจริญใน NaCl ร้อยละ 18	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
การเจริญที่พีเอช 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
การเจริญที่พีเอช 9.6	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
กรดแลคติก[e]	L	D, L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	D, DL[f]

+ มีการสร้างหรือมีการเจริญ ; - ไม่มีการสร้างหรือไม่มีการเจริญ ; ± อาจมีหรือไม่มีการเจริญ (ผันแปรระหว่างสปีชีส์) ; ND ไม่ได้วิเคราะห์

[a] สายพันธุ์ *Weissella* อาจมีรูปร่างท่อน

[b] การทดสอบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส : ถ้าให้ผลลบ (-) หมายถึง โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และ ให้ผลบวก (+) หมายถึง เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

[c] สามารถผลิต CO_2 ได้เล็กน้อยขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

[d] รายงานว่า ไม่เจริญใน NaCl ร้อยละ 8

[e] รูปแบบ (Configuration) ของกรดแลคติกที่ผลิตจากกลูโคส

[f] การผลิต D-, L- หรือ DL-lactic acid มีความผันแปรระหว่างสปีชีส์

ที่มา : Axelsson (2004)

2.2.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

1) *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Vagococcus*

แบคทีเรียกรดแลคติกจีนัส *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Vagococcus* แต่เดิมรวมอยู่เป็น 1 จีนัสคือ *Streptococcus* กลุ่มของ *Streptococcus* ที่ใช้ในเทคโนโลยีอาหารคือ *S. thermophilus* ซึ่งใช้ในการผลิตโยเกิร์ตโดยใช้ร่วมกับ *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* (Axelsson, 2004)

lactococci เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะ *L. lactis* ในปัจจุบันจะใช้ในเทคโนโลยีของนม สายพันธุ์ของ *L. garviae* พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับโรคเต้านมอักเสบในสัตว์ประเภทโคกระบือ และยังพบในปลา *L. lactis* สามารถแบ่งได้ 3 สับสปีชีส์ (subspecies) คือ *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* subsp. *hordniae* 2 สับสปีชีส์แรกมีความสำคัญในการทำผลิตภัณฑ์นม *L. lactis* subsp. *lactis* แต่เดิมรวมอยู่ในสปีชีส์ที่ชื่อว่า *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis* และ *Lactobacillus xylosus* ต่อมาพบว่าการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ เนื่องจากการแยกความแตกต่างของแบคทีเรียรูปกลมและรูปท่อน บางครั้งไม่ใช่สิ่งที่จะทำได้ง่าย *L. lactis* subsp. *cremoris* เป็นสปีชีส์ที่แต่เดิมมีชื่อว่า *Streptococcus cremoris* หรือ *S. lactis* subsp. *cremoris* ซึ่ง *L. lactis* subsp. *cremoris* มีความแตกต่างกับ *L. lactis* subsp. *lactis* ตรงที่เชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* 1) ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 2) ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 4 และ 3) ไม่สามารถไฮโดไลซ์อาร์จินีน 4) ไม่สามารถหมักไรโบสได้ ซึ่งจากการศึกษา DNA-DNA homlogy และการเปรียบเทียบลำดับของ 16S rRNAของ *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม *L. lactis* subsp. *lactis* บางสายพันธุ์มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถบ่งบอกว่าเป็นสับสปีชีส์ *cremoris* ซึ่งสายพันธุ์ที่เป็นมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วโลกคือ MG 1363 และ LM 0230 คุณลักษณะทางชีวเคมี เช่น การใช้ประโยชน์จากน้ำตาลสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของ lactococci แต่วิธีทางพันธุศาสตร์ก็สามารถใช้จำแนกได้เช่นกัน (Axelsson, 2004)

จีนัส *Vagococcus* ง่ายต่อการสับสนกับ lactococci แต่โดยทั่วไปการจำแนกจะชัดเจนเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของกรดไขมัน แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของ vagococci ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ โพรบ (probe) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อจีนัสและสปีชีส์ (genus-and species-specific oligonucleotide) ของ *Vacococcus* สามารถหาได้ซึ่งจะใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุลนี้ (Axelsson, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enterococci ไม่มีความสำคัญในเทคโนโลยีอาหาร บางสปีชีส์ เช่น *E. faecalis* สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อโรคซึ่งไม่เป็นที่ต้องการในอาหาร (Axelsson, 2004)

2) *Aerococcus, Pediococcus* และ *Tetragenococcus*

aerococci, pediococci และ tetragenococci เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเซลล์ที่มีรูปร่างเกาะกัน 4 เซลล์ (tetrad) *Aerococcus* มี 5 สปีชีส์ โดยทั่วไปจะไม่ค่อยน่าสนใจในเทคโนโลยีอาหาร อย่างไรก็ตาม จากรายงานเมื่อเร็วๆนี้ว่าเกี่ยวข้องกับการทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสุก (cooked meat products) เป็นสีเขียว (greening) (Axelsson, 2004)

Pediococcus เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบกรด เป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ แบ่งตัว 2 ระนาบเกิดการจัดเรียงตัวติดกัน 4 เซลล์ (tetrad) มีความสำคัญในด้านเทคโนโลยีอาหารทั้งในด้านให้ประโยชน์และให้โทษ เช่น *P. damnosus* จะเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เบียร์เกิดการเน่าเสีย *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทำไส้กรอกและทำหญ้าหมัก คุณลักษณะที่สำคัญสำหรับใช้จำแนกระหว่างสปีชีส์ของ *Pediococcus* คือ จำนวนชนิดของน้ำตาลที่เชื้อสามารถหมักได้ การไฮโดรไลซ์อาร์จินีน การเจริญที่ระดับพีเอชต่างกันได้แก่ 7.0 และ 4.5 และรูปแบบ (configuration) ของกรดแลคติกที่ผลิต *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ยากที่จะจำแนกความแตกต่างโดยใช้คุณลักษณะเหล่านี้ แต่จากการศึกษาได้มีการแสดงข้อแตกต่างระหว่างสปีชีส์โดยศึกษา DNA-DNA homology ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้จะมีความคล้ายคลึงกันในการผลิตเอนไซม์ซูโดคะตะเลสที่ไม่มีฮีม (nonheme pseudocatalase) และวิธีการพันธุศาสตร์ (genetic fingerprinting) สามารถใช้สำหรับการแยกความแตกต่างของ pediococci อีกด้วย (Axelsson, 2004)

Tetragenococcus ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆซึ่งเดิมคือ *P. halophilus* ปัจจุบันมีเพียง 2 สปีชีส์ได้แก่ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* แบคทีเรีย tetragenococci สามารถทนเกลือได้สูงสุด (โซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 18) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลอื่นๆ โดยทั่วไปต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 สำหรับการเจริญ ซึ่งสปีชีส์ของ *Tetragenococcus* สำคัญในการหมักกรดแลคติกในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง เช่น ซีอิ๊ว (Axelsson, 2004)

3) *Leuconostoc, Oenococcus และ Weissella*

จีนัส *Leuconostoc* คือ แบคทีเรียกรดแลคติกรูปกลม มีการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ผลิต D-lactic acid จากน้ำตาลกลูโคสและไม่ผลิตแอมโมเนียจากอาร์จินีน leuconostocs แยกออกจากแบคทีเรียกรดแลคติกรูปกลมชนิดอื่นโดยอาศัยเมแทบอลิซึมของการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟและแยกออกจาก lactobacilli โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอื่นๆบางอย่าง อาจสับสนระหว่างรูปร่างกลมของ *Leuconostoc* กับแบคทีเรียรูปท่อนเกือบกลม (coccoid rods) ของ lactobacilli และจีนัส *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรียที่คล้าย *Leuconostoc* และจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปร่างทั้งรูปกลมและรูปท่อน ส่วนพวก enterococci จะง่ายต่อการจำแนกโดยจะทนต่อเอทานอลและกรดสูง (Axelsson, 2004)

จีนัส *Leuconostoc* อาจจะสร้างไดอะซิติลจำนวนหนึ่งจากซิเตรตในนมและบางสปีชีส์ โดยเฉพาะ *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* จะใช้ในอุตสาหกรรมนม นอกจากนี้ *Leuconostoc* ยังเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่ใช้ในการหมักผักตามธรรมชาติ (spontaneous fermentation) เช่น กะหล่ำปลีดอง โดย *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียที่เริ่มต้นการหมัก ส่วน *Weissella* หลายสปีชีส์ พบว่า เกี่ยวข้องเนื้อสัตว์และจะเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณที่อุณหภูมิต่ำ (Axelsson, 2004)

สปีชีส์และสับสปีชีส์ของ *Leuconostoc* และ *Weissella* สามารถแยกความแตกต่างได้โดยคุณลักษณะหลายประการ เช่น รูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต การสร้าง dextran จากซูโครส การไฮโดรไลซ์เอสคิวลิน (esculine) สิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต การเจริญที่พีเอชและอุณหภูมิต่างกัน การใช้ซิเตรต (citrate) และ/หรือมาเลท (malate) (Axelsson, 2004)

4) *Lactobacillus* และ *Carnobacterium*

จีนัส *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลใหญ่ที่สุด ดังนั้น จึงมีความแตกต่างกันอย่างมากไม่ว่าจะเป็นความหลากหลายของฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพ ความแตกต่างของแบคทีเรียจีนัสนี้อยู่ที่ช่วงของ mol% G+C ของดีเอ็นเอ จีนัสนี้จะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างท่อน มีความจำเป็นในการพยายามแยกจุลินทรีย์ชนิดนี้ ดังนั้น สับจีนัสของ *Lactobacillus* จึงแบ่งได้เป็น *Thermobacterium*, *Streptobacterium* และ *Betabacterium* ในตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นถึงข้อสรุปของคุณลักษณะที่ใช้จำแนกความแตกต่างระหว่าง 3 กลุ่มนี้ คุณลักษณะทางกายภาพพื้นฐานสำหรับการแบ่งโดยทั่วไปคือ การมีอยู่หรือการไม่มีของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลจากจุลินทรีย์ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ได้แก่ เอนไซม์ฟรุกโตส 1, 6 ไดฟอสเฟต (fructose-1,6 – diphosphate) อัลโดเลส (aldolase) และฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) (Axelsson, 2004)

lactobacilli มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติและมีหลายสปีชีส์ที่พบว่า มีความเหมาะสมในอุตสาหกรรมอาหาร โดยทั่วไปจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการทนกรดมากที่สุดและจะหยุดการหมักกรดแลคติกตามธรรมชาติ เช่น หญ้าหมักและผักดอง lactobacilli จะพบในช่องปาก ทางเดินอาหารและช่องคลอดของคนและสัตว์ lactobacilli บางสปีชีส์ เช่น *L. brevis*, *L. casei* และ *L. plantarum* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่พืชหรือสัตว์อาศัยอยู่ (Axelsson, 2004)

สปีชีส์ต่างๆ ของจีนัส *Carnobacterium* แต่เดิมถูกจัดจำแนกอยู่ในพวก lactobacilli กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Lactobacillus divergens*, *L. carnis* และ *L. piscicola* การศึกษาต่อมาแสดงให้เห็นถึงการแยกแบคทีเรียเหล่านี้ออกจากจีนัส lactobacilli และอนุญาตให้แยกออกเป็นอีกจีนัสหนึ่งและเมแทบอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิซึมของกลูโคสใน *Carnobacterium* เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟซึ่งเป็นลักษณะเด่นของจุลินทรีย์จีนัสนี้ โดยทั่วไป carnobacteria จะเจริญได้ที่พีเอชสูง (เช่น พีเอช 9) ในขณะที่ lactobacilli จะไม่เจริญที่ พีเอชระดับนี้ carnobacteria พบในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างทวีคูณที่อุณหภูมิต่ำ (Axelsson, 2004)

ตารางที่ 2.3 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียในสกุล Lactobacillus

คุณลักษณะ	กลุ่มที่ 1 Obligately homofermentative	กลุ่มที่ 2 Facultatively heterofermentative	กลุ่มที่ 3 Obligately heterofermentative
การหมักน้ำตาลเพนโตส	-	+	-
CO_2 จากกลูโคส	-	-	+
CO_2 จากกลูโคเนท	-	+[a]	+[a]
เอฟดีพี อัลโดเลส (FDP aldolase)	+	+	-
ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase)	-	+[b]	+
	L. acidophilus	*L. casei*	*L. brevis*
	L. delbrückii	*L. curvatus*	*L. buchneri*
	L. helveticus	*L. plantarum*	*L. fermentum*
	L. salivarius	*L. sakei*	*L. reuteri*

[a]เมื่อเกิดการหมัก

[b]เมื่อถูกชักนำโดยเพนโตส

ที่มา : Axelsson (2004)

2.3 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

กล้าเชื้อนี้อาจเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟชนิดเดียวหรือผสมกันหลายชนิดก็ได้ ถ้าผลิตภัณฑ์มีไนเตรตอาจใช้ micrococci ร่วมด้วย โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ได้แก่ *Lactobacillus sake, L. curvatus, L. plantarum, L. pentosus* และ *Pediococcus pentosaceus* โดยสายพันธุ์ที่เลือกต้องมีความสามารถในการสร้างกรดอย่างรวดเร็ว ช่วยลดระยะเวลาในการบ่ม ปรับปรุงความเข้มของสีและมีความคงตัวที่อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (Marshall และ Bal'A, 2001) ดังตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักในกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิต่างกัน

ชนิดของแบคทีเรีย	อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิต (°C)	สปีชีส์ของแบคทีเรีย
Thermophiles	30-38	*Pediococcus acidilactici*
		Pediococcus cerevisiae
Mesophiles	20-25	*Lactobacillus pentosus*
		Lactobacillusplantarum
Psychrotrophs	15-20	*Lactobacillussake*
		Lactobacilluscurvatus

ที่มา : Holzapfel (1998)

ปัจจัยสำคัญในกระบวนการผลิตที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีความคงตัว ได้แก่ 1) พีเอชมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.2 และปริมาณน้ำอิสระ (a_w) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.95 หรือ 2) พีเอชน้อยกว่า 5.0 หรือ a_w น้อยกว่า 0.91 กล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดแรกที่ผลิตขึ้นจำหน่ายคือ *P. cerevisiae* ซึ่งจะใช้ในไส้กรอกแบบกึ่งแห้ง เนื่องจากสามารถสร้างแลคเตทได้ปริมาณมากและสามารถอยู่รอดจากการไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) (Walsh และ Hoover, 1987)

pediococci มีความคล้ายคลึงกับ streptococci ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์นม พวกนี้จะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม เจริญในสภาพมีอากาศหรือไม่มีอากาศก็ได้และอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งไม่สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส มีความจู้จี้ (fastidous) ในเรื่องสารอาหาร สามารถเจริญเติบโตที่พีเอช 3.5-3.8 และในสภาพมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึงร้อยละ 8 ส่วน *Pediococcus* จะพบน้อยมากในผลิตภัณฑ์นม เนื่องจาก *Pediococcus* ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้แลคโตสซึ่งเป็นน้ำตาลในนมได้และ *Pediococcus* จัดเป็นพวกที่มีความแปรผันในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เนื่องจากบางไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่มีฮีมได้ (Walsh และ Hoover, 1987)

จุดประสงค์แรกของการใช้ pediococcal starter culture ในผลิตภัณฑ์เนื้อคือ การผลิตกรดแลคติกจากคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปใช้กลูโคสเติมลงไปเพื่อเป็นอิมัลชันในเนื้อสัตว์ กรดจะให้รสชาติหรือกลิ่นแรงและปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสในส่วนผสมโดยไปทำให้โปรตีนเสียสภาพหรือทำให้ค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ต่ำลงและเพิ่มอายุของผลิตภัณฑ์โดยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย สำหรับไส้กรอกกึ่งแห้ง (semidry sausage) ที่มีพีเอช 5.3 หรือน้อยกว่าปริมาณความชื้นสุดท้ายร้อยละ 40-50 หลังจากผ่านความร้อนและรมควัน จะใช้ *P. acidilactici* เป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากมีลักษณะที่ดี 2 ประการคือ สามารถผลิตกรดแลคติกในปริมาณสูงและทนต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้ เชื้อ *P. acidilactici* จะเจริญที่อุณหภูมิสูง ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 40 องศาเซลเซียสและสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุดคือ 52 องศาเซลเซียส ทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการหมักไส้กรอกกึ่งแห้ง ถึงแม้ว่าสปีชีส์นี้จะผลิตสารประกอบที่สำคัญต่อกลิ่นรส เช่น ไดอะซิติล กลิ่นรสที่มีความสำคัญต่อ summer sausage ส่วนใหญ่คือ รสกรด (acid taste) ที่มีสาเหตุมาจากกรดแลคติก นอกจากนั้นกลิ่นรสที่สำคัญได้มาจากเกลือ เครื่องเทศ น้ำตาลและเนื้อสัตว์ (Walsh และ Hoover, 1987) สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแห้ง (dry sausage) ที่มีพีเอช 5.3 หรือน้อยกว่า และมีปริมาณความชื้นสุดท้ายร้อยละ 25-45 โดยทั่วไปจะไม่ผ่านการรมควันหรือให้ความร้อน ทำการหมักที่อุณหภูมิน้อยกว่า 32 องศาเซลเซียส มักจะใช้ *P. pentosaceus* เป็นกล้าเชื้อ เพราะว่าสปีชีส์นี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญต่ำประมาณ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้จะเจริญได้คือ 42-45 องศาเซลเซียสซึ่งต่ำกว่าของ *P. acidilactici* ปัจจัยสนับสนุนอื่นๆคือ ความไวของ *P. acidilactici* ต่อสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ที่ใช้ในการหมักไส้กรอกแห้ง เช่น BHA และ BHT และกิจกรรมของ *P. pentosaceus* ในการหมักกลูโคสอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิต่ำเมื่อบ่มในสภาพที่มีแมงกานีส (Walsh และ Hoover, 1987)

2.3.1 การใช้กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก อาจใช้เชื้อเพียงชนิดเดียวหรือใช้เชื้อหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งแล้วแต่ชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ สหรัฐอเมริกาเป็นประเทศแรกที่เริ่มใช้เชื้อแบคทีเรียในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเนื้อ ในปี ค.ศ. 1958 America Meat Institute Foundation ของสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับและอนุญาตให้ใช้กล้าเชื้อ *P. cerevisiae* ในการหมักไส้กรอก และมีการใช้เชื้อนี้ในโรงงานผลิตเนื้ออย่างกว้างขวางมากขึ้น โดยเรียกว่า "meat starter culture" ซึ่ง Smith และ Palumbo (1981) ได้ให้คำจำกัดความว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตซึ่งนำไปใส่ในเนื้อเพื่อปรับปรุงคุณภาพการเก็บรักษาให้ดีขึ้นและทำให้อาหารหมักที่ได้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค

ไส้กรอกหมักกึ่งแห้งและไส้กรอกแห้งหลายชนิดสามารถผลิตโดยใช้สปีชีส์เดี่ยวของ *Pediococcus cerevisiae, P. pentosaceus, Lactobacillus plantarum* หรือ *Penicillium* spp. หรือส่วนผสมของ *P. cerevisiae* และ *L. planterum* หรือ *P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians* ดังตารางที่ 2.5 ที่กล่าวถึงกล้าเชื้อที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

83743

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ผลิตภัณฑ์เนื้อสด และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งใส่กล้าเชื้อแบคทีเรีย

ชนิดของจุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก
Pediococcus cerevisiae	A. Semi –dryfermented sausage
	summer sausage, cervelat, thuringer, pork roll
	summer-style turkey sausage
	B. Dry fermented sausage
	dry sausage, dry turkey sausage, salami, pepperoni
	hot bar sausage
	C. Processed meat
	country – style ham
Pediococcus pentosaceus	A. Semi –dry fermented sausage
	summer sausage
	B. Dry fermented sausage
	pepperoni, Genoa
Lactobacillus plantarum	A. Semi –dry fermented sausage
	summer sausage
	B. Dry fermented sausage
	salami, European - type dry sausage
	C. Processed meat
	bacon, country-style ham
Lactobacillus brevis	A. Fresh meat
	minced meat
เชื้อผสมของ *P. cerevisiae* และ *L. plantarum*	A. Semi –dry fermented sausage
	Lebanon bologna, Summer sausage, cervelat
	B. Dry fermented sausage
	pepperoni, dry turkey sausage
	C. Processed meat
	cooked, mecheanically deboned poultry meat
	D. Fresh meat
	mechanically deboned poultry meat, ground poultry breast meat
เชื้อผสมของ *P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians*	A. Dry fermented sausage
	Genoa, dry sausage
เชื้อผสมของ *Penicillium: P. janthinellum, P. simplicissimum,*	A. Dry fermented sausage
P. cyclopium หรือ *P. viridicatum*	mold-ripened salami sausage
Thamnidium elegans	A. Fresh meat
	Beef carcass aging
Candidalipolytica	A. Fresh fish
	fish

ที่มา : Smith และ Palumbo (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ ต้องผลิตกรดแลคติกอย่างรวดเร็วจากน้ำตาล โดยทั่วไปใช้กลูโคสเติมลงไปในส่วนผสมของไส้กรอก กรดแลคติกจะทำให้ไส้กรอกหมักมีค่าพีเอชต่ำ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มคุณภาพการเก็บของผลิตภัณฑ์ ยิ่งไปกว่านั้นกรดแลคติกช่วยบดบังกลิ่นและรสชาติที่รุนแรงและทำให้โปรตีนในเนื้อสัตว์เสียสภาพ การเสียสภาพนี้เป็นผลให้เกิดการสูญเสียน้ำซึ่งทำให้เกิดลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกหมักส่วนบทบาทของเชื้อราใน mold-riened sausage จำกัดเฉพาะผิวหน้าภายนอกของไส้กรอก โดยเชื้อราจะผลิตผลิตภัณฑ์เมแทบอไลซ์ที่ให้รสชาติ กลิ่นและคุณภาพในการเก็บรักษาไส้กรอกเพิ่มขึ้น (Smith และ Palumbo, 1983)

2.3.2 ลักษณะสำคัญของจุลินทรียที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

2.3.2.1 คุณสมบัติทั่วไปในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์ไส้กรอก ควรพิจารณาถึงคุณลักษณะที่สำคัญดังต่อไปนี้ (Varnam และ Sutherland, 1995)

1. ต้องสร้างกรดแลคติกและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดี
2. ต้องสร้างกรดแลคติกในปริมาณที่มากพอ
3. ต้องทนเกลือโซเดียมคลอไรด์และสามารถเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นอย่างต่ำสุดร้อยละ 6
4. ต้องทนโซเดียมไนไตรต์และสามารถเจริญในสภาพที่มีโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้นอย่างน้อยที่สุด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
5. สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15- 40 องศาเซลเซียสและช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม 30 – 37 องศาเซลเซียส
6. ต้องอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ
7. ต้องไม่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน
8. ต้องไม่สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
9. ควรจะสร้างเอนไซม์คะตะเลส
10. ควรจะสร้างเอนไซม์ที่รีดิวซ์ไนเตรต
11. ควรจะทำให้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกมีกลิ่นรสที่ดี
12. ไม่ควรสร้างสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้ (biogenic amine)
13. ไม่สร้างเมือก
14. ควรจะยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ
15. ควรจะทนกล้าเชื้อชนิดอื่นและทำงานร่วมกับกล้าเชื้อชนิดอื่นที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gilliland (1985) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยป้องกันการสะสมของ histamine ในอาหารหมักและพบว่า แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษจะเป็นตัวการผลิตสารนี้ โดยเกิดจากการ decarboxylate ของสาร histidine มักพบ histamine ในอาหารหมักต่างๆ เนยแข็ง ไวน์ และกะหล่ำปลีหมัก เป็นต้น อาหารหมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะปลอดภัยต่อการบริโภคอันเนื่องจากสารพิษ เช่น ทอกซินของ *Clostridium botulinum* และ ไนโตรซามีน เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณมากจะผลิตกรดอย่างรวดเร็วเป็นผลให้ระดับพีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ซึ่งจะไปเร่งให้ไนไตรต์ที่ตกค้าง (residual nitrite) ถูกสลายเป็นไนตรัสออกไซด์ จึงทำให้เกิดการสะสมของไนไตรต์ในอาหารหมักลดลงและเป็นเหตุให้การสะสมไนโตรซามีนลดลงเช่นกัน

Hugas และคณะ (1993) ทำการแยกเชื้อแบคเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกหมักแบบแห้งของสเปนจากผู้ผลิต 15 ราย ได้ทั้งหมด 254 สายพันธุ์ พบเชื้อ *L. Sake* ร้อยละ 55, *L. curvatus* ร้อยละ 26, *L. bavaricus* ร้อยละ 11 และ *L. plantarum* ร้อยละ 8 เป็นเชื้อที่เด่นที่พบในไส้กรอกซาลามิของกรีก Hammes และคณะ (1990) กล่าวว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง เพราะมีความสามารถในการแข่งขันสูงระหว่างการหมัก โดย *L. Sake* นั้นสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (Scillinger และ Lücke, 1991) ซึ่งสารนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อได้ ต่อมา Garriga และคณะ (1996) ได้ทำการผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นได้แก่ *L. Sake* 5 สายพันธุ์, *L. curvatus* 4 สายพันธุ์, *L. bavaricus* 2 สายพันธุ์ และ *L. plantarum* 1 สายพันธุ์ พบว่า *L. curvatus* CTC 435T ทำให้ไส้กรอกมีค่าพีเอชต่ำที่สุด ส่วน *L. plantarum* CTC 305 สร้าง D-lactic acid สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่พบว่ามีกลิ่นกรดแรงที่สุด และจากการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *L. curbatus* พบว่า *L. curbatus* CTC 371 จะให้กลิ่นหมักและกลิ่นโดยรวมที่ดี และไม่มีกลิ่นที่ผิดปกติ

2.3.2.2 คุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก

โพรไบโอติก (probiotic) คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Fuller, 1989)

Havenaar และ Vied (1982) ได้ขยายคำจำกัดความของ Fuller ได้ใจความใหม่ว่า โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอาจมีเพียงชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดก่อให้เกิดประโยชน์กับคนหรือสัตว์โดยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรียที่มีโดยกำเนิดในระบบทางเดินอาหาร ข้อเสนอนี้จำกัดผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกว่าจะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจอยู่ในรูปของเซลล์แห้งจากกระบวนการระเหิด (freeze-dried cell) หรืออยู่ในรูปผลิตภัณฑ์หมัก (fermented product) และช่วยปรับปรุงสุขภาพของคนหรือสัตว์ (Havenaar และ Veid, 1982)

สำหรับมนุษย์แนะนำให้ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จำเพาะที่สามารถมีบทบาทสำคัญคือ

1. การสร้างความสมดุลของจุลินทรีย์ที่มีในอยู่แล้วลำไส้และ/หรือจุลินทรีย์ในระบบหายใจ
2. ปรับปรุงการทนทานของจุลินทรีย์ที่มีโดยกำเนิดในลำไส้ ระบบหายใจและระบบไต
3. ลดระดับคอเรสเตอรอล
4. ยับยั้ง mutagenicity ของส่วนประกอบลำไส้และลดการเกิดเนื้องอก
5. ไม่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับระบบภูมิคุ้มกัน
6. บรรเทาอาการแพ้น้ำตาลแลคโตส
7. ปรับปรุงการดูดซึมของแคลเซียม
8. สังเคราะห์วิตามินและย่อยโปรตีนบางส่วนก่อน

การคัดเลือกสายพันธุ์ของโพรไบโอติกหลายๆชนิดที่เป็นที่ต้องการควรพิจารณาในด้านเกี่ยวกับหน้าที่คือ (Saarela และคณะ, 2000)

1. ทนต่อกรดและทนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์
2. ทนต่อน้ำดี
3. ยึดติดแน่นในผิวชั้นในและทนอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้
4. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแต่ไม่มีผลก่อนเกิดการอับเสบ
5. ยับยั้งกิจกรรมของศัตรูที่ก่อให้เกิดเชื้อโรค เช่น *Helicobacter rpylori, Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium difficile*
6. มีคุณสมบัติต้านเนื้องอกและมะเร็ง

นอกจากนี้ ยังต้องมีคุณสมบัติที่ดีในการทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ดี ต้านทานฟาจ (phage resistance) มีชีวิตรอดในระหว่างกระบวนการแปรรูปและมีความคงตัวในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา (Saarela และคณะ, 2000)

2.4 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

2.4.1 เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกควรมีปริมาณเนื้อแดง (lean meat) ร้อยละ 50 ถึง 70 และมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ดี ได้แก่ เนื้อวัว และลูกวัว เนื้อหมู เนื้อแกะและเนื้อสัตว์ปีก แต่โดยทั่วไปการทำไส้กรอกหมักจะใช้เนื้อหมูและ/หรือเนื้อวัว จะใช้เนื้อแกะน้อยมาก และอาจมีการเติมเนื้อปลาเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงไปในไส้กรอกหมักด้วย เนื้อหมูปกติจะมีค่าพีเอชประมาณ 5.6 ขณะที่เนื้อหมู PSE (Pale, Soft and Exudative pork) จะมีพีเอชต่ำกว่า (5.4) เป็นเนื้อที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำน้อย และมีสีซีด ส่วนเนื้อหมู DFE (Dark, Firm, Dry) จะมีพีเอชสูงกว่า (6.4) เป็นเนื้อที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีสีเข้มและมีปริมาณกลูโคสเพียงเล็กน้อย ซึ่งคุณภาพของเนื้อหมูขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความเครียดของสัตว์ก่อนถูกฆ่า เนื้อหมู PSE ไม่เหมาะต่อการนำมาทำไส้กรอกหมัก และมีรายงานว่าการใช้เนื้อหมู PSE ในการทำไส้กรอกหมักจะทำให้พีเอชระหว่างการหมักลดลงช้ากว่า และมีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่า มีความชื้นต่ำกว่า มีโปรตีนและไขมันสูงกว่า ในระดับอุตสาหกรรมจะใช้เนื้อหมู PSE ผสมกับเนื้อหมูปกติในการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้งโดยไม่มีผลทำให้คุณภาพด้อยลง (Kröckel, 1995 ; Varnam และ Sutherland, 1995)

2.4.2 ไขมัน

ไขมันเป็นส่วนผสมที่สำคัญของไส้กรอกหมักและอาจมีปริมาณมากถึงร้อยละ 50 หลังการทำแห้ง การออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดการหืนและลดอายุการเก็บของไส้กรอก ดังนั้นสิ่งสำคัญในการเลือกใช้ไขมันคือ ควรใช้ไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงและมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นส่วนประกอบในปริมาณน้อย มันแข็งของหมู (pork back fat) จะนิยมใช้กันอย่างมากเนื่องจากมีส่วนประกอบของกรดลิโนเลอิค (linoleic) และกรดลิโนเลนิค (linolenic) ในปริมาณที่ต่ำคือร้อยละ 8.5 และร้อยละ 10 ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งถ้ามีกรดลิโนเลอิคและกรดลิโนเลนิคในที่ปริมาณต่ำ กรดไขมันทั้งสองชนิดนี้จะมีแนวโน้มทำให้เกิดออโตออกซิเดชัน (Autoxidation)ได้ดี เนื้อเยื่อไขมันอ่อนจากหมูที่รับประทานอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณสูงจะทำให้เกิดตำหนิในด้านสีและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากออโตออกซิเดชันเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (Varnam และ Sutherland, 1995)

2.4.3 กลูโคโนแลคโตน (Glucono-δ-lactone)

การเติมกลูโคโนแลคโตน (GdL) ลงในไส้กรอกแห้งทำให้มีสภาพเป็นกรดในสภาวะที่มีน้ำ GdL จะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นกรดกลูโคนิก โดยปกติจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติกโดย lactobacilli ตั้งแต่ปี ค.ศ.1960 ได้มีการนำ GdL มาใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อบดที่ผ่านการทำให้สุกโดยใช้เป็นตัวเร่งให้เกิดสีที่ดีของเนื้อหมัก (cured color) ต่อมาพบว่ามีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตไส้กรอกหมัก โดยปกติจะใช้ถึงความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (Mogensen, 1993)

2.4.4 แอสคอร์เบท (Ascorbate)

แอสคอร์เบทหรือไอโซแอสคอร์เบท (erythorbate) มักใช้ร่วมกับไนไตรต์เพื่อเร่งการเกิดสีที่ดีของเนื้อหมัก ไอโซแอสคอร์เบทมีผลในการทำหน้าที่เป็นวิตามินเพียงร้อยละ 5 ของแอสคอร์เบท และไอโซแอสคอร์เบทอาจขัดขวางการนำแอสคอร์เบทมาใช้ประโยชน์ (bioavailability) ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่างกาย ดังนั้นจึงนิยมเลือกใช้แอสคอร์เบทมากกว่าในการเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อ ซึ่งโดยปกติจะเติม 300-600 ส่วนในล้านส่วน นอกจากนี้ข้อดีของแอสคอร์เบทจะช่วยป้องกันการสร้างสาร ไนโตรซามีน ถึงแม้ว่าจะพบปริมาณต่ำในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้มีรายงานว่า การมีสารที่เป็น nitrosamine precursor อยู่ปริมาณมาก เช่น GdL และกล้าเชื้อจุลินทรีย์ จะช่วยสนับสนุนการเกิดไนโตรซามีน ซึ่งการเกิดปรากฏการณ์นี้เกี่ยวข้องกับการที่พีเอชต่ำลง แอสคอร์เบทสามารถขัดขวางปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนได้แต่ต้องเติมแอสคอร์เบทมากกว่า 1000 ส่วนในล้านส่วน (Mogensen, 1993)

2.4.5 ฟอสเฟต (phosphate)

โดยปกติจะใช้โพลีฟอสเฟตเพื่อเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำและป้องกันการเกิดการเหม็นหืน ชนิดที่ให้ผลดีที่สุดที่เกี่ยวกับการอุ้มน้ำจะมาจากสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) และไตรโพลีฟอสเฟต (tripolyphosphate) ส่วนหน้าที่พื้นฐานคือจะช่วยเพิ่ม ionic strength และบางส่วนจะทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น ส่วนผสมของโพลีฟอสเฟตใช้ในหลายประเทศสำหรับการผลิตไส้กรอกหมักแห้ง ในสเปนอนุญาตให้ใช้โพลีฟอสเฟตถึง 3000 ส่วนในล้านส่วน สำหรับการผลิต chorizo และ salchichon (Mogensen, 1993)

2.4.6 เกลือ

เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จะใช้เติมลงไปในส่วนผสมโดยใช้ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 2.5-3.0 ในกรณีของไส้กรอกประเภท spreadable sausage จะกำหนดให้มีเกลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายประมาณร้อยละ 2.8-3.0 ส่วนในไส้กรอกแผ่น (sliceable sausage) จะมีเกลือประมาณร้อยละ 3.2-4.5 (Leistner, 1995) ซึ่งเกลือโซเดียมคลอไรด์มีหน้าที่ช่วยในการละลายโปรตีน (Varnam และ Sutherland, 1995)

2.4.7 คาร์โบไฮเดรต

การเติมคาร์โบไฮเดรตลงในส่วนผสมมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นสับสเตรทที่ใช้ในการหมักเพื่อเป็นการเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกและผลิตกรดอินทรีย์ สัดส่วนและชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปจะต้องสมดุลกันระหว่างความต้องการให้เกิดการหมักกรดแลคติกและหลีกเลี่ยงการลดลงของพีเอชอย่างรวดเร็วเกินไป (Varnam และ Sutherland, 1995) ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมในการเติมลงในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกคือ ประมาณร้อยละ 0.1-0.2 ของน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด การเติมกลูโคสในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวและเกิดการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ต้องการ ส่วนแลคโตสเป็นน้ำตาลที่มีราคาถูกและมีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลกลูโคสและซูโครส จะใช้เติมลงในปริมาณมากร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่น (Kröckel, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.8 เครื่องเทศ

เครื่องเทศหลายชนิดนำไปใช้เติมเป็นส่วนผสมของไส้กรอกหมัก เช่น พริกไทยดำ กระเทียม ปาปริก้า (paprika) ดอกจันทน์ (mace) (Varnam และ Sutherland, 1995) รวมไปถึงพริกแดง พบว่า สามารถกระตุ้นการสร้างกรดแลคติกได้ เนื่องจากในพริกมีแมงกานีส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการใช้ในการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด รวมถึงการนำไปใช้ใน Embden-Meyerhof pathway ความไวของ *Lactobacillus plantarum* ต่อไนไตรต์ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับแมงกานีสในเซลล์ ระหว่างการยับยั้งไนไตรต์จะพบว่า lactobacilli ชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟมีการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มของแมงกานีสในเซลล์และกระตุ้นวิถีของเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Kröckel, 1995)

2.4.9 ไนไตรต์และไนเตรต

โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ใช้เติมลงในเนื้อสัตว์เพื่อรักษาสภาพเนื้อสัตว์ให้ดูใหม่สดทำให้เนื้อสัตว์เป็นสีแดงและช่วยเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* ซึ่งทำให้เกิดอาหารเป็นพิษและป้องกันไม่ให้อาหารบูดเน่า (Jay, 1992)

โซเดียมไนไตรต์เป็นเกลือที่มีความเป็นเบสสูง ผลึกมีสีเหลืองอ่อน สามารถละลายน้ำได้ดี ถ้าอยู่ในรูปสารละลายจะมีประจุไฟฟ้าสูง ไนไตรต์ไอออนสามารถเป็นได้ทั้งตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ ไนไตรต์จะถูกใช้ในรูปไนไตรต์แอนไอออน (NO_2^-) และในรูปของกรดไนตรัส (HNO_2) แบคทีเรียบางชนิดที่สามารถใช้ประโยชน์จากไนเตรตได้ จะเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนผ่านปฏิกิริยารีดักชันกลายเป็นไนไตรต์ (Martin, 2001)

ก) สีของเนื้อบ่ม

ไนไตรต์ไอออนเป็นสารสำคัญที่ใช้เป็นสารกันบูดในเนื้อสัตว์ ในการเปลี่ยนสภาพของไนไตรต์ไปเป็นไนตริกออกไซด์นั้นมีกลไกหลายประการด้วยกัน ถ้าเป็นรูปของน้ำเกลือ บางส่วนของไนไตรต์จะอยู่ในรูปของกรดไนตรัส (HNO_2) ซึ่งขณะนั้นความเป็นกรดด่างของเนื้อปกติจะมีค่าประมาณ 5.5-6.0 จึงเป็นสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมที่กรดไนตรัสจะแปรสภาพไปเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ดังแสดงในสมการต่อไปนี้ (Martin, 2001)

$$3\,HNO_2 \rightleftharpoons HNO_3 + 2\,NO + H_2O$$

อาจมีการเติมสารช่วยเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ แอสคอร์เบท (Ascorbate) หรือ อิริทรอเบท (Erythrobate) เพื่อช่วยในการรีดิวซ์ไนไตรต์เป็นไนตริกออกไซด์ได้เร็วมากขึ้น (Jay, 1992) ไนตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกไซด์ (NO) เป็นสารสำคัญในการเกิดสีในเนื้อสัตว์บ่ม โดยไนตริกออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) ทำให้เกิดสีแดงของเนื้อสัตว์ การเกิดสีในเนื้อสัตว์ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ 1) ความเข้มข้นของไมโอโกลบิน (myoglobin) ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ 2) ระดับของการเปลี่ยนไปเป็นรงควัตถุไนโตรซิล (nitrosyl pigment) และ 3) โปรตีนในกล้ามเนื้อ เมื่อให้ความร้อนเนื้อสดและเนื้อบ่มจะมีสีแดงต่างกัน มีรายงานว่า เนื้อสัตว์ที่ผ่านการบ่มจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไมโอโกลบินซึ่งเป็นรงควัตถุที่สำคัญในกล้ามเนื้อ ความแตกต่างนี้เกิดในระหว่างให้ความร้อน รงควัตถุในเนื้อสัตว์จะทำปฏิกิริยาเคมีกับไนไตรต์ ที่อาจมาจากน้ำเกลือที่ใช้บ่มหรือส่วนประกอบที่เป็นเกลือในผลิตภัณฑ์หรือได้จากการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยจุลินทรีย์บางชนิด (Martin, 2001)

ถ้าเราเอาเนื้อสดมาบดละเอียดและเติมไนไตรต์ลงไป เนื้อจะกลายเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากส่วนฮีมถูกออกซิไดซ์โดยไนไตรต์ได้เป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ซึ่งเป็นสีน้ำตาล ส่วนไนไตรต์กลายเป็นไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับเมทไมโอโกลบินต่อได้ไนโตรโซไมโอโกลบิน กระบวนการเปลี่ยนแปลงสีในเนื้อบ่ม

Myoglobin + NO ----> nitrosomyoglobin + ความร้อน ---> Nitrosohemachrome
(สีแดงอมม่วง) (สีแดงเข้ม) (สีชมพูอ่อน ;สีแบบเดียวกับเนื้อสัตว์บ่ม)

ปฏิกิริยานี้ไม่สามารถผันกลับได้และแหล่งของไนตริกออกไซด์คือ ไนไตรต์ ส่วนไนโตรโซไมโอโกลบินเป็นสีที่เกิดขึ้นครั้งแรกในปฏิกิริยาการบ่มเนื้อ ซึ่งเมื่อนำมาให้ความร้อนจะเปลี่ยนเป็นไนโตรโซฮีมาโครมซึ่งเป็นผลจากการเสียสภาพของโปรตีนและแสดงออกมาในรูปสีแดงชมพูของเนื้อบ่ม (Martin, 2001)

ข) การยับยั้งแบคทีเรีย

ไนไตรต์ที่เติมลงในเนื้อสัตว์จะช่วยเพิ่มสีและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ เช่น แฮม โบโลน่า ไส้กรอกเยอรมัน เบคอน นอกจากนี้ประโยชน์ที่สำคัญคือ ช่วยยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโบทัวลิซึม (botulism) เป็นโรคที่เกี่ยวกับระบบประสาทเกิดได้ทั้งในคนและในสัตว์ เซลล์ที่เจริญเติบโต (vegetative cell) ของ *C. botulinum* จะสร้างสารพิษ (neurotoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกความร้อน โรคโบทัวลิซึมอาจเกิดจากการติดเชื้อทางบาดแผลหรือเกิดจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษชนิดนี้เข้าไป การเกิดโรคโบทัวลิซึมพบได้ทั่วโลก เนื่องจากพบจุลินทรีย์ชนิดนี้ในอาหารหลายประเภท เช่น เนื้อสัตว์ บรรจุกระป๋อง ผัก ผลไม้และปลา โรคนี้พบครั้งแรกในยุโรปสาเหตุมาจากผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

botulism จึงมาจากภาษาลาตินว่า botulus ซึ่งแปลว่า ไส้กรอก ปัจจุบันมีการศึกษากลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้ไนไตรต์ ในการยับยั้งเชื้อ C. *botulinum* โดย 1)ใช้ไนไตรต์และสารผสมอื่นในเนื้อสัตว์ 2) ใช้ไนไตรต์หรือสารตัวกลางเป็นตัวออกซิไดซ์หรือรีดิวซ์เอนไซม์ภายในเซลล์หรือกรดนิวคลีอิกของเชื้อ 3) ใช้ไนไตรต์ในการควบคุมเหล็กและโลหะอื่นที่จำเป็นต่อเมแทบอลีซึมและการซ่อมแซมระบบของ *C. botulinum* 4) ใช้ไนไตรต์ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนส่งสารในขบวนการเมแทบอลิซึมถูกจำกัด กลไกทั้งหมดนี้อาจเกิดมากกว่า 1 กลไก ถ้าพบในสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น สัตว์ สารตัวกลางที่ใช้ขัดขวางไอออนของโลหะไม่ให้ทำปฏิกิริยา เช่น EDTA ช่วยเพิ่มกิจกรรมในการยับยั้งของไนไตรต์ ด้วยเหตุนี้ ไอออนเหล็กที่มากเกินจะทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลง นอกจากนี้มีรายงานว่า ไนไตรต์ในรูปไนตริกออกไซด์สามารถยับยั้งโดยทำปฏิกิริยากับเหล็กของเฟอริดอกซิน (ferredoxin)ในระยะที่เซลล์สร้างสปอร์ (Martin, 2001)

ค) กลิ่นรส

ประโยชน์ของไนไตรต์ที่เติมลงในเนื้อสัตว์บ่ม คือ ช่วยเพิ่มกลิ่นรสที่ดีให้เนื้อสัตว์ ซึ่งไม่เกี่ยวกับกลิ่นรสที่มีลักษณะเฉพาะตัวขององค์ประกอบต่างๆในเนื้อสัตว์ การใช้โซเดียมไนไตรต์เพียงอย่างเดียวสามารถเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งกลิ่นรสที่เกิดขึ้นเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนไตรต์กับองค์ประกอบในเนื้อสัตว์ ส่วนมากจะมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของไนไตรต์ต่อกลิ่นรสของเนื้อสัตว์ในกระบวนการผลิตและการประเมินทางด้านประสาทสัมผัสหรือการวิเคราะห์ทางเคมีของปฏิกิริยาระหว่างองค์ประกอบในเนื้อสัตว์กับไนไตรต์ มีรายงานที่บ่งชี้ว่า ไนไตรต์ที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ (ไส้กรอกเยอรมัน) ช่วยให้มีกลิ่นรสที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเติมไนไตรต์และ/หรือไนเตรตในผลิตภัณฑ์แฮมแผ่นที่บรรจุห่อ ช่วยปรับปรุงสีและคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสให้ดีขึ้น และมีรายงานว่า การเติมโซเดียมไนไตรต์เล็กน้อยเพียง 25-50 ไมโครกรัมต่อผลิตภัณฑ์ 1 กรัม (ไส้กรอก) เพียงพอในการเพิ่มสีและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ (Martin, 2001)

ง) การออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation)

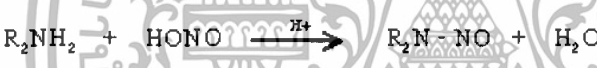
มีการศึกษาการใช้ไนไตรต์ในการต้านการเกิดกลิ่นเหม็นหืน การขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเหม็นหืนนั้นอาจเกิดคล้ายกับปฏิกิริยาการเกิดสี โดยส่วนฮีมในกล้ามเนื้อซึ่งมีเหล็กไอออนเป็นองค์ประกอบ เหล็กไอออนนี้จะไปเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของไขมัน แต่ถ้ามีไนไตรต์ร่วมด้วยจะเกิดปฏิกิริยาการเกิดสี โดยไนไตรต์จะทำปฏิกิริยากับส่วนฮีมในเนื้อสัตว์และเหล็กที่เป็นองค์ประกอบของฮีม (ปกติจะอยู่ในรูป Fe^{2+}) จะถูกรีดิวซ์ทำให้ไปเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้น้อยลง ผลของปฏิกิริยานี้จะช่วยป้องกันการเกิดกลิ่นเหม็นหืนที่เกิดกับเนื้อสัตว์บ่มได้ (Martin, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ) ความเป็นพิษของไนไตรต์

การเติมไนไตรต์และไนเตรตที่มากเกินกำหนด อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพในภายหลัง มีการกล่าวว่า ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อร่างกายและหากอยู่ในรูปของไนโตรซามีน (Nitrosamine) จะเป็นสารก่อมะเร็ง แต่หากใช้ในปริมาณที่กำหนดก็จะไม่เป็นอันตราย และมีรายงานเหตุการณ์ที่เกิดเกี่ยวกับสารพิษของไนไตรต์น้อยมาก ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นการใช้ไนไตรต์ในปริมาณที่มากเกินกำหนด ถ้าร่างกายรับไนไตรต์เข้าไป 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวจะเป็นอันตรายถึงชีวิต ไนไตรต์จะทำให้เส้นเลือดโป่งพองและเกิดภาวะความดันโลหิตต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถรีดิวซ์วิตามิน A ที่สะสมอยู่ในตับ และรบกวนการทำงานของต่อมไทรอยด์ ไนไตรต์สามารถออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินไปเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) ทำให้การขนส่งออกซิเจนในเลือดลดลง เกิดภาวะความผิดปกติที่เรียกว่า เมทฮีโมโกลบินีเมีย (methemoglobinemia) ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิตถ้าเกิดกับเด็กทารก (Martin, 2001)

ไนโตรซามีนเกิดจากไนไตรต์ทำปฏิกิริยากับเอมีนทุติยภูมิ (secondary amine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ปฏิกิริยามีดังนี้ (Martin, 2001)



เอมีนไดเมทิลเอมีน (amine dimethylamine) ทำปฏิกิริยากับ ไนไตรต์ เกิด ไนโตรโซไดเมททิลเอมีน (N-nitrosodimethylamine) (Martin, 2001)

เอมีนทุติยภูมิ (secondary amine) เอมีนจตุรภูมิ (tertiary amine) และอนุพันธ์ของสารประกอบแอมโมเนียมกับอะตอมของไฮโดรเจน (quaternary ammonium compound) ทำปฏิกิริยากับไนไตรต์ในสภาวะกรดทำให้เกิดไนโตรซามีน โดยไนโตรซามีนจะพบในเนื้อสัตว์บ่มและผลิตภัณฑ์ปลา นอกจากนี้วิตามินซีสามารถช่วยยับยั้งการเกิดไนโตรซามีนได้ (Jay, 1992)

2.5 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในอาหารหมัก

2.5.1 การหมักคาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียกรดแลคติกมีการหมักคาร์โบไฮเดรต แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก) <u>กลุ่มที่ 1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ</u> เป็นการหมักที่ได้แลคเตทอย่างเดียว เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส หรือ EMB pathway (Emden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway) (Toldrá และคณะ, 2001) เริ่มต้นจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัสและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เกิดขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลสจะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออก เป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวทและแลคเตท ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH และได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Buckenhüskes, 1993)

ข) <u>กลุ่มที่ 2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ</u> เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทานอล หรืออะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลสจึงเปลี่ยนรูปจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ไปเป็นเพนโตสซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการสร้างโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชันและดีคาร์บอกซิเลชันร่วมด้วย น้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตและอะซิติลฟอสเฟตโดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส กลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท เช่นเดียวกับ การเกิดไกลโคไลซีสในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (แต่เนื่องจากในการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ มีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนของอะซิติลฟอสเฟตนั้น ขึ้นอยู่กับว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอน อะซิติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเอง ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลและได้ NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะซิติลฟอสเฟตมีมากพอสำหรับการเปลี่ยนให้เป็นอะซิเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับสับสเตรทอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มอีก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุล จากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆด้วย เช่น ฟรุกโตสซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิทอล การระบุว่าเกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟหรือไม่ อาศัยการบ่งชี้ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น (Buckenhüskes, 1993)

2.5.2 กระบวนการย่อยโปรตีน (proteolysis)

การย่อยของโปรตีนที่สำคัญในกล้ามเนื้อคือ ไมโอฟีบิลาโปรตีน (myofibrillar protein) และซาโคพลาสมิกโปรตีน (sarcoplasmic protein) ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการหมักและการบ่มโดยเอนไซม์โปรตีนเนส (proteinases) ในกล้ามเนื้อ (cathepsins และ calpains) เอกโซเปปทิเดส (dipeptidylpeptidases และalanyl-, arginyl-, leucyl- และ pyroglutamyl-aminopeptidases) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โปรตีเอส (protease) จากจุลินทรีย์ที่เป็นกล้าเชื้อ มีความพยายามที่จะศึกษาหาความสัมพันธ์และบทบาทของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นภายในกล้ามเนื้อและเอนไซม์ที่มาจากจุลินทรีย์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ แต่เป็นเรื่องที่ทำได้ยากมากเนื่องจากความหลากหลายของจุลินทรีย์และความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ ขั้นตอนของการย่อยโปรตีนแสดงดังนี้

รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการย่อยโปรตีน

ที่มา : Toldrá และคณะ (2001)

การย่อยของโปรตีนเริ่มจากโครงสร้างของโปรตีนในกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์สุดท้ายได้กรดอะมิโน พบว่า การรวมกันของเปปไทด์สายสั้นๆจะทำให้เกิดกลิ่นรสและกรดอะมิโนอิสระมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับรสชาติ หรือกรดอะมิโนจะเป็นสารตั้งต้นผ่านกระบวนการสลายได้เป็นสารประกอบที่มีกลิ่น

2.5.3 กระบวนการย่อยไขมัน (lipolysis)

การย่อยไขมันเป็นกรดไขมันอิสระเป็นกระบวนการสำคัญช่วยให้เกิดกลิ่นรสที่ดี โดยกรดไขมันอิสระที่ไม่อิ่มตัวจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สารประกอบที่ระเหยได้และมีคุณสมบัติที่ช่วยให้เกิดกลิ่น เนื้อเยื่อไขมันและไขมันระหว่างกล้ามเนื้อมีส่วนประกอบหลักเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ส่วนไขมันในกล้ามเนื้อมีส่วนประกอบของฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ด้วยการย่อยสลายไขมัน เริ่มต้นจากการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยเอนไซม์ไลเปสภายในกล้ามเนื้อ เช่น ไลโซโซมอลไลเปส (Lysosomal lipase) ปกติพบในกล้ามเนื้อและทำงานที่พีเอชประมาณ 5.0 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไลเปสในธรรมชาติเกิดในเนื้อเยื่อไขมัน แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้ แต่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนและไดกลีเซอไรด์ได้จึงย่อยไขมันได้กรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์ย่อยไขมันในกล้ามเนื้อสามารถย่อยไขมันได้ประมาณร้อยละ 60-80 ของไขมันทั้งหมด ส่วนไขมันที่เหลือจะถูกย่อยโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ส่วนกรณีของฟอสโฟไลปิดจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสในกล้ามเนื้อ ขั้นตอนการย่อยไขมันของเนื้อเยื่อไขมัน แสดงดังนี้ (Toldrá และคณะ, 2001)

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการย่อยไขมัน
ที่มา : Toldrá และคณะ (2001)

2.5.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์และไนเตรตรีดักเทส (Nitrite/Nitrate Reductase)

กิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์และไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) จากแบคทีเรียในแฟมมีลี่ Micrococcaceae เป็นกระบวนการสำคัญในการถนอมอาหาร การปรับปรุงสี และกลิ่นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (Toldrá และคณะ, 1993) โดยเอนไซม์นี้จะรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ และทำปฏิกิริยาต่อกับไมโอโกลบิน นอกจากนี้ไนไตรต์ยังสามารถเปลี่ยนกลับเป็นไนเตรตได้อีกด้วย ไนไตรต์อาจถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสจากแบคทีเรียในแฟมมีลี่ Micrococcaceae หรือสลายโดยปฏิกิริยาทางเคมีที่ค่าพีเอช 5-5.4 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์เกี่ยวข้องกับพลังงานในกระบวนการหายใจ ส่วนเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา NADH รีออกซิเดชัน ไนไตรต์และไนเตรตจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในแบคทีเรียที่ไม่ต้องอากาศในการเจริญ (anaerobe) โดยมีโมลิบดินัมเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรต กิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์/ไนเตรตรีดักเทสพบในพวกแบคทีเรียแกรมบวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Enterobacteriaceae และ psychrotroph) เช่นกัน และมีมากกว่าพวกแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ แต่จะเกิดขึ้นอย่างจำกัดในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ค่อยมีบทบาทในปฏิกิริยารีดักชันของไนไตรต์/ไนเตรตมากนัก *Lactobacillus plantarum* สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ในหลอดทดลองแต่จะไม่เกิดภายใต้สภาวะการหมักเนื้อสัตว์ กิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสในแบคทีเรียกรดแลคติกมี 2 แบบ แบบแรกกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับฮีมซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวพบในสายพันธุ์ *L. plantarum L. pentosus* และ *Pediococcus pentosaceus* แบบที่สอง กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ขึ้นอยู่กับฮีมจะทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (NO) และไนตรัสออกไซด์ (N_2O) พบในสายพันธุ์ *L. plantarum* และพบน้อยมากใน *L. sake* และไม่พบใน *L. curvatus* (Toldrá และคณะ, 2001)

การรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์พบใน *Staphylococcus xylosus, S. simulans, S. sciuri* และ *Micrococcus varians* นอกจากนี้ *S. carnosus* อาจรีดิวซ์ไนไตรต์ต่อได้เป็นแอมโมเนีย มีการกล่าวอ้างว่า การใช้ไนไตรต์น้อยกว่า 50 ส่วนในล้านส่วน เพียงพอในการทำให้เกิดสีในเนื้อสัตว์บ่ม และปฏิกิริยาต้องเกิดก่อนที่พีเอชจะลดลงต่ำกว่า 5.4 ซึ่งเป็นพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เนื่องจากความหลากหลายของสภาวะการหมัก เช่น อุณหภูมิ พีเอช การมีหรือไม่มีกรดแลคติกและ micrococci ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ จึงเป็นการยากที่จะทราบกิจกรรมที่จำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ชนิดนี้ (ppm ของไนไตรต์ต่อชั่วโมงต่อจำนวนจุลินทรีย์) มีรายงานว่า *S. carnosus* 10^7 เซลล์ต่อ 1 กรัมของไส้กรอกสามารถรีดิวซ์ไนเตรต 125 และ 200 ส่วนในล้านส่วนต่อวัน (เทียบกับโซเดียมไนไตรต์ 84 และ 135 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 18 และ 24 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อัตราการรีดิวซ์ไนเตรตเกือบจะคงที่ในช่วง 5-6 วันแรกของการหมัก และหลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจำเป็นต้องมี micrococci จำนวนอย่างน้อย 10^6 เซลล์ต่อกรัมของไส้กรอกเมื่อใช้ไนเตรตเป็น curing agent แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ micrococci ในหลอดทดลองแต่พบในสภาวะการหมักเนื้อสัตว์ (Kröckel, 1995)

2.5.5 กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (Kröckel, 1995) กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสจะเป็นตัวกลางในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สีผลิตภัณฑ์ซีดและเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี พบในแบคทีเรียแฟมิลี่ Micrococcaceae แบคทีเรียที่เจริญในสภาพมีอากาศและแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสร่วมกับเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ซึ่งจะทำให้เกิดการสลายขององค์ประกอบสารพิษที่มาจากออกซิเจน แบคทีเรียแกรมบวกจะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสต่อเซลล์มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

staphylococci มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสสูงสุดในช่วงต้นของระยะ stationary phase ภายใต้สภาพมีอากาศและมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำ (Toldrá และคณะ, 2001) เอนไซม์คะตะเลสจะไม่พบในแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศหรือแบคทีเรียกรดแลคติกแต่มีบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ซูโดคะตะเลสได้ (pseudocatalase) (Kröckel, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลสเพื่อสลายเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ได้ 2 ชนิด คือ เอนไซม์คะตะเลสที่มีฮีม (heme) เป็นส่วนประกอบซึ่งจะพบในสภาพที่มีฮีมาตินเท่านั้น และเอนไซม์ซูโดคะตะเลสหรือ manganese-dependent catalase ปัจจุบันพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* มียีนที่สร้างเอนไซม์ซูโดคะตะเลส และ *Lactobacillus* สายพันธุ์ *L. sakei* มียีนที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสที่มีฮีมเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสใน *L. sakei* จะถูกชักนำให้เกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Toldrá และคณะ, 2001)

กล้าเชื้อ micrococci ที่เติมลงในไส้กรอก (10^6-10^7 เซลล์ต่อกรัม) สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ประมาณ 15 นาโนโมลต่อนาที จำนวนแบคทีเรียเพียง 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตรสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสได้ในหลอดทดลอง แต่ในอาหารความไวของการรีดิวซ์จะลดลงต้องใช้แบคทีเรีย 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างกันมากระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสของจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ในกล้าเชื้อบริสุทธิ์กิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสของ *Micrococcus* และ *Bacillus* มีมากกว่า *Pseudomonas* และ *E.coli* ถึง 4 เท่า ปริมาณเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโต (growth phase) และสภาวะการเจริญเติบโต ใน *Staphylococcus aureus* กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสจะเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของระยะ stationary phase (Kröckel, 1995)

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ

จุลินทรีย์	Catalase		Nitrate-reductase	Nitrite-reductase		Proteolytic activity		Lipolytic activity
	Heme-containing	Pseudo-catalase		Heme-dependent	Heme-independent	Endo-	Exo-	
L. sake	+	-	-	-	+	-	++	-
L. curvatus	-	-	-	-	-	-	++	-
L. plantarum	+	+	+	+	+	-	++	-
P. acidilactici	+	-	-	-	-	-	++	-
P. pentosaceus	-	+	-	+	-	-	++	-
Kocuria	++	-	++	-	++	-	+	+
Staphylococcus	++	-	++	-	++	-	+	+
Yeast	+	-	-	-	-	-	+	+
Molds	+	-	-	-	-	+	+	+

ที่มา : Kröckel (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 กิจกรรมและกลไกการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

2.6.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติกและกรดโพรไพโอนิก ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของค่าพีเอช ค่าคงที่การแตกตัวและความเข้มข้นของกรด ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยับยั้ง กรดแลคติกจะทำให้โปรตีนเสียสภาพและลดค่าพีเอชภายในเซลล์ของ *Clostridium aceetobutylicum* กรดอะซิติกยับยั้งการขนส่งกรดอะมิโนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ในราในสภาวะพีเอชต่ำ กรดที่มีค่าคงที่การแตกตัวสูงจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่าคงที่การแตกตัวต่ำ เช่น กรดอะซิติก จะมีกรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติก 2 - 4 เท่า ที่พีเอชในช่วง 4 - 4.6 ทำให้มีผลในการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติก (Earnshaw, 1992)

2.6.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ในสภาพที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยการทำงานของฟลาโวโปรตีนของเอนไซม์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเพื่อกำจัดอิเล็กตรอนส่วนเกินออกจาก NADH โดยปราศจากการสร้าง ATP นอกจากนี้ พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถสังเคราะห์ได้จากสารตั้งต้นต่างๆ เช่น แอลฟากลีเซอรอลฟอสเฟต (α -glycerophosphate) และแลคเตท (lactate) ในสภาวะไม่มีธาตุเหล็กแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน แต่จะมีระบบอื่นที่ใช้กำจัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะเป็นไปตามกลไกการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม ไม่มีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์เพราะกิจกรรมดังกล่าวสามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) และซูโดคะตาเลส (pseudocatalase)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดซ์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl) ได้แก่ โปรตีนในเซลล์และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจนจึงทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ (Earnshaw, 1992)

ในสภาพธรรมชาติเมื่อมีไทโอไซยาเนท (thiocyanate) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไทโอไซยาเนทเปลี่ยนเป็นไฮโปไซยาไนต์ (hypocynite, OSCN) และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากจะเปลี่ยน เป็น O_2SCN และ O_3SCN ตามลำดับ ซึ่ง OSCN จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกหลักในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น คือการขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิสในขั้นตอนการขนส่งกลูโคส รวมทั้งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีหมู่ซัลไฟดริลเป็นองค์ประกอบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม lactobacilli สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเป็นพิษ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* ในระยะระหว่างการเก็บรักษาหอยนางรมโดยการแช่แข็งสามารถยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารที่อุณหภูมิต่ำได้

2.6.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentative นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม homofermentative บางชนิดสามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากมาเลท (malate) และซิเตรต โดยมาเลทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตทและคาร์บอนไดออกไซด์โดยมาโลแลคติก (malolactic) ในขณะที่ซิเตรตจะเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตทและออกซาโลอะซิเตท โดยเอนไซม์ซิเตรตไลเอส (citrate lyase) และจากนั้นออกซาโลอะซิเตทเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์

การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียแลคติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้เกิดสภาพไร้อากาศโดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนทำให้พีเอชทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง นอกจากนี้พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น จึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญมากโดยเฉพาะการทำผักดองและหญ้าหมักเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา (Holzapfel และคณะ, 2003)

2.6.4 ไดอะซิติล (Diacetyl)

ไดอะซิติล (2,3-butanedione) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ไพรูเวทในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักซิเตรตได้ ซึ่งในกระบวนการหมักจะเกิดไพรูเวทจำนวนมาก (ไม่รวมไพรูเวทส่วนที่จะถูกรีดิวซ์เป็นแลคเตท) ไพรูเวทเหล่านี้ทำปฏิกิริยาเป็นไดอะซิติลและอะซิโตอิน โดยพบว่า lactococci, lactobacilli และ leucoconostocs ใช้เป็นหัวเชื้อ (starter) มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสให้กับผลิตภัณฑ์ ไดอะซิติลสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ความเข้มข้นประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ในทางปฏิบัติยอมรับได้ในผลิตภัณฑ์หมักในปริมาณ 2 - 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Earnshaw, 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5 รูทีรีน (reuterin)

รูทีรีน (3-hydroxypropionaldehyde) ที่ผลิตและถูกปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ lactobacilli กลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus reuteri* ระหว่างกลไกการสันดาปของกลีเซอรอลหรือกลีเซอรอลดีไฮด์ในสภาพไร้อากาศ ผลิตผลจากกระบวนการสันดาปจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนมาก รวมถึงยีสต์ รา โปรโตซัวและแบคทีเรีย บทบาทการยับยั้งเนื่องจากการไม่เกิดการกระตุ้นของเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์ รีดักเทส (Holzapfel และคณะ, 2003)

2.6.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่สร้างโดยแบคทีเรียบางชนิด สามารถทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะเจาะจง สันนิษฐานว่าน่าจะสร้างขึ้นภายใต้สภาวะเครียดและเป็นกลไกเพื่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ (Daeschel และ Klaenhammer, 1985) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการค้าโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากวัตถุกันเสียเป็นสารเคมีซึ่งมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคจึงมีความสนใจหันมาศึกษาการนำแบคเทอริโอซินมาใช้แทนวัตถุกันเสียเนื่องจากเป็นสารจากธรรมชาติจึงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้ง่ายกว่า (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

2.6.6.1 คุณลักษณะของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนซึ่งแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน แบคเทอริโอซินไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากการศึกษาโครงสร้างของแบคเทอริโอซินพบว่าในสายเปปไทด์แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ซึ่งในแต่ละส่วนจะมีหน้าที่ต่างกันดังนี้ (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

1. Binding peptide มีหน้าที่ช่วยโมเลกุลของแบคเทอริโอซินถูกดูดซึมด้วย receptor บนผิวของแบคทีเรียเป้าหมาย

2. Active peptide มีหน้าที่ทำลายแบคทีเรียเป้าหมายโดย active peptide จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ของแบคทีเรียเป้าหมาย

3. immunity protein มีหน้าที่จับกับ Active protein อย่างจำเพาะเจาะจง ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein ที่เหมือนกัน

4. Translocation peptide ช่วยให้มีการโยกย้ายของสารเชิงซ้อนของแบคเทอริโอซินผ่านเข้าไปใน outer membrane ของแบคทีเรียเป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.6.2 ประเภทของแบคเทอริโอซิน

Class I : Lantibiotic

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สร้างขึ้นโดยการดัดแปลงกรดอะมิโนปกติในสายเปปไทด์หลังกระบวนการแปลรหัส เช่น ไนซิน ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, subtilin ผลิตโดย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรู (Pore) และสูญเสียแรงเคลื่อนโปรตอน (proton motive force, PMF) เป็นสาเหตุให้ carboxyfluorescein (CF) ไหลออกจากถุงไขมันเล็กๆ ดังนั้น เมื่อเกิดโพรงที่เยื่อหุ้มจึงมีการเคลื่อนย้ายของไอออนอิสระทำให้ความต่างศักย์ลดลงและไม่มีการสร้างพลังงาน เซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่น้ำสามารถไหลสวนกับการไหลออกของโมเลกุลขนาดเล็กส่งผลให้เซลล์แตกเนื่องจากแรงดันออสโมติก (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

Class II : Small heat-stable proteins

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน สามารถทนอุณหภูมิตั้งแต่ 100-121 องศาเซลเซียส เช่น Pediocin PA-1 ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici*, Lactacin F ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* 11088, Lactacin B ผลิตโดย *Lactobaciluus acidophilus* N2 เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งทนความร้อน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ต้องการตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับดูดซับที่ผิวเซลล์และออกฤทธิ์โดยไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน รูที่เกิดขึ้นมีผลต่อเซลล์คล้ายกับแบคเทอริโอซิน Class I คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถการเข้าออกของสาร เกิดการสูญเสียแรงเคลื่อนโปรตอนและเกิดการหยุดสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน

Class III : Large heat-labile protein

แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) ไม่ทนความร้อนรวมทั้งเอนไซม์ ฮีโมไลซีน (hemolysins) และ มิวรามิเดส (muramidase) แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้แยกได้จาก *Lactobacillus* เท่านั้น เช่น Acidophilucin A ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* ALPI 1060, Helveticin J ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* 481 (Ouwehand และVesterlund, 2004)

Class IV : Complex bacteriocins

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีคาร์โบไฮเดรตและ/หรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่ได้รับการยอมรับนัก เพราะอาจเกิดจากการทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไม่ดีพอ แต่เมื่อทดสอบโครงสร้างพบว่าการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจำเป็นต้องอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบที่เป็นไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต เช่น Lactocin 27 ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* LP 27 ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในคลาส 3 และคลาส 4 ยังไม่ทราบแน่ชัด ยกเว้น Lactococcin 972 สามารถทำให้แบคทีเรียตาย หรือทำให้หยุดการเจริญเติบโตโดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

2.6.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน

การสร้างแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน การลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (transslation) แบคเทอริโอซินถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินด้วย ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการสร้างแบคเทอริโอซินเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (complex medium) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินคือ อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน เช่น การสูญเสียการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียจากแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) หรือถูกยับยั้งโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญปะปนอยู่ (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

2.6.6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (Activity) ของแบคเทอริโอซิน

1) จำนวนและชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แตกต่างกันไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก

2) สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพของแบคเทอริโอซินจะเหมือนโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การรบกวนที่รุนแรงและมากเกินไปจะเกิดการฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริโอซิน

3) การรวมกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบอาหารหรือส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารที่เติมลงไปโดยพบว่า เกลือไนไตรต์ กรดอินทรีย์ สารจับโลหะและอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมันเนย ฟอสโฟไลปิด โปรตีนและสารในกลุ่มฟีนอล จะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

4) ค่าพีเอชของสารละลายหรือตัวกลางซึ่งมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าพีเอช 2.5 ไนซินสามารถละลายได้ร้อยละ 12 และที่ค่าพีเอช 5 ไนซินสามารถละลายได้ร้อยละ 4 แต่ไม่สามารถละลายได้ที่ค่าพีเอชเป็นกลางหรือเป็นเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทนความร้อนได้ดีที่ค่าพีเอช 2.5 โดยทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียสโดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ไนซินจะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

2.6.6.5 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินแต่ละกลุ่มมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแตกต่างกัน แต่ประกอบด้วยสองขั้นตอนที่เหมือนกันคือ 1) การยึดเกาะกับผิวเซลล์ 2) การสร้างรู (pore) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย กิจกรรมทางชีววิทยาของแบคเทอริโอซินจะอยู่ในรูป simple protein ประกอบเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนกับลิปิด หรือคาร์โบไฮเดรต ซึ่งโมเลกุลของแบคเทอริโอซินจะประกอบด้วยโครงสร้างที่ทำหน้าที่หลายอย่างซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละโมเลกุลคือ การจดจำของ immunity protein ที่มีความจำเพาะกับ receptor บนแบคทีเรียเป้าหมาย หลังจากนั้นจะถูกส่งเข้าไปใน outer และ inner membrane ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย การทำงานของส่วน active protein มีฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอภายในเซลล์แบคทีเรีย ลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินมีดังนี้ (Ouwehand และ Vesterlund, 2004)

1. แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่สายพันธุ์ต่างกันทนต่อแบคเทอริโอซินต่างกัน
2. แบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันแต่คนละเซลล์มีผลต่อแบคเทอริโอซินไม่เท่ากัน
3. บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันทนต่อแบคเทอริโอซินที่คล้ายคลึงกันต่างกัน
4. เซลล์ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งอาจไม่ทนต่อแบคเทอริโอซินอีกชนิดหนึ่ง
5. ภายใต้สภาวะปกติแบคทีเรียแกรมลบทนต่อแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก

2.6.6.6 การใช้ประโยชน์จากแบคเทอริโอซิน

ปัจจุบันการถนอมอาหารโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โดยไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งบางชนิดออกมา ซึ่งพบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินเป็นสารที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยโดย FDA และ FAO/WHO โดยที่ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับและอนุญาตให้ใช้เติมลงในอาหารได้ ในประเทศอังกฤษและประเทศอื่นบางประเทศได้ใช้ไนซินเป็นวัตถุกันเสียในอาหารมาตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1950 ในขณะที่ US.FDA เพิ่งผ่านกฎหมายยอมรับไนซินเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) เมื่อปี ค.ศ. 1988 (FDA, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 การผลิตแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่ผลิต	แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน	องค์ประกอบทางพันธุศาสตร์
Carnobacterium piscicola	ไม่ทราบชื่อ	Lactic acid bacteria	ไม่มีการตรวจสอบ
		Enterococci	
		Listeria monocytogenes	
	ไม่ทราบชื่อ	*Carnobacterium* sp.	40 และ 49 MDa
		Lactic acid bacteria	plasmids
		Enterococcus sp.	
Lactococcus cremoris	Lactostrepcin 5	*Lactococcu lactis* และ	ไม่มีการตรวจสอบ
		Bacillus subtilis	
		Protoplasts	
	Diplococcin	*Lactococcus lactis*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Lactococcus cremoris	
Lactobacillus acidophilus	ไม่ทราบชื่อ	*Bacillus cereus*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Clostridium sporogenes	
	Lactocin	*Staphylococcus aureus*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Pseudomonas aeruginosa	
		Streptococcus aureus	
		Salmonella enteritidis	
		Eschericia coli	
		Staphylococcus epidermidis	
		Lactobacilli	
		Mycobacterium sp.	
	Lactacin B	Lactobacilli	ไม่มีการตรวจสอบ
	Lactacin F	Lactobacilli	52 และ 68 MDa plasmids
		Enterococci	
Lactobacillus sp.	ไม่ทราบชื่อ	Clostridia	ไม่มีการตรวจสอบ
	ไม่ทราบชื่อ	*Bacillus cereus*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Clostridium sporogenes	
Lactobacillus sake	Sakacin A	*Listeria monocytogenes*	18 MDa plasmid
		Listeria monocytogenes	
Lactobacillus bulgaricus	Bulgaricin	*Bacillus subtilis*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Escherichia coli	
		Pseudomonas sp.	
		Sarcina luteus	
		Staphylococcus aureus	
		Lactococcus lactis	
Lactobacillus helveticus	Lactocin 27	Lactobacilli	ไม่มีการตรวจสอบ
	Helveticin J	Lactobacilli	ไม่มีการตรวจสอบ
Lactobacillus plantarum	Plantaricin A	Lactobacilli	ไม่มีพลาสมิด
		Leuconostocs	
		Pediococci	
		Lactobacillus lactis	
		Streptococcus faecalis	
	Plantacin B	*Lactococcus plantarum*	ไม่มีการตรวจสอบ
		Leuconostoc mesenteroides	
		Pediococcus damnosus	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 (ต่อ) การผลิตแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่ผลิต	แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน	องค์ประกอบทางพันธุศาสตร์
Lactobacillus fermenti	ไม่ทราบชื่อ	Lactobacilli	ไม่มีการตรวจสอบ
Leuconostoc gelidum	ไม่ทราบชื่อ	ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Listeria monocytogenes* *Enterococcus faecalis*	7•6 MDa plasmid
Pediococcus acidolactici	ไม่ทราบชื่อ	*Listeria monocytogenes*	ไม่มีการตรวจสอบ
	Pediocin AcH	*Lactobacillus plantarum* *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus* *Clostridium botulinum*	ไม่มีการตรวจสอบ
	Pediocin PA-1	*Listeria monocytogenes*	23 MDa plasmid
Pediococcus acidolactici	ไม่ทราบชื่อ	Pediococci *Listeria monocytogenes* *Leuconostoc mesenteroides* *Streptococcus faecalis*	5•5 MDa plasmid
Pediococcus pentosaceus	Pediocin A	*Staphylococcus aureus* *Clostridium botulinum* *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดใน เนื้อวัวบด	13•6 MDa plasmid
	ไม่ทราบชื่อ	Pediococci *Listeria monocytogenes* *Leuconostoc mesenteroides* *Streptococcus faecalis*	5•5 MDa plasmid

ที่มา : ดัดแปลงจาก Earnshaw (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างอาหารได้แก่ เนื้อหมูสด 10 ตัวอย่าง แหนม 9 ตัวอย่างและไส้กรอกอีสาน 2 ตัวอย่างได้จากตลาดสำโรง ตลาดคลองเตยและตลาดนัดเรือนไทย (ลาดกระบัง) ตัวอย่างแหนมและไส้กรอกอีสานที่ผลิตเองอีก 11 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนสิงหาคมถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2550

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ de Man Rogosa and sharpe medium (MRS, Difco) modified nitrite MRS medium (MRS broth และ MRS Agar, Difco) Bacteriocin Screening Medium (BSM) Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) Gibson's Semi Tomato Juice Medium Nutrient agar TSB soft agar MRS soft agar MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) 1 กรัมต่อลิตร bile extract porcine (Sigma) และสารละลายที่ใช้เจือจาง ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และชุดทดสอบ API 50 CH (Biomérieux)

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 95 สารละลาย NIT 1 (กรดซัลฟานิลิค 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารละลาย NIT 2 (ไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สีและสารเคมีที่ใช้ย้อมแกรม ได้แก่ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แกรมไอโอดีน (Gram's iodine) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ซาฟรานีน (safranin) และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ตกค้าง ได้แก่ โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3\ H_2O$] ซิงค์อะซิเตท [$(CH3COO)_2\ Zn \cdot 2\ H_2O$] โซเดียมเตตระบอเรท [$(Na_2B_4O_7) \cdot 10\ H_2O$] ซัลฟานิลามายด์ ($C_6H_8N_2O_2S$) กรดอะซิติก N-1-แนฟทิลลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N-1-naphthylene diamine dihydrochloride) และโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$)

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ได้แก่ เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher Masticator) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (Novasina Thermoconstanter รุ่น TH 200) เครื่องวัดพีเอช (Testo 205) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV 1601 Shimadzu) เครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex mixer) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) โถไร้อากาศ (anaerobic jar) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ตู้ปลอดเชื้อ(Laminar air fiow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง microplate reader (iEMS Reader MF, Labsytems) และเครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น ได้แก่ ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีป่น ปิเปต ลูกยาง จานเพาะเชื้อ ลูปเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วงอและเครื่องแก้วที่จำเป็น เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวงและอื่นๆ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

นำตัวอย่างที่สุ่มมาจากตลาด ได้แก่ เนื้อหมู 10 ตัวอย่าง แหนม 9 ตัวอย่างและไส้กรอกอีสาน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ผลิตเอง ได้แก่ แหนมที่เติมโซเดียมไนไตรต์ 7 ตัวอย่างและไส้กรอกอีสานที่เติมโซเดียมไนไตรต์ 4 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ วิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณน้ำอิสระและปริมาณไนไตรต์ตกค้างโดยใช้วิธีการดังนี้

3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)

นำตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน มาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องเครื่องวัด pH (Testo 205)

3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)

นำตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน มาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w)โดยใช้เครื่องเครื่องวัด water activity ของ Novasina Thermoconstanter รุ่น TH 200

3.2.1.3 การหาปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน (Kirk และ Sawyer, 1991)

ก) สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณไนไตรต์

1. สารละลายโพแทสเซียมเตรียมโดยชั่ง potassium ferrocyanide trihydrate 109 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. ชั่ง Zinc acetate dehydrate 220 กรัม ละลายน้ำและเติม glacial acetic acid 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. ชั่ง Sodium tetraborate decahydrate 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลาย

4. ชั่ง Sulphanilamide 2 กรัม ละลายในน้ำอุ่น 800 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วทำการกรอง เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คนตลอดเวลา) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. N-1-naphthylene diamine dihydrochloride 0.25 กรัม ละลายน้ำปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาและนำไปแช่ตู้เย็น เตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 445 มิลลิลิตร เจือจางกับน้ำเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การทำกราฟมาตรฐาน

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรต์ (stock) เตรียมโดยชั่งโซเดียมไนไตรต์ 1.0000 กรัมพอดี ละลายน้ำและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่ใช้ในการทดลอง ควรเตรียมใหม่ทุกวัน โดยเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 3 ระดับความเข้มข้นดังนี้

- ปีเปตสารละลาย stock 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1 ลิตร และนำมาเจือจางต่อโดยเติมสารละลายนี้ปริมาตร 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นี้จะมีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์เป็น 2.5, 5.0 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ค) การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

ทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวโดยใส่เครื่องบด วิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรุงทันที สำหรับตัวอย่างอื่นที่ยังไม่ทำการวิเคราะห์ให้รีบทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ใช้อาจเก็บไว้ก่อนทำให้เป็นเนื้อเดียวกันได้ถึง 4 วันถ้าเก็บในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ชั่งตัวอย่างที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายบอแรกซ์ (สารข้อ ก(3)) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 70 มิลลิลิตร (อุณหภูมิห้ามต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส) ลงในบีกเกอร์ที่ใส่ตัวอย่าง คนผสมให้เข้ากัน ถ่ายตัวอย่างใส่ฟลาสก์สำหรับปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำร้อน 75 มิลลิลิตร ช่วยในการถ่ายตัวอย่าง ให้ความร้อนโดยเอาไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 30 นาทีและเขย่าอย่างสม่ำเสมอ รอให้เย็นลงและเติมสารเคมีในข้อ ก(1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมกับสารเคมีในข้อ ก(2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปริมาตรให้ได้เกือบถึง 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ค่าพีเอช 8.3 โดยค่อยๆหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ หลังปรับพีเอช ปรับปริมาตรให้ได้ถึงขีด 200 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ค่อยๆกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากไนเตรตและไนไตรต์อย่างระมัดระวังเพื่อให้ได้ส่วนกรองที่ใส

ง) การวัดสี (colour measurement)

ทำโดยปีเปตสารที่กรองได้ v มิลลิลิตร (v ไม่เกิน 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตร (volumetrie flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร เติมสารเคมีในข้อ ก(4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารเคมีในข้อ ก(6) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาทีเติมสารเคมีในข้อ ก(5) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 3 นาที ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยนำสารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น (โซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยปิเปตมาความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร (โซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 25, 50 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไนไตรต์ นำสารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่แต่ละความเข้มข้นทำตามขั้นตอนการวัดสีของตัวอย่าง แต่เปลี่ยนตัวอย่างเป็นสารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่างๆแทน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์

<u>หมายเหตุ</u> ถ้าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายโซเดียมไนไตรต์ ให้เจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างใหม่โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าเดิม

3.2.2 การแยกเชื้อการศึกษาคุณลักษณะและการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

3.2.2.1 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อแล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจาง 10^{-1}) นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารนาน 1 นาที ด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้อาหารเข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยมีอากาศผสมลงไปน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} ถึง 10^{-7} โดยใช้สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่แต่ละระดับความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร MRS Agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ใช้แท่งแก้วงอปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ตัวอย่างซึมเข้าในอาหารโดยทำที่ระดับความเจือจางละ 2 จาน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic condition) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติก และคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างอาหาร (CFU ต่อกรัมของอาหาร) โดยนับโคโลนีที่มีโซนใสล้อมรอบ (clear zone) คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่มีโซนใสล้อมรอบ นำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร MRS Agar เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆมาลากลงบนหลอดอาหาร MRS agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บเชื้อไว้ในหลอดทนความเย็นที่มีอาหารเหลว MRS ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 15 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

ก) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน จากหลอดเก็บเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มา 1 ลูป นำมาลากลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS และนำไปบ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งมา 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเทส่วนใสทิ้งแล้วปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับตะกอนเซลล์ (cell pellet) ให้เข้ากันด้วย (vortex mixer) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง เมื่อล้างเซลล์ครบ 2 ครั้งแล้ว ทำสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) แต่ละไอโซเลต โดยปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตไปปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ข) การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง (indicator stain)

เขี่ยเชื้อที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescence* DMST 20076, *E.coli* DMST 4212 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 ชนิดละ 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสม โดย *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescence* DMST 20076 และ *E. coli* DMST 4212 ใช้อาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร *Vibrio parahaemolyticus* SH1 ใช้อาหารเหลว TSB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 ใช้อาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับข้อ ก. ทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อ โดยปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดไปปรับความขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ค) การทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar spot test

ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ด้วยวิธี agar spot test (Schillinger และ Lücke, 1989)

ทำได้โดยเขี่ยเชื้อจากสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมาแตะลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Bacteriocin Screening Medium (BSM) นำไปบ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของ *S.* Typhimurium DMST 0562, *S. aureus* TISTR 118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescence* DMST 20076 และ *E. coli* DMST 4212 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว TSB soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว TSB soft agar ที่เติมเกลือร้อยละ 1 และปิเปตสารละลายแขวนลอยเซลล์ *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. pentosaceus* TISTR 414 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส โดยผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหารด้วย vortex mixer จากนั้นเทเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดลงบนอาหาร BSM ที่บ่มแล้วข้างต้น โดยใช้เชื้อทดสอบ 1 เชื้อต่ออาหาร 1 จาน เกลี่ยอาหารที่มีเชื้อที่ใช้ทดสอบให้ทั่วจานนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่ม โดยจานที่ใช้เชื้อทดสอบ *S.* Typhimurium DMST 0562, *S. aureus* TISTR 118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescence* DMST 20076, *E.coli* DMST 4212 และ *V. parahaemolyticus* SH1 นำไปบ่มในสภาพมีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนจานที่มีเชื้อทดสอบเป็น *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. pentosaceus* TISTR 414 นำไปบ่มในสภาพไร้อากาศ (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสังเกตจากบริเวณโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ถือว่าให้ผลบวกกับ agar spot test จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ก) การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

ทำการเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตจาก MRS slant มาแตะที่สไลด์ที่สะอาดแล้วหยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไป สังเกตเกิดฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นในทันทีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (ให้ผลบวก) และถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าไม่มีการผลิตเอมไซม์คะตะเลส (ให้ผลลบ)

ข) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยวิธี agar plate method

ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามวิธีการของ Miralles และคณะ (1996) ซึ่งทำได้โดยเตรียมอาหาร MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนไตรต (KNO_3) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งแล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบซึ่งได้เตรียมไว้ในวิธีการในข้อ 3.2.2.2 (ก) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลุมนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยราดด้วยสารละลายของ NIT 1 [เตรียมโดยสารละลายกรดซัลฟานิลิค (Sulphanilic acid) 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร] และ NIT 2 [เตรียมโดยซั่งไดเมทิลแนฟทิลลามีน (N-N-dimethyl-1-napthylamine) 0.6 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100] ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรให้ท่วมผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่เติมโพแทสเซียมไนไตรต (KNO_3) ถ้ามีไนไตรต์จะเกิดสีแดงรอบๆหลุมที่ใส่สารแขวนลอยของเซลล์ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ค) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2 (ก) สำหรับการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส ทำได้โดยวิธีของ Wolf และ Hammes (1988) ซึ่งทำได้โดยถ่ายเชื้อจากสารแขวนลอยเซลล์ที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ลงในอาหารเหลว modified nitrite MRS medium บ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีปริมาณเซลล์ $2.0x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ตามวิธีการของ Kirk และ Sawyer (1991) ถ้าปริมาณไนไตรต์ลดลง แสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ได้แก่ ไอโซเลตที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีและมีคุณสมบัติที่เหมาะสมอื่นๆ ได้แก่ สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสได้ โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเหล่านี้มาทั้งหมด 5 ไอโซเลต เพื่อมาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์และทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.4 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

ก) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ละไอโซเลตที่คัดเลือกจำนวน 5 ไอโซเลต เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.2.2.1 (ก)

ข) การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 และการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 นอร์มอล โดยปรับพีเอชของอาหารเหลวที่เติมกรดทั้ง 2 ชนิดให้ได้ระดับพีเอช 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0 และ 1.5 การทดสอบทำได้โดยปิเปตอาหารเหลวดังกล่าวที่แต่ละระดับพีเอช ปริมาตร 95 ไมโครลิตรลงในหลุมของ microtiter plate จากนั้นเติมสารแขวนลอยเซลล์ลงไปในหลุมนั้นปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่ม ถ้าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.03 แสดงว่า มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตเจริญได้

ค) การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์

ทำการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ เช่นเดียวกับการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก ต่างกันที่อาหารเหลวที่ใช้สำหรับการทดสอบ การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี ใช้อาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5, 1.0 และ 1.5 สำหรับการทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ใช้อาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 11 หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มเชื้อแล้ว หาค่าความเข้มข้นของเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

3.2.2.5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติก

ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก 5 ไอโซเลต ที่คัดเลือกโดยการนำมาย้อมแกรม ทำได้โดยโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ สเมียร์เชื้อเป็นแผ่นฟิล์มบางๆบนสไลด์ ตรึงเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นหยดคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที และล้างสีคริสตัลไวโอเลตด้วยน้ำ จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมเชื้ออีกครั้งและทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำแล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 20 วินาที หยดสีซาฟรานีน (safranin) และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ตรวจดูรูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ข) การจำแนกชนิดถึงระดับจีนัส

- การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส

นำอาหาร Gibson's Semi Tomato Juice Medium มาหลอมและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์แต่ละสายพันธุ์ที่ได้เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากัน เมื่ออาหารเริ่มแข็งตัวแล้วปิดทับด้วยอาหาร Nutrient agar ให้มีความหนาประมาณ 2-3 เซนติเมตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นในอาหารหรืออาหารแยกตัวออกเป็น 2 ชั้น แสดงว่ามีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลบวก) และถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นในอาหารแสดงว่าไม่มีการก๊าซผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลลบ)

- การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

ปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

- การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

- การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่พีเอช 4.4 และ 9.6

ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ที่มีพีเอช 4.4 และ 9.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค) การจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์

i) อุปกรณ์ที่ใช้จำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH ได้แก่

- อาหารเหลว API 50 CHL (API 50 CHL medium)

อาหารเหลวชนิดนี้ประกอบด้วย โพลีเปปโตน 10 กรัม (bovine/porcine origin) ยีสต์สกัด 5 กรัม ทวีน 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2 กรัม โซเดียมอะซิเตต 5 กรัม ไดแอมโมเนียมซิเตรต 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.20 กรัม แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัม โบรโมครีซอลเพอเพิล (bromocresol purple) 0.17 กรัม และน้ำดีไอออนไนซ์ (deionized water) 1000 มิลลิลิตร พีเอช 6.7-7.1

- API 50 CH strips

API 50 CH strips ประกอบด้วย microtube ทั้งหมด 50 หลอดโดยหลอดแรกเป็นหลอดควบคุม (ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต) ส่วนหลอดถัดไปอีก 49 หลอด แต่ละหลอดจะบรรจุสารคาร์โบไฮเดรตต่างชนิดกัน เพื่อการทดสอบการใช้สารคาร์โบไฮเดรตจำนวนทั้งหมด 49 ชนิด ได้แก่ Glycerol (GLY), Erythritol (ERY), D-Arabinose (DARA), L-Arabinose (LARA), D-Ribose (RIB), D-Xylose (DXYL), L-Xylose (LXYL), D-Adonitol (ADO), Methy-βD-Xylopyranoside (MDX), D-Galactose (GLU), D-Fructose (FRU), D-Mannose (MNE), L-Sorbose (SBE), L-Rhamnose (RHA), Dulsitol (DUL), Inositol (INO), D-Mannitol (MAN), D-Sorbitol (SOR), Methyl-αD-Mannopyranoside(MDM), Methyl-αD-Glucopyranoside (MDG), Amyldalin (AMY), N-Acetylglucosamine (NAG), Arbitin (ARB), Esuculin ferric citrate (ESC), Salicin (SAL), D-Melibiose (MEL), D-Saccharose (sucrose, SAC), D-Trehalose (TRE), Inulin (INU), D-Melezitose (MLZ), D-Raffinose (RAF), Amidon (starch) (AMD), Glycogen (GLYG), Xylitol (XLT), Genitiobiose (GEN), D-Turanose (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 (5 KG)

- ถาดรังผึ้ง

- McFarland Standard เบอร์ 2

- Mineral oil

- API Identification Software (Bio Merieux)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ii) วิธีการทดสอบทำได้ดังนี้

1) การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.2 (ก) และปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงไปในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนมีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2 บันทึกปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์ที่ใช้ในการปรับความขุ่น ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตรเท่ากับที่บันทึกไว้ลงไปในอาหาร API 50 CHL medium ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) การเตรียม strips

เตรียมถาดที่ใช้บ่ม บันทึกรหัสสายพันธุ์ที่ทดสอบบนถาด จากนั้นใส่น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงไปในหลุมของถาด

3) การเติมเชื้อจุลินทรีย์ลงใน API 50 CH strips

ทำการแบ่ง API 50 CH strips ออกเป็น 5 strips ย่อย จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ได้เตรียมไว้ลงบน API 50 CH strips ปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้เตรียมไว้ลงในหลอดโดยเอียง strips เล็กน้อยและแตะปลายปิเปตลงบน cupule เพื่อป้องกันการเกิดฟอง จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้จนเต็มหลอด ทำซ้ำจนครบ 50 หลอด และปิดทับโดยหยด mineral oil ลงใน cupule จนเต็ม จากนั้นนำ strips แต่ละอันมาวางไว้ในถาดรังผึ้งและปิดด้วยฝาครอบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เวลาครบ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) แต่หลอดที่ 25 ซึ่งเป็นสาร Esuculin และ ferric citrate อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าไม่เกิดการหมัก (ให้ผลลบ) บันทึกผลการทดลองและนำผลการทดลองที่ได้ไปเข้าโปรแกรม API Identification Software (Biomérieux) จะทำให้ทราบชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

จากการศึกษาคุณลักษณะทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช a_w และปริมาณไนไตรต์ตกค้างในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน พบว่าเนื้อหมูสดมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.54 – 6.21 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 5.94 ส่วนแหนมและไส้กรอกอีสานมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.37-6.01 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 5.19 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเนื้อหมูสด และค่า a_w ของเนื้อหมูสดมีค่าอยู่ในช่วง 0.972-0.989 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 0.979 ซึ่งมีค่าสูงกว่า a_w ของแหนมและไส้กรอกอีสานที่มีค่าอยู่ในช่วง 0.933-0.979 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 0.958 และปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่พบในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานที่สุ่มตัวอย่างมาตรวจ พบว่าอยู่ในช่วง 0-131.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะทางเคมีของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ค่า a_w (30°C)	ปริมาณไนไตรต์ตกค้าง (mg/kg)
เนื้อหมูสด[a]	10	5.54-6.21	0.972-0.989	0-6.22
แหนม[a]	9	4.37-5.06	0.933-0.959	0-3.25
แหนม[b]	7	5.18-5.89	0.933-0.979	6.89-86.10
ไส้กรอกอีสาน[a]	2	4.66-4.79	0.951-0.974	0-0.75
ไส้กรอกอีสาน[b]	4	5.86-6.01	0.934-0.976	5.56-131.56

[a] ตัวอย่างที่สุ่มจากตลาด

[b] ตัวอย่างที่ผลิตเองซึ่งมีการเติมโซเดียมไนไตรต์

จากผลการทดลองการที่เนื้อหมูสดมีพีเอชค่อนข้างเป็นกรด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย ไกลโคเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกโดยกระบวนการไกลโคไลซิส นอกจากนี้การที่เนื้อหมูสดมีค่าพีเอชผันแปรมากอาจเนื่องมาจากปัจจัยก่อนฆ่าและหลังฆ่า สัตว์ที่ได้รับการเลี้ยงดูอย่างดี เช่น ไม่มีอาการเครียดระหว่างการเดินทาง มีการพักผ่อนที่เพียงพอหรือการทำให้สัตว์สลบก่อนฆ่า สัตว์จะมีปริมาณไกลโคเจนสูง หลังถูกฆ่าไกลโคเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้สูง ทำให้ค่าพีเอชลดต่ำมากกว่าในสัตว์ที่เครียด พักผ่อนไม่เพียงพอหรือสัตว์ที่ดิ้นรนก่อนถูกฆ่า เพราะสัตว์จะมีการใช้ไกลโคเจน หลังถูกฆ่าพีเอชจะลดลงไม่ต่ำพอ (เยาวลักษณ์, 2536) ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับรายงานของ Sayre และ Briskey (1963) ที่กล่าวว่า คุณภาพของเนื้อหมูเกี่ยวข้องกับค่าพีเอชของเนื้อหมูและอุณหภูมิในการเก็บรักษา การที่พีเอชมีค่าลดลงเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย ไกลโคเจนซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสถูกเก็บไว้ในกล้ามเนื้อเพื่อเตรียมจะสลายให้พลังงานออกมา กระบวนการไกลโคไลซิสจากไกลโคเจนและกลูโคส การสลายกรดไขมันเป็นผลทำให้เกิดไพรูเวท ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการไกลโคไลซิสและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมไม่สามารถเคลื่อนที่ไปตามกระแสเลือดได้ กรดแลคติกจึงสะสมอยู่ในกล้ามเนื้อ (Greaser, 2001) ช่วงของค่าพีเอชของเนื้อหมูสดที่สุ่มตัวอย่างมาศึกษาซึ่งอยู่ในระดับต่ำนั้นสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า โดยปกติในช่วงหลังการฆ่า 24 ชั่วโมง ค่าพีเอชในกล้ามเนื้อหมูจะลดลงจาก 7.2 เหลืออยู่ในช่วง 5.5-5.8 (Bendall และ Swatland, 1988) และเช่นเดียวกับ Kröckel (1995) ที่ได้กล่าวว่าเนื้อหมูปกติจะมีพีเอช 5.6 ส่วนค่าพีเอชของแหนมและไส้กรอกอีสานที่สุ่มตัวอย่างมาศึกษาที่มีค่าต่ำกว่าพีเอชของเนื้อหมูสด เนื่องมาจากกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นระหว่างกรรมวิธีการผลิต นอกจากนี้กระบวนการหมักยังทำให้เกิดการสูญเสียน้ำซึ่งจะเห็นได้จากการที่ค่า a_w ของแหนมและไส้กรอกอีสานมีค่าน้อยกว่าค่า a_w ของเนื้อหมูสด อาจเนื่องมาจากเมแทบอลิซึมในกระบวนการหมักเกิดการหมักน้ำตาลและได้กรดแลคติก ค่าพีเอชที่ลดลงเกิดจากการสะสมของกรดแลคติกซึ่งเป็นสิ่งสำคัญยิ่งสำหรับการถนอมรักษาไส้กรอก การลดลงของค่าพีเอชยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการลดความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนและเกิดการจับก้อนของโปรตีน (protein coagulation) ในช่วงที่ค่าพีเอชเข้าใกล้จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของโปรตีนในเนื้อ (Toldrá และคณะ, 2001) Vissessanguan และคณะ (2005) ได้รายงานว่า เมื่อระยะเวลาการหมักแหนมเพิ่มขึ้น จะมีการเพิ่มขึ้นของการสูญเสียน้ำหนัก และการเพิ่มขึ้นของน้ำที่ถูกปล่อยออกจากแหนม โดยเขาได้กล่าวว่า ปกติส่วนผสมของแหนมดิบจะมีน้ำประมาณร้อยละ 73 ความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์นั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนและคอลลาเจนในกล้ามเนื้อ เนื่องจากมีการสะสมเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ และมีการลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจากการเสียสภาพของโปรตีน ตามรายงานของ Kröckel (1995) กล่าวไว้ว่า ค่า a_w ของไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้งมีค่าในช่วง 0.90-0.95

ส่วนปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่พบในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานตามท้องตลาดในกรุงเทพมหานครและสมุทรปราการที่สุ่มตัวอย่างมาตรวจพบว่า อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ คือไม่เกินมาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2547 ฉบับที่ 28 เรื่องวัตถุเจือปนอาหารที่กำหนดให้มีโซเดียมไนไตรต์ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. 145/2546) ที่กำหนดให้ใช้โซเดียมไนไตรต์หรือโพแทสเซียมไนไตรต์ ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมหรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก ต้องไม่เกิน 2 กรัมต่อเนื้อสัตว์ 1 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนเตรตและไนไตรต์ ที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ถ้าใช้มากเกินไปจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย มีรายงานว่าไนไตรต์มีความเป็นพิษมากกว่าไนเตรตถึง 10 เท่า ปริมาณของไนเตรตและไนไตรต์ที่บริโภคเข้าไปแล้วทำให้เป็นอันตรายถึงชีวิตคือ ไนเตรต 80-800 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และไนไตรต์ 33-250 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม กฎข้อบังคับซึ่งออกโดยสภาและคณะนิติบัญญัติของยุโรป คำสั่ง 95/2/EC เกี่ยวกับการเติมวัตถุเจือปนในอาหารอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนไตรต์ ได้ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (cured meat product) และโซเดียมไนเตรต 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งทำให้มีปริมาณไนไตรต์ตกค้าง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน และมีปริมาณไนไตรต์ตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มชนิดอื่นประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปริมาณไนเตรตตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มจะมีประมาณ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Honikel, 2008)

Sırıken และคณะ (2006) ทำการศึกษาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ตกค้างของตัวอย่างไส้กรอกตุรกี (Soudjouck) โดยสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าและตลาดในเขต Afyon ของประเทศตุรกีมา 100 ตัวอย่าง ซึ่งกฎข้อบังคับเกี่ยวกับอาหารในประเทศตุรกีจำกัดให้เติมโซเดียมไนเตรตและโซเดียมไนไตรต์ไม่เกิน 250 และ 100 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ จากการวิเคราะห์พบว่าไส้กรอกตุรกีร้อยละ 18 ของปริมาณตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์มีโซเดียมไนเตรตตกค้างเกินกำหนด และปริมาณตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 11 ที่มีโซเดียมไนไตรต์ตกค้างเกินกำหนด

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

4.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน และการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสานซึ่งสุ่มตัวอย่างจากตลาดสดและซุปเปอร์มาเก็ตในกรุงเทพมหานครทั้งหมด 32 ตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 4.2 พบว่า ในตัวอย่างเนื้อหมูสด 10 ตัวอย่างมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.7×10^{8} ถึง 2.0×10^{10} CFU ต่อกรัม ตัวอย่างแหนม 16 ตัวอย่าง แบ่งเป็นแหนมที่สุ่มตัวอย่างมาจากตลาดและแหนมที่ทำเอง มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.2×10^{7}-1.8×10^{10} ตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 6 ตัวอย่าง แบ่งเป็นไส้กรอกอีสานที่สุ่มมาจากตลาดและตัวอย่างที่ทำเองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 2.1×10^{8}-2.5×10^{10} และได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 174 ไอโซเลต เป็นเชื้อที่แยกได้จากเนื้อหมูสด 53 ไอโซเลต แหนม 84 ไอโซเลตและไส้กรอกอีสาน 37 ไอโซเลต พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้มีจำนวน 73 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คิดเป็นร้อยละ 41.95 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่แยกได้ แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ/หรือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 มีจำนวน 62 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 84.93 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้งหมด โดยทั้ง 62 ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้ง แยกได้จากตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมจากตลาดและแหนมที่ทำเอง ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescence* DMST 20076, *E. coli* DMST 4212 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 โดยยับยั้งได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์มี 24 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 32.88 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้งหมด โดยทั้ง 24 ไอโซเลตแยกได้จากตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนม ไส้กรอกอีสานที่สุ่มมาจากตลาดและทำเอง แบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ มีทั้งหมด 101 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 58.05 ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดเลือกได้

จากผลการทดลองที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกปนเปื้อนในเนื้อหมูสดปริมาณมากถึง 10^8-10^{10} CFU ต่อกรัม อาจเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์เหล่านี้จะปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการฆ่าสัตว์และการตัดแต่งซาก โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในซากสัตว์อาจมาจากจุลินทรีย์ภายในตัวสัตว์เอง ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับสุขภาพของสัตว์ นอกจากนี้ยังอาจปนเปื้อนมาจากหนังสัตว์ เครื่องในและสิ่งขับถ่ายของสัตว์ แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิด รวมทั้ง *Lactobacillus, Lactococcus* และ *Leuconostoc* มักพบปนเปื้อนบ่อยในเนื้อสัตว์ (Marshall และ Bal′A, 2001) Zweifel และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาซากหมู 750 ซาก จากโรงฆ่าสัตว์ 17 แห่ง โดยวิเคราะห์จุลินทรีย์ในซากหมูส่วนต่างๆ เช่น คอ สามชั้น หลังและขาหลัง พบว่า ในซากหมูพบจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.4-4.2 log CFU ต่อตารางเซนติเมตร ส่วนซากของหมูบริเวณส่วนหลังจะมีจำนวนจุลินทรีย์มีชีวิตทั้งหมดค่อนข้างสูงกว่าซากหมูส่วนอื่นๆจำนวน Enterobacteriaceae ที่ตรวจพบในซากหมูมีปริมาณต่ำเพียงร้อยละ 23.9 ของจำนวนซากทั้งหมดที่วิเคราะห์ ดังนั้นเมื่อนำเนื้อหมูที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงไปทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ได้แก่ แหนม ไส้กรอกอีสาน ทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงตามไปด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติในเนื้อหมูอาจเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก นอกจากนี้ผู้ผลิตอาจเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปเพื่อเร่งการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาทำเป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* (Toldrá และคณะ, 2001) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณมากถึง 10^7-10^{10} CFU ต่อกรัมในแหนม และ 10^8-10^{10} CFU ต่อกรัมในไส้กรอกอีสาน เช่นเดียวกับการทดลองของ Sırıken และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งทำการวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์ของตัวอย่างในไส้กรอกหมักตุรกี (Soudjouck) โดยสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าและตลาดในเขต Afyon ของประเทศตุรกีมา 100 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกตุรกีร้อยละ 40 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 10^8 CFU ต่อกรัม (10^8-10^9CFU ต่อกรัม) นอกจากนี้ Fontán และคณะ (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไส้กรอกหมักที่ทำจากหมูของประเทศสเปน พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียในปริมาณมาก ได้แก่ แบคทีเรียที่ต้องการอากาศและเจริญที่อุณหภูมิปานกลางทั้งหมด 8.65 log CFU ต่อกรัม แบคทีเรียกรดแลคติก 8.87 log CFU ต่อกรัม จุลินทรีย์ที่ทน 6.56 log CFU ต่อกรัม และจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae 2.18 log CFU ต่อกรัม

จากผลการทดลอง แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกส่วนใหญ่ สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ/หรือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 ได้คิดเป็นร้อยละ 84.93 ของจำนวนไอโซเลตที่ให้ผลบวกกับ agar spot test หรือ ไอโซเลตที่ยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้มีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น และมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเพียงส่วนน้อยร้อยละ 32.88 ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยจุลินทรีย์ก่อโรคที่ถูกยับยั้งน้อยที่สุด คือ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 ซึ่งมีไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ เพียง 2 ไอโซเลต การที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบอาจเป็นเพราะสารยับยั้งหลายชนิดที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น Wood (1992) ได้กล่าวไว้ว่า กรดแลคติกเป็นสารเมแทบอไลท์หลักที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นมีผลทำให้พีเอชของสิ่งแวดล้อมลดลงและช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนี้ผลการยับยั้งอาจมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิตสารที่เป็นอนุมูลอิสระทำลายแบคทีเรีย เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH•) ซึ่งสารเหล่านี้จะไปทำลายดีเอ็นเอของแบคทีเรีย นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟจะทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสและการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในเยื่อหุ้มสองชั้น (membrane lipid bilayer) ทำให้การขนส่งสารเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความผิดปกติ (Eklund, 1984) แบคทีเรียที่หมักกรดซิเตรตได้จะสร้างไดอะซิติล ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบโดยทำปฏิกิริยากับอาร์จินีน (Jay, 1982) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยแบคเทอริโอซินจะเกิดปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์และยับยั้งแรงขับเคลื่อนโปรตอน (proton motive force) ทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	จำนวนไอโซเลตที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด	จำนวนไอโซเลตที่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ*	แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ**	
						จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
เนื้อหมูสด	10	$1.7 \times 10^{8} - 2.0 \times 10^{10}$	53	23	22	3	P0203, P0304 P0701
แหนม[a]	9	$2.9 \times 10^{8} - 1.8 \times 10^{10}$	48	21	21	2	N0203, N0702
แหนม[b]	7	$1.2 \times 10^{7} - 6.1 \times 10^{9}$	36	13	11	7	T0201, T0301 T0502, T0504 T0603, T0702 T0703
ไส้กรอกอีสาน[a]	2	3.3×10^{9}	12	2	0	2	S0201, S0202
ไส้กรอกอีสาน[b]	4	$2.1 \times 10^{8} - 2.5 \times 10^{10}$	25	14	8	10	T0801, T0802 T0803, T0804 T0904, T1002 T1003, T1004 T1010, T1101
รวม	32	-	174	73	62	24	-

* *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ/หรือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414

** *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescence* DMST 20076, *E.coli* DMST 4212 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 อย่างน้อย 1 ชนิด

[a] ตัวอย่างที่สุ่มจากตลาด

[b] ตัวอย่างที่ผลิตเองซึ่งมีการเติมโซเดียมไนไตรต์

4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ทั้งหมด 73 ไอโซเลต และทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้มี 4 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 5.48 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้งได้ โดยสังเกตจากสไลด์ที่ทดสอบมีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้ผลการทดลองเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บวก สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสโดยคัดเลือกจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้มาทำการทดสอบ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสได้มี 6 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 8.22 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้งได้ สังเกตได้จากโซนสีแดงที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อในอาหารที่ใช้ทดสอบ แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ และการทดสอบเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสโดยคัดเลือกจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสหรือเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสมาทำการทดสอบ พบว่า ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดเลยที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส เนื่องจากไม่มีการลดลงของปริมาณไนไตรต์ในอาหารเหลว modified nitrite MRS medium และจากการทดสอบมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่สร้างเอนไซม์ทุกชนิดที่ทดสอบ 63 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 86.30 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้ง

การศึกษานี้พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกบางไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสจะพบในแบคทีเรียที่สร้างพลังงานจากการขนส่งอิเล็กตรอนผ่านไซโตโครมในกระบวนการหายใจ ได้แก่ แบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญได้ในสภาวะมีอากาศและแบคทีเรียที่เจริญทั้งในสภาวะมีหรือไม่มีอากาศส่วนใหญ่ โดยปกติจะไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสในแบคทีเรียที่ชอบเจริญในสภาวะมีอากาศอย่างแท้จริง (strict anarerobe) รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่แท้จริงหรือเอนไซม์ซูโดคะตะเลส (pseudocatalase) ได้ (Krökel, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิด เพื่อสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ 1) เอนไซม์คะตะเลสที่มีฮีม (heme) เป็นส่วนประกอบซึ่งจะพบในสภาพที่มีฮีมาตินเท่านั้น และ 2) เอนไซม์ซูโดคะตะเลส หรือ manganese-dependent catalase ซึ่งพบในแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (Toldrá และคณะ, 2001) แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการออกซิไดซ์แลคเตท ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไปเร่งการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีซีด ดังนั้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักควรจะสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลสสามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องในการหมักเนื้อบางสายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum, L. sake, Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* มีกิจกรรมของเอนไซม์ heme-dependent catalase ซึ่งจะทำงานได้ดีในผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื่องจากเนื้อมีสับสเตรทที่มี heamin ปริมาณมาก (Ammor และ Mayo, 2007) เช่นเดียวกับการทดลองของ Wolf และ Hammes (1988) ที่ได้รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ได้แก่ *L. plantarum* และ *L. sake* แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสใน *L. curvatus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้การที่พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกบางไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีความสำคัญในกระบวนการถนอมอาหาร พัฒนาปรับปรุงสีและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม เอนไซม์นี้จะรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ (Toldrá และคณะ, 2001) ทำให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม Lücke (1985) กล่าวว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรตและไนไตรต์ และได้พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ในหลอดทดลอง แต่ไม่พบในสภาวะการหมักเนื้อจริง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสที่พบในแบคทีเรียกรดแลคติกมี 2 แบบ คือ แบบที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ต้องมีฮีมมากระตุ้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียเพียงอย่างเดียว พบใน *L. plantarum, L. pentosus* และ *Pediococcus pentosaceus* และแบบที่ 2 คือ กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต้องมีฮีมมากระตุ้นทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (NO) และไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ซึ่งพบใน *L. plantarum* การมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรต/ไนไตรต์รีดักเทส เกี่ยวข้องโดยตรงกับการมีไนโตรโซไมโอโกลบิน (Ammor และ Mayo, 2007) ดังนั้น ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้จึงเหมาะสมที่จะคัดเลือกมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ตารางที่ 4.3 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้งได้

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง	แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส		แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
เนื้อหมูสด	23	4	P0702, P0803 P0804, P0805	4	P0201, P0604 P0804, P0805	0	-
แหนม[a]	21	0	-	1	N0506	0	-
แหนม[b]	13	0	-	1	T0504	0	-
ไส้กรอกอีสาน[a]	2	0	-	0	-	0	-
ไส้กรอกอีสาน[b]	14	0	-	0	-	0	-
รวม	73	4	-	6	-	0	-

[a] ตัวอย่างที่สุ่มจากตลาด

[b] ตัวอย่างที่ทำเองมีการเติมโซเดียมไนไตรต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

จากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริกระดับพีเอชต่ำสุดคือ 2.5 และ 2.0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกอีก 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากเนื้อหมูสด 4 ใน 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกมาทดสอบ สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 1.5 ยกเว้นไอโซเลต T0201 เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ระดับต่ำกว่าคือร้อยละ 0.5 และการทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตที่ทดสอบสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 11 (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

ไอโซเลต	แหล่งที่มาของไอโซเลต	พีเอช[a]ของกรดแลคติก	พีเอช[a]ของกรดไฮโดรคลอริก	ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี[b] (% w/v)	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์[b] (% w/v)
P 0201	เนื้อหมูสด	4.0	3.0	1.5	11.0
P 0804	เนื้อหมูสด	4.0	3.0	1.5	11.0
P 0805	เนื้อหมูสด	2.5	2.0	1.5	11.0
T 0201	แหนมที่เติมไนไตรต์	2.5	4.0	0.5	11.0
T 0702	แหนมที่เติมไนไตรต์	2.0	1.5	1.5	11.0

[a] ระดับพีเอชต่ำสุดที่สามารถเจริญได้

[b] ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเจริญได้

จากผลการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ เชื้อที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลตที่แยกได้จากเนื้อหมูสดคือ P0201, P0804 และ P0805 เนื่องจากเชื้อมีการอยู่รอดในสภาวะที่ค่าพีเอชต่ำ ทนต่อสภาพเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูง ซึ่งคุณลักษณะนี้เป็นคุณสมบัติของโพรไบโอติก ตามรายงานของ Holzapfel และคณะ (1998) กล่าวว่า คุณสมบัติที่สำคัญของโพรไบโอติกในทางเดินอาหารคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะต้องสามารถอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อสภาพเกลือน้ำดีที่ส่วนต้นของลำไส้เล็ก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Goldin และ Gorbach (1992) ที่กล่าวว่า บทบาทของโพรไบโอติกจะต้องอยู่รอดในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารได้ และเช่นเดียวกับรายงานของ Erkkilä และ Petäjä (2000) กล่าวว่าการอยู่รอดของแบคทีเรียในน้ำย่อยของกระเพาะอาหารจะอาศัยความสามารถในการทนพีเอชต่ำ ค่าพีเอชของกรดไฮโดรคลอริกที่กระเพาะขับออกมามีค่า 0.9 แต่ค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 เมื่อมีอาหารในกระเพาะอาหาร มีรายงานว่าโพรไบโอติกเป็นสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกหรือ bifidobacteria ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เมื่อเข้าไปสู่ร่างกายทางปากในปริมาณที่พอเพียง การที่ลำไส้ถูกครอบครองโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกจะป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายโดยการป้องกันจะต่อสู้และผลิตสารอินทรีย์และสารประกอบที่ยับยั้งจุลินทรีย์ (Fuller, 1989) แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น สายพันธุ์ Micrococcaceae เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักเนื้อ ยิ่งไปกว่านั้นยังช่วยปรับปรุงความปลอดภัยและความคงตัวของผลิตภัณฑ์ช่วยยืดอายุและคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยคุณสมบัติเหล่านี้เป็นลักษณะของโพรไบโอติก (Lücke, 2000) เมื่อไม่นานมานี้ความคิดใหม่ที่จะพัฒนาโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารอื่น เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Hugas และ Monfort, 1997) ที่จริงแล้วอุตสาหกรรมเนื้อเริ่มที่จะหากล้าเชื้อตัวใหม่เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ (Erkkilä และคณะ, 2001a) มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านเสนอให้ใช้โพรไบโอติกเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง (Hugas และ Monfort, 1997)

เกลือน้ำดีสร้างจากคอเลสเทอรอลในตับถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดีและปล่อยเข้าไปในลำไส้เล็กหลังจากการกินอาหารเข้าไปและจะทำการย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน อย่างไรก็ตาม มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถสลายเกลือน้ำดีกับเอนไซม์ไบซอล์ทไฮโดรเลส (BSH) (Hofmann และ Mysels, 1992) ในกระเพาะอาหารของมนุษย์ เชื่อกันว่ามีความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 0.3 โดยปริมาตร และจุดสำคัญที่จะพิจารณาจะคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่จะต้องมีการทนต่อเกลือน้ำดีในระดับที่สูงพอ (Gilliland และคณะ, 1984) นอกจากนี้เชื้อที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อยังต้องมีคุณสมบัติที่ทนต่อสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและมีหน้าที่หลัก คือ เป็นสารถนอมอาหาร ช่วยลดปริมาณน้ำอิสระและช่วยพัฒนาเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของอาหาร (Kröckel, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

4.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการทดลองจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน โดยคัดเลือกจากไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้และสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และ/หรือสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสได้ คัดเลือกมาทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ P0201, P0804, P0805, T0201 และ T0702 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม และจากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (MRS) พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลต มีรูปร่างกลมนูน สีขาวมันเงาและลักษณะโคโลนีโค้งนูนจากผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีมีลักษณะเกลี้ยงไม่มีรอยเว้า ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนม และไส้กรอกอีสาน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ผลการตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลคติก				
	P0201	P0804	P0805	T0201	T0702
การย้อมแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่างเซลล์	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง					
- รูปร่าง	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน
- ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.)	1	2	2	3	2
- สีโคโลนี	ขาวมันเงา	ขาวมันเงา	ขาวมันเงา	ขาวมันเงา	ขาวมันเงา
- ผิวโคโลนี	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ

4.2.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ P0201, P0804, P0805, T0201 และ T0702 โดยทำการทดสอบในระดับจีนัส 4 การทดสอบ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสเนื่องจากไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นหรือไม่มีการแยกชั้นของอาหารที่ทดสอบ และจากการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลต P0804, P0805, T0201 และ T0702 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิทั้งสองระดับ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต P0201 เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในสภาพมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ไอโซเลต P0804, P0805, T0201 และ T0702 สามารถเจริญได้ที่สภาพมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 โดยสังเกตจากอาหารที่ใช้ทดสอบมีลักษณะขุ่น ส่วนไอโซเลต P0201 ไม่เจริญในสภาพโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 แต่การทดสอบการเจริญในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18 พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ที่สภาพนี้เนื่องจากอาหารที่ใช้ทดสอบไม่มีลักษณะขุ่นหรือไม่มีการเจริญ สำหรับการทดสอบการเจริญที่ พีเอช 4.4 และ 9.6 พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.4 และการเจริญที่พีเอช 9.6 พบว่าไอโซเลต P0201 ไม่เจริญที่พีเอช 9.6 แต่อีก 4 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอชระดับนี้

ตารางที่ 4.6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

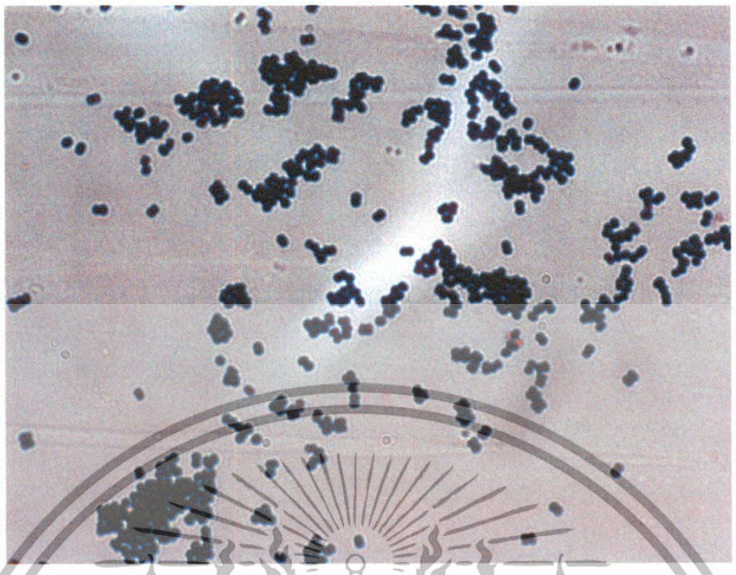
คุณสมบัติทางชีวเคมี	ผลการตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลคติก				
	P0201	P0804	P0805	T0201	T0702
การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-	+	+	+	+
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5	-	+	+	+	+
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18	-	-	-	-	-
การเจริญที่ค่าพีเอช 4.4	+	+	+	+	+
การเจริญที่ค่าพีเอช 9.6	-	+	+	+	+

- ไม่เกิดความขุ่น หรือไม่มีการเจริญ

+ เกิดความขุ่น หรือมีการเจริญ

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในระดับจีนัส แล้วทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก ตาม Axelsson (2004) พบว่า ไอโซเลต P0201 น่าจะเป็นจีนัส *Lactococcus* หรือ *Pediococcus* และอีก 4 ไอโซเลต ได้แก่ P0804, P0805, T0201 และ T0702 น่าจะเป็นจีนัส *Enterococcus* หรือ *Pediococcus*

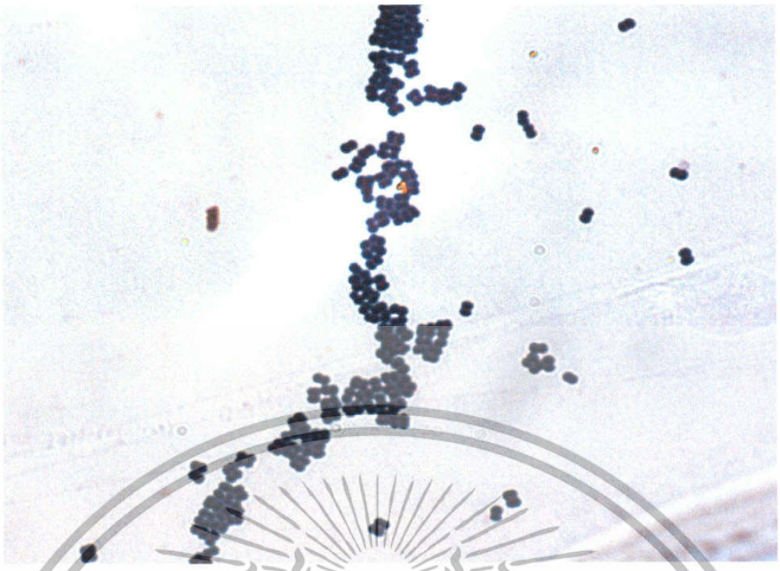
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201

รูปที่ 4.2 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0804

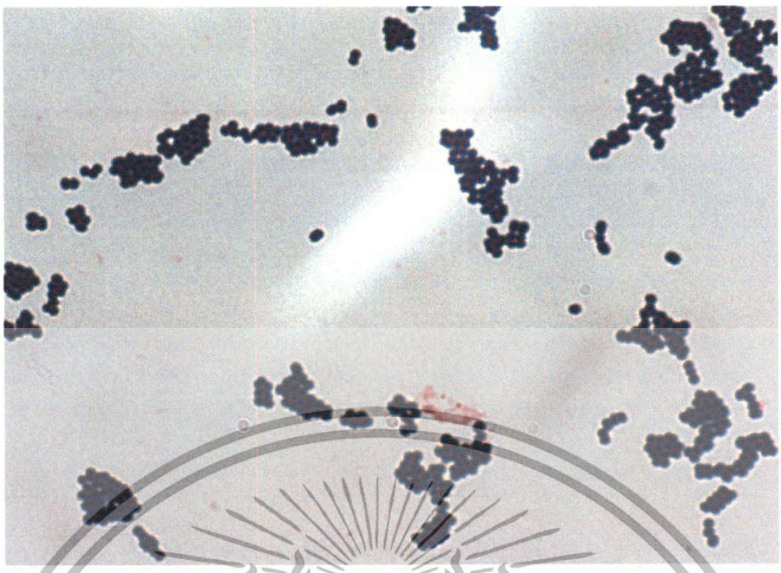
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805

รูปที่ 4.4 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต T0201

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



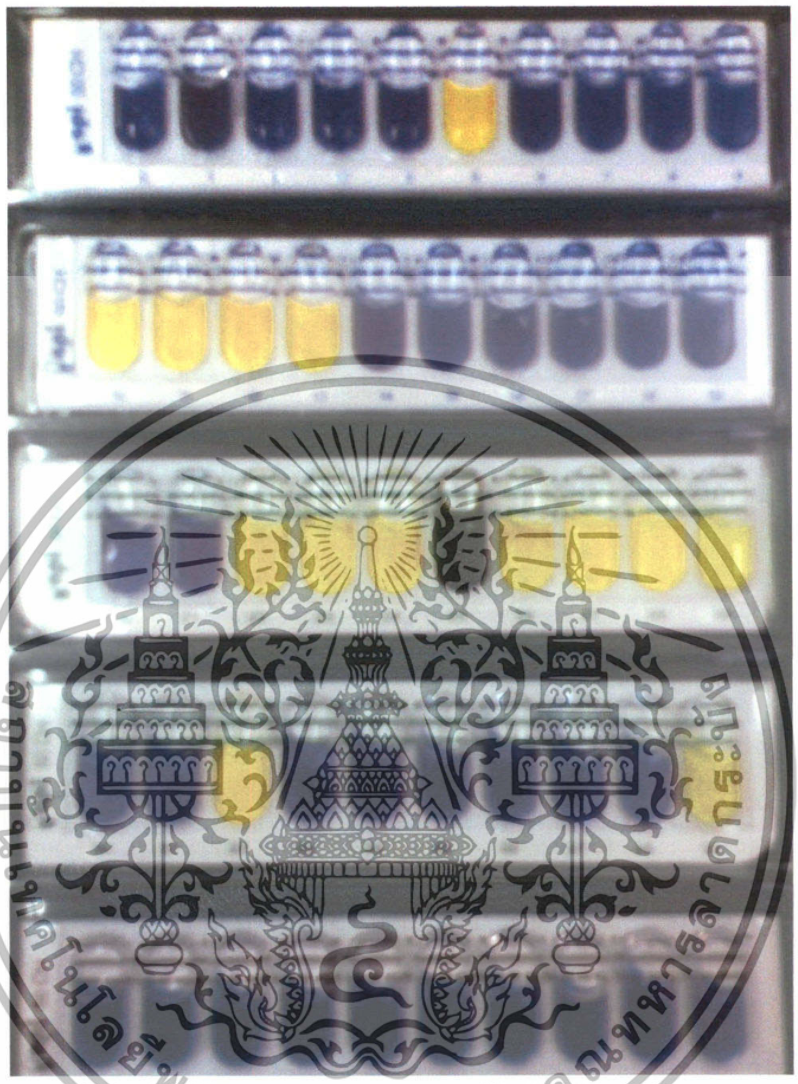
รูปที่ 4.5 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต T0702

4.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์

จากการทดลองการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน โดยทำการคัดเลือกจากแบคทีเรียกรดแลคติก 5 ไอโซเลตที่ทดสอบในระดับจีนัสมา 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต P0201 และนำมาทดสอบโดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) และจากผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 มีผลการทดสอบคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 2 ร้อยละ 58.4

ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์ด้วยชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน สอดคล้องกับรายงานของ Noonpakdee และคณะ (2003) ที่ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* WNC 20 ได้จากแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 ในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 ในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH)

สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	ผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	ผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง
Control	-	ESC	+
GLY	-	SAL	+
ERY	-	CEL	+
DARD	-	MAL	+
LARA	-	LAC	+
BIB	+	MEL	-
DXYL	-	SAC	-
LXYL	-	TRE	+
ADO	-	INU	-
MDX	-	MLZ	-
GAL	+	RAF	-
GLU	+	AMD	-
FRU	+	GLYG	-
MNE	+	XLT	-
SBE	-	GEN	+
RHA	-	TUR	-
DUL	-	LYX	-
INO	-	TAG	-
MAN	-	DFUC	-
SOR	-	LFUC	-
MDM	-	DARL	-
MDG	-	LARL	-
NAG	+	GTNT	-
AMY	+	2KG	-
ARB	+	5KG	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เนื้อหมูสดที่วิเคราะห์มีค่าพีเอชเฉลี่ยประมาณ 5.94 ซึ่งสูงกว่าพีเอชของแหนมและไส้กรอกอีสาน ซึ่งมีค่าพีเอชเฉลี่ยประมาณ 5.19 และค่า a_w ของเนื้อหมูสดเฉลี่ย 0.979 ซึ่งสูงกว่าค่า a_w ของแหนมและไส้กรอกอีสาน ซึ่งมีค่า a_w เฉลี่ย 0.958 และไส้กรอกอีสานที่สุ่มมาจากตลาด มีปริมาณไนไตรต์ตกค้างอยู่ในช่วง 0-6.22 ซึ่งมีค่าไม่เกินกำหนด (125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ส่วนตัวอย่างแหนมและไส้กรอกอีสานที่ทำเอง พบว่า มีปริมาณไนไตรต์ตกค้างเกินมาตรฐานเพียง 1 ตัวอย่าง (131.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน มีจำนวนค่อนข้างสูงคือ อยู่ในช่วง ตั้งแต่ 10^7-10^{10} CFU ต่อกรัม และได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากเนื้อหมูทั้งหมด 174 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar spot test พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำแยกมาทดสอบสามารถยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 ได้อย่างน้อย 1 ชนิดมีจำนวนทั้งหมด 62 ไอโซเลต และไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 20076, *E. coli* DMST 4212 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 ได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 24 ไอโซเลต ซึ่งจากการทดสอบจะเห็นว่าแบคทีเรียกรดก่อโรคที่ใช้ทดสอบมีความต้านทานต่อสารยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบ การสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของการคัดเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 73 ไอโซเลต ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 1 ชนิด พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนเตรตรีดักเทสได้มีจำนวน 4 และ 6 ไอโซเลต ตามลำดับ แต่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่สร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส และมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 63 ไอโซเลต ที่ไม่สร้างเอนไซม์ทุกชนิดที่ทดสอบ

จากการทดสอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้โดยการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากคุณสมบัติของการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นและการสร้างเอนไซม์คะตะเลสหรือเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต P0201, P0804 และ P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสด ไอโซเลต T0201 และ T0702 แยกได้จากแหนมที่ผู้ทดสอบผลิตเอง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201, P0804, P0805 และ T0702 สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงสุดคือ ร้อยละ 1.5 ส่วนไอโซเลต T0201 สามารถทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริกได้มากกว่าไอโซเลตอื่น และทุกไอโซเลตทนเกลือได้สูงสุดร้อยละ11 นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม โคโลนีมีลักษณะโค้งนูน สีขาวมันเงาและไม่สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ ซึ่งจะต้องเป็นพวกโฮโมเฟอเมนเททีฟ และจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า ไอโซเลต P0201 น่าจะเป็น *Lactococcus* หรือ *Pediococcus* ส่วน P0804, P0805, T0201 และ T0702 น่าจะเป็น *Enterococcus* หรือ *Pediococcus*

จากการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0201 มาทำการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) พบว่า ให้ผลคล้ายคลึงกับ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ร้อยละ 58.4

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นการศึกษาในขั้นต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อนำมาทำเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก อาจทำการศึกษาต่อโดยการศึกษาเรื่องการพัฒนาสีและกลิ่นรสที่ดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นกล้าเชื้อ โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ย่อยไขมัน นอกจากนี้อาจทำการศึกษาโดยการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นและคัดเลือกกล้าเชื้อที่เหมาะสมมาทำกล้าเชื้อผสมหรือทดลองเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะด้านประสาทสัมผัสกับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เยาวลักษณ์ สุพันธพิศิษฐ์. 2536. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 127 หน้า.

Ammor, M. S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science, 76*, 138-146.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria : classification and physiology. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. Ouweland, *Advance in Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.

Bendall, J. R., & Swatland, H. J. (1988). A review of the relationships of pH with physical aspect of pork quality. *Meat Science, 24*, 85-99.

Buckenhüskes, H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiological Reviews, 87*, 253-272.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology, 50*, 131–149.

Daeschel, M. A., & Klaenhammer, T. R. (1985). Association of a 13·6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology, 50* (6), 1538-1541.

Earnshaw, R. G. (1992). The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In B. J. B. Wood, *Advances in the lactic acid bacteria in health & disease* (pp. 211-225). England: Elsevier Science.

Eklund, T. (1984) The effect of carbon dioxide on bacterial growth and an uptake process in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology, 1*, 179-185.

Erkkilä, S., & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science, 55*, 297-300.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M.-L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science, 58*, 111-116.

FDA (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *USA Food and Drug Administration Federal Regulation, 53*, 11247.

Fontán. M. C. G., Lorenzo, J. M., Martínez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 40*, 1610-1622.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology, 66*, 365-378

Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M. T., Arnau, J., & Monfort, J. M. (1996). Technological and sensory evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology, 32*, 173-183.

Gilliland, S. E. (1985). *Bacterial Starter Cultures for Foods.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Gilliland, S. E., Staley, T.E., & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science, 67*, 3045-3051.

Goldin, B., & Gorbach, S. (1992). Probiotics for humans. In R. Fuller, *Probiotic the scientific basis* (pp. 355-376). London: Chapman and Hall.

Greaser, M. L. (2001). Postmortem muscle chemistry. In Y. H. Hui, W. K. Nip, R. W. Rogers, & O. A. Young, *Advances in meat science and applications* (pp. 21-37). New York: Marcel Dekker.

Hammes, W. P., Bantleon, A., & Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiological Reviews, 87*, 165-173.

Havenaar, R., & Veld, J. H. J. (1982). Probiotics: a general view. In B. J. B. Wood, *Advances in the lactic acid bacteria: the lactic acid bacteria in health & disease* (Vol.1)(pp.151-170) London: Elsevier Applied Science.

Hofmann, A., & Mysels, K. (1992). Bile salt solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca^{2+} ions. *Journal of Lipid Research, 33*(102), 617-626.

Holzapfel, W. H. (1998). The gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In A. Davies, & R. Board, *Advances in Microbiology of Meat and Poultry* (pp.35-84). New York: Blackie Academic & Professional.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Holzapfel, W. H., Schillinger, V., Geisen, R., & Lücke, F.-k. (2003). Starter and protective cultures. In N. J. Russell & G. W. Gould, *Advances in food presrvatives* (pp. 291-318) New York: Kluwer Academic/Plenum publishers.

Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science, 78*, 68-76.

Hugus, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry, 59*(4), 547-554.

Hugus, M., Garriga, M., Aymerich, T., & Monfort, J. M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology, 18*, 107-113.

Jay, J. M. (1982) Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology, 44*, 525-532.

Jay, J. M., (1992). *Modern Food Microbiology*. New York: AVI Book.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. M. (2005). *Modern Food Microbiology*. New York: Springer Science+Business Media, Inc.

Jones, R. J., Hussein, H. M., Zagorec, M., Brightwell, G., & Tagg, J. R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food microbiology, 25*, 228-234.

Kirk, R. S., & Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods*. Essex, England: Longman Scientific & Technical.

Kröckel, L. (1995). Bacteria fermentation of meats. In G. Campbell-Platt, & P.E. Cook, *Advances in fermented meats* (pp. 69-101). Great Britain: Blackie Academic and Professional.

Leistner, L. (1995). Stable and safe fermented sausages world-wide. In G. Campbell-Platt & P. E. Cook, *Advances in fermented meats* (pp. 160-175). Great Britain: Academic and Professional.

Lücke, F. K. (1985). Fermented sausages. In B. J. B. Wood, *Advances in Microbiology of Fermented Foods* (Vol. 2)(pp. 41). London, UK: Elsevier Applied Science.

Lücke, F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science, 56*, 105-115.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Martin, M. (2001). Meat curing Technology. In Y. H. Hui, W. K. Nip, R. W. Roger, & O. A. Young, *Advances in meat science and applications* (pp. 493-497). New York: Marcel Dekker.

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

Mogensen, G. (1993). Starter cultures. In J. Smith, *Advances in technology of reduced-additive foods* (pp. 1-25). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumrianngrit, P., Sonomoto, K., & Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology, 81*, 137-145.

Ouwehand, A., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. Ouweland, *Advance in Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (pp.375-395). New York: Marcel Dekker.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidov, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science, 65*, 859-867.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology, 84*,197-215.

Sayre, R. N., & Briskey, E. J. (1963). Protein solubility as influenced by physiological conditions in the muscle. *Journal of Food Science, 28*, 675-679.

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

Schillinger, U., & Lücke, F. K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology, 70*, 473-478.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sıriken, B., Özdemir, M., Yavuz, H., & Pamuk, S. (2006). The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in turkish sausage (soudjouck) produced in Afyon Province, Tuekey. *Food Control, 17*, 923-928.

Smith, L. J., & Palumbo, A. S. (1983). Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection, 46*(11), 997-1006.

Toldrá, F., Sanz, Y., & Flores, M. (2001). Meat fermentation technology. In Y. H. Hui, W. K. Nip, R. W. Rogers, O. A. Young, *Advances in meat science and applications* (pp. 537-561). New York: Marcel Dekker.

Varnam, A. H., & Sutherland, J. P. (1995). *Meat and meat products : technology, chemistry and microbiolgy.* London: Chapmen & Hall.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Panya, A., Kittikan, C., & Assavanig, A. (2005). Influence of minced pork and rind ratios on physic – chemical and sensory quality of Nham – a Thai ferment pork sausage. *Journal of Meat Science, 69*, 359.

Walsh, P. M., & Hoover, D.G. (1984). Bacterial starter cultures In D. Knorr, *Advances in Food Biotechnology* (pp.537-540). New York: Marcel Dekker.

Wolf, G., & Hammes, W. P. (1988). Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archives of Microbiology, 149*, 220-224.

Wood, B.J.B. (1992). The lactic acid bacteria in health and disease. Cambridge: Elsevier Science.

Zweifel, C., Fischer, R., & Stephan, R. (2008). Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs. *Meat Science, 78*, 225-231.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทำเจือจาง

1.1 modified nitrite MRS medium

ส่วนประกอบ

Glucose	1	กรัม
Sodium Nitrite ($NaNO_2$)	2	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	0.05	กรัม
Sodium Molybdate (Na_2MoO_4)	24.2	มิลลิกรัม
Sodium Acetate	5	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Furrus Chloride ($FeCl_3$)	5.4	มิลลิกรัม
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Gibson's Semi solid Tomato Juice Medium

ส่วนประกอบ

Yeast extract	2.5	กรัม
D-glucose	50	กรัม
Reconstitued skim milk	800	มิลลิลิตร
Nutrient agar	200	มิลลิลิตร

Tomato juice pH 6.5 100 มิลลิลิตร หรือ $MnSO_4$ Solution 0.4 %

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทำการฆ่าเชื้อทั้งหมด 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 de Man Rogosa and sharpe medium (MRS agar)

ส่วนประกอบ

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Dipotassium Hydrogen Orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
Sodium Acetate	5	กรัม
Triammonium Citrate	2	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	200	มิลลิกรัม
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	50	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและปรับพีเอชเป็น 6.2-6.6 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Bacteriocin Screening Medium (BSM) (Tichaczele และคณะ, 1992)

ส่วนประกอบ (ต่อน้ำ 1 ลิตร)

Glucose	2	กรัม
Beef extract	2	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Diammonium Hydrogen Citrate $(NH_3)_2C_6H_6O_7$	2	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	0.05	กรัม
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	8.7	กรัม
Potassium dihydrogen orthrophosphate (KH_2PO_4)	8	กรัม
Agar	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและปรับพีเอชเป็น 6.8-7.0 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from casein)	15	กรัม
เปปโตนจากถั่วเหลือง (Peptone from soymeal)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 สารละลายทำเจือจาง

การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 โมลาร์

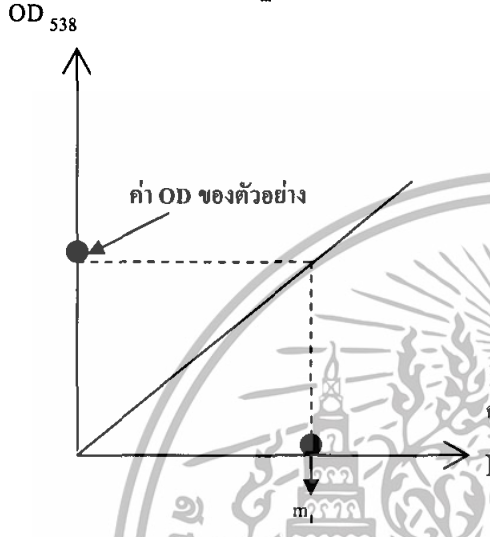
ละลาย HCl ความเข้มข้นร้อยละ 37 ปริมาตร 414.49 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. คำนวณปริมาณไนไตรต์

การสร้างกราฟมาตรฐาน



$$\text{mg/kg ของ } NaNO_2 = \frac{200\ m_1}{m_0 V}$$

m_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

m_0 = น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งมา

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่กรองได้

2. คำนวณจำนวนจุลินทรีย์

$$\text{CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร} = \frac{C}{V \times (n_1 + (0.1 \times n_2)) \times d}$$

เมื่อ C = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจาน

V = ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปในแต่ละจาน

n_1 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางต่ำ*

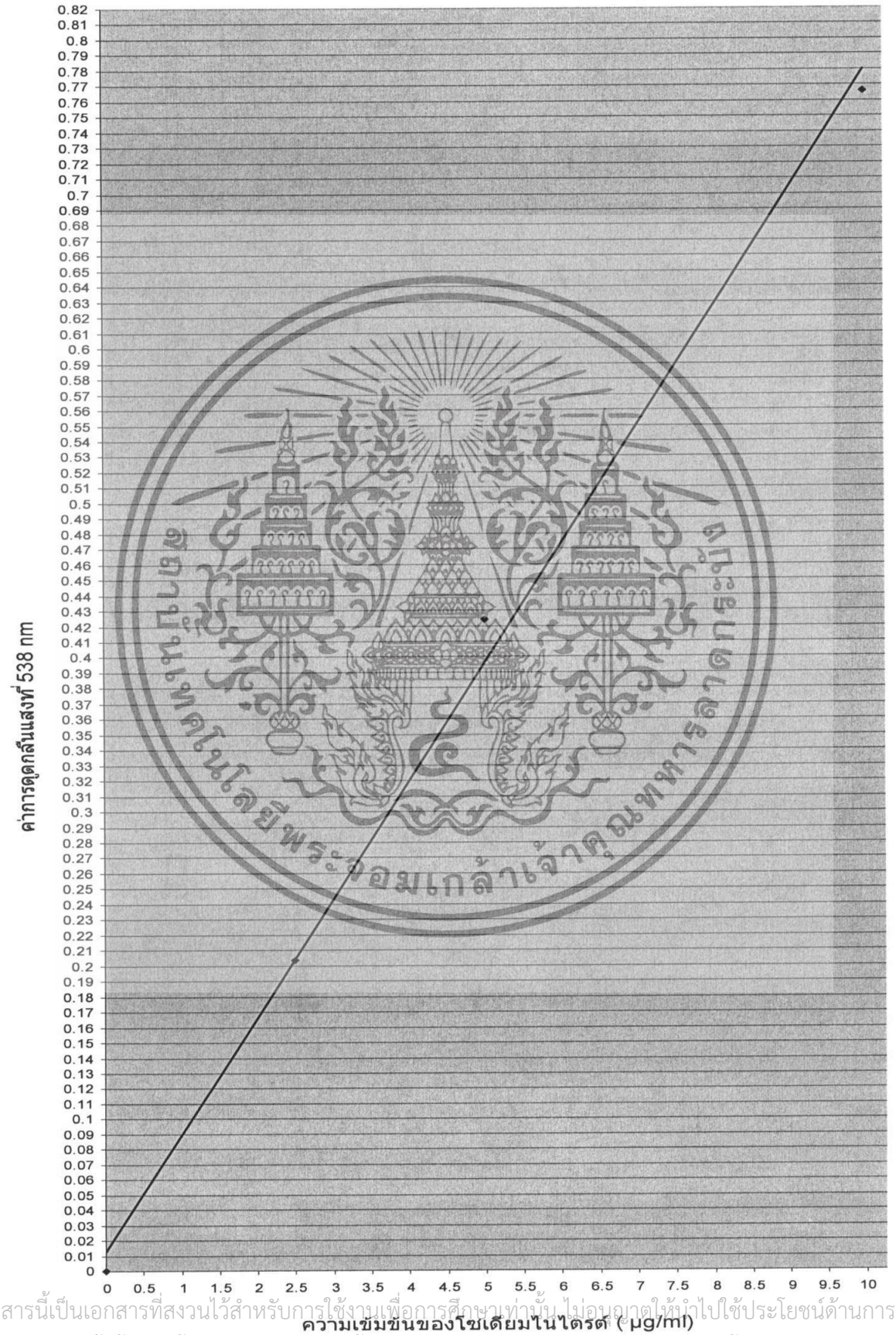
n_2 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางสูง

d = ระดับความเจือจางต่ำที่นับโคโลนีได้

*ระดับความเจือจางต่ำ หมายถึง ตัวอย่างที่เจือจางน้อยที่สุดที่นับโคโลนีได้ เช่น ถ้านับโคโลนีได้ที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ดังนั้นตัวอย่างที่เจือจางน้อยกว่าก็คือที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตาราง ค.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ค่า a_w และค่า pH ของเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

รหัสตัวอย่าง	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	ค่า a_w (30° C)	ค่า pH	อุณหภูมิของตัวอย่าง ขณะวัด pH (°C)
N01	แหนม	Lotus ลาดกระบัง	1.8×10^{10}	0.957	4.69	12.3
N02	แหนม	Lotus ลาดกระบัง	3.2×10^{8}	0.953	4.55	9.1
N03	แหนม	Lotus ลาดกระบัง	2.6×10^{9}	0.933	4.37	15.6
N04	แหนม	Lotus ลาดกระบัง	1.8×10^{10}	0.958	4.45	11.7
N05	แหนม	Lotus ลาดกระบัง	2.7×10^{9}	0.977	4.43	9.1
N06	แหนม	7-11 ซอยจินดา	3.0×10^{9}	0.950	5.06	10.4
N07	แหนม	7-11 ซอยจินดา	3.5×10^{9}	0.959	4.38	9.7
N08	แหนม	7-11 ซอยจินดา	2.2×10^{9}	0.935	4.81	-
N09	แหนม	7-11 ซอยจินดา	2.9×10^{8}	0.955	4.97	19.0
S01	ไส้กรอกอีสาน	กลางซอยจินดา	TNTC	0.974	4.66	1.5
S02	ไส้กรอกอีสาน	ปากซอยจินดา	3.3×10^{7}	0.951	4.79	2.7
P01	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	3.3×10^{9}	0.978	6.10	25.9
P02	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	1.6×10^{10}	0.986	5.61	25.8
P03	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	2.2×10^{9}	0.984	6.11	22.3
P04	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	1.7×10^{8}	0.974	5.54	24.4
P05	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	2.0×10^{10}	0.980	6.00	23.8
P06	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	2.0×10^{10}	0.972	5.86	22.7
P07	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	1.8×10^{10}	0.974	6.18	20.5
P08	เนื้อหมูสด	ตลาดคลองเตย	1.6×10^{10}	0.989	5.89	24.4
P09	เนื้อหมูสด	ตลาดวัดราชสิงขร	1.8×10^{8}	0.977	5.91	24.3
P10	เนื้อหมูสด	ตลาดวัดราชสิงขร	1.8×10^{9}	0.979	6.21	23.0
T01	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	9.5×10^{7}	0.979	5.18	24.2
T02	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	4.2×10^{7}	0.975	5.89	24.3
T03	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	1.3×10^{7} ESPC	0.954	5.67	23.5
T04	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	1.2×10^{7} ESPC	0.975	5.71	24.4
T05	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	6.1×10^{9}	0.959	5.68	23.2
T06	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	5.4×10^{7}	0.933	5.55	23.8
T07	แหนมเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	TNTC	0.971	5.69	24.5
T08	ไส้กรอกอีสานเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	2.1×10^{8}	0.934	5.92	24.4
T09	ไส้กรอกอีสานเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	2.4×10^{8}	0.934	5.86	22.5
T10	ไส้กรอกอีสานเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	3.2×10^{9}	0.976	5.91	23.7
T11	ไส้กรอกอีสานเติม $NaNO_2$	ผลิตเอง	2.5×10^{10}	0.973	6.01	21.5

TNTC มากกว่า 250 โคโลนี

ESPC จำนวนจุลินทรีย์โดยประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.2 ปริมาณไนไตรต์ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างเนื้อหมูสด แหนมและไส้กรอกอีสาน

ตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่างที่ชั่ง (g)	ปริมาณส่วนใสที่กรองได้ (มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของ $NaNO_2$ เทียบกับกราฟมาตรฐาน (µg/ml)	ปริมาณ $NaNO_2$ที่ตกค้างในตัวอย่าง (mg/kg)
	m_0	V		m_1	$\frac{200m_1}{m_0V}$
N01	10.001	0.8	0.018	0.120	2.9997
N02	10.000	0.8	0.015	0.050	1.2500
N03	10.001	0.8	0.014	0.040	0.9999
N04	10.001	0.8	0.012	0	-
N05	10.002	0.8	0.017	0.110	2.7497
N06	10.002	0.8	0.018	0.120	2.9994
N07	10.000	0.8	0.012	0	-
N08	10.001	0.8	0.019	0.130	3.2497
N09	10.002	0.8	-0.17	0	-
S01	10.000	0.8	0.013	0.030	0.7500
S02	10.001	0.9	-0.022	0	-
P01	10.002	0.9	0.011	0	-
P02	10.002	0.9	-0.011	0	-
P03	10.000	0.9	0.025	0.220	4.8889
P04	10.000	0.9	0.011	0	-
P05	10.005	0.9	0.031	0.280	6.2191
P06	10.001	0.9	0.011	0	-
P07	10.002	0.9	0.013	0.030	0.6666
P08	10.002	0.9	0.011	0	-
P09	10.001	0.9	0.031	0.280	6.2216
P10	10.002	0.9	0.013	0.030	0.6665
T01	10.001	0.9	0.035	0.310	6.8882
T02	10.000	0.9	0.049	0.490	10.8889
T03	10.002	0.9	0.042	0.420	9.3315
T04	10.001	0.9	0.148	1.780	39.5516
T05	10.001	0.9	0.191	2.250	49.9950
T06	10.000	0.9	0.238	2.870	63.7778
T07	10.001	0.9	0.311	3.875	86.1025
T08	10.001	0.9	0.029	0.250	5.5550
T09	10.004	0.9	0.075	0.750	16.6600
T10	10.002	0.9	0.188	2.200	48.8791
T11	10.000	0.9	0.465	5.920	131.5556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
N0101	+	+	-	-	-	-	-	-
N0104	+	+	-	-	-	-	-	-
N0105	+	+	-	-	-	-	-	-
N0106	+	-	-	-	-	-	-	-
N0201	-	+	-	-	-	-	-	-
N0202	+	+	-	-	-	-	-	-
N0203	-	+	+	-	-	-	-	-
N0204	+	+	-	-	-	-	-	-
N0205	-	+	-	-	-	-	-	-
N0206	-	-	-	-	-	-	-	-
N0302	-	-	-	-	-	-	-	-
N0304	-	-	-	-	-	-	-	-
N0305	-	-	-	-	-	-	-	-
N0306	-	-	-	-	-	-	-	-
N0402	-	-	-	-	-	-	-	-
N0403	-	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
N0501	+	-	-	-	-	-	-	-
N0502	+	-	-	-	-	-	-	-
N0503	-	+	-	-	-	-	-	-
N0504	-	+	-	-	-	-	-	-
N0506	-	+	-	-	-	-	-	-
N0601	-	-	-	-	-	-	-	-
N0602	-	-	-	-	-	-	-	-
N0603	-	+	-	-	-	-	-	-
N0702	+	+	-	-	-	-	-	+
N0703	+	+	-	-	-	-	-	-
N0705	+	+	-	-	-	-	-	-
N0706	+	+	-	-	-	-	-	-
N0802	-	-	-	-	-	-	-	-
N0803	+	+	-	-	-	-	-	-
N0805	-	-	-	-	-	-	-	-
N0806	-	+	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
N0903	-	-	-	-	-	-	-	-
N0905	-	-	-	-	-	-	-	-
N0906	-	-	-	-	-	-	-	-
S0102	-	-	-	-	-	-	-	-
S0201	-	-	-	-	+	-	+	-
S0202	-	-	-	-	-	-	+	-
S0203	-	-	-	-	-	-	-	-
S0204	-	-	-	-	-	-	-	-
S0205	-	-	-	-	-	-	-	-
P0101	-	-	-	-	-	-	-	-
P0102	-	-	-	-	-	-	-	-
P0103	-	-	-	-	-	-	-	-
P0201	+	+	-	-	-	-	-	-
P0202	+	+	-	-	-	-	-	-
P0203	+	+	-	-	+	-	-	-
P0204	+	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
P0301	-	-	-	-	-	-	-	-
P0302	-	-	-	-	-	-	-	-
P0303	-	-	-	-	-	-	-	-
P0304	-	-	-	-	+	-	-	-
P0305	-	-	-	-	-	-	-	-
P0306	-	-	-	-	-	-	-	-
P0401	-	-	-	-	-	-	-	-
P0402	-	-	-	-	-	-	-	-
P0403	-	+	-	-	-	-	-	-
P0404	-	-	-	-	-	-	-	-
P0406	-	-	-	-	-	-	-	-
P0407	-	-	-	-	-	-	-	-
P0501	-	+	-	-	-	-	-	-
P0502	-	+	-	-	-	-	-	-
P0503	-	+	-	-	-	-	-	-
P0504	-	+	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
P0505	-	+	-	-	-	-	-	-
P0601	-	-	-	-	-	-	-	-
P0603	+	+	-	-	-	-	-	-
P0604	+	+	-	-	-	-	-	-
P0701	+	+	-	+	-	-	-	-
P0702	+	+	-	-	-	-	-	-
P0703	+	+	-	-	-	-	-	-
P0705	-	-	-	-	-	-	-	-
P0801	+	+	-	-	-	-	-	-
P0803	+	+	-	-	-	-	-	-
P0804	+	+	-	-	-	-	-	-
P0805	+	+	-	-	-	-	-	-
P0901	-	-	-	-	-	-	-	-
P0902	-	-	-	-	-	-	-	-
P0904	-	-	-	-	-	-	-	-
P0905	-	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
P1002	+	-	-	-	-	-	-	-
P1003	+	-	-	-	-	-	-	-
P1004	+	-	-	-	-	-	-	-
P1005	-	-	-	-	-	-	-	-
T0101	-	+	-	-	-	-	-	-
T0103	+	-	-	-	-	-	-	-
T0201	-	-	+	-	+	+	-	-
T0202	-	-	-	-	-	-	-	-
T0203	-	-	-	-	-	-	-	-
T0205	-	-	-	-	-	-	-	-
T0206	-	-	-	-	-	-	-	-
T0207	-	-	-	-	-	-	-	-
T0301	-	-	-	+	-	+	-	-
T0302	-	-	-	-	-	-	-	-
T0303	-	-	-	-	-	-	-	-
T0305	+	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
T0401	-	-	-	-	-	-	-	-
T0402	+	-	-	-	-	-	-	-
T0502	+	-	-	-	-	+	-	-
T0504	+	-	-	-	-	+	-	-
T0505	+	-	-	-	-	-	-	-
T0603	+	-	-	-	-	+	+	+
T0702	+	-	-	-	+	-	+	-
T0703	+	-	-	-	+	-	-	-
T0704	+	-	-	-	-	-	-	-
T0801	+	-	-	-	-	-	+	-
T0802	-	-	-	-	+	-	-	-
T0803	-	-	-	-	+	-	-	-
T0804	-	-	-	+	-	+	-	-
T0805	-	-	-	-	-	-	-	-
T0902	-	-	-	-	-	-	-	-
T0903	-	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตาราง ค.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
	Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
T0904	-	-	-	-	-	+	-	-
T0905	+	-	-	-	-	-	-	-
T0906	-	-	-	-	-	-	-	-
T1001	+	-	-	-	-	-	-	-
T1002	+	-	-	-	-	-	+	-
T1003	+	-	-	-	-	-	+	-
T1004	+	-	-	-	-	-	+	-
T1005	+	-	-	-	-	-	-	-
T1006	-	-	-	-	-	-	-	-
T1007	-	-	-	-	-	-	-	-
T1008	-	-	-	-	-	-	-	-
T1009	-	-	-	-	-	-	-	-
T1010	-	-	-	-	-	+	-	-
T1101	-	-	-	+	-	-	-	-
T1102	+	-	-	-	-	-	-	-
T1103	-	-	-	-	-	-	-	-

+ สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

- ไม่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ธนบุรี เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตาราง ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส (Nitrite reductase)
N0101	-	-	NT
N0104	-	-	NT
N0105	-	-	NT
N0106	-	-	NT
N0201	-	-	NT
N0202	-	-	NT
N0203	-	-	NT
N0204	-	-	NT
N0205	-	-	NT
N0206	-	-	NT
N0302	-	-	NT
N0304	-	-	NT
N0305	-	-	NT
N0306	-	-	NT
N0402	-	-	NT
N0403	-	-	NT
N0501	-	-	NT
N0502	-	-	NT
N0503	-	-	NT
N0504	-	-	NT
N0506	-	+	-
N0601	-	-	NT
N0602	-	-	NT
N0603	-	-	NT
N0702	-	-	NT
N0703	-	-	NT
N0705	-	-	NT
N0706	-	-	NT
N0802	-	-	NT
N0803	-	-	NT
N0805	-	+	-

+ เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส (Nitrite reductase)
N0806	-	-	NT
N0903	-	-	NT
N0905	-	-	NT
N0906	-	-	NT
S0101	-	-	NT
S0201	-	-	NT
S0202	-	-	NT
S0203	-	-	NT
S0204	-	-	NT
S0205	-	-	NT
P0101	+	+	-
P0102	-	-	NT
P0103	-	-	NT
P0201	-	+	-
P0202	-	-	NT
P0203	-	-	NT
P0204	-	-	NT
P0301	-	-	NT
P0302	+	-	NT
P0303	-	-	NT
P0304	-	-	NT
P0305	-	-	NT
P0306	-	-	NT
P0401	-	-	NT
P0402	-	-	NT
P0403	-	-	NT
P0404	-	+	-
P0406	-	-	NT
P0407	-	+	-
P0501	-	-	NT
P0502	-	-	NT

+ เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส (Nitrite reductase)
P0503	-	-	NT
P0504	-	-	NT
P0505	-	-	NT
P0601	-	-	NT
P0603	-	-	NT
P0604	-	+	-
P0701	-	-	NT
P0702	+	-	-
P0703	-	-	NT
P0705	+	-	-
P0801	-	-	NT
P0803	+	-	NT
P0804	+	+	-
P0805	+	+	-
P0901	-	-	NT
P0902	-	-	-
P0904	-	+	-
P0905	-	+	-
P1002	-	+	-
P1003	-	-	NT
P1004	-	-	NT
P1005	-	-	NT
T0101	-	-	NT
T0103	-	-	NT
T0201	-	-	NT
T0202	-	+	-
T0203	-	-	NT
T0205	-	-	NT
T0206	+	+	-

+ เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส (Nitrite reductase)
T0207	+	+	-
T0301	-	-	NT
T0302	-	-	NT
T0303	-	-	NT
T0305	-	-	NT
T0401	-	-	NT
T0402	-	-	NT
T0502	-	-	NT
T0504	-	+	-
T0505	-	-	NT
T0603	-	-	NT
T0702	-	-	NT
T0703	-	-	NT
T0704	-	-	NT
T0801	-	-	NT
T0802	-	-	NT
T0803	-	-	NT
T0804	-	-	NT
T0805	-	-	NT
T0902	-	-	NT
T0903	-	-	NT
T0904	-	-	NT
T0905	-	-	NT
T0906	-	-	NT
T1001	-	-	NT
T1002	-	-	NT
T1003	-	-	NT
T1004	-	-	NT
T1005	-	-	NT

+ เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.4 การสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase)	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส (Nitrite reductase)
T1006	-	-	NT
T1007	+	-	-
T1008	-	+	-
T1009	-	-	NT
T1010	-	-	NT
T1101	-	-	NT
T1102	-	-	NT
T1103	-	-	NT

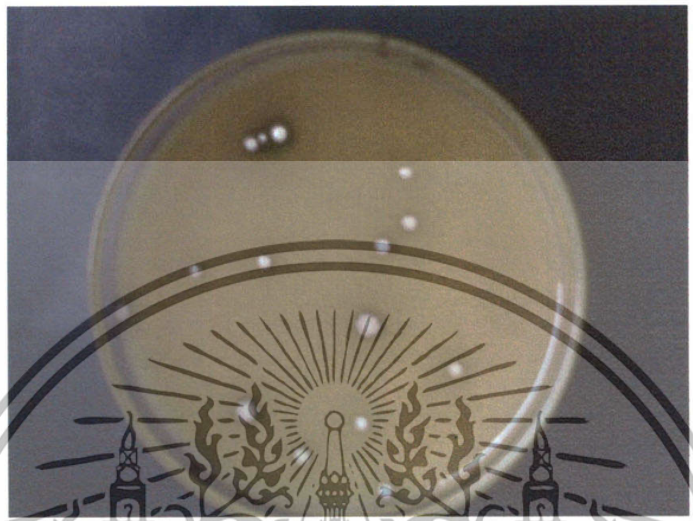
+ เกิดปฏิกิริยา

- ไม่เกิดปฏิกิริยา

NT ไม่ได้ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

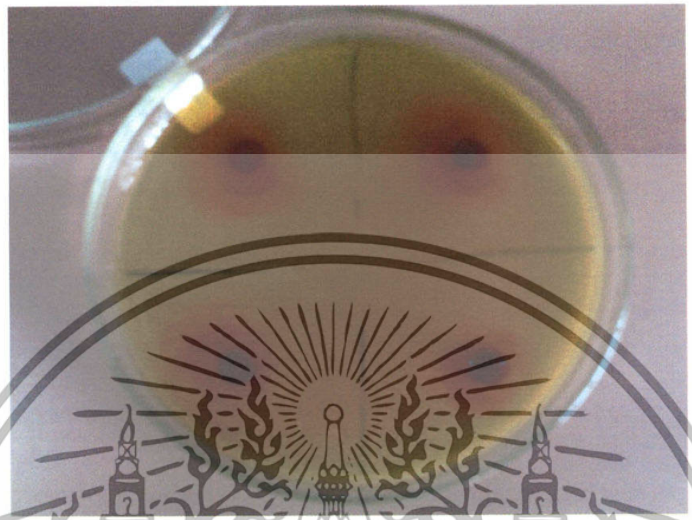
ภาคผนวก ง



รูปที่ ง.1 โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างโซนใส (clear zone) บนอาหาร MRS agar

รูปที่ ง.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร BSM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

รูปที่ ง.4 การทดสอบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

1. วิธีการใช้เครื่องวัด pH (Testo 205)

1. ดึงเครื่องออกจาก Storage Cap อย่างระมัดระวัง (มือซ้ายจับ Storage Cap ไว้ มือขวาค่อยๆดึงเครื่องมือออก ใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางประคองเครื่องไว้ ง้างปลาย Storage Cap เล็กน้อยเพื่อดันเครื่องขึ้นมา จับอย่างระมัดระวัง ห้ามทำเครื่องหล่นโดยเด็ดขาด

2. กดปุ่ม (ON) (กดแล้วปล่อยทันที) เพื่อเปิดเครื่อง

3. ทำการ Calibrate โดยกดปุ่ม (Cal) เครื่องจะบอกให้ Calibrate ที่ pH 4 ได้ (ตัวอักษร "Cal" ที่หน้าปัด จะกระพริบ) จุ่ม Probe ลงใน Buffer pH 4 (อย่าให้ Probe สัมผัสกับภาชนะใส่ Buffer) รอจนค่านิ่งกดปุ่ม (Cal) อีกครั้ง (ตัวอักษร "Auto" จะกระพริบ รอเสียงสัญญาณดังติ๊ดแสดงว่าเครื่อง Calibrate เสร็จแล้ว) ล้าง Probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

4. ทำการ Calibrate ที่ค่า pH 7 ต่อไปโดยจุ่ม Probe ลงใน Buffer pH 7 รอจนค่านิ่ง กดปุ่ม (Cal) อีกครั้ง ตัวอักษร "Auto" จะกระพริบ รอสัญญาณดังติ๊ด เมื่อการ Calibrate เสร็จสิ้น เครื่องจะแสดงปริมาณ Gradient และ Offset Value ที่หน้าปัด (หน่วยมิลลิโวลต์) จากนั้น ล้าง Probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

5. เปลี่ยนไปสู่โหมดการวัดโดยกดปุ่ม (Cal) อีกครั้ง (ตัวอักษรAuto Hold จะกระพริบ) จึงทำการวัดค่า pH ของตัวอย่างได้

6. จุ่ม Probe ลงในตัวอย่าง รอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้ เมื่อวัดเสร็จแล้วก่อนจะวัดตัวอย่างต่อไป ล้าง Probe ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่

7. เมื่อจะวัด pH ของตัวอย่างถัดไปให้จุ่ม Probe ลงไปในตัวอย่างแล้วกดปุ่ม (ON/HOLD) อีกครั้ง เพื่อให้เครื่องทำการวัด pH ของตัวอย่าง รอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้

8. เมื่อเลิกใช้เครื่องมือให้**ปิดเครื่อง**โดยกดปุ่ม (ON/HOLD) ค้างไว้สัก 2-3 วินาที จนตัวเลขที่หน้าปัดจะหายไป

9. ทำความสะอาด Probe โดยล้างด้วยน้ำสบู่เจือจาง ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 40 °C (ห้ามใช้น้ำยาทำความสะอาดที่แรงเกินไป) ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดเครื่องให้สะอาดด้วยผ้าที่สะอาดหรือกระดาษทิชชู่ชุบน้ำพอหมาดๆ ห้ามถู

10. เสียบหัว Probe ลงใน Storage Cap ที่มี electrolyte gel (สีส้ม) อยู่ โดยเสียบเครื่องเข้าทางขวาของ Storage Cap

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : หัว Probe ต้องจุ่มลงใน electrolyte gel ขณะปิดเครื่อง ต้องรักษาให้ electrolyte gel ให้สะอาดอยู่เสมอ ถ้า probe อยู่นอก electrolyte gel เป็นเวลานาน จะต้องจุ่มหัว Probe ลงใน electrolyte gel เป็นเวลาประมาณ 12 ชม. เพื่อ regenerate

2. วิธีการใช้เครื่องวัดหาค่า Water Activity รุ่น Thermoconstanter

วิธีการ Set-up Calibration

ให้ทำการปรับ Calibrate เครื่องโดยให้สังเกตดังนี้

- ให้ปรับ 1 ครั้งในตอนเช้าหรือตอนเริ่มต้นแล้วใช้ได้ทั้งวัน
- ถ้าเครื่องทิ้งไว้นานโดยไม่ได้ใช้ ให้ปรับทุกครั้งก่อนที่จะนำเครื่องมาใช้

วิธีปฏิบัติ

1. นำตลับ Salt Standard (ความชื้นมาตรฐาน) มาใส่ใน Measuring Chamber ให้เริ่มต้นด้วย Salt Standard SAL-90 (90.1 % ERH)
2. ปิดฝาครอบให้เรียบร้อย
3. ให้หมุนปุ่มสีเหลืองตรงด้านหน้าซ้ายมือของเครื่องไปยังหมายเลข 2
4. รอประมาณ 1 ถึง 2 นาที แล้วจึงต่อยกดปุ่มสีฟ้า Enter ด้านขวามือ กดจนกระทั่งบนจอแสดงค่า (LCD) กระพริบ ถ้าข้อความบนจออ่านว่า NO CAL ให้รอจนกว่าบนจอจะแสดงข้อความว่า SO CAL พร้อมๆกับกระพริบด้วย
5. ให้กดปุ่มสีฟ้า Enter อีกครั้งหนึ่งจนกระทั่งข้อความบนจอหยุดกระพริบ
6. เครื่องจะทำการ Calibrate จนเสร็จสิ้นกระบวนการ
7. หลังจากเสร็จสิ้นการ Calibrate แล้ว เครื่องจะคืนสู่สภาพปกติคือพร้อมที่จะวัดและแสดงค่าอุณหภูมิและ % ERH (a_w = ERH/100) ของตัวอย่าง
8. สำหรับค่าอื่นๆให้ทำการ Calibrate ในทำนองเดียวกับค่า 90 ดังกล่าวข้างต้น

หมายเหตุ

1. ต้องใช้ตลับ Salt Standard ให้ตรงกับค่าที่ต้องการ Calibrate เท่านั้น มิฉะนั้นแล้วจะเกิดการคลาดเคลื่อนในความแม่นยำของการวัดค่า ERH เช่น ถ้ากำลังทำการ Calibrate ที่ ERH 90 ก็ต้องใช้ตลับ Salt Standard ที่เขียนว่า SAL-90 เท่านั้น
2. ห้ามกดปุ่มสีฟ้า Enter จนกว่าจะแน่ใจ ข้อความที่กำลังกระพริบอยู่บนจอ LCD เป็นค่าที่ต้องการทำการ Calibrate
3. ให้ทำการ Calibrate หลายๆค่าในคราวเดียวกันเป็นลำดับ เริ่มต้นจากค่ามากถึงค่าน้อยอย่างน้อยสองค่า ซึ่งสามารถคลุมถึงค่าของ a_w ที่คาดคิดว่าจะเป็น เช่น ถ้าคาดคิดว่าค่า a_w ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ที่จะการวัดอยู่ในช่วง 0.6-0.7 ให้ทำการ Calibrate เริ่มต้นจากค่า 90 75 และ 53 เป็นต้น แต่ถ้าต้องการความแน่นอนและแม่นยำก็ให้ทำการ Calibrate โดยเริ่มต้นจากค่า 901 75 53 และ 33 ซึ่งเท่านี้ก็เพียงพอที่จะครอบคลุมได้เกือบทั้งหมด

4. ให้สังเกตสีของ Salt Standard (SAL) ที่ค่าต่างๆกัน ในกรณีที่เกิดการผิดพลาดอันเนื่องมาจากการสลับกันของฝาตลับหรือทำฝาตลับหายก็ให้สังเกตง่ายๆ ดังนี้

	SAL 98	สีส้ม
	SAL 90	สีขาว
	SAL 75	สีม่วง
	SAL 53	สีเขียว
	SAL 33	สีน้ำเงิน
และ	SAL 11	สีขาว

<u>วิธีการใช้เครื่องเพื่อทำการวัดสารตัวอย่าง</u>

1. หมุนปุ่มสีเหลืองของเครื่อง Thermoconstanter ในตำแหน่งที่ 1
2. นำตลับพลาสติก (Sample Cup) มาใส่สารตัวอย่างให้ได้ปริมาตรประมาณ 80-90%
3. นำตลับตัวอย่างมาใส่ไว้ใน Measuring Chamber
4. ปิดฝาให้เรียบร้อย
5. Set อุณหภูมิให้ได้ตามที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการควบคุมตัวอย่างให้ได้ 25 องศาเซลเซียส ก็ให้ตั้งปุ่มสีดำตรงขวามือให้ได้หมายเลข 190 เป็นต้น
6. จากนั้นรอจนกระทั่งอ่านอุณหภูมิได้ตามที่ตั้งไว้ และ Relative Humidity ของอากาศที่วัดได้อยู่ในสภาวะสมดุลย์ (Equilibrium) กับสารตัวอย่าง สภาวะนี้เราเรียกว่า Equilibrium Relative Humidity (ERH) เมื่อหารด้วย 100 ก็จะได้ค่า a_w (Water Activity) ตามที่ต้องการ

<u>หมายเหตุ</u>

1. สารตัวอย่างแต่ละอย่างที่นำมาทดลองเพื่อทำการวัดหาค่า Water Activity (a_w) จะมีค่า a_w ที่แตกต่างกันออกไป อุณหภูมิของสารตัวอย่างนั้นๆก็มีส่วนทำให้ค่า a_w แตกต่างกันออกไปอีกด้วย หมายความว่า สารตัวอย่างเดียวกันถ้ามีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ก็จะมี a_w ที่แตกต่างกันไปด้วย
2. ระยะเวลาที่รอคอยให้ถึงจุด Equilibrium นั้นจะสั้นหรือยาวก็จะขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบของสารตัวอย่างนั้นๆ ตัวอย่างเช่น ถ้าเป็นสารตัวอย่างที่มีส่วนผสมของน้ำมันจะต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงกว่าจะถึงจุด Equilibrium ถ้าเป็นสารตัวอย่างทั่วๆไป เช่น แยม ไส้กรอก หรือ ขนมปังแห้ง จะใช้เวลาประมาณ 15-25 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้