ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น *P.pentosaceus* TISTR536 ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

(Effect of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture on Salmonella during semi-dried Nham Production)

จัดทำโดย

นาย เปรมชัย ศีลาเจริญ รหัสนักศึกษา 45040207

นาย ภัคพล อุปมา รหัสนักศึกษา 45040881

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 12/04/49 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21058

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น *P.pentosaceus* TISTR 536 ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

(Effect of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture on Salmonella during semi-dried Nham Production)

T097026

จัดทำโดย

นาย เปรมชัย ศีลาเจริญ รหัสนักศึกษา 45040207

นาย ภัคพล อุปมา รหัสนักศึกษา 45040881

ปพ.
ป๔๑๒ผ
๒๕๔๘

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....97026
วัน,เดือน,ปี.....5 JUN 2009

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาย เปรมชัย ศีลาเจริญ และนาย ภัคพล อุปมา . 2548 : ผลของการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น *P.pentosaceus* TISTR 536 ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง(Effect of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter culture on Salmonella during semi-dried Nham Production) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ***P. pentosaceus* TISTR536** ที่มีผลต่อการเจริญ เติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา ในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้งซึ่งจะพบว่าในผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อจะมีค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูง และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชให้ต่ำอย่างรวดเร็วกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และเมื่อดูประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลา พบว่าเมื่อหมักครบ 3 วัน แหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ยังคงตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง 66.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งสองปัจจัยนี้มาผลิตเป็นแหนมกึ่งแห้ง โดยทำการอบแหนมที่ 3 วัน ด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลารวม 8 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างตรวจในช่วงเวลา ทุกๆ 2 ชั่วโมง คือ 2 ,4 ,6 และ 8 ชั่วโมง พบว่าเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนอยู่และเหลือรอดจากการหมักครบ 3 วัน ใน แหนมกึ่งแห้งที่มีการใช้กล้าเชื้อ จะถูกทำลายได้ทั้งหมด ที่เวลา 4 ชั่วโมง ส่วนแหนมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อเชื้อซัลโมเนลลาจะถูกทำลายได้หมดที่ 6 ชั่วโมง เมื่อนำผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งทั้งสองปัจจัยมาทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อมากกว่าแหนมกึ่งแห้งที่ไม่ใช้กล้าเชื้อในด้าน สี และความเปรี้ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนด้านกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เปรมชัย ศีลาเจริญ ภัคพล อุปมา 12/04/49

ลายมือนักศึกษา (ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์) วัน / เดือน / ปี

ลายมืออาจารย์ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำปรึกษา และแนะนำแก้ไข ตลอดจนให้กำลังใจตลอดการศึกษานี้ และขอขอบพระคุณ ท่านอาจารย์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้คำแนะนำต่างๆที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

ขอบพระคุณ คุณ พรพิมล เทียนทอง และ คุณ สมัญญา สุขพหล พี่นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนปริญญาตรี ทุกคนที่คอยช่วยเหลือให้ข้อมูล และคำแนะนำ เป็นกำลังใจตลอดการศึกษานี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยอบรบเลี้ยงดู ให้กำลังใจที่ทำให้สามารถเดินมาจนถึงจุดนี้ได้

นาย เปรมชัย ศีลาเจริญ

นาย ภัคพล อุปมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาปัญหาพิเศษ ซึ่งรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับ ผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *P. pentosaceus* TISTR536 ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง ในเนื้อหาจะกล่าวถึงตั้งแต่ความเป็นมาของอาหารหมัก กระบวนการผลิตแหนมกึ่งแห้ง ทั้งการใช้กล้าเชื้อ เทียบกับ การไม่ใช้กล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการรวบรวมข้อมูลการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแหนม และผลการใช้กล้าเชื้อในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลารวมถึงการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีบางประการต่อแหนมกึ่งแห้งที่ผลิต และปัจจัยต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสในการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

รายงายฉบับนี้ข้าพเจ้าตั้งใจในการศึกษาหาข้อมูล และหวังว่าข้อมูลที่ได้มาเรียบเรียง จะเกิดประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจไม่มากก็น้อย อนึ่ง ถ้ารายงานฉบับนี้มีข้อผิดพลาดหรือไม่สมบูรณ์ประการใด ข้าพเจ้าก็ขออภัยไว้ ณ. ที่นี้ด้วย

นาย เปรมชัย ศีลาเจริญ
นาย ภัคพล อุปมา
ผู้จัดทำ
21 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
คำนำ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2. ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แหนม	3
2.2 แบคทีเรียแลคติก	5
2.3 เชื้อซัลโมเนลลา	9
บทที่ 3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิต	11
3.2 เชื้อจุลินทรีย์	11
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์	11
3.4 สารเคมี	12
3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ	12
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	13
3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	13
3.8 วิธีทดลอง	14
บทที่ 4. ผลการทดลองและวิจารณ์	18
4.1 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นและการทำแห้ง ที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลา	18
4.1.1 ค่าพีเอชและเปอร์เซนต์กรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	18
4.1.2 ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	20
4.1.3 ผลการวิเคราะห์การหลงเหลือของเชื้อ Lactic acid Bacteria (LAB)	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	23
4.1.5 ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	24
บทที่ 5. สรุปและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	31
ภาคผนวก ก.	32
ภาคผนวก ข.	40
ภาคผนวก ค.	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงส่วนผสมในการผลิตแหนม	15
4. 1 ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอช และ เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	19
4. 2 ผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	21
4. 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่พบของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	22
4. 4 ผลการตรวจซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	23
4. 5 ผลการลดลงของซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	24
4. 6 ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
3.1	วิเคราะห์โดยตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมโดยใช้วิธี salmosyst	16
4.1	การวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	19
4.2	ผลการวิเคราะห์ค่า พีเอชช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	20
4.3	ผลการวิเคราะห์ค่าค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	21
ก 1	Salmosyst Broth Base ที่มีการเติม Salmosyst seletive supplement tablet	33
ก 2	อาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar หลังมีการเจริญของเชื้อ	34
ก 3	อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar หลังมีการเจริญของเชื้อ	35
ก 4	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี ก่อนและหลังการเจริญของเชื้อ	37
ก 5	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar	38
ก 6	ลักษณะเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth	39
ค 1	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 0 วัน	43
ค 2	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 0 วัน	43
ค 3	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 3 วัน	44
ค 4	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 3 วัน	44
ค 5	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง	45
ค 6	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง	45
ค 7	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	46
ค 8	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง	46
ค 9	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง	47
ค 10	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง	47
ค 11	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง	48
ค 12	ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แหนม เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย มีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องในด้านต่าง ๆ เช่น ผลของปริมาณโซเดียมไนไตรท์ และเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lactobacillus curvatus* ต่อการเกิดสารระเหยในแหนม ซึ่งจากการศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำแหนม (สมบุญ , 2518) การศึกษาเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในแหนม โดย Petchsing และ Woodburn (1990) ซึ่งพบว่าเมื่อมีการใส่เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น จะทำให้ปริมาณของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* มีจำนวนลดลง เป็นต้น การผลิตแหนมจากแหล่งต่าง ๆ จะมีส่วนผสม และปริมาณของเครื่องปรุงแตกต่างกันไป แต่มีส่วนประกอบหลักที่เหมือนกัน คือ หมูเนื้อแดงบด หนังหมูหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ผู้ผลิตบางรายอาจใช้หูหมู หรือหัวหมูเป็นส่วนผสมด้วย ข้าวสุก กระเทียม ในการผลิตจะนำส่วนผสมดังกล่าวมานวดผสมกัน และนำเครื่องปรุงรสตามแต่สูตรมาผสมด้วย นวดจนส่วนผสมเข้ากันจนเหนียว นำไปบรรจุในถุงพลาสติก รีดเอาอากาศออก แล้วรัดปากถุงให้แน่น ไม่ให้มีอากาศอยู่ภายใน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 วัน แหนมก็จะมีรสเปรี้ยว พร้อมที่จะนำไปบริโภค ซึ่งการหมักแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่นั้นยังคงอาศัยแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาติจากเนื้อสัตว์ เครื่องปรุงต่าง ๆ เพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยว และกลิ่นเฉพาะตัวของแหนม ซึ่งถ้าเราอาศัยแต่แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้น จะทำให้ไม่สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการที่ทำให้เกิดการหมักได้ จึงมักเกิดปัญหาในการผลิต เช่น แหนมที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากสภาวะในการหมักแตกต่างกันตามแต่ละฤดูกาล ดังนั้นการนำเชื้อแลคติกบริสุทธิ์มาใส่ในตอนเริ่มต้น จะช่วยให้สามารถควบคุมกระบวนการหมักได้มากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตมั่นใจได้ว่าจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพดี และสม่ำเสมอ อีกทั้งเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นจะสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการในการผลิต เช่น มีการสร้างแบคเทอริโอซิน (Noonpakdee และคณะ , 2003 ; Mataragas และคณะ , 2003 ; Tyopponen และคณะ , 2003 ; Liserre และคณะ , 2002 ; Mataragas และคณะ , 2002 ; Tantillo และคณะ , 2002 ; Kulaesan และ Cakmakci , 2002 ; Rekhif และคณะ , 1995 ; Hugas และคณะ , 1995) ศิพัตน์ (2539) ได้ศึกษาถึงผลการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staph. aureus* และเรณู (2539) ศึกษาถึงผลการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ Salmonella Typhimurium และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. Anatum ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสามชนิดได้

1.2 วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาถึงผลการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการลดปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนม กึ่งแห้ง

2. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการและการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งที่ผลิต

3 . ศึกษาการหลงเหลือของเชื้อแบคทีเรียแลคติกหลังการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมเกี่ยวข้อง

2.1 แหนม

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของประเทศไทย ในปัจจุบันนิยมบริโภคกันมาก โดยเฉพาะทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มาตราฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้ให้นิยมของแหนมว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมูส่วนสะโพกที่แยกไขมัน และเอ็นออกแล้ว ผสมกับหนังหมู อาจผสมหูหมู หรือจมูกหมูที่ต้มสุก และหั่นเป็นเส้นแล้วเติมเกลือ ข้าวสุก กระเทียมบด น้ำตาลทรายผสมให้เข้ากัน อาจเติมพริกสดด้วยก็ได้ ห่อเป็นมัด หรือบรรจุในภาชนะบรรจุลักษณะอื่นๆ หมักจนมีรสเปรี้ยว (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน , 2546) สำหรับคุณลักษณะของแหนมนั้น ต้องมีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้ทำ ผสมกันอย่างทั่วถึง เนื้อแน่น ไม่มีโพรงอากาศ และมีน้ำจากการหมักได้เล็กน้อย มีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนม มีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมัก มีรสเปรี้ยวที่พอเหมาะ ซึ่งรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นนั้น มาจากกระบวนการหมักที่มีจุลินทรีย์เข้าเกี่ยวข้อง โดยเฉพาะจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลคติก ในระยะแรกของการหมักพบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อหมู ได้แก่ แบคทีเรียรูปท่อน และรูปกลม ติดสีแกรมบวก และแกรมลบ มีทั้งพวกที่สร้างกรดได้ และทำให้อาหารเน่าเสีย หลังการหมักประมาณ 24 ชั่วโมง จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดี และเติบโตในที่ที่มีอากาศน้อย คือ เชื้อในกลุ่ม homofermentative cocci เช่น *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ที่เติบโตจำนวนมาก เชื้อชนิดนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างเป็นกรดแลคติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ทำให้ค่าพีเอชของแหนมลดลง ซึ่งพีเอชของแหนมในวันที่ 4 นั้น ควรมีค่าต่ำกว่า 4.5 และมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชที่ต่ำ และปริมาณกรดที่สูงนี้ จะทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคอย่างซัลโมเนลลา ลดจำนวนลงด้วย (บุษกร , 2545)

ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแหนมในด้านต่าง ๆ มากมาย ซึ่งส่วนมากจะเน้นถึงงานวิจัยในด้านการใช้กล้าเชื้อเพื่อความปลอดภัยในการผลิตแหนม รวมถึงคุณภาพที่ดีของแหนมเมื่อใช้กล้าเชื้อในการผลิต เพื่อที่จะปรับปรุงคุณภาพทั้งในแง่ของกระบวนการผลิต และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังเช่นงานวิจัยในต่อไปนี้

อรนุช (2530) ได้คัดเลือก และศึกษาวิธีการผลิตเชื้อผงแบคทีเรียแลคติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลา พบว่าจากแบคทีเรียแลคติกจำนวน 112 isolates ได้แก่ *Pediococcus* spp. 78 isolates *Lactobacillus* spp.34 isolates เชื้อแต่ละไอโซเลทให้ผลต่างกันในการยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ S. Anatum , S. Bovis – morbificans , S. Derby , S. Krefeld , S. Lexington , S. London , S. Weltevreden และ S. Newport และจากการพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาได้สูง การผลิตกรดได้ดี และการมีค่าความขุ่นของการเจริญต่าง ๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท *Pediococcus* spp. รหัส P_{9}, P_{18}, P_{33}, P_{39}, P_{42}, และ TISTR 536 *Lactobacillus* spp. รหัส L_{23} และ TISTR 539 งานวิจัยของอดิศร (2533) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม พบว่าแหนมที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* spp. รหัส P_{55} และกล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส P_{55} และ *Pediococcus* spp. รหัส L_{1} ในการหมัก จะให้ผลในการยับยั้ง และทำลายเชื้อซัลโมเนลลา ในขณะหมักได้ดีที่สุด และยังพบว่าการหมักแหนมโดยมีการเติมกล้าเชื้อจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากเชื้อซัลโมเนลลา เมื่อใช้เวลาในการหมัก 5 วัน ขณะที่การหมักโดยธรรมชาติต้องใช้ระยะเวลา 6 วัน เมื่อทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค โดยใช้แหนมที่มีแบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อในการหมักเทียบกับแหนมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ พบว่าผู้บริโภคมีความชอบในแหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส L_{1} และเชื้อรหัส P_{55} มากที่สุด และในปี 1999, Swetwiwathana และคณะก็ได้ทำการทดลองในทำนองเดียวกันโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* และ *P. acidilactici* ร่วมกับ nitrate, nitrite และกระเทียม ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ S. Anatum ในแหนม พบว่าเมื่อใช้ sodium nitrite 125 – ppm, กระเทียมสด 5 % ร่วมกับ starter culture จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ S. Anatum ได้ แต่ถ้าใช้ร่วมกับ *Lb. sakei* จะให้ผลในการยับยั้งดีที่สุด

งานวิจัยของ Noonpakdee และคณะ (2003) ได้ทำการแยกเชื้อ lactic acid ที่มีอยู่ในแหนม สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 14,020 ชนิด พบว่า หนึ่งในนั้น คือ *Lb. lactis* สายพันธุ์ WNC20 ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ไม่เพียงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกใกล้เคียงแล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ pathogen ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่ประกอบด้วย *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfrigens*, *Bacillus cereus* และ *Staph. aureus* ได้ด้วยความสามารถของ *Lb. lactis* WNC20 ในการผลิตแบคเทอริโอซินจึงน่าจะมีประโยชน์ในการปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก Swetwiwathana และคณะ(2003)ได้ศึกษาการสร้าง bacteriocin ของแบคทีเรียแลคติกในแหนม พบว่ามี bacteriocin ที่ถูกสร้าง 14 strain และใน 6 strain คือ N10, N39, N60, N100, N190 และ TISTR 536 เป็นสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่เป็น indicator ได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ N100 และ N190 จะให้ผลในการยับยั้งพวกแกรมบวกที่เป็น pathogen ในอาหาร เช่น *L. monocytogenes*, *Staph. aureus* และพวกแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้ดี นอกจากนี้ยังมี TISTR 536 ที่สามารถยับยั้งพวก pathgen ในอาหาร เช่น *E. coli* และ *L. monocytogenes* ได้ แต่ไม่สามารถใช้ได้กับ *Staph. aureus* และ *Staph. carnosus* ซึ่ง *Staph. carnosus* มักนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในไส้กรอกหมักหลายชนิดของชาวยุโรป เนื่องจากจะช่วยเพิ่มเรื่องของกลิ่น และสีในผลิตภัณฑ์ ต่อมา Swetwiwathana และคณะ (2004) ศึกษาถึงผลของกระเทียม และไนไตรท์ที่มีต่อการผลิต Pediocin PA – 1 ของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ S. Anatum ในสภาวะการหมักแหนมจำลอง พบว่ากระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เจริญได้ดีทั้งในที่มีไนไตรท์ และไม่มี เมื่อเทียบกับที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ได้ใส่กระเทียม และเมื่อใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท์ 125 ppm และ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถลดจำนวนของ S. Anatum ได้ภายใน 30 ชั่วโมง

2.2 แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผัก ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อต่าง ๆ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า เป็นต้น ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียพวกนี้ คือ ความสามารถในการสลายน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้ส่วนมากจะเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย และจากสิ่งที่สร้างได้จากการหมักของแบคทีเรียประเภทนี้ ทำให้สามารถแบ่งย่อยแบคทีเรียพวกนี้ได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เน้นสร้างแลคเตท (homofermentative) และกลุ่มที่สร้างแลคเตทร่วมกับสารอื่น (heterofermentative) โดยกลุ่มเชื้อในกลุ่ม homofermentative นั้น หมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วจะสร้างกรดแลคติก 95 เปอร์เซ็นต์ อีก 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนในกลุ่มของ heterofermentative จะหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติกออกมา 50 เปอร์เซ็นต์อีก 25 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดอื่น ๆ เช่น กรดแอซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) เป็นต้น และอีก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เชื้อในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกนี้เมื่อก่อนมีเพียง 4 สกุลเท่านั้น ได้แก่ *Streptococcus* , *Pediococcus* , *Leuconostoc* , *Lactobacillus* และ *Lactobaccillus* แต่ในปัจจุบันเมื่อใช้ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) ได้จัดแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็นสกุลต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ๆ ได้แก่ *Aerococcus* , *Alloiococcus* , *Bifidobacterium* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Pediococccus* , *Streptococcus* , *Tetragenococcus* , *Vagococcus* และ *Weisella* (บุษกร , 2545)

2.2.1 หลักการผลิตกรดแลคติกจาก Lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้

Lactic acid bacteria

$$\underset{\text{น้ำตาล}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{กรดแลคติก}}{2C_3H_6O_3}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่ Lactic acid bacteria เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรด แลคติกเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ pH ของอาหารหมักดองลดลง พร้อมกับรสเปรี้ยวของกรดจะสูงขึ้น ในสภาพเช่นนี้จะมีผลช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและก่อโรคได้

2.2.2 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย Lactic acid bacteria

2.2.2.1 Organic acids หลายชนิดถูกนำมาใช้เติมในอาหาร แต่ไม่ได้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ acetic , lactic ,propionic , sorbic , และ benzoic acid ส่วน citric , caprylic , fumalic และ organic acids อื่น ๆ มีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัด แต่ถูกนำมาใช้ในแง่ของ รสชาติมากกว่า ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ organic acids ขึ้นอยู่กับ pH โดยจะมีความสัมพันธ์กับ pH ซึ่งกรดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะอยู่ในรูป undissiciated ดังนั้นการจะเลือกใช้ organic acids ในการถนอมอาหารต้องพิจารณาถึงค่า pH และ pKa ของกรดชนิดนั้น ๆ ซึ่งโดยปกติ organic acids ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีค่า pH ต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 5.0 สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์นั้น organic acid ที่อยู่ในรูป undissociated จะสามารถผ่านเข้าสู่ cell membrane และ lipid bilayer ได้ง่ายขึ้น โดยปกติสภาพภายในเซลล์ กรดจะอยู่ในรูป associated เนื่องจากภายในเซลล์มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ แบคทีเรียจึงพยายามรักษา pH ภายในเซลล์ให้มีค่าใกล้เคียงความเป็นกลาง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนรูปของ โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และ phospholipids โปรตอนจาก organic acids จะทำให้ความเป็นกรดภายใน cytoplasms เพิ่มสูงขึ้น จึงต้องมีการกำจัดกรดที่มากเกินไปออกสู่ภายนอกเซลล์ โปรตอนถูกขับออกภายนอกเซลล์ผ่านทาง membrane โดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า เรียกว่า proton motive force (PMF)

การขับโปรตอนภายในเซลล์ซึ่งเกิดจาก organic acids ออกสู่ภายนอกเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการไหลเข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่องของโปรตอน ทำให้พลังงานภายในเซลล์ถูกนำออกมาใช้ในการกำจัดโปรตอนจนหมด ขณะเดียวกันก็เกิดการรบกวนการผ่านเข้า – ออก ของสารใน membrane ทำให้แบคทีเรียขาดพลังงานและตายในที่สุด (Dolye และคณะ , 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1.1 กรดแลคติก

Lactic acids มีค่า pKa = 3.79 เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้ในการหมักอาหาร โดย lactic acid bacteria ซึ่ง lactic acid สามารถยับยั้งแบคทีเรีย กลุ่มที่สร้างสปอร์ และ *Staph. aureus* ซึ่งสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดแลคติกขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งมีรายงานเพียงไม่กี่ฉบับที่รายงานเกี่ยวกับกลไกที่จำเพาะต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารของ lactic acid ซึ่งกลไกหลังเหมือนกับ organic acid ทั่วไปคือ มีผลต่อการขนส่งของ โปรตอน ผ่าน cytoplasmic membrane (Doyle และคณะ , 1997)

2.2.2.1.2 กรดอะซิติก และ กรดโพรพิโอนิก

Lactic acid bacteria หลายสายพันธุ์สามารถสร้าง acetic และ propionic acid ได้ในปริมาณน้อย acetic และ propionic acid มีค่า pKa สูงกว่า lactic acid จึงมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า lactic acid กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ acetic และ propionic acid จะเหมือนกับ lactic acid คือรบกวนการทำงานของ cell membrane โดยจะไปทำให้ electrochemical potential เป็นกลาง นอกจากนี้ acetic acid ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลง และยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนได้ด้วย (Wood , 1992)

2.2.2.2 Hydrogen peroxide (H_2O_2)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) จะถูกสร้างขึ้นโดย lactic acid bacteria กลุ่มที่ไม่สร้าง เอนไซม์ catalase แต่มีการสร้าง flavoprotein oxidase สาร Hydrogen peroxide ได้รับอนุญาตโดย FDA ให้ใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในน้ำนมดิบที่จะใช้ผลิตเนยแข็ง โดยให้ใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 0.05 % เมื่อเติมลงในไข่ขาว Hydrogen peroxide จะมีความสามารถในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้ สำหรับการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อยืดอายุการเก็บน้ำนมดิบนั้นอาศัยระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase system) ซึ่งเป็นกระบวนการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในน้ำนมดิบโดยมีกลไกคือ thiocyanate จะถูกออกซิไดซ์ด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้ได้สารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ hypothiocyanate radical และ thiocyanous acid ซึ่งประสิทธิภาพของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ pH inorganic ions ระยะเวลาในการสัมผัส และปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อจุลินทรีย์ เช่น ความร้อน รังสี หรือสารกันเสียอื่น ๆ (Wood , 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 Bacteriocins

bacteriocin คือสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดหนึ่งแล้วสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน ทั้งในรูปการยับยั้งการเจริญและการทำลาย ปัจจุบันแบคเทอริโอซินกำลังได้รับความสนใจซึ่งมีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lb. fementum* , *Lb. acidophilus* , *Lb. plantarum* , *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* แบคเทอริโอซิน จากแบคทีเรียต่าง ชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมี ต่างกันแบคเทอริโอซิน มีความสามรถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *L. monocytogenes*ทำให้ แบคเทอริโอซิน มีความสามารถในการเป็นสารถนอมอาหารได้

ในปัจจุบัน สารกลุ่มนี้เป็นสารที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจอยู่ เนื่องจากเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ ตัวที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น ไนซิน (nisin) (สุมณฑา , 2545) ซึ่งตอนนี้ในประเทศไทยก็มีผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้อยู่หลายท่าน เช่น Swetwiwathana และคณะ (1999) ได้คัดเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหนม มี 3 สายพันธุ์ ที่มาจาก *Pediococcus* spp. 8nv TTSTR 419 ,530 ,536 และสายพันธุ์จาก *Lactobacillus* spp. คือ TISTR 543 พบว่าสายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. เท่านั้นที่มีผลในการยับยั้ง *L. innocua* ที่ใช้เป็นเชื้อ indicator ในการทดลอง และ Swetwiwathana และคณะ (2004) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แรกที่ผลิตสาร Pediocin PA-1 ที่แยกได้จากแหนม

Scharner (1990) ได้ทดลองใส่เชื้อบริสุทธิ์ เริ่มต้น Reodema SSHK 76 ลงในไส้กรอกหมัก “Hausschiachtene Knackwurst” ที่มีการปนเปื้อนของ S. Dublin ซึ่งให้ผลว่าภายในระยะ 7 วัน จำนวนของเชื้อซัลโมเนลลาจะลดลง 1-3 ส่วนจาก 10 ส่วน Hugus (1995) และคณะได้นำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. sake* CTC 494 ที่แยกได้จากไส้กรอกหมักแบบธรรมชาติมาใส่ในไส้กรอกหมักแบบแห้ง พบว่าสามารถหยุดการเจริญเติบโตของ *Listeria* และลดจำนวนเซลล์ลงได้ 1.25 log 10 cfu/g. จากการวิเคราะห์เชื้อแลคติกชนิดนี้สามารถสร้างสาร แบคเทอริโอซินได้ ที่เรียกว่า “sakacin K.” ต่อมา Savic และคณะ (2001)ได้ทำการทดลองโดยใส่และไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ เริ่มต้นในการผลิต Sramska salami พบว่ามีการเติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไป จะทำให้ค่า pH และ A_w ของไส้กรอกลดลงอย่างรวดเร็วในวันแรกของการหมักทำให้ค่า pH และ A_w ในวันสุดท้ายของการหมักต่ำกว่าที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริสุทธิ์เริ่มต้น และการใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้นจะทำให้ได้ไส้กรอกที่มีสี และความแน่นเนื้อสม่ำเสมอ โดยใช้เวลาสั้นกว่าที่ไม่ใช้เชื่อแบคทีเรียบริสุทธิ์เริ่มต้น

2.2.2.4 Diacetyl

Diacetyl (2 , 3- butancdione) เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ pyruvate Diacetyl เป็นสารที่ทำให้เนยมีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ด้วยความเข้มข้นที่200 $\mu g / ml$ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แกรมบวกกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติก ส่วนแบคทีเรียแลคติกนั้นจะไม่ยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 350 $\mu g / ml$

2.3 เชื้อซัลโมเนลลา (Salmonella)

เชื้อซัลโมเนลลาจัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคเทอริซิอี (Family Enterobacteriaceae) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีอากาศชอบอุณหภูมิปานกลาง โดยเฉพาะที่ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญ พีเอชที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.0-9.0 สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่จะไม่ย่อยแล็กโทส หรือซูโคส มีการแยกชนิดโดยการใช้วิธีทางซีโรโลยี (serology) เพราะเชื้อมีคุณสมบัติเป็น แอนติเจน (antigen)

เชื้อซัลโมเนลลาเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่าโรซัลโมเนลโลซีส (Salmonellosis) เนื่องจากการบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป ผ่านทางเดินอาหาร โดยความรุนแรงของอาการจะแตกต่างกันไปตามปริมาณของเชื้อ สายพันธุ์ และความต้านทานของผู้บริโภค ระยะฟักตัวของโรคนี้ประมาณ 12-36 ชั่วโมง อาการที่สำคัญ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเสีย แต่ผู้ป่วยได้รับเชื้อสายพันธุ์ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi ซึ่งเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ และไข้รากสาดน้อย จัดเป็นเชื้อซัลโมเนลลาที่มีความรุนแรงมากที่สุด มีอัตราการตายสูงสุดในบรรดาเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหลาย

ในผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อซัลโมเนลลาแพร่กระจายในอาหารหลายชนิดที่มี เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนใหญ่ สัตว์ปีกก็เป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอีกหนึ่งแหล่ง ซึ่งในประเทศไทยเองเคยพบเชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อนอยู่ในเนื้อไก่ที่เป็นสินค้าส่งออกของประเทศด้วย (Bangtrakulnonth และคณะ, 1993) รวมถึงเนื้อหมูที่จำหน่ายตามท้องตลาดและ ห้างสรรพสินค้าภายในประเทศ อดิศร และ คณะ (2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับรายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม อดิศร (2533) ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในแหนม 56 ตัวอย่าง พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสิน 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมาก ได้แก่ *S.* Derby และ *S.* Anatum พบถึง 20.50 และ 14.72 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่ตรวจตามลำดับ และพบว่า *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด ต่อมา อดิศร และคณะ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์)

ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยที่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในอาหาร ในต่างประเทศก็พบปัญหานี้เช่นเดียวกัน Abbar และคณะ (1989) ได้รายงานว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในประเทศอียิปต์จากตัวอย่างไส้กรอกเนื้อ 80 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา 28 ตัวอย่าง คิดได้เป็นร้อยละ 35 เซโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่พบได้แก่ *S.* Anatum, *S.* Typhimurium และ *S.* Molade สำหรับในเนื้อที่บรรจุขาย 70 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนจาก *S.* Anatum 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.6 ในปีเดียวกันที่ประเทศเยอรมัน, Schmidt (1989) รายงานว่าในตัวอย่างไส้กรอก bratwurst (frying sausage) 872 ตัวอย่าง จากร้านขายเนื้อ 6 ร้าน และในซุปเปอร์มาร์เก็ต 4 แห่ง ในเมืองบาวาเรียน ในปี 1984 และ 1985 มีเชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อนเฉลี่ยร้อยละ 5 ในปี 1984 เดือนสิงหาคม มี 22 ตัวอย่างที่ตรวจพบซึ่งพบว่าร้อยละ 42 นั้นเป็น *S.* Typhimurium ถ้านำไส้กรอกชนิดนี้ไปเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าซัลโมเนลลาจะลดลงร้อยละ 30 ถ้าเก็บไส้กรอกที่ 10 องศาเซลเซียส เชื้อจะโตหลังจาก 12 ชั่วโมง เมื่อเราทอดไส้กรอกที่ 130 องศาเซลเซียส อุณหภูมิใจกลาง 75 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จะสามารถฆ่าเชื้อซัลโมเนลลาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิต

3.1.1 เนื้อหมูส่วนสะโพก (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.2 หนังหมู (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.3 ข้าวสุก (ข้าวหอมมะลิ ตราหงส์ทอง)

3.1.4 กระเทียม (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

3.1.5 เกลือ (ตราปรุงทิพย์)

3.1.6 น้ำตาล (ตรามิตรผล)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 MRS broth (Merck , USA)

3.3.2 MRS agar (Merck , USA)

3.3.3 Salmosyst broth base (SB) (Merck , USA)

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

3.3.5 XLD agar (Scharlau , Spain)

3.3.6 Rambach agar (Merck , USA)

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

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

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

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

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

3.3.12 KOVAC (Merck , USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สารเคมี

3.4.1 โซเดียมคลอไรด์ (Merck , USA)

3.4.2 โซเดียมไนไตรต์ (Merck , USA)

3.4.3 โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent , Italy)

3.4.4 โซเดียมแอสคอเบท (Fluka , Switzerland)

3.4.5 สารละลายฟีนอฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1 (Carlo Erba Reagent , Italy)

3.4.6 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล (Merck , USA)

3.4.7 แอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 (องค์การสุรากรมสรรพสามิต , ประเทศไทย)

3.4.8 แอลกอฮอล์ ร้อยละ 70 (องค์การสุรากรมสรรพสามิต , ประเทศไทย)

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

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

3.5.2 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Memmert , Germany)

3.5.3 ตู้อบ (Memmert , Germany)

3.5.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy SS-325 , Japan)

3.5.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (inolab pH Lever I , Germany)

3.5.6 เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Sartorius ; BP 3100S , Germany)

3.5.7 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (A&D Company Ltd ., Japan)

3.5.8 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer VM-300)

3.5.9 ไมโครเวฟ (LG intellowave , China)

3.5.10 เตาไฟฟ้า (Kando , Germany)

3.5.11 เครื่องปั่นผสมอาหาร (Turbora TRK 72 , Thailand)

3.5.12 เครื่องผสม (Kitchen Aid รุ่น K5SS , USA)

3.5.13 เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Sammic S.A.)

3.5.14 เครื่องบรรจุ

3.5.15 เครื่องบดเนื้อ (Seven Five OC 572 , Thailand)

3.5.16 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

การปฏิบัติงาน	ระยะเวลาในการทดลอง(เดือน)
1. หาข้อมูลและศึกษาเกี่ยวกับแหนม และวิธีการผลิต	20 พ.ค. – 16 มิ.ย. 48
2. หาข้อมูล เกี่ยวกับ ซัลโมเนลลา และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	17 มิ.ย. – 8 ก.ค. 48
3. ทำการเตรียมเชื้อที่จะใช้ในการทดลอง	13 ก.ค. – 20 ก.ค. 48
4. เตรียมอุปกรณ์ในการทดลอง , สารเคมี และทำการทดลองในครั้งที่ 1. เก็บและบันทึกผล	1 ส.ค. – 5 ก.ย. 48
5. เตรียมอุปกรณ์ในการทดลอง , สารเคมี และทำการทดลองในครั้งที่ 2. เก็บและบันทึกผล	13 ต.ค – 1 พ.ย. 48
6. ศึกษาและวิเคราะห์ผล และปัญหาที่เกิดขึ้นในการทดลอง	1. พ.ย. – 10 ธ.ค. 48
7. เตรียมอุปกรณ์ในการทดลอง , สารเคมี และทำการทดลองในครั้งที่ 3. เก็บและบันทึกผล	21ธ.ค. – 22 ม.ค. 49
8. สรุปผลการทดลอง	1 ก.พ. – 28 ก.พ. 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 วิธีทดลอง

3.8.1 ศึกษาผลของการใช้เชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

3.8.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยทำต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง

3.8.1.2 การผลิตแหนม

ผลิตแหนมโดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัย คือ แหนมที่มีการเติมเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้น และไม่มีการเติมเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้น หนังหมูบดที่ผ่านรูตะแกรงขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm เตรียมส่วนผสมในแต่ละสูตรตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 3.1 ในสูตรที่ไม่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นให้นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมในเครื่องผสม (Kitchen Aid) นวดจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 3 นาที) แต่ถ้าเป็นสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดก่อนประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไป นวดต่อจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 2 นาที)จากขั้นตอนนี้ไปจะมีขั้นตอนที่เหมือนกัน คือ นำไปบรรจุโดยใช้ cellulose casing ให้แต่ละแท่งมีความยาวประมาณ 6 นิ้ว จากนั้นรีดเอาอากาศออก มัดหัว-ท้ายให้แน่น นำไปบรรจุในถุงสุญญากาศปิดผนึกให้เป็นแบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่อง Vaccum Pack นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และทำการเก็บตัวอย่างในช่วงการหมักคือ ในวันเริ่มต้นของการผลิตแหนมก่อนหมัก 0 วัน และเมื่อแหนมหมักครบ 3 วัน

จากนั้นนำตัวอย่างที่หมักครบ 3 วัน มาทำการอบแห้งด้วยเครื่อง Tray dry ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลารวมทั้งหมด 8 ชั่วโมง โดยจะสุ่มตัวอย่างตรวจในช่วงเวลา ทุกๆ 2 ชั่วโมง คือ 2 , 4 , 6 ,8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆที่จะศึกษาในข้อ 3.8.1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมในการผลิตแหนม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมู	650
หนังหมู	350
ข้าวสุก	60
กระเทียม	50
เกลือ	25
น้ำตาล	5
Sodium tripolyphosphate	3
Sodium ascobate	0.5
Sodium nitrite	0.100

ที่มา : Swetwiwathana และคณะ (1999)

3.8.1.3 วิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของตัวอย่างแหนม

1. วิเคราะห์หาปริมาณกรด แลคติก

ชั่งตัวอย่างแหนม 3 กรัม บดให้ละเอียดเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO_2 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองนำน้ำใสที่ได้เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2 -3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH จนกระทั่งถึงจุด end point เกิดสีชมพู คำนวณหาปริมาณกรดแลคติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1{,}000 \times \text{กรัมของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

2. การวัดค่าพีเอช

นำตัวอย่างแหนม 20 กรัม มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน วัดด้วยเครื่องวัด pH meter

3. การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้

โดยใช้เครื่อง NOVASINA EEJA-3 ที่อุณหภูมิ 28 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์เชื้อ Lactic acid Bacteria (LAB)

ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัมนำไปใส่ในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 %ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในถุงสเตอร์ไลต์ นำไปตีด้วยเครื่อง Stomacher ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวจะได้สารละลายตัวอย่าง 1:10 จากนั้นทำการเจือจางต่อแบบ 10 fold dilution จนได้ความเจือจาง $1:10^2$ จนถึง $1:10^6$ โดยดูดสารละลายจากถุงสเตอร์ไรต์มา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 0.85 % อยู่ 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางต่อจนได้ความเจือจางในระดับ $1:10^6$ ใช้ปิเปตดูดสารจาก ทุกระดับความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในเพลตที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + $CaCO_3$ 0.5 % ทำการ Spread plateนำ plate ที่ทำการ spread plate แล้วไปบ่มใน Candle jar เก็บในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับเชื้อโดยตรวจนับโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี

5. วิเคราะห์โดยตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมโดยใช้วิธี salmosyst

ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม

↓

ใส่ลงใน salmosyst broth base(SB) 225 มล.

↓

นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา6-8 ชม.

↓

จากนั้นถ่ายเชื้อจาก(SB) 10มล.ลงในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

↓

ทำการเติมSalmosyst seletive supplement tablet (SBST)1เม็ด

↓

ทำการเขย่าให้เม็ด SBST ละลายใน SB ให้หมด

↓

บ่มหลอดที่มี SBST+SB ที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา18-24 ชม.

↓

นำไปเขี่ยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง XLD agar และ Rambach agar

↓

บ่มเชื้อที่ที่อุณหภูมิ35-37°C เป็นเวลา18-24 ชม.

↓

จากนั้นนำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นซัลโมเนลลาทดสอบทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางเซโรโลยี

↓

ส่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจเพื่อหาเซโรไทป์ของซัลโมเนลลา

รูปที่ 3.1 วิเคราะห์โดยตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมโดยใช้วิธี salmosyst

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6 การวิเคราะห์การยอมรับของผู้บริโภคทางด้านประสาทสัมผัส

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 70 คนดำเนินการทดสอบโดยใช้การทดลองแบบ (RCBD) โดยการทดสอบผู้ชิมประเมินผลในด้าน สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ 5 = ชอบมากที่สุด และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติใช้ตาราง(ANOVA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
97026

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นและการทำแห้งที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลา

4.1.1 ค่าพีเอชและเปอร์เซนต์กรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

การทดลองที่ผลิตแหนมโดยใช้การเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณกรดแลคติกและค่าพีเอช(ตารางที่ 4.1 และรูปที่4.1,4.2) พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นจะให้กรดในปริมาณที่สูงกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อเมื่อหมักครบ 3 วันทั้งนี้เนื่องมาจากว่าการเติมกล้าเชื้อในตอนเริ่มต้นการหมักนั้นทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนจากคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกจากกระบวนการหมัก และถ้าแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในปริมาณมาก ทำให้ผลิตกรดแลคติกในปริมาณมากขึ้นด้วย จึงจะส่งผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลงอย่างรวดเร็วกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อในช่วงระหว่างการหมัก 3 วัน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ ไปผ่านการอบแห้ง พบว่าค่าพีเอชสูงขึ้นเล็กน้อยทั้งในแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อ เนื่อง จากแหนม เมื่อผ่านการอบแห้งเนื้อสัมผัสของแหนมจะแข็งขึ้น การที่น้ำซึมเข้าเนื้อของแหนมจะไม่ดีเท่าตอนก่อนอบ ปริมาณกรดในเนื้อจะออกมาน้อยลง จึงจะทำให้ค่าพีเอชวัดได้ค่าที่สูงขึ้น สำหรับค่าปริมาณกรด ที่สูงขึ้น หลังการอบนี้ เนื่องจากหลังการอบแห้งจะมีปริมาณเนื้อสารมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการอบแห้งเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างที่เท่ากัน จึงได้ตัวอย่างที่ปริมาณกรดมากกว่าในน้ำหนักที่เท่ากัน เมื่อทำการ ไตเตรทจึงทำให้ มีกรดทำปฏิกิริยากับด่างมากขึ้น จึงทำให้เปอร์เซ็นต์กรดมีค่าสูงมากขึ้น

การอบแห้งของตัวอย่างแหนมที่ใช้เวลาอบแห้งมากขึ้น จะทำให้มีการระเหยของน้ำมากขึ้น ซึ่งยิ่งจะทำให้ผลของปริมาณกรดที่น้ำหนักแหนมที่นำมาตรวจสอบในน้ำหนักเดียวกันมากขึ้นตามไปด้วย แต่สำหรับค่าพีเอชนั้นจะไม่แตกต่างกันมาก ดังแสดงในผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 1 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าพีเอช และ เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ระยะเวลาในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	pH		% กรด	
	ธรรมชาติ	536	ธรรมชาติ	536
หมัก 0 วัน	6.19	6.14	0.40	0.40
หมัก 3 วัน	4.68	4.50	1.20	1.35
อบแห้ง 2 ชั่วโมง	4.70	4.51	1.30	1.40
อบแห้ง 4 ชั่วโมง	4.73	4.57	1.42	1.54
อบแห้ง 6 ชั่วโมง	4.80	4.68	1.48	1.75
อบแห้ง 8 ชั่วโมง	4.85	4.70	1.55	1.81

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

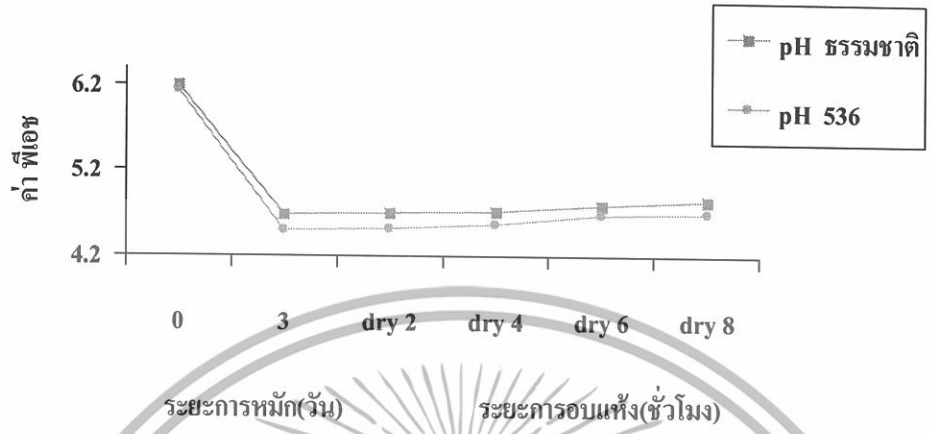
536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6cfu/กรัม

รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซนต์กรดแลคติกช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6cfu/กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/กรัม

4.1.2 ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคทิวิตี้ ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง(ตารางที่4.2 และรูปที่4.3) พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อผลไม่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะอยู่ในช่วงการหมักก่อนอบแห้ง และหลังการอบแห้งครบ 8 ชั่งโมง เนื่องจากไส้ที่บรรจุเป็นพลาสติกที่ยอมให้อากาศและน้ำผ่านเข้าออกได้ เมื่อนำผลิตภัณฑ์หมักที่ได้แล้วมาอบแห้ง โดยนำออกจากถุงสุญญากาศ แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อผลไม่แตกต่างกัน ที่ระยะเวลาอบแห้งเท่ากัน การอบแห้งที่นานขึ้นทำให้น้ำในผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง ซึ่งค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ที่อบแห้งนาน 8 ชั่งโมง มีค่า 0.940 ซึ่งลดลงจากตอนเริ่มต้นประมาณ 0.03

ซึ่งการใช้ไส้บรรจุแบบที่ยอมให้น้ำและอากาศผ่านได้นี้ ซึ่งเหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาอบแห้ง เพราะ สามารถนำเข้าอบได้เลยโดยไม่ต้องแกะผลิตภัณฑ์ออกจากไส้บรรจุอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนระหว่าง การผลิต ซึ่งจะแสดงในผลการวิเคราะห์ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

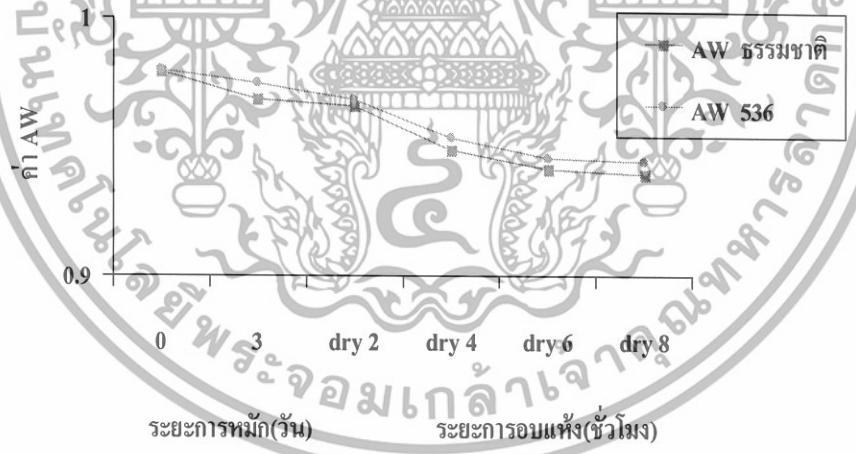
21058

ตารางที่ 4. 2 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ระยะเวลาในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	ธรรมชาติ	536
หมัก 0 วัน	0.979	0.980
หมัก 3 วัน	0.969	0.975
อบแห้ง 2 ชั่วโมง	0.966	0.969
อบแห้ง 4 ชั่วโมง	0.949	0.954
อบแห้ง 6 ชั่วโมง	0.942	0.946
อบแห้ง 8 ชั่วโมง	0.940	0.945

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/กรัม



รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ช่วงระยะเวลาต่างๆในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/กรัม

หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการวิเคราะห์การหลงเหลือของเชื้อ Lactic acid Bacteria (LAB)

จากผลการตรวจนับปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่หลงเหลืออยู่ในช่วงต่างๆในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง พบว่า การอบแหนมโดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมงก็ยังคงตรวจพบแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ระดับความเจือจางในระดับ $1:10^6$ หลงเหลืออยู่ในปริมาณดังกล่าว(ตารางที่ 4.3) และยังพบว่าผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการใช้กล้าเชื้อจะมีการหลงเหลือของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในปริมาณที่มากกว่าแหนมกึ่งแห้งที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อในหน่วย cfu/กรัม จากการทดลองดังกล่าว ทำการเลือกโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มาทำการทดสอบ แอคติวิตี้แบคเทอริโอซิน ซึ่งปรากฏว่ายังคงมีการสร้างแบคเทอริโอซินเกิดขึ้น แม้ว่าแหนมจะผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมงก็ตาม ซึ่งผลของการอยู่รอดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เกิดขึ้นจากการทดลองนั้นจะทำให้ผู้บริโภคได้รับแบคทีเรียแลคติกเข้าไปด้วยซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

ตารางที่ 4. 3 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่พบของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ระยะเวลาในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	ธรรมชาติ	536
หมัก 0 วัน	$2x10^3$	$4x10^6$
หมัก 3 วัน	$1.1x10^9$	$1.4x10^9$
อบแห้ง 2 ชั่วโมง	$8.7x10^8$	$9.1x10^8$
อบแห้ง 4 ชั่วโมง	$4.7x10^8$	$7.4x10^8$
อบแห้ง 6 ชั่วโมง	$2.1x10^8$	$4.1x10^8$
อบแห้ง 8 ชั่วโมง	$3.0.x10^7$	$5.6x10^7$

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6cfu/กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการวิเคราะห์ซัลโมเนลลา(ตารางที่ 4.4) ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง พบว่าแหนมที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อในการหมักสามารถลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาได้ในวันที่ 3 ของการหมักที่ตรวจพบเชื้อเพียง 66.7 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อที่ยังตรวจพบอยู่ 100 เปอร์เซนต์ ในวันสุดท้ายของการหมักเมื่อดูค่าพีเอช ของแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อพบว่าจะมีค่าต่ำกว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติ เนื่องจากการเติมกล้าเชื้อลงในตอนเริ่มต้นของการหมัก จะทำให้แบคทีเรียแลคติกเพิ่มมากขึ้น สารต่างๆที่เชื้อสร้างขึ้นมาอาทิ เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ก็จะมีปริมาณมากขึ้นด้วย ซึ่งสารดังกล่าวจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อของซัลโมเนลลา จึงทำให้แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในจำนวนที่น้อยกว่า และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปทำการอบแห้งที่ระยะเวลาที่ต่างๆกัน คือ 2 , 4 , 6 และ 8 ชม. ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลา (ตารางที่ 4.5) พบว่า แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น เชื้อซัลโมเนลลา จะถูกทำลายได้ทั้งหมด ที่เวลา 4 ชั่วโมง ส่วนแหนมที่หมักตามธรรมชาติที่เวลา 4 ชั่วโมงยังเจอเชื้อซัลโมเนลลา เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ดังนั้นการอบแห้งที่อุณหภูมิดังกล่าวจึงสามารถทำลายเชื้อได้ และการใช้แบคทีเรียแลคติกรวมในระหว่างการผลิตจะส่งผลให้การลดลงของซัลโมเนลลาที่มีอยู่ ลดลงจนหมดในระยะเวลาที่สั้นกว่าแหนมที่ผลิตโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

ตารางที่ 4. 4 ผลการตรวจซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

ระยะเวลาในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	การตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา	
	ธรรมชาติ	536
หมัก 0 วัน	+	+
หมัก 3 วัน	+	+
อบแห้ง 2 ชั่วโมง	+	+
อบแห้ง 4 ชั่วโมง	+	-
อบแห้ง 6 ชั่วโมง	-	-
อบแห้ง 8 ชั่วโมง	-	-

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 5 ผลการลดลงของซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมกึ่งแห้ง

ระยะเวลาในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ	การตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา			
		ธรรมชาติ		536	
		จำนวน	เปอร์เซ็นต์	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
หมัก 0 วัน	3	3	100	3	100
หมัก 3 วัน	3	3	100	2	66.7
อบแห้ง 2 ชั่วโมง	3	2	66.7	1	33.4
อบแห้ง 4 ชั่วโมง	3	1	33.4	0	0
อบแห้ง 6 ชั่วโมง	3	0	0	0	0
อบแห้ง 8 ชั่วโมง	3	0	0	0	0

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/กรัม

4.1.5 ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการทดสอบการอบแห้งที่หมักแหนมครบ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 , 4 , 6 และ 8 ชั่วโมง(ตารางที่ 4.6)ซึ่งพบว่าหลังอบที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะมีรูปร่างลักษณะที่เหมาะสมที่สุด อีกทั้งยังปลอดภัยจากเชื้อก่อโรคอย่างซัลโมเนลลา จึงนำแหนมที่ผ่านการอบแห้งดังกล่าวไปทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบ 70 คน ให้คะแนนความชอบ 5 ระดับ ในด้าน สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม พบว่าผู้บริโภคให้คะแนน สี และความเปรี้ยว ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยให้คะแนนในสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อมากกว่า เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อในการหมักทำให้ความเปรี้ยวที่มากกว่าการไม่เติมกล้าเชื้อและสีก็จะดูอ่อนกว่า ส่วนกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม พบว่าทั้งแหนมที่ผลิตแบบธรรมชาติ และเติมกล้าเชื้อไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 6 ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ตัวอย่าง	คะแนน±ค่าเบี่ยงแบนมาตราฐาน				
	สี	กลิ่นรส^{ns}	ความเปรี้ยว	เนื้อสัมผัส^{ns}	การยอมรับโดยรวม^{ns}
ธรรมชาติ	3.2±0.8^{b}	3.2±0.8	3.3±0.8^{b}	3.2±0.8	3.4±0.7
536	3.4±0.8^{a}	3.4±0.9	3.6±0.8^{a}	3.1±0.8	3.5±0.8

หมายเหตุ ธรรมชาติ หมายถึง แหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ

536 หมายถึง แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 เริ่มต้นที่ 10^{6} cfu/กรัม

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

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

1. การทดลองที่ผลิตแหนมโดยใช้การเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นจะให้กรดในปริมาณที่สูงกว่าแหนมหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และส่งผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลงอย่างรวดเร็วในช่วงระหว่างการหมักครบ 3 วัน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ ไปผ่านการอบแห้งเป็นเวลารวม 8 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชสูงขึ้นเล็กน้อยทั้งในแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ส่วนปริมาณเปอร์เซนต์กรดก็จะเริ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อจะสูงขึ้นในปริมาณที่มากกว่า

2. แหนมที่ผลิตโดยมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและแหนมที่หมักตามสภาวะธรรมชาติ เมื่อนำมาทำการตรวจหาจำนวนของเชื้อ ซัลโมเนลลา พบว่าแหนมที่หมักตามสภาวะธรรมชาตินั้นตรวจพบเชื้อมากกว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ และเมื่อนำแหนมที่หมักครบ 3 วันไปอบแห้งแล้วนำมาตรวจหาจำนวนเชื้อซัลโมเนลลา พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นเชื้อซัลโมเนลลาจะถูกทำลายทั้งหมดที่เวลา 4 ชั่วโมง ส่วนแหนมที่หมักตามธรรมชาติที่เวลา 4 ชั่วโมงยังเจอเชื้อซัลโมเนลลา เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย

3. จากการศึกษาการหลงเหลือของเชื้อแบคทีเรียแลคติกหลังการผลิตแบบกึ่งแห้งพบว่าแหนมที่มีการใช้กล้าเชื้อยังปรากฏเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภคผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

4. จากการศึกษาการใช้กล้าเชื้อแลคติกเริ่มต้น และการทำแห้งของผลิตภัณฑ์แหนมในการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อมากกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อในด้าน สี และ ความเปรี้ยว ส่วนลักษณะอื่น เช่น เนื้อสัมผัส กลิ่นรส การยอมรับโดยรวม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. จากการศึกษาวิจัยขั้นตอนและกรรมวิธีต่างๆที่ใช้ในการผลิตแหนมกึ่งแห้ง ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งให้โรงงานผลิตแหนมสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เป็นแหนมกึ่งแห้งแบบนวัตกรรมใหม่ให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และจะสามารถช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาล้นตลาด และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคจากเชื้อซัลโมเนลลามากกว่าแหนมที่ผลิตแบบดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บุษกร อุตรภิชาติ และมาณี แก้วชนิต . 2542 . “การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักอาหารหมัก พื้นบ้านไทยเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางชนิด” ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยทักษิณ

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

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยใช้เป็นกล้าเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก บัณฑิตวิทยาลัย โท. มหาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ไพโรจน์ วิริยะจารี. 2537 . “โครงการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์แหนม” สถาบันวิจัยพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ไพโรจน์ วิริยะจารี. 2541 . “การพัฒนากระบวนการผลิตแหนมที่ใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม(แหนมไบโอเทค)” กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์

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

เรณู ทวิชาติวิทยากุล. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Salmonella typhimurium*และ*Samonella anatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ

สมบุญ เตชะกิญญาวัฒน์. 2518. “การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำแหนม.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

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

ศิพัฒน์ รักษ์เผ่า. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2543. ตำรับอาหารแหนม: เอกลักษณ์ไทย. มหาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. “ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซัลโมเนลลา. การประชุมวิชาการครั้งที่34 มหาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272-279.เกษตรศาสตร์. 272-279.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัตน์. 2543. ประโยชน์ของงานวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักดองประเภทเนื้อของไทย. เอกสารประกอบการประชุมระดมความคิดเรื่อง " การยกระดับคุณภาพแหนมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ". สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

อดิศร เสวตวิวัตน์ วราวุฒิ ครูส่ง ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2548. เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก. (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวารสารเกษตรพระจอมเกล้าปี 2548)

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. "การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงในการหมักแหนม" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย , มหาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

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

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

Dessaet, S. R., and R. Steenson. 1995. Biotechnology of dairy *Leuconostoc*, pp. 655-698. In Y. H. Hui and G. G. Khachatouriam (eds.). VCH. Publishers, Inc., U.S.A.

Dick, L. M., T.E. Dellaglio and M.D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc* as *Ocnococuss oeni*. (corring). Int. Syst. Bacteriol. 2nd ed.

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

Geoffrey , C. P. 1987. Fermentation Foods of the World : A Dictionary and Guide Butterworth, London. pp. 9-13, 141.

Hammes, W. P. and R. F. Vogel. 1998. The genus of *Lactobacillus*, pp. 55-124. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel(eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Hardie, M. and R.A. Whiley. 1995 . The genus of *Lactobacillus,* pp. 15-124. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel(eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Harrigan, W. F. 1998. Laboratory Method in Food Microbiology. 3rd ed. Academic Press, New York. pp. 346-348.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Jay,M. J. 1996. Modern Food Microbiology. 5th ed. International Thomson Publishing, Newyork. Pp. 110-113.

Kuleasan, H. and ML. Cakmakci.2002. "Effect of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on The surface of sausages to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.*" Nahrung.46(6): 322-330

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

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

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

Rekhif, N., A. Atrih., and G. Lefebvre. 1995 . " Activity of plataricin SA6, a bacteriosin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausages". J. Appl. Bacteriology

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

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

Schillinger, K. H. and W. Ludwing. 1995. Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria , pp. 7-19. In B. .J. B. Wood and Wood W. H. Holzapfel (eds). The Genera of Lacid Acid Bacteria. 2th ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

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

Simpson, W. J and H. Taguchi. 1995. The genus *Pediococus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, pp. 125-164. . In B. .J. B. Wood and Wood W. H. Holzapfel (eds). The Genera of Lacid Acid Bacteria. 2th ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Stiles,M.E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Swetwiwathana , A., N. Lotong, , J.Nakayama, and K. Sonomoto. 2004. Effect of garlic and Nitrite in Pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth *Salmonella anatum* is stimulated nham fermentation .Proceeding of the 1th KMITL International Conference on Intergration of Science and Technology Sustainable Development Ausgust 25-26 2004. Bangkok, Thailand

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

Varnam, H. A. and P. J. Sutberland. 1995 Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology. Champman & Hall, New York. pp. 315-332.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก1. Salmosyst Broth Base

Peptone from casein	5.0 กรัม
Peptone from meat	5.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Calcium carbonate	10.0 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายสารประกอบโดยรวม 25 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ก2. Salmosyst Selective Supplement

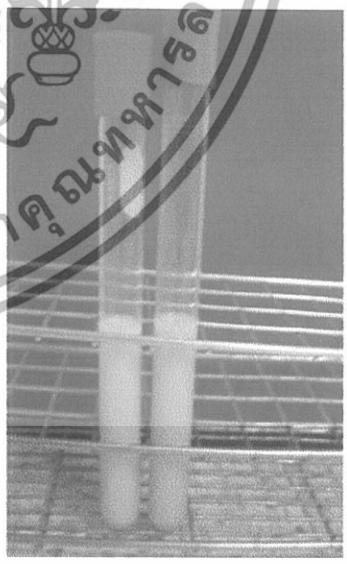
Potassium tetrathionate	0.2 กรัม
OX bile	0.08 กรัม
Brillant green	

Preliminary Enrichment

ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ใส่ลงใน Salmosyst Broth Base(SB) ที่เตรียมไว้ 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6-8 ชั่วโมง

Selective Enrichment

ดูดสารละลาย Preliminary Enrichment มา 10 มิลลิลิตร เติม Salmosyst seletive supplement tablet (SBST)1เม็ด เขย่า 30 นาที นำไปบ่มที่ 35- 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจในขั้นตอน selective plating ต่อไป



รูปที่ 1 ก1 Salmosyst Broth Base ที่มีการเติม Salmosyst seletive supplement tablet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 Rambach agar

Peptone	8.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Sodium deoxychlolate	1.0 กรัม
Chromogenic	1.5 กรัม
Proplylene glycol	10.5 กรัม
agar-agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด ปรับ pH 7.3 ± 0.2

รูปที่ ก2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar หลังมีการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 Xylose-Lysin-Desoxycholate (XLD) agar

Yeast extract	3.0 กรัม
Sodium choride	5.0 กรัม
D(+)xylose	3.5 กรัม
Lactose	7.5 กรัม
Sucrose	7.5 กรัม
Lysine	5.0 กรัม
Sodium deoxychlolate	2.5 กรัม
Sodium thiosulfate	6.8 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.8 กรัม
Phenol red	0.08 กรัม
agar-agar	13.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด ปรับ pH 7.4 ± 0.2

โคโลนีของเชื้อ Salmonella

รูปที่ ก3 อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar หลังมีการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.5 Triple Sugar Iron (TSI) agar slant

Peptone from casein	15.0 กรัม
Peptone from meat	5.0 กรัม
Meat extract	3.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Lactose	10.0 กรัม
Sucrose	10.0 กรัม
D(+)glucose	1.0 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.5 กรัม
Sodium thiosulfate	0.5 กรัม
Phenol red	0.024 กรัม
agar-agar	12.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ก6. Lysine-Indole-Motility (LIM) medium

Peptone from meat	5.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
D(+)glucose	1.0 กรัม
L-lysine monohydrochloride	10.0 กรัม
Sodium thiosulfate	0.04 กรัม
Ammonium iron(III) citrate	0.5 กรัม
Bromocresol purple	0.02 กรัม
agar-agar	12.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

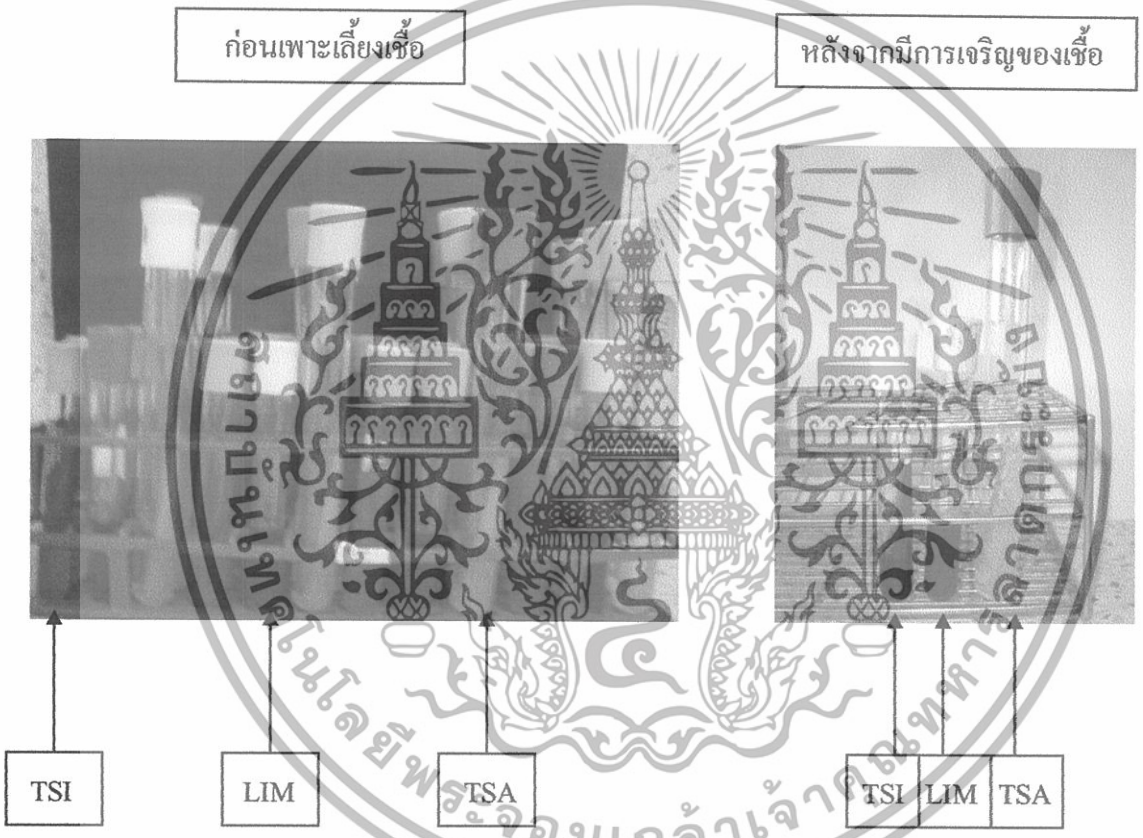
ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก7. Trypticase soy agar (TSA)

Peptone from casein	15.0 กรัม
Peptone from soymeal	5.0 กรัม
Sodium choride	5.0 กรัม
agar-agar	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที



รูปที่ ก4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี ก่อนและหลังการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก8.MRS Agar

Proteose peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Soxbitan monooleate complex	1.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.1 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
Disodium phosphate	2.0 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อ 118 องศาเซลเซียส 15 นาที

รูปที่ ก5 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก9.MRS Broth

Proteose peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Soxbitan monooleate complex	1.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.1 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
Disodium phosphate	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อ 118 องศาเซลเซียส 15 นาที

รูปที่ ก6 ลักษณะเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข1. วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีตัวอย่างแหนม

1.1 . วิเคราะห์หาปริมาณกรด แลคติก (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

ชั่งตัวอย่างแหนม 3 กรัม บดให้ละเอียดเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO_2 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองนำน้ำใสที่ได้เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2 -3 หยดไตเตรทด้วยสารละลายด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1NaOH จนกระทั่งถึงจุด end point เกิดสีชมพูคำนวณหาปริมาณกรดแลคติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1,000 \times \text{กรัมของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

1.2 . การวัดค่าพีเอช (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

นำตัวอย่างแหนม 20 กรัม มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันวัดด้วยเครื่องวัด pH meter

ข2. วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของแหนม

2.1 การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้

โดยใช้เครื่อง NOVASINA EEJA-3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

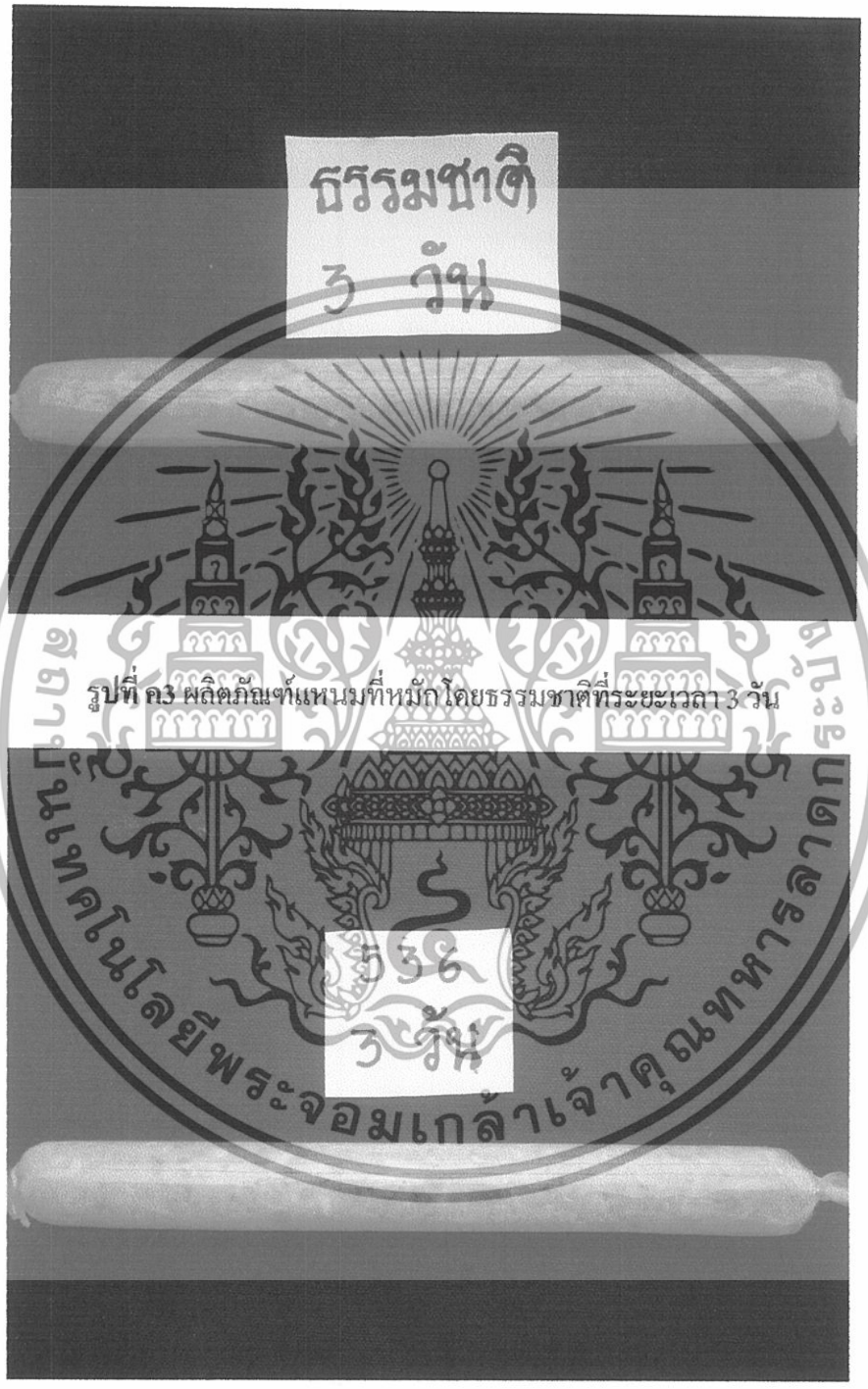
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของแหนมที่หมักตามธรรมชาติและเติมกล้าเชื้อที่การหมักในช่วงต่างๆ

รูปที่ ค1 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 0 วัน

รูปที่ ค2 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 0 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค3 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 3 วัน

รูปที่ ค4 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค5 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

รูปที่ ค6 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค7 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

รูปที่ ค8 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค9 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

รูปที่ ค10 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค11 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง

รูปที่ ค12 ผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้