หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาภาวะของอุณหภูมิและสมบัติทางเคมีบางประการที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักหม้ำ

(Study on the temperature profile and some chemical properties during process of traditional Thai fermented beef sausage (Mum))

จัดทำโดย

นางสาวพิมพา สุพรรณโกมุท รหัสนักศึกษา 45040211

นางสาวรุจิรา จันทะโคตร์ รหัสนักศึกษา 45040219

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 31/ม.ค./49 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21059

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาภาวะของอุณหภูมิและสมบัติทางเคมีบางประการที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักหม้ำ

(Study on the temperature profile and some chemical properties during process of traditional Thai fermented beef sausage (Mum))

โดย

นางสาวพิมพา สุพรรณโคมุท รหัสนักศึกษา 45040211

นางสาวรุจิรา จันทะโคตร์ รหัสนักศึกษา 45040219

T096594

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ปพ.
W722ก
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิมพา สุพรรณโกมุท และรุจิรา จันทะโคตร์. 2548 :การศึกษาภาวะของอุณหภูมิและสมบัติทางเคมีบางประการที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักหม้า (Study on the temperature profile and some chemical properties during process of traditional Thai fermented beef sausage (Mum)). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์

จากการศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์ *Pediococcus pentosaceus* ในการหมักหม้าเปรียบเทียบกับการหมักหม้าโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยทำการผลิตหม้าจากสูตรพื้นบ้านและใช้สถานที่ผลิตแบบครัวเรือนซึ่งเป็นร้านครัวแม่คำพอง อ.เมือง จ.ขอนแก่น เป็นเวลา 28 วัน พบว่า จากการหมักทั้งสองวิธีมีอุณหภูมิในระหว่างการหมักไม่แตกต่างกัน โดยมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25.5-31.5 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิเฉลี่ยที่ 28 องศาเซลเซียส ค่าA_wในระหว่างการหมักไม่เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันมากนัก โดยวิธีการหมักที่เติมกล้าเชื้อและวิธีหมักธรรมชาติในวันเริ่มต้นของการหมักมีความชื้น72.82% และ 71.50% แล้วลดลงเหลือ 16.45% และ 19.70% ตามลำดับ ค่า Aw เท่ากันคือ0.940 แล้วลดลงเหลือ 0.590 และ 0.617 ตามลำดับ ปริมาณกรดแลคติกเริ่มต้นในหม้าที่เติมกล้าเชื้อเท่ากับ 1.78 % หม้าแห้ง และหม้าที่หมักธรรมชาติมีค่าเท่ากับ 1.76 % หม้าแห้ง ซึ่งจะมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 5 คือ 3.36% และ 3.11 % หม้าแห้ง ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงค่า pH เริ่มต้นจะมีค่าใกล้เคียงกัน คือ ค่า pH ทั้งจากวิธีที่เติมกล้าเชื้อและวิธีที่หมักธรรมชาติเท่ากับ 5.75 และ 5.73 แล้วจะลดลงต่ำสุดในวันที่ 5 คือ 3.97 และ 4.7 ตามลำดับ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในช่วงเริ่มต้นจะมีแบคทีเรียแลคติกในสูตรที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อเท่ากับ4.83 x 10^7 cfu/g ส่วนหม้าที่ทำการหมักโดยวิธีธรรมชาติมีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 3.34 x 10^5 cfu/g และในวันที่ 3 ของการหมักจะมีปริมาณมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.57 x 10^{11}cfu/g และ 7.95 x 10^{14}cfu/g ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียแลคติคจะเริ่มลดลง เมื่อทำการหมักจนถึงวันที่ 28 จะมีแบคทีเรียแลคติกคงเหลือเท่ากับ 5.45 x 10^2และ 2.18 x 10^3 cfu/g ตามลำดับ

พิมพา สุพรรณโกมุท
รุจิรา จันทะโคตร์ .... 3 พ.ค 49

ลายเซ็นต์นักศึกษา ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษา วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีการศึกษา 2548 ทางคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ ผศ. เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยการให้คำแนะนำคำปรึกษา รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนทำให้รูปเล่มปัญหาพิเศษสมบูรณ์ยิ่งขึ้นและสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่นักศึกษาปริญญาโท โดยเฉพาะพี่ตั้มที่พาไปทำปัญหาพิเศษที่ขอนแก่นและคอยให้คำแนะนำต่างๆ พี่นกที่สอนวิธีใช้ data logger ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการยืมอุปกรณ์และสารเคมี ที่สำคัญขอขอบคุณ คุณขวัญนภาภรณ์ พรมทองมี ที่กรุณาสาธิตการผลิตหม้ำ

และสุดท้ายผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้ปกครอง ที่เป็นห่วงใยและเป็นกำลังใจ รวมทั้งสนับสนุนการศึกษาเล่าเรียนตลอดมา

ขอขอบพระคุณ
คณะผู้จัดทำ
เมษายน 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	2
2.2 ชนิดของไส้กรอกหมัก	3
2.3 กรรมวิธีการหมักไส้กรอก	4
2.4 หมัก	5
2.5 คุณสมบัติของส่วนประกอบในการผลิตหมัก	6
2.6 เชื้อแบคทีเรียแลคติก	9
2.7 การสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก	13
2.8 การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของแบคทีเรียแลคติก	13
2.9 การสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติก	14
2.10 การสร้างกลิ่นรสของแบคทีเรียแลคติก	14
2.11 ประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ประเภทเนื้อสัตว์	16
2.12 กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักอาหารประเภทเนื้อ	17
2.13 ประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการผลิตเนื้อหมัก	20
2.14 สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	24
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ	24
3.2 วัตถุดิบ	24
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการทดลอง	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางด้านเคมี	41
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา	43
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	45
ภาคผนวก ง ข้อมูลจากการทดลอง	47
ภาคผนวก จ รูปภาพ	53
ประวัติผู้เขียน	56

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติกสกุลต่างๆ 15

ตารางที่ 2 ตัวอย่างกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 18

ตารางที่ 3 ปริมาณส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตหม้ำ 25

ภาคผนวก

ตาราง ง1 อุณหภูมิในการหมักหม้ำเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยทำการบันทึกทุก ๆ 4 ชั่วโมง 48

ตาราง ง2 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 51

ตาราง ง3 การเปลี่ยนแปลงของค่าWater activity ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 51

ตาราง ง4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 51

ตาราง ง5 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 52

ตาราง ง6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้ำเป็นระยะเวลา 28 วัน 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในของหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 27

ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 28

ภาพที่ 4.3 การลดลงของค่า A_w ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 28

ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 29

ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติกในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 30

ภาพที่ 4.2 การลดลงของปริมาณความชื้นในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน 31

ภาคผนวก

ภาพที่ ง1 แสดงร้านค้าที่มีการจำหน่ายหม้ำในจังหวัดขอนแก่น 54

ภาพที่ ง2 แสดงหม้ำที่ทำการผลิตเสร็จพร้อมสำหรับการนำไปหมัก 54

ภาพที่ ง3 แสดงการแขวนหมักหม้ำที่อุณหภูมิห้อง 54

ภาพที่ ง4 แสดงอุปกรณ์ Data logger ที่ใช้ในการบันทึกอุณหภูมิระหว่างการหมักหม้ำ 55

ภาพที่ ง5 แสดงอุปกรณ์เชื่อมต่อคอมพิวเตอร์ของ Data logger 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

หม้ำเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักพื้นบ้านของไทย พบการผลิตและจำหน่ายในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี ร้อยเอ็ด มหาสารคาม เป็นต้น โดยส่วนประกอบในการทำหม้ำจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ซึ่งได้แก่ เนื้อวัวบด เครื่องในวัว ข้าวคั่ว ข้าวเจ้าหุงสุก ข้าวเหนียวนึ่ง กระเทียม ตะไคร้ เกลือ ผงชูรสและเครื่องปรุงรสอื่น ๆ นำส่วนประกอบทั้งหมดมานวดผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุในไส้สุดหรือกระเพาะปัสสาวะของหมูหรือวัว จากนั้นนำไปตากแดดจัด 1 วันให้ผิวด้านนอกแห้งแล้วจึงนำไปแขวนหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 วัน จะได้หม้ำที่มีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวและสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน เมื่อจะรับประทานควรนำมาทำให้สุกโดยการปิ้ง ย่าง อบ นึ่ง ลวกน้ำร้อนหรือนำไปประกอบอาหารอื่น ๆ

ในการผลิตหม้ำส่วนใหญ่มักจะทำเพื่อการบริโภคในครัวเรือนหรือเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากและต้นทุนการผลิตไม่สูงเนื่องจากยังไม่มีการใช้อุปกรณ์และเทคโนโลยีในการผลิต

การศึกษาสภาวะการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ คุณสมบัติทางเคมีและปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในระหว่างการหมักหม้ำทั้งจากวิธีการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์และการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ทำให้สามารถนำความรู้มาปรับปรุงกระบวนการผลิตหรือปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการหมัก ทำให้สามารถลดเวลาในการหมัก ยืดอายุในการเก็บรักษา และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอเป็นมาตรฐานเดียวกัน ทำให้สามารถผลิตหม้ำในระดับอุตสาหกรรมได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์ในการหมักหม้ำเปรียบเทียบกับการหมักหม้ำ โดยเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมักหม้ำที่มีผลต่อจุลินทรีย์
3. ศึกษาสมบัติทางเคมีบางประการของหม้ำในระหว่างการหมัก
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนากระบวนการผลิตให้มีมาตรฐานมากขึ้น
2. ลดระยะเวลาในการหมักของผลิตภัณฑ์และมีคุณภาพสม่ำเสมอ
3. สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้ได้รับการไว้วางใจในความปลอดภัยจากผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ จัดเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งความปลอดภัยและอายุของผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับเทคนิคที่ใช้ในการถนอมรักษาเนื้อสัตว์ภายหลังจากการชำแหละ ความสำเร็จในการถนอมรักษาอาหาร (preservation) เป็นผลมาจากการใช้วิธีการเดียวหรืออาจใช้หลายวิธีการร่วมกัน เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นแหล่งอาหารที่มีองค์ประกอบที่สำคัญหลายอย่าง ได้แก่ โปรตีน วิตามินและเกลือแร่ องค์ประกอบของไขมัน กรดไขมันอิ่มตัว คลอเรสเตอรอล เกลือ เนื้อสัตว์จึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ในหลายประเทศ การบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์มีอิทธิพลจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ดึงดูดความสนใจ คุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส ความปลอดภัย ราคา ความสะดวกในการบริโภค และสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องมีการบ่มในระหว่างการผลิตเพื่อให้เกิดกิจกรรมที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ และมีการสร้างสารที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติเฉพาะตัว แม้ว่าโดยทั่วไปจะมีความเชื่อว่าจุลินทรีย์เป็นสิ่งที่ทำความเสียหายในกระบวนการแปรรูปผลิตเนื้อสัตว์ ดังนั้น การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จึงต้องมีการควบคุมกิจกรรมและปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อไม่ให้ผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหาย(Pearson and Dutson,1986) ลักษณะจำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกิดขึ้นจากการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เกิดจากการผสมส่วนของเนื้อสัตว์ ไขมันเข้ากับเกลือ คิวริ่งเอเจนต์ (curing agent) น้ำตาลและเครื่องเทศ จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาบรรจุลงในภาชนะและปล่อยให้เกิดการหมัก โดยผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เรียกว่า ไส้กรอกหมัก (fermented sausage)(Lucke,1985)

ตามประวัติศาสตร์ มนุษย์ได้เรียนรู้ว่าการเติมเกลือและน้ำตาลลงในเนื้อบดและปล่อยไว้ช่วงระยะเวลาหนึ่ง พบว่ามีการถนอมเนื้อสัตว์เกิดขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติเป็นที่ยอมรับต่อการบริโภค ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆในการถนอมรักษาอาหาร และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกันไปในเรื่องของขนาด รูปร่าง เนื้อสัมผัสและรสชาติ โดยพบว่ารสชาติและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากปริมาณของเครื่องเทศ น้ำตาลและเกลือที่ใช้ในสูตรการผลิต อย่างไรก็ตามความคงตัวของผลิตภัณฑ์ตลอดจนคุณค่าทางโภชนาการของอาหารเหล่านี้ขึ้นอยู่กับการควบคุมเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติคโดยแบคทีเรีย ซึ่งมีชื่อเรียกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) (Hong and Pyun,1999)

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (fermented meat products) เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อีกประเภทหนึ่งที่ได้จากการนำเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น เนื้อแพะ เนื้อแกะ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อไก่ ที่ผ่านการบดให้ละเอียด นำมาคลุกเคล้าผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ได้แก่ เกลือบริโภค(โซเดียมคลอไรด์ ไนไตรท์-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนเตรท กระเทียม พริกไทย และเครื่องเทศอื่นๆ จนเข้ากันดี จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาบรรจุลงในภาชนะ ซึ่งอาจจะเป็นหลอดหรือถุงพลาสติก บางแห่งหุ้มทับด้วยใบตอง จากนั้นปล่อยไว้ให้เกิดการหมักจนผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสเปรี้ยว เพราะมีการสร้างกรดเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง เป็นที่เชื่อกันว่าผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีต้นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน แม้ว่าจะมีการผลิตมากในประเทศจีนและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ก็ตาม (Adams และ Moss,1995)

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนับว่ามีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีความหลากหลายทั้งรูปแบบและสูตรของการผลิตตามความนิยมในแต่ละภูมิภาค ทำให้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์เนื้อหมักซึ่งเป็นที่รู้จักและมีชื่อเสียง ได้แก่ แหนม หมูส้ม ไส้กรอกเปรี้ยว และหม้า โดยส่วนใหญ่แล้วผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีต้นกำเนิดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในสูตรการผลิตและรูปแบบของการบรรจุเป็นส่วนใหญ่

2.2 ชนิดของไส้กรอกหมัก

Varnam และ Sutberland(1995) กล่าวว่าไส้กรอกหมักแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือไส้กรอกหมักชนิดกึ่งแห้ง (semi – dry fermented sausages) และไส้กรอกหมักชนิดแห้ง (dry fermented sausage) โดยไส้กรอกหมักชนิดกึ่งแห้งเป็นไส้กรอกหมักที่มีระยะเวลาในการผลิตตั้งแต่ 3 วันจนถึง 4 สัปดาห์ มีความชื้นร้อยละ 30-42 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้(A_w ; water activity) 0.92-0.96 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น Teewurst, Frische Mettwurst, Summer sausage และThuringer เป็นต้น สำหรับไส้กรอกหมักแบบแห้งเป็นไส้กรอกหมักที่มีระยะเวลาในการผลิตตั้งแต่ 12-14 สัปดาห์ มีความชื้นร้อยละ 20-30 ค่า A_w 0.82-0.86 ตัวอย่างเช่น Salami, Genoa, Saucisson และ Chorizo เป็นต้น สำหรับ Bacus (1984) กล่าวว่าไส้กรอกหมักแบบแห้งจะทำให้แห้งโดยเอาน้ำออกไป ร้อยละ 25-30 และมีสัดส่วนความชื้นต่อโปรตีนในผลิตภัณฑ์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 2.3:1 ส่วน ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้งจะทำให้แห้งโดยเอาน้ำออกไปร้อยละ 10-15 และต้องมีสัดส่วนของความชื้นต่อโปรตีนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน3.7:1

ในประเทศไทยไส้กรอกหมักที่ผลิตจำหน่ายและบริโภคกันทั่วไป ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยวโดยแหนมมีความชื้นร้อยละ 63.93-67.60 ไส้กรอกเปรี้ยวร้อยละ 31.48-38.49 ตามลำดับ ส่วนหม้า มีความชื้นร้อยละ 33.82-74.65 จึงจัดเป็นไส้กรอกหมักชนิดกึ่งแห้ง และมีระยะเวลาในการผลิต 2-5 วัน (Wongkhalaung และ Boonyaratanakornkit,1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กรรมวิธีการหมักไส้กรอก

Jay (1996) ได้กล่าวถึงการผลิตไส้กรอกโดยทั่วไปว่า พบได้สองลักษณะ คือ การหมักตามสภาพธรรมชาติ(Natural fermentation) และการหมักโดยใช้กล้าเชื้อ (Fermentation with starter culture) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.3.1 การหมักตามสภาพธรรมชาติ

การหมักตามสภาพธรรมชาติ เป็นการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อในสูตรการผลิต เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำหน้าที่สร้างกรด ได้มาจากการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และส่วนผสมในการผลิต ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่พบมีจำนวนน้อย และยังพบแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการรวมอยู่ด้วย ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้แก่ *Micrococcus* การสร้างปริมาณกรดแลคติกในช่วงแรกของการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น เชื้อแบคทีเรียแลคติกจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงการหมักวันที่ 2-5 โดยจะพบจำนวนของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 10^6-10^8 โคโลนี/กรัม ค่าพีเอชที่ลดลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้เชื้อ *Pseudomonas* และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งที่ไวต่อกรดตายภายในเวลา 2-3 วัน แต่มีเชื้อบางชนิด เช่น *Salmonella* อาจจะทนอยู่ได้ จำนวนของแบคทีเรียแลคติกมีแนวโน้มที่จะลดลงหลังจากที่มีการสร้างกรดสูงสุด ในช่วงที่สองของการหมัก (15 วัน) อาจมีเชื้อราเกิดขึ้น การผลิตกรดและค่าพีเอชที่ลดลงเริ่มเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งระยะนี้เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S.aureus* และอาจมีการผลิตสารพิษเกิดขึ้น แบคทีเรียแลคติกที่พบตามสภาพธรรมชาติ ได้แก่ สกุล *Lactobacillus* ซึ่งส่วนมากที่พบจะเป็นสปีชีส์ *L.bavaricus*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. plantarum* และ *L. sake* โดยพบว่า *L. sake* มีความสำคัญต่อการหมักไส้กรอกมากที่สุดในสกุล Lactobacillus ทั้งหมด

กลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่พบรองจาก Lactobacillus คือสกุล Pediococcus ได้แก่ *P. damnosus*, *P. acidilactici* และ *P.pentosaceus* ส่วน *Leuconostoc* พบจำนวนน้อยและพบในไส้กรอกที่คุณภาพต่ำ (Varnam และ Sutberland,1995)

2.3.2 การหมักด้วยกล้าเชื้อ

การหมักไส้กรอกด้วยการเติมกล้าเชื้อของแบคทีเรียแลคติกลงในสูตรการผลิตมีความสำคัญเช่นเดียวกับการหมักตามสภาพธรรมชาติ ลักษณะของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกจะต้องมีคุณสมบัติตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ได้แก่ สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆที่พบในเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพ ต้องสร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณที่เพียงพอ ต้องทนต่อโซเดียมคลอไรด์และสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างน้อย 6 เปอร์เซ็นต์ ต้องทนต่อโซเดียมไนไตรท์ และสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์อย่างน้อย 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มที่มีวิถีการสร้างกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบ homefermentative ต้องไม่มีการย่อยสลายโปรตีน ต้องไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไป ควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างคะตาเลส (catalase negative) ควรมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทได้ดี เมื่อผลิตไส้กรอกไส้กรอกแล้วควรมีผลในการเพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์อันเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ไม่ควรมีการเติมสารไบโอจินิกเอมีน(biogenic amines) เพราะเป็นสารที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ไม่ควรมีการสร้างเมือกในผลิตภัณฑ์ มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรค และสุดท้ายควรมีความทนต่อสภาวะของการหมัก และสามารถทำงานร่วมกับกล้าเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี

2.4 หม้ำ(Mum)

หม้ำ (Mum) หรือ Thai fermented beef sausage เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดี โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะนิยมบริโภคมากที่สุด พบว่ามีการผลิตจำหน่ายมากในจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อุดรธานี ร้อยเอ็ด เป็นต้น โดยวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในการทำหม้ำจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ซึ่งได้แก่ เนื้อวัว เครื่องในสัตว์ ข้าวคั่ว ข้าวเจ้าหุงสุกหรือข้าวเหนียวนึ่ง กระเทียม ตะไคร้ และเกลือ แล้วนำมานวดผสมให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุในไส้หรือกระเพาะปัสสาวะของหมูหรือวัว นำไปผึ่งกลางแดด 1 วันเพื่อให้ผิวนอกแห้งแล้วจึงนำไปแขวนหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 วัน จะได้หม้ำที่มีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวและสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน เมื่อจะรับประทานต้องนำมาทำให้สุกโดยการปิ้ง ย่าง อบ นึ่ง หรือลวกน้ำร้อน

2.4.1 ชนิดของหม้ำ

หม้ำแบ่งตามภาชนะบรรจุได้เป็น 3 ชนิด (เยาวลักษณ์,2536) คือ

ก. หม้ำข้อ บรรจุในไส้หมูสด หรือไส้วัวสดที่ล้างสะอาดแล้วผูกมัดเป็นปล้องขนาด 4 ถึง 5 นิ้วผึ่งแดดรำไรให้ผิวนอกของไส้แห้ง แขวนผึ่งไว้ที่อุณหภูมิ 1-2 วัน จึงรับประทานได้ หม้ำข้อที่แห้งดีสามารถเก็บไว้รับประทานได้นาน

ข. หม้ำพก บรรจุในไส้สุดหรือไส้ตั่งของวัว มีขนาดใหญ่ น้ำหนัก 1-4 กิโลกรัมต่อพก แขวนผึ่งลมไว้ หม้ำจะเกิดการหมักให้รสเปรี้ยวภายใน 2-3 วัน หม้ำจะแห้งและน้ำหนักลดลงเรื่อยๆ หม้ำพกที่แห้งได้ที่พอเหมาะ สามารถเก็บไว้รับประทานได้นาน 1-3 เดือน โดยไม่เน่าเสียและความเปรี้ยวไม่เพิ่มมากขึ้น ความชื้นประมาณร้อยละ 30-40

ค. หม้ำหม้อ บรรจุในหม้อ มีราคาถูกที่สุด เนื่องจากมีการเติมปอดผสมรวมกับเนื้อ ม้ามและตับ บรรจุในหม้ออัดให้แน่น ตั้งหมักไว้ 1-2 วัน แล้วจึงนำมารับประทาน

หม้ำแบ่งตามวัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น 2 ชนิด คือ

ก. หม้ำเนื้อ ใช้เนื้อวัวเพียงอย่างเดียวผสมกับเครื่องปรุงอื่นๆ

ข. หม้ำเครื่องใน อาจใช้เครื่องในอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือหลายอย่างผสมกัน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตับ ปอด และม้าม หรือในบางท้องที่จะมีการใช้เนื้อวัวร่วมด้วย แต่สัดส่วนของเนื้อวัวจะน้อยกว่าเครื่องใน

ค. หม้ำเนื้อผสมเครื่องใน จะใช้เนื้อวัวร่วมกับเครื่องในต่างๆ โดยสัดส่วนของเนื้อวัวจะมากกว่าเครื่องใน

2.4.2 องค์ประกอบทางเคมีของหม้ำ

Wongkhalaung และ Boonyaratanakornkit(1986) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่จำหน่ายทางการค้า มีดังนี้

ความชื้น	ร้อยละ 33.82-74.65
โปรตีน	ร้อยละ 11.39-39.28
ไขมัน	ร้อยละ 1.40-4.50
เส้นใย	ร้อยละ 0.10-1.44
เถ้า	ร้อยละ 3.28-9.65
โซเดียมคลอไรด์	ร้อยละ 2.98-7.04
น้ำตาลอินเวอสร์(invert sugar)	ร้อยละ 0-11.74
กรดแลกติก	ร้อยละ 1.10-4.31
พีเอช (pH)	4.0-4.5

2.5 คุณสมบัติของส่วนประกอบในการผลิตหม้ำ

ส่วนประกอบในการผลิตหม้ำมีดังนี้คือ

2.5.1 เนื้อสัตว์

เนื้อที่ใช้ผลิตไส้กรอกหมักอาจใช้เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อแกะ หรือเนื้อไก่ ขึ้นกับชนิดของไส้กรอกหมักและท้องถิ่นที่ผลิต บางท้องถิ่นในแถบยุโรปตะวันตกพบว่ามีการใช้เนื้อลาและเนื้อม้าในการผลิตไส้กรอกอีกด้วย เนื้อที่ใช้จะต้องมีคุณภาพดี ไม่ปนเปื้อนเลือด มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อย เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นองค์ประกอบหลักของผลิตภัณฑ์ โดยมีการใช้อยู่ในช่วง 50-70 % อาจจะมีการใช้เนื้อพีเอสอี (PSE;pale soft exudative) ซึ่งเป็นเนื้อที่มีลักษณะสีซีดจางกว่าปกติ เนื้อสัมผัสนิ่มซึ่งจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์แห้งเร็วขึ้น แต่เนื้อดีเอฟดี (DFD; dark firm dry) ซึ่งเป็นเนื้อที่มีลักษณะสีเข้ม เนื้อสัมผัสแน่นและแห้ง ไม่เหมาะในการนำมาทำไส้กรอกหมักแบบแห้งเพราะจะทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียได้ง่าย (Varnam และ Sutberland,1995) สำหรับเนื้อส่วนที่นิยมใช้ทำหม้ำ คือ เนื้อส่วนโคนขา ซึ่งจะมีไขมันอยู่น้อยเพราะหม้ำต้องการเนื้อที่มีปริมาณไขมันต่ำ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคล้ายไส้กรอกแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2. คาร์โบไฮเดรต

การเติมคาร์โบไฮเดรตมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็วและผลิตกรดจำนวนมาก ส่งผลให้พีเอชในผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Staphylococcus aureus* โดยทั่วไปมักใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.4-0.8 (Varnam และ Sutberland,1995) คาร์โบไฮเดรตที่นิยมใช้ได้แก่ ซูโครส(sucrose) ทั้งฟอกสี และไม่ฟอกสี กลูโคส (glucose) แลกโตส(lactose) น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) และแป้งมันฝรั่ง (potato flour) ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่นิยมเติมลงในหม้าคือ

ก. ข้าวเหนียว - ข้าวเหนียวที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ไม่ได้เป็นการเติมลงไปเพื่อเพิ่มปริมาณ เนื่องจากแป้งของข้าวเหนียวที่ได้มีการทำให้สุกแล้วจึงเติมลงไปเพื่อเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ เพราะเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำเอาไปใช้ได้ง่ายกว่าแป้งที่ยังไม่ผ่านการทำให้สุกก่อน จากการรายงานของActon และคณะ(1977) ในการใช้ข้าวเหนียว หลังผ่านระยะการหมักแล้ว แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิด homofermentation คือจะให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียวได้ เมื่อคาร์โบไฮเดรตที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นแต่มีข้อเสียคือทำให้ระยะเวลาในการหมักยาวนานขึ้นด้วย

ข. ข้าวคั่ว - ข้าวคั่วที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์นั้นเพื่อให้ข้าวคั่วที่มีกลิ่นหอมไปลดกลิ่นคาวของเนื้อเป็นจุดหลัก ไม่เหมาะสำหรับการเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเนื่องจากแป้งข้าวจ้าวที่นำมาทำข้าวคั่วนั้นไม่ได้ผ่านการทำให้สุก(gelatinization)

2.5.3. เกลือแกง (NaCl)

เกลือแกงที่ใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 2.5 – 3.0 เพื่อให้มีระดับ A_w เริ่มต้นประมาณ 0.96 เกลือจะทำหน้าที่สกัดไมโอซิน (myosin) และโปรตีนอื่นๆที่ละลายได้ในเกลือออกมา ทำให้รอบๆอนุภาคของเนื้อมีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มเหนียวห่อหุ้มอยู่ และให้รสชาติกับผลิตภัณฑ์ รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก จึงเป็นการคัดเลือกจุลินทรีย์ทางหนึ่ง (Varnam และ Stuberland, 1995) แต่เกลือก็จะไปเร่งให้เกิดการหืนของไขมันเร็วขึ้น จึงเป็นการลดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั้งแบบสด แช่แข็ง ผ่านการหมัก และไม่ผ่านการหมัก (Kramlich,1960)

2.5.4. กระเทียม

ด้านคุณค่าทางอาหารของกระเทียม กระเทียมจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 29 % โปรตีน 5.6 % น้ำมันหอมระเหย 0.1 % นอกจากนั้นยังมีพวกแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก ไนอาซีน วิตามินบี1 วิตามินบี2 และวิตามินซี ในหัวกระเทียมจะมีสารประกอบกำมะถันชนิดหนึ่งคือ อัลลิอิน (Alliin) ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียร ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ แต่ถ้าถูกบดขยี้หรือเมื่อทุบหัวกระเทียมสารนี้จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อัลลิเนส ได้เป็นสารอัลลิซิน(allicin)และจะได้กลิ่นของกระเทียมที่รุนแรง ทั้งฉุนและเผ็ดของสาร odoriferous diallyl disulphide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเทียมมีคุณสมบัติทางด้านโภชนาการคือใช้เป็นเครื่องชูรสและกลิ่นในการปรุงอาหาร ส่วนทางยานั้นมีสรรพคุณที่หลากหลาย เช่น แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ป้องกันโรคหัวใจโดยลดระดับคอเลสเตอรอล ลดความดันโลหิต ป้องกันมะเร็ง ต้านเชื้อรา แก้อักเสบ ถึงจะใช้กระเทียมรักษาอาการเหล่านี้ให้หายไม่ได้แต่ก็สามารถบรรเทาอาการลงได้ และสามารถสร้างภูมิต้านทานโรคให้แก่ร่างกายได้

สำหรับในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักนั้นมีการเติมกระเทียมในปริมาณมากเพื่อช่วยดับกลิ่นคาวของเนื้อสัตว์หรืออาจใช้เป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสารต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในไส้กรอกหมัก

2.5.5.เกลือไนไตรท์ และเกลือไนเตรท

ใช้ในรูปของโซเดียมไนไตรท์หรือโปแตสเซียมไนไตรท์ และโซเดียมไนเตรทหรือโปแตสเซียมไนเตรท ซึ่งมีหน้าที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดง และรักษาสีแดงของผลิตภัณฑ์ไว้ ช่วยเพิ่มรสชาติแก่ผลิตภัณฑ์ ทำให้มีกลิ่นรสเฉพาะตัวเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และป้องกันการงอกของสปอร์แบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Clostiduim botulinum* นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการหืนของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยไปยับยั้งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของไขมัน (Goutefongea, 1992) ทางการค้าจะผสมไนไตรท์และไนเตรทกับเกลือแกงเพื่อสะดวกต่อการใช้ และมีชื่อทางการค้าว่า ผงเพรค(praque powder) กิตติวรรณ (2546) ได้รายงานว่าการเติมโซเดียมไนไตรท์ 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ โซเดียมแอสคอร์เบท 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งด้านลักษณะปรากฏและการยอมรับโดยรวม

2.5.6. เครื่องเทศ

เครื่องเทศที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักจะทำหน้าที่ในการให้กลิ่นรสและชูรส โดยเครื่องเทศสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่ช่วยชูรส (Stimulated hot spices) ได้แก่ พริกขี้หนู ขิง พริกไทยดำและขาว พริกสีแดงสด ผงมัสตาด กระเทียมและหัวหอม เป็นต้น กลุ่มที่สองเป็นเครื่องเทศหอม(Aromatic spices) ได้แก่ ยี่หร่า อบเชย กานพลู ลูกผักชี ดอกจันทร์ ลูกจันทร์ ลูกกระวาน โป๊ยกั๊ก เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สามเป็นประเภทใบและต้นผักต่างๆ (Herbs) ได้แก่ ใบโหระพา ใบกระวาน ใบโรสแมรี่(rosemary leaves) ใบสะระแหน่ ใบหูเสือ(sage) ตะไคร้ เป็นต้น (นงลักษณ์,2527;เยาวลักษณ์,2536)

2.5.7. การบรรจุในไส้หรือพิมพ์

ไส้ที่ใช้อาจเป็นไส้ธรรมชาติ(natural casing) เช่น ไส้จากหมู แกะ วัว ควาย นำมาล้างทำความสะอาด หรือไส้เทียม (artificial casing) ซึ่งผลิตจาก fibrous collagen หรืออาจบรรจุในพิมพ์ (molds) (Varnam และ Sutberland,1995) นอกจากนี้ยังมีการบรรจุในอวัยวะส่วนต่างๆของสัตว์ เช่น หลอดคอ กระเพาะอาหาร กระเพาะปัสสาวะ ไส้ติ่งของวัว เป็นต้น (เยาวลักษณ์,2536) การบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องบรรจุให้แน่น ไม่ให้มีโพรงอากาศภายใน อาจบรรจุด้วยเครื่องมือบรรจุ (stuffer) ทั้งในสภาวะอากาศปกติ หรือระบบสุญญากาศ

การทำหม้ำนิยมใช้ไส้ธรรมชาติที่เป็นไส้หมูหรือไส้วัว หรือส่วนที่เรียกว่าไส้ติ่งซึ่งอยู่ส่วนปลายลำไส้เล็กต่อกับลำไส้ใหญ่ โดยนำมาขูดเมือก และสิ่งสกปรกออก ล้างน้ำแล้วนำมาใช้ได้ทันที หรืออาจใช้ไส้ที่หมักเกลือเมื่อนำมาใช้ต้องล้างเกลือออกก่อนและผึ่งให้แห้งจึงนำมาบรรจุ การบรรจุในไส้ธรรมชาติจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดไม่สม่ำเสมอและฉีกขาดง่าย

2.6 เชื้อแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางอุตสาหกรรมอาหารหมักเนื่องจากมีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั่วไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ และให้ผลลบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส คุณลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของแบคทีเรียแลคติกคือทนต่อกรด และไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่าๆกับในสภาวะไร้อากาศ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแลคติกจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญและทนต่อก๊าซออกซิเจน(aerotolerant anaerobes) (Brock และ คณะ,1984: Ingram, 1975)

2.6.1 การแบ่งแบคทีเรียแลคติกตามตระกูล Lactobacillaceae ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 สกุล คือ Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus และ Lactobacillus (Frazler และ Westhoff,1988) นอกจากนั้นยังมีตระกูล Enterococcus, Weissella และอื่น ๆ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก. Streptococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentation มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) Streptococci บางชนิดก่อให้เกิดโทษแก่มนุษย์และสัตว์ (pathogenic bacteria) แบคทีเรียในสกุล Streptococcus ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิต buttermilk เนยแข็ง หญ้าหมัก (silage) และผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่นๆได้แก่ *S.thermophilus,S.diacetilactis, S.lactis* และ *S.cremoris* เป็นต้น (Brock และคณะ,1984; Frazier และ Westhoff, 1988 ; George,1983)

ข. Leuconostoc

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ Streptococci แต่จัดเป็น Heterofermentation สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล เช่น *L. mesenteroides* สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 55-60 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งประกอบไปด้วยไดอะเซททิลและอะซิโตอิน และทำให้เกิดปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็วกว่าแบคทีเรียแลคติกหรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องชนิดอื่นๆ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโทษ (nonpathogenic bacteria) พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช

เชื้อ Leuconostoc spp. เช่น *L.mesenteroides* มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ผักกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) และแตงกวาดอง (pickle) นอกจากนี้ *L. dextranicum* และ *L.cremoris* ยังร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์นมหมักอีกด้วย (Brock และคณะ, 1984; Frazier และ Westhoff, 1988; George, 1983)

ค. Pediococcus

แบคทีเรียในสกุลนี้จัดเป็น Homofermentatio มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่มๆละ 4 (tetrads) โดยแบ่งเป็น 2 ระนาบ บางครั้งอาจพบเซลล์เดี่ยว เซลล์เรียงกันเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophilic bacteria) สามารถเจริญที่ช่วงอุณหภูมิประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญได้ในน้ำเกลือที่เข้มข้นไม่เกิน 5.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เจริญได้ไม่ดีหรือไม่สามรถเจริญได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 6-10 เปอร์เซ็นต์

Pediococcus มักพบในอาหารหมักประเภทผักผลไม้ หรือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น *P.cerevisiae* เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว (Frazier และ Westhoff, 1988)

ง. Lactobacillus

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างเป็นแท่งยาว เรียงต่อกันเป็นสายเกือบทุกสายพันธุ์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตในปริมาณที่น้อยมาก (microaerophilic bacteria) หรือบางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนเลย (strict anaerobes) เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล Lactobacillus มีองค์ประกอบของดีเอ็นเอแตกต่างกันมาก แต่ละสายพันธุ์จึงมีคุณสมบัติแตกต่างกัน บางชนิดจัดเป็น Homofermentation และบางชนิดจัดเป็น Heterofermentatio Lactobacilli สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5 ดังนั้นโดยทั่วไปในการหมักแลคติกตามธรรมชาติ Lactobacilli จึงสามารถดำเนินปฏิกิริยาหมักต่อไปเมื่อพีเอชต่ำลงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติชนิดอื่นจะเจริญได้ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโทษ พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช ปุ๋ยจากมูลสัตว์ และน้ำนม

Lactobacilli ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหารหมักได้แก่ *L. bulgaricus, L acidophilus* และ *L.brevis* เป็นต้น (Brock และคณะ, 1984)

จ. Enterococcus

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างกลมหรือกลมรี เซลล์อาจอยู่เป็นคู่ๆหรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก ผลิตกรดแลคติกชนิดไม่รีดิวซ์ไนเทรต ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เป็นพวกที่ใช้ออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ในการเจริญ(facultative anaerobe) ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส (homofermentative) เป็นพวกที่ทนความร้อนได้ดี(60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) สามารถทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกลือได้ถึงร้อยละ6.5 หรือมากกว่า เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอช 9.6 และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ปัจจุบันมี 5 สปีชีส์ ได้แก่ *E. faecalis*, *E.faecium.E.avium,E.gallinarum* และ *E.cecorum* แบคทีเรียกรดแลคติกพวก Enterococci จัดเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับ โรคทางเดินอาหาร ส่วนใหญ่จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้(indicators) ในด้านความปลอดภัยของอาหาร (stiles,1989) นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นโปรไบโอติก(probiotics) สำหรับป้องกันและช่วยบำบัดอาการที่ผิดปกติในลำไส้(intestinal disorders) ของมนุษย์ (Lewenstein และคณะ, 1979)และสัตว์(Ushe และ Nagy,1985) โดยเฉพาะเชื้อ *Enterococcus faecium* ถูกนำไปประยุกต์ร่วมกับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเนยแข็ง(cheese) ในหลายๆประเทศทางตอนใต้ของทวีปยุโรป (Stiles และ Holzapfel,1997)

ฉ. Weissella

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างกลมค่อนข้างรี คล้ายแบคทีเรียสกุล Leuconostoc เซลล์มักจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบเป็นสายโซ่สั้น ๆ ไม่สร้างเอนโซม์คะตะเลส ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างแก๊สจากกลูโคส(heterofermentative) เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ในปัจจุบันถูกจัดให้เป็นสกุลใหม่ เพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนในด้านการจัดจำแนกแบคทีเรียระหว่างสกุล Lactobacillus Lactococcus และ Leuconostoc คือ *Leuconostoc paramesenteriodes (Weissella paramesenteroides) Lactobacillus confuses (W.confusa) Lactobacillus halotolerans (W. halotolerans) Lactobacillus Kandleri (W.kandleri) Lactobacillus minor(W.minor) Lactobacillu viridescens (W.viridescens)* และสปีชีส์ใหม่ (Collins และคณะ,1993) ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W.hellenica* (Stiles และ Holzapfel,1997)

ช. Carnobacterium

เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม anaerobe สามารถหมักน้ำตาลแลคโทสในนมให้เป็นกรดแลคติกชนิด L(+) ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักนมและผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ พบได้ในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง และน้ำนมดิบ จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมพบว่าเชื้อในกลุ่มนี้มีพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการใช้แลคโตส เคซีนและซิเตรทในนม

ซ. Aerococcus

มีลักษณะการแบ่งตัวใกล้เคียงกับ Pediococcus มีสองชนิดคือ *A.viridans* และ *A.urinae* ในปี 1997 Stiles และ Holzapfel ได้รายงานว่า *A. viridans* เป็นสาเหตุให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฌ. Oenococcus

มีสมาชิกในสกุลนี้เพียงชนิดเดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นชนิดที่แยกตัวมาจาก *Leuconostoc oenos* โดยมีลักษณะเด่นคือ คุณสมบัติการทนกรดและเอธานอลในปริมาณสูงและจากการศึกษาของ Dellaglio และคณะ(1995) พบว่า Oenoccoccus มีลำดับเบสบน 16s rRNA ต่างจากชนิดอื่นๆของ Leuconostoc อย่างชัดเจน

ญ. Tetragenococcus

เชื้อในสกุลนี้แยกตัวออกมาจากสกุล Pediococcus (ก่อนหน้านี้คือ *P. halophilus*) โดยมีลักษณะพิเศษคือสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อในสกุล Enterococcus และ Carnobacterium มากกว่าสกุลเดิม

2.5.2 การแบ่งแบคทีเรียแลคติกยังสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักออกเป็น 2 ชนิดหลักๆ คือ

ก. homofermentative lactic acid bacteria

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้เมื่อมีการใช้น้ำตาลเฮกโซส จะสร้างกรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ (1.8 โมลต่อกลูโคส 1 โมล) โดยวิถี Embden-Meyerhof Parans (EMP)จะเป็นวิถีที่สำคัญสำหรับคาร์โบไฮเดรตเมตาบอลิซึม ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมดคือ

กลูโคส + 2Pi + 2ADP ⟶ 2 กรดแลคติก + 2 ATP

เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวในระหว่างกระบวนการผลิต ได้แก่ จีนัส Streptococcus,Pediococcus,Lactobocus,Vagococcus และ Lactobacilli บางสปีชีส์

ข. heterofermentative lactic acid bacteria

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ จะสร้างกรดแลคติกในปริมาณที่น้อยกว่า คือ ประมาณร้อยละ 50 และมีสารอื่นๆ อีก คือ เอทานอลและกรดแอซีติกร้อยละ 20-25 ที่เหลือเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกร้อยละ 25 จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีการสลายคาร์โบไฮเดรตโดยวิถี Pentose Phosphoketolase ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมด คือ

กลูโคส + Pi + 2 ADP ⟶ กรดแลคติค + กรดแอซีติก + เอทานอล + CO_2 +ATP

ได้แก่ จีนัส Leuconostoc,Oenococcus,Weissella,Carnobacterium และ Lactobacilli บางสปีชีส์ (Jay,1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การสร้างกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติค

กรดแลคติคเป็นกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นจากกระบวนการหมักน้ำตาล โดยมีไพรูเวทเป็น Intermediate ซึ่งนอกจากไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นกรดแลคติกภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วแบคทีเรียแลคติกชนิด Heterofermentation ยังสามารถใช้ไพรูเวทไปในวิถีทางอื่นๆ ทำให้เกิดเมตาบอไลท์ที่แตกต่างกันออกไปจากการหมักแบบ Homofermentation ภายใต้สภาวะปกติ ทั้งนี้แบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์จะใช้วิถีที่แตกต่างกันหรือไม่ขึ้นกับสภาวะการเจริญเติบโต และเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก(Kandler,1983)

กรดอินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่พีเอชต่ำเยื่อหุ้มเซลล์จะอิ่มตัวด้วยอิออนของไฮโดรเจน ทำให้แอนไอออนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ยาก ดังนั้นการเจริญและกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์จึงถูกยับยั้ง นอกจากนี้โมเลกุลของกรดที่อยู่ในสภาพที่ไม่แตกตัว (undissolved molecules) สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และแตกตัวภายในเซลล์ทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดต่ำลง มีผลในการรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ (วริพัสย์,2536)

2.8 การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของแบคทีเรียแลคติค

แบคทีเรียแลคติคในกลุ่ม Heterofermentation สามารถสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการ pentose phosphate pathway ได้ โดยจะเกิดขึ้นในระหว่างการ decarboxylation 6 – phosphogluconate ไปเป็น pentose-5-phosphate (Axelsson,1993;Brock และคณะ,1984) การสร้างก๊าซนี้จะเกิดขึ้นมากในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์ประเภทผักผลไม้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหายใจภายในของเซลล์พืช รวมกับกิจกรรมจากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะสามารถยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ เช่น เชื้อราที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในผักผลไม้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

กลไกของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้ 2 กรณี คือ การยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการ decarboxylation และการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผนังเมมเบรนในส่วนของ lipid bilayer ซึ่งจะทำลายคุณสมบัติการเข้าออกของสารบริเวณผนังเซลล์ (วริพัสย์,2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติก

คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักของแบคทีเรียแลคติกคือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมัก(curing) หรือการบ่ม (maturing) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพและกลิ่นรสของอาหาร

กรดอะมิโนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก แต่โดยปกติปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียในการเจริญเติบโตนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรียแลคติก ตัวอย่างเช่น ลิวซีน และอาร์จินีนในน้ำนมมีปริมาณเพียง 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนปริมาณน้อยที่สุดที่ *Streptococcus lactis* ต้องการเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นตัวกลางในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโน โดยการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร เพื่อก่อให้เกิดการเจริญเติบโตอย่างสูงสุดของแบคทีเรียแลคติก (Law และ Kolstad,1983)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติกมีความซับซ้อนและมีความแตกต่างระหว่างเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเนส รวมทั้งการกระจายตัวของเอนไซม์เหล่านี้ภายในเซลล์ด้วย ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเดสนั้นขึ้นกับความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลโปรตีนหรือเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์โปรตีเนสจะใช้ซับสเตรทเป็นโปรตีน ในขณะที่เอนไซม์เปปติเดสจะใช้ซับสเตรทเป็นเปปไทด์หรืออนุพันธ์ของเปปไทด์ ทั้งนี้ความแตกต่างของตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์จะเป็นตัวกำหนดซับสเตรทของเอนไซม์ทั้ง2 ชนิด เอนไซม์โปรตีเนสซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์จะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ให้เป็นเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพียงพอที่จะแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ให้เอนไซม์เปปติเดสที่อยู่ภายในหรือบริเวณผิวของเซลล์เมมเบรนย่อยต่อจนได้กรดอะมิโน (Thomas และ Mills,1981)

2.10 การสร้างกลิ่นรสของแบคทีเรียแลคติก

กระบวนการที่ทำให้เกิดกลิ่นรสหอม(organoleptic compound) ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเกิดจากแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างไพรูเวทภายในเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกอาจเก็บไพรูเวทที่เกิดขึ้นจากขบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตไว้ และใช้สารประกอบอื่น ๆ เป็นตัวรับอิเลคตรอนแทน หรืออาจสร้างไพรูเวทจากสารอาหารอื่นนอกจากคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนซิเตรทให้เป็นไพรูเวทโดยเอนไซม์ซิเตรทไลเอส เกิดเป็นออกซาโลอะซิเตท จากนั้นออกซาโลอะซิเตทจะถูกดึงเอาคาร์บอนอะตอมออกในรูปคาร์บอนไดออกไซด์ และเกิดเป็นไพรูเวท โดยเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase (Harvey และ Collins,1961) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติคยังสามารถเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารที่มีกลิ่นรสหอม ได้แก่ อะเซททาดไฮด์ และไดอะเซททิล เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลและพีเอชต่ำ(Axelsson,1993) ส่วนการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับขบวนการสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลิ่นรส พบว่าในสภาพการหมักแบบมีอากาศร่วมกับการมีอนุมูลของโลหะบางชนิด เช่น Cu^{2+},Fe^{2+} และ Fe^{3+} สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไดอะเซททิลได้มากขึ้น ดังนั้นความสามารถในการใช้ซิเตรทจึงขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก สภาพแวดล้อม ความเป็นกรดด่าง สารอาหาร ปริมาณออกซิเจน และชนิดของอนุมูลโลหะ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกลิ่นรสหอมในผลิตภัณฑ์มักพบในกลุ่ม Streptococci และ Leuconostoc การเกิดสารระเหยในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้อาหารหมักมีกลิ่นหอม(aroma) แต่ถ้ามีสารระเหยเกิดขึ้นมากเกินไปจะทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า off – flavor (Tsutomu และคณะ,1991)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติกสกุลต่างๆ [a]

ลักษณะ	Rod		Cocci							
	C.	La	A.	E.	V./La.	Ln.	P.	S.	T.	W. [b]
เซลล์ต่อกัน 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2จากกลูโคส [c]	- [c]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่NaCl 6.5%	ND [f]	±	-	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่pH 4.4	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลคติก [d]	L	D,L DL [g]	L	L	L	D	D,L DL [g]	L	L	D DL [g]

หมายเหตุ : C. = *Carnobacterium* , La. = *lactobacillus* , A. = *Aerococcus* , E. = *Enterococcus* , V. = *Vagococcus* , Ln. = *Leuconostoc* , P. = *Pediococcus* , S. = *Streptococcus* , T. = *Tetragenococcus* , W. = *Weissella* , [a] +,ใช่ ;- ไม่ใช่ ;± ผลขึ้นกับสปีชีส์ , [b] Weissellaบางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน , [d] ชนิดของกรดแลคติกจากการหมักกลูโคส , [c] อาจผลิต CO2 ปริมาณเล็กน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ , [f] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มี NaCl 8% , [g] ชนิดของกรดแลคติกแตกต่างกันตามสปีชีส์ , ND = Not determine ,

ที่มา: Axelsson (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 ประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์จัดเป็นอาหารประเภทที่เสื่อมเสียได้ง่าย (perishable foods) เนื่องจากมีสารอาหารและวิตามินอุดมสมบูรณ์ รวมทั้งมีค่าความเป็นกรดด่าง(pH) และความชื้น(a_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ที่ผ่านขั้นตอนการหั่น สับ บด ให้มีขนาดเล็กลง จุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม phychrotrophic แกรมลบ เช่น *Pseudomonas sp., Acinetobacter sp.*และ *Alcaligenes sp.* จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสดได้แก่ *Staphyolcoccus aureus,Salmonella spp., Clostridium botulinum* และ *Listeria monocytogenes* (Bacus และ Brown, 1981)

นอกจากนี้อุปกรณ์และเครื่องมือ รวมทั้งกระบวนการแปรรูปอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากขึ้น กระบวนการในการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบนั้นอาจทำได้โดยวิธีการต่างๆ เช่น การเก็บรักษาไว้ในห้องเย็น หรือการบรรจุลงในถุงสุญญากาศ และการเปลี่ยนแปลงสภาพบรรยากาศภายใน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการยืดอายุการเก็บเนื้อสัตว์ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และมีผลทำให้เกิดแบคทีเรียแลคติคเจริญขึ้นเป็น dominant ในการถนอมอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่ถ้าพบลักษณะไม่ดีในผลิตภัณฑ์ เช่น การเกิดกลิ่นเหม็น รสชาติไม่ดี และการเกิดเมือกจะแสดงถึงความล้มเหลวในการใช้แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์ และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ดังนั้น การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะต้องสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญต่าง ๆ ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น (วริพัสย์, 2535)

ในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พื้นบ้านของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติจะเปลี่ยนแปลงตามสภาพวัตถุดิบ สภาวะการบ่ม รวมทั้งปัจจัยอื่น ซึ่งจะมีผลต่อผู้บริโภค ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพคงที่ และเกิดประโยชน์ทางโภชนาการต่อผู้บริโภคมากที่สุด จึงควรมีการปรับปรุงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตแทนการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรือองค์ประกอบอื่นๆในธรรมชาติ ปกติแล้วในการหมักตามธรรมชาติจะตรวจพบแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น *Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus leichannil* (Bacus และ Brown, 1980)

การเพิ่มรสชาติในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อทำโดยการเติมเกลือ น้ำตาล ไนเตรท ซึ่งการเติมน้ำตาลจะมีความสำคัญในแง่ของการเพิ่มธาตุอาหารให้เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ไนเตรทจะถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์แล้วเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกับไมโอโกลบิน (myoglobin) เปลี่ยนเป็น nitrosomyoglobin และ nitrosohemochrome ในการรักษาสีในเนื้อสัตว์ (Bryden และ Bridsall, 1980) ดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{Myoglobin} + NO \longrightarrow \underset{\text{(red)}}{\text{nitrosomyoglobin}} \xrightarrow{\text{heat}} \underset{\text{(pink)}}{\text{nitrosohemochrome}}$$

(purplish red)

นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังมีผลต่อการสลายตัวของไนเตรทที่เติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ทำให้การสะสมของ nitrosamine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งลดลง ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในปริมาณมากจะสามารถสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้ระดับพีเอชในอาหารหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะไปเร่งให้ส่วนที่เหลือของไนไตรท์ (residual nitrite) สลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลง การสะสมของ nitrosamine จึงลดลงด้วยเช่นกัน (Andres, 1979;Zaika และคณะ,1976)

2.12 กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักอาหารประเภทเนื้อ

ก่อนที่จะมีการนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกมาใช้กับอาหารประเภทเนื้อ ก็ได้มีการใช้กับผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดเป็นเวลานานมาแล้ว เพื่อยืดอายุการเก็บนมสด โดยแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักและเพื่อปรับปรุงคุณภาพให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นอาหารเสริมแก่สัตว์เลี้ยง เช่น สุกร แทนยาปฏิชีวนะเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกช่วยให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ normal flora ในลำไส้ ช่วยรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารที่เกิดจากการติดเชื้อต่างๆ เช่น *E.coli, Salmonella spp.* แบคทีเรียแลคติกช่วยให้เกิดสมดุลของ normal flora ในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์ต่างๆ จึงจัดว่าเป็นพวก probiotic ชนิดหนึ่ง

Reddy และคณะ (1970) กล่าวถึงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกลดการเน่าเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม Pseudomonas – Achromobacter

ในสหรัฐอเมริกาได้มีการริเริ่มใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียในโรงงานอุตสาหกรรมเนื้อเป็นครั้งแรกในปี 1955 กล้าที่ใช้เป็นกล้าไลโอฟิลไลส์ที่มีชื่อทางการค้าว่า ACCEL ในรูปของกล้าเชื้อแห้ง (lyophilize) ในการหมักผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (semidry sausage) เช่น thuringer, cervelat, summer sausage, Lebanon bologna และ pepperoni โดยพบว่าการใช้กล้าเชื้อ ACCEL ช่วยลดระยะเวลาหมักไส้กรอกจากเดิมใช้เวลาประมาณ 150 ชั่วโมง ลดลงเหลือประมาณ 32-48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสชาติและคุณภาพที่ดีอีกด้วย และในปี 1958 American Meat Institute Foundation ของสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับการใช้กล้าเชื้อดังกล่าว จึงทำให้มีการใช้กล้าเชื้อชนิดนี้ในโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อย่างแพร่หลายทั่วยุโรปและอเมริกา (Bacus และ Brown,1981) นอกจากนี้ในยุโรปยังมีการใช้กล้าเชื้อ *Micrococcius spp.* มีชื่อทางการค้าว่า "Baktofermente" ผลิตโดย Rudolf miller Co.,Hamburg, Germany (Niinivaara และคณะ,1964)

สาเหตุที่มีการเลือกใช้ *Pediococcus cerevisiae* ในระยะแรก แทนการใช้ *Lactobacillus spp.* ซึ่งมีบทบาทในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่ด้อยกว่า *Pediococcus spp.* เนื่องจากเมื่อผลิตเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96594

กล้าไลโอฟิลไลส์ *Pediococcus spp.*มีชีวิตอยู่รอดนานกว่า ต่อมามีการค้นพบวิธีการเติมสารต่างๆ เพื่อป้องกันการตายและการบาดเจ็บของเชื้อในขณะผลิตกล้า ดังนั้นจึงมีการผลิตกล้าสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยใช้เชื้ออื่นๆ รวมทั้ง *Lactobacillus spp.* โดยส่วนใหญ่ใช้เฉพาะกลุ่มที่เป็น *homofermentative* เช่น *L.plantarum* สำหรับกลุ่ม heterofermentative นั้น ขณะหมักเชื้อจะผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกแตกได้ จึงมีการใช้เชื้อกลุ่มนี้เฉพาะผลิตภัณฑ์บางชนิดเท่านั้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปในระดับอุตสาหกรรมได้แสดงดังตารางที่ 2 smith และ Palumbo (1983)ได้กล่าวถึงกล้าเชื้อที่ใช้หมักอาหารมากที่สุดในสหรัฐอเมริกาได้แก่ *P.acidilactici* และ *P.pentosaceus*

การใช้กล้าเชื้อในด้านการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีรูปลักษณะที่ดี มีกลิ่นรสและคุณภาพที่สม่ำเสมอ ช่วยลดระยะเวลาในการผลิต ยังมีการรายงานที่ศึกษาผลของการใช้กล้าแบคทีเรียแลคติคในแง่ต่างๆอีก ได้แก่ การยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, C. perfringens, Yarsinia enterocilitica, Salmonella sp.*และ *Shigella sp.*(อรนุช,2530 และอดิศร, 2533)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

กล้าเชื้อ	ผลิตภัณฑ์
Pediococcus cerevisiae(P.pentosaceus)	**Semi-dry fermented sausages**
	summer sausage
	cervelat
	Thuringer
	pork roll
	summer-style turkey sausage
	Dry- fermented sausages
	dry dausage
	dry turkey
	pepperoni
	hot bar sausage
	Genoa
	Processed meat
	Country-style ham

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้าเชื้อ	ผลิตภัณฑ์
Lactobacillus plantarum	**Semi-dry fermented sausages**
	summer sausage
	Dry-fermented sausages
	European-type sausage
	Processed meat
	bacon
	Country-style ham
Lactobacillus brevis	**Fresh meat**
	minced meat
เชื้อผสมระหว่าง *P.cerevisiae* และ *L.plantarum*	**Semi-dry fermented sausages**
	Lebanon bologna
	summer sausage
	cervelat
	Dry fermented sausage
	pepperoni
	dry turkey sausage
	Processed meat
	cooked,mechanically deboned poultry meat
	Fresh meat
	mechanically deboned poultry meat
	ground poultry breast meat
เชื้อผสมระหว่าง*P.cerevisiae* และ *Micrococcus varians*	**Dry fermented sausage**
	Genoa
	dry sausage

ที่มา: Smith และ Palumbo (1983)

Goepfert และ Chung(1970) ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อ *P.cerevisiae* หรือ *Lactobacillus sp.* ในการหมักไส้กรอก (Thuringer sausage หรือ beaker sausage) พบว่า กล้าเชื้อที่ใช้นี้สามารถลดค่าพีเอชได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งค่าพีเอชที่ต่ำประกอบกับปริมาณเกลือที่เติมลงในไส้กรอกหมักมีส่วนสำคัญในการยับยั้งหรือทำลาย *Salmonella typhinurium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียผสมมีการรายงานของ Niskamen และ Nurmi (1976) ซึ่งใช้กล้าเชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus spp.* และ *Micrococcus spp.* ในไส้กรอกหมัก European dry sausage พบว่า ช่วงสุดท้ายของการหมักผลิตภัณฑ์จะมีพีเอชประมาณ 5.0 – 5.1 ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิต enterotoxin A จาก *S.aureu* แต่ในไส้กรอกหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อผสมนั้นจะมีพีเอชสุดท้ายคือ 5.6 ซึ่งสามารถตรวจพบ enterotoxin A

สำหรับประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อ ได้แก่ ลดระยะเวลาการหมัก สามารถควบคุมกระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น ลดการสะสมของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นโรค ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก ซึ่ง Rice และคณะ(1975) พบว่าระยะเวลาที่ใช้หมักมีผลต่อการสะสมของฮีสตามีน ถ้าหมักโดยวิธีธรรมชาติจะใช้เวลานานกว่าและพบว่ามีฮีสตามีนสะสมในปริมาณมาก

กล้าเชื้อหลายชนิด เช่น *Pediococcus spp.* และ *Micrococcus spp.* ผลิตเอนไซม์ซูโดคะตะเลส(pseudocatalase) ซึ่งมีปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารนี้มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีดไม่น่ารับประทาน

การเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไปในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความมั่นใจต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทำให้มีความปลอดภัยสูง ใช้ระยะเวลาการหมักที่สั้นลง และได้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสม่ำเสมอ และมีอายุการเก็บรักษาที่คงทน การศึกษาวิจัยและสนับสนุนการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อที่จะทำให้คุณภาพเกิดสม่ำเสมอ และได้ลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ดี

ในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พื้นบ้านของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติจะเปลี่ยนแปลงตามสภาพวัตถุดิบ สภาวะการบ่ม รวมทั้งปัจจัยอื่น ซึ่งจะมีผลต่อผู้บริโภค ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพคงที่ และเกิดประโยชน์ทางโภชนาการต่อผู้บริโภคมากที่สุด จึงควรมีการปรับปรุงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตแทนการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรือองค์ประกอบอื่นๆ ในธรรมชาติ

การใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นควรจะต้องคำนึงถึงปริมาณที่ใช้ว่าจะต้องเพียงพอที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคด้วย ตลอดจนต้องคำนึงถึงการควบคุมกระบวนการหมักให้เหมาะสม ซึ่งหากมีการควบคุมและการปฏิบัติที่ดีแล้วก็จะเป็นการประกันได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และมีคุณภาพมาตรฐานที่ดี (Bacus and Brown,1981)

2.13 ประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเนื้อหมัก

อดิศร (2542) ได้ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและสรุปถึงประโยชน์ที่ได้ไว้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21059

2.13.1 ช่วยลดระยะเวลาในการหมักผลิตภัณฑ์ให้สั้นลง เช่น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักไส้กรอกหลายชนิดในยุโรป จะลดระยะเวลาในการหมักจากที่ใช้อยู่เดิมประมาณ 150 ชั่วโมง ให้เหลือเพียง 32-48 ชั่วโมง

2.13.2 สามารถควบคุมการหมักและคุณภาพ รวมถึงกลิ่นรสจำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อได้ง่ายขึ้น เช่น การเติมกล้าเชื้อ *S.carnosus subsp. Utilis* หรือ *Kocria cariance* (เดิมคือ *Micrococcur carian*) ในการผลิตไส้กรอกเยอรมัน(Rohwurst) นอกจากจะทำให้สีของผลิตภัณฑ์เป็นสีชมพูอมแดงอันเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องมาจากการผลิตเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพื่อเปลี่ยนไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ได้เร็ว และผลิตเอนไซม์แคตาเลสซึ่งกำจัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อาจจะเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ เชื้อดังกล่าวยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรตีเอสในขณะหมักผลิตภัณฑ์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสดีขึ้น

2.13.3 ช่วยลดการสะสมของสารไนโทรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ต้องใช้ไนเทรตหรือไนไทรต์เป็น curing salts จะสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลทำให้ไนไตรท์ที่มีอยู่หรือรีดิวซ์มาจากไนเตรทสลายเป็นไนทรัสออกไซด์ มีผลทำให้ปริมาณของสารไนโทรซามีนที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวลดลงด้วย

2.13.4 ช่วยควบคุมสีของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมไนเทรตและไนไทรต์จะให้คงสีชมพูอมแดง ไม่ซีด กล่าวคือ กล้าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Pediococcus spp.* และ *Kocuria spp.* สามารถผลิตเอนไซม์ pseudocatalase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน จึงไม่มีผลต่อสีชมพูอมแดงของผลิตภัณฑ์

2.13.5 ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคในการหมัก จะทำให้กระบวนการหมักเกิดได้อย่างรวดเร็ว และมีผลในการทำลายกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ฮีสติดีนคาร์บอกซิเลสแล้วเปลี่ยนฮีสติดีนไปเป็นฮีสตามีน ดังนั้น การใช้กล้าเชื้อจึงทำให้ระดับของฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ลดลง

ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสีย และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรค ซึ่งในปัจจุบันเป็นวัตถุประสงค์หลักประการหนึ่งของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการควบคุมการผลิตผิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่างๆ ให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของความเป็นกรดที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสารชนิดต่างๆที่กล้าเชื้อสามารถผลิตขึ้นระหว่างการหมัก เช่น กรดระเหย (volatile acid) กรดไขมัน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคนิคการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

2.14 สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก

Kojic และคณะ (1991) รายงานว่า การศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินเริ่มมาจาก Gratia ได้สังเกตเห็นว่ามีโปรตีนชนิดหนึ่งที่ผลิตโดย *E. coli* นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อบางชนิดได้ และให้ชื่อว่า "colicin" โดยในปัจจุบันได้จัดสารนี้อยู่ในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคทีเรียผลิตกรดหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม *Leuconostoc* , *Lactobacillus* , *Pediococcus* , *Lactococus* และ *Strptococcus* เป็นต้น ซึ่งแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกัน โดยไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิต นอกจากนี้ยังพบว่า แบคเทอริโอซินยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Listeria monocytogenes* , *Bacillus cereus* , *Clostridium botulinum* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

ปัจจุบัน แบคเทอริโอซินจากกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก โดยอาจนำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ปรับปรุงกลิ่นของอาหารหมักดอง การใช้เป็นสารถนอมอาหาร และการใช้ป้องกันโรคเต้านมอักเสบในวัว เป็นต้น (ศิริรัตน์, 2547)

2.14.1 กลไกการทำงานและการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน (สุรีย์รัตน์, 2545)

ก. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (permility) ของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์เสียสมดุลไป ซึ่ง Kojic และคณะ(1991) ได้กล่าวว่า แบคเทอริโอซินจะจับอย่างจำเพาะที่ outer membrane receptors ในขณะที่แบคทีเรียที่ต้านทานต่อแบคเทอริโอซินก็จะไม่มี receptor ที่เหมาะสมให้จับ

ข. ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดเสียสมบัติไป

ค. ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่างหรือหน้าที่ไปจากเดิม

การออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินนั้น โดยทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินจะยึดจับกับเซลล์เป้าหมายและขั้นตอนที่สองแบคเทอริโอซินจะสร้างรู (pore) ในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทั้งนี้ แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความต้านทานเซลล์เป้าหมายไม่เท่ากัน อีกทั้งแบคเทอริโอซินชนิดเดียวกันจะออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกันด้วย

2.14.2 ประโยชน์ของแบคเทอริโอซิน

ก. อาหารปลอดภัย เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งแบคเทอริโอซินจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากการเสื่อมเสียด้วย

ข. ทำให้อาหารเกิดกลิ่นรสเฉพาะเนื่องจากกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ค. เป็นสารที่สามารถใช้แทนสารกันเสียประเภทเคมี ซึ่งผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัยมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงระยะเวลา 20-30 ปี ที่ผ่านมามีการค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินอย่างกว้างขวางและทุกทิศทาง แต่แบคเทอริโอซินที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง คือ ไนซิน (nisin) หรือชื่อทางการค้า "nisaplin" (Galvez และคณะ, 1998) ที่ผลิตโดย lactococcus lactis subsp. Lactis เพราะได้รับการทดสอบและอนุญาตให้ใช้ได้ทั้งอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ ไนซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดและสามารถทนความร้อนสูงได้ จึงมีการนำไนซินไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารชนิดต่างๆและรูปแบบต่างๆ เช่น การใช้ไนซินเป็นสารกันเสียโดยตรงในอาหารกระป๋อง เนยแข็ง นมและผลิตภัณฑ์นม เบียร์และน้ำผลไม้ การใช้ไนซินร่วมกับสารอื่นๆ เช่น EDTA และเอนไซม์ไลโซไซม์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ เป็นต้น (Thomas และคณะ, 2000)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3

การดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- เครื่องแก้ว
- อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

MRS (de Man Rogosa and Sharp)

Agar

$CaCO_3$(แคลเซียมคาร์บอเนต)

NaOH (โซเดียมไฮดรอกไซด์)

ฟีนอฟทาลีน (phenolpthalene)

3.1.2 เครื่องมือ

- ตู้อบ(Hot Air Oven) ยี่ห้อ WBT binder รุ่น E53
- เครื่องวัด Water Activity ยี่ห้อ Thermoconstanter Swiss made novasina รุ่น RS232
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- เตาอบไมโครเวฟ
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เครื่องตีปั่น (Stomacher)
- โถดูดความชื้น (desicator)
- เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (vertex)
- เครื่องบันทึกอุณหภูมิ (data logger)
- pH meter

3.2 วัตถุดิบ

3.2.1 เนื้อวัวบด

3.2.2 ตับวัวและม้ามวัวบด

3.2.3 กระเทียม

3.2.4 ข้าวคั่ว

3.2.5 เกลือ

3.2.6 ผงชูรส

3.2.7 ไส้สุดของวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อโดย *Pediococcus pentosaceus* ในการผลิตหม้ำเปรียบเทียบกับการหมักหม้ำโดยทำการผลิตหม้ำจากสูตรพื้นบ้านและใช้สถานที่ผลิตแบบครัวเรือนซึ่งเป็นร้านคำพอง อ.เมือง จ.ขอนแก่น และได้รับความอนุเคราะห์ใช้สถานที่จากคุณขวัญนภาภรณ์ พรมทองมี โดยสูตรส่วนผสมในการผลิตทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.1 และมีขั้นตอนการผลิตแสดงดังภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตหม้ำ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์	ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)	ส่วนประกอบ
เนื้อล้วนบด	5,000	79.37	ข้าวคั่ว	300	4.76
ม้ามและตับบด	300	4.76	เกลือ	100	1.59
กระเทียม	500	7.94	ผงชูรส	100	1.59

ที่มา : ได้จากการสัมภาษณ์คุณขวัญนภาภรณ์ พรมทองมี อ.เมือง จ. ขอนแก่น

นำหม้ำไปตากแดดจัด 1 วัน แล้วนำมาผึ่งหมักที่อุณหภูมิห้องต่อ 1-2 วัน จึงรับประทานได้

ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการผลิตหม้ำทั้ง 2 สูตร

ที่มา: ได้จากการสัมภาษณ์คุณขวัญนภาภรณ์ พรมทองมี อ.เมือง จ. ขอนแก่น

ในการทดลองได้ใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* จากหม้ำซึ่งทำการศึกษาคัดแยกโดย สุเมธ(2548) ในลักษณะของกล้าเชื้อเหลว ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตร (โดยใช้เชื้อ 1 ลูป เขี่ยเชื้อใน MRS broth 5 มิลลิลิตร ผสมให้เชื้อกระจายตัวดี และใช้เติมในสูตรการผลิตหม้ำภายใน 24 ชั่วโมง) โดยมีอัตราการเติมคือ ส่วนผสมหม้ำ 1 กิโลกรัมต่อกล้าเชื้อ 1 มิลลิลิตร (10^6cell) ดังนั้นจากสูตรการผลิตจึงเติมกล้าเชื้อเหลว 5 มิลลิลิตรลงในส่วนผสมของหม้ำ(5 กิโลกรัม) ตามสูตรที่แสดงดังตารางที่ 3.1 และดำเนินการผลิตตามขั้นตอนแสดงดังภาพที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาทำการผลิตหม้ำ 2 ลักษณะ คือ เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* และไม่เติมกล้าเชื้อเพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบการหมักของหม้ำตามธรรมชาติ และดำเนินการศึกษาศึกษาดังนี้

3.3.1.1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระหว่างการหมักหม้ำ

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการผลิตหม้ำจากการใช้กล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์และจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ทำโดยนำdata loggerสุ่มใส่ในหม้ำที่ผลิตสูตรละ 1 ชุดและมัดปล้องตามปกติ ซึ่ง Data logger ที่ใช้ได้ตั้งค่าการบันทึกอุณหภูมิไว้ที่ทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อติดตามอุณหภูมิภายในตัวอย่างในระหว่างการหมักหม้ำเป็นระยะเวลา 28 วัน

3.3.1.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีบางประการ

การติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีบางประการของหม้ำในระหว่างการหมัก กระทำโดยการเก็บตัวอย่างหม้ำในวันที่ 0,1,2,3,5,7,14 และ28 วันตามลำดับหลังจากทำการผลิต โดยศึกษาสมบัติต่างๆ ดังนี้

ก. ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)

ข. ค่า water activity โดยใช้เครื่อง NOVASINA EEJA-3 ที่อุณหภูมิ 25°C

ค. ค่า pH

ง. วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด (AOAC, 1995)

3.3.1.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้ำ

ชั่งตัวอย่างหม้ำ 25 กรัมใส่ใน stomacher bag ซึ่งบรรจุ peptone water ร้อยละ 0.1 ในปริมาตร 225 ml. ตีด้วยเครื่อง stomacher ที่ความเร็วปานกลางเป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายของตัวอย่างหม้ำ ที่มีความเจือจาง 10 เท่า ทำการเจือจางแบบ serial dilution จนได้ความเจือจางระดับที่$1:10^3$,$1:10^4$,$1:10^5$,$1:10^6$,$1:10^7$ จนถึง$1:10^{14}$ นำสารละลายทุกระดับความเจือจางมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรด โดยใช้เทคนิค spread plate ในอาหาร MRS-$CaCO_3$ ความเจือจางละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีสร้างกรดที่เกิด clear zone รอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

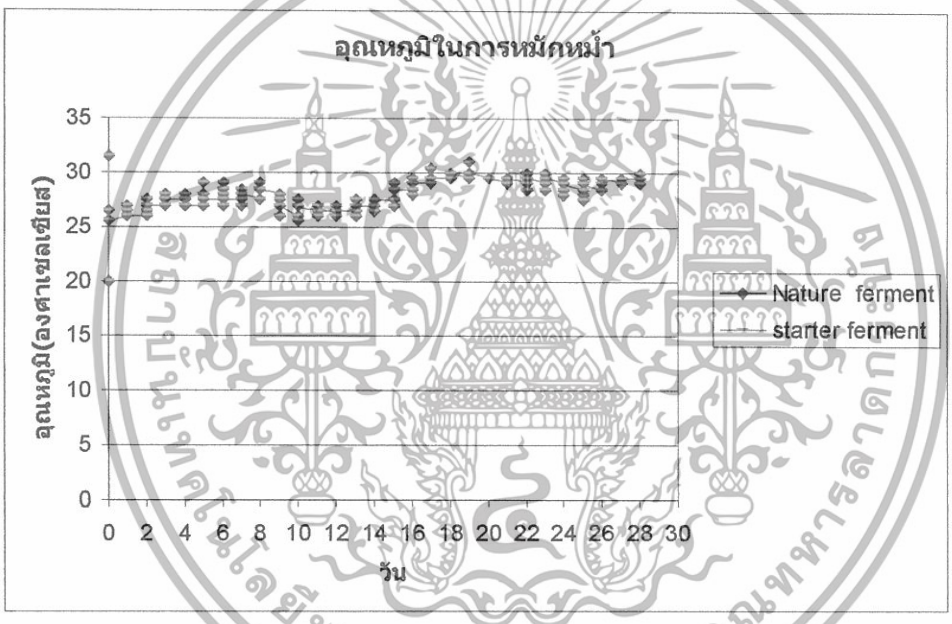
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ในการหมักหม้า

จากการศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ *Pediococcus pentosaceus* ในการหมักหม้า เปรียบเทียบกับการหมักหม้าโดยเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ โดยหม้า 2 สูตรที่ผลิตได้คือ หม้าจากการหมักแบบเติมกล้าเชื้อและหม้าจากการหมักแบบธรรมชาติ เมื่อทำการตั้งหมักไว้เป็นระยะเวลา 28 วัน มีความเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นดังนี้

4.1.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในระหว่างการหมักหม้า

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระหว่างการหมักหม้าที่ผลิตขึ้นโดยเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์และการใช้เชื้อจากธรรมชาติพบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันตลอดอายุการหมัก แสดงผลดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในของหม้าระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

จากภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระหว่างการหมักหม้าทั้งจากการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์และการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติมีค่าไม่แตกต่างกันตลอดอายุการหมักและการเก็บรักษา โดยในช่วงเริ่มต้นของการหมักจะมีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ คือประมาณ 26 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องมาจากความชื้นของหม้าที่ได้ในวันแรกมีปริมาณความชื้นสูงและหม้ามีขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางของปล้องหม้าประมาณ 1.5 นิ้ว)หลังจากนั้นหม้าจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากสูญเสียความชื้นไปในระหว่างการตาก ทำให้ความชื้นลดลงและหม้ามีขนาดเล็กลง ประกอบกับการเกิดกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติกซึ่งผลิตพลังงานความร้อนออกมาจึงทำให้หม้ามีอุณหภูมิสูงขึ้นด้วย จนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการหมักอุณหภูมิจะค่อนข้างคงที่เนื่องจากหม้ามีความชื้นต่ำและมีขนาดเล็กลง ซึ่งทำให้ data logger ที่อยู่ภายในข้อหม้ามีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมภายนอก โดยที่อุณหภูมิตั้งแต่เริ่มทำการหมักจนถึงวันที่ 28 ภายในจะมี

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

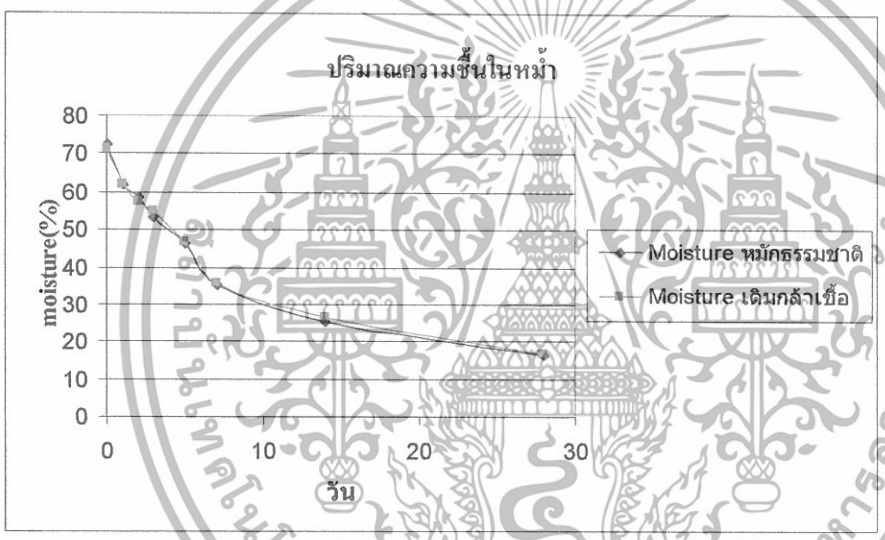
อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25.5-31.5 องศาเซลเซียสและมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการหมักเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* และแบคทีเรียแลคติกอื่น ๆ

4.1.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบทางด้านเคมีในการหมักหม้ำ

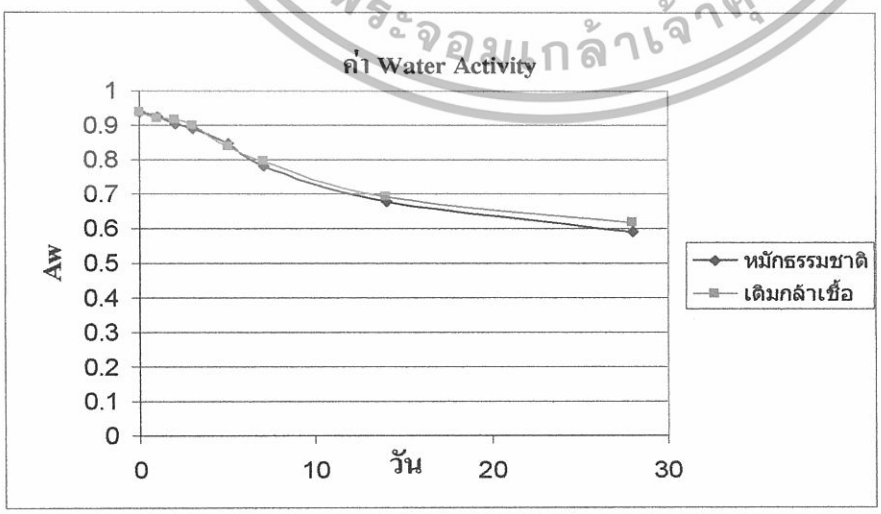
จากการเก็บตัวอย่างของหม้ำทั้ง 2 สูตร คือ การผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *Pediococcus pentosaceus* และการผลิตโดยการหมักแบบธรรมชาติที่ทำการหมักในวันที่ 0,1,2,3,5,7,14 และ 28 พบว่าองค์ประกอบทางเคมีบางประการของหม้ำ มีการเปลี่ยนแปลงดังนี้

4.1.2.1 ปริมาณความชื้นและ A_w ของหม้ำในระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณความชื้นและ A_w ระหว่างการหมักหม้ำที่ผลิตขึ้นทั้ง 2 สูตร พบว่าความชื้นและ A_w มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง แสดงผลดังภาพที่ 4.2 และภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน



ภาพที่ 4.3 การลดลงของค่า A_w ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

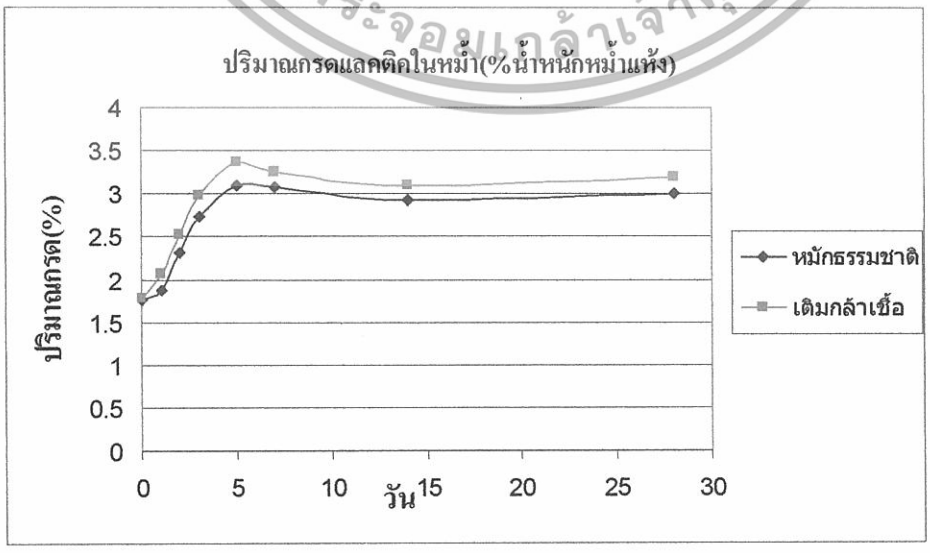
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.2 และ 4.3 ปริมาณความชื้นและค่า A_w ของหม้ำตลอดอายุการหมัก 28 วัน มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องทั้งการหมักแบบเติมกล้าเชื้อและการหมักแบบธรรมชาติ โดยผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งแสดงว่าการเติมกล้าเชื้อไม่มีผลต่อความชื้นและค่า A_w โดยปริมาณความชื้นและค่า A_w สูงสุดเมื่อเริ่มต้นการหมักโดยใช้กล้าเชื้อเท่ากับ 71.50% และ 0.941 ตามลำดับ แล้วลดลงต่ำสุดในวันที่ 28 คือ ปริมาณความชื้น 16.70% และค่า A_w 0.617 ส่วนการหมักแบบธรรมชาติจะมีปริมาณความชื้นสูงสุดเท่ากับ 72.82% และค่า A_w สูงสุดเท่ากับ 0.939 แล้วลดลงต่ำสุดในวันที่ 28 คือ ความชื้น 16.45% และ A_w 0.590 ตามลำดับ

เมื่อหม้ำผ่านการตากแดดจัดในวันแรกของการหมัก ทำให้ปริมาณความชื้นในหม้ำระเหยออกไปและค่า A_w ลดลง หม้ำจึงมีลักษณะแห้ง โดยเฉพาะที่บริเวณผิวนอกจะมีลักษณะแห้งและแข็งกว่าภายในข้อของหม้ำ เนื่องจากมีการระเหยของน้ำที่ผิวนอกอย่างรวดเร็วและอัตราการซึมผ่านของน้ำจากภายในสู่ภายนอกผิวเป็นไปได้ช้า นอกจากนี้ลักษณะของหม้ำจะเปลี่ยนจากสีแดงเข้มเป็นสีดำคล้ำอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจาก หม้ำผลิตจากเนื้อวัวซึ่งมีปริมาณของรงควัตถุไมโอโกลบินมาก เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุเป็นเมทไมโอโกลบินที่ทำให้เนื้อมีสีคล้ำ ทั้งนี้เนื่องจากหม้ำที่ทำการทดลองไม่มีการเติมเกลือของไนไทรต์ไนเทรต

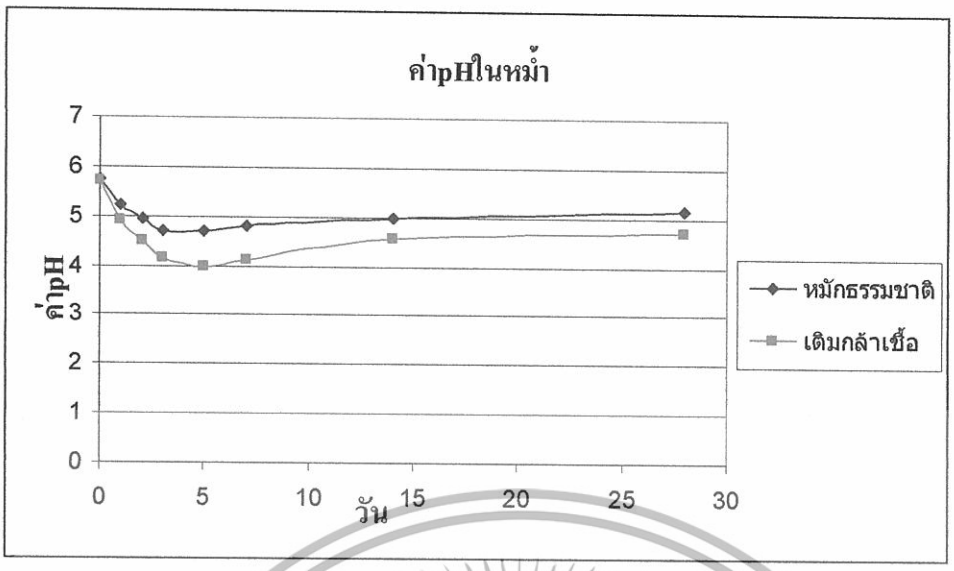
4.1.2.2 ค่าพีเอช (pH) และกรดแลคติก ของหม้ำในระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกในหม้ำทั้ง 2 สูตรมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกันตลอดระยะการหมัก 28 วัน คือ ในช่วง 5 วันแรกของการหมักจะมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น และจะลดลงเพียงเล็กน้อยในช่วงหลังของการหมัก ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช(pH) ของการผลิตหม้ำทั้ง 2 สูตรในระหว่างการหมักมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน คือ ช่วงแรกของการหมัก (วันที่ 0- 5) ค่าพีเอชลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก 5 วันแรก และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงหลังของการหมัก ซึ่งแสดงผลดังภาพที่ 4.4 และภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติกในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของหม้าระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

จากภาพที่ 4.4 และ 4.5 จะพบว่าในวันแรกของการหม้าที่เติมกล้าเชื้อและหม้าที่หมักธรรมชาติ มีปริมาณกรดและค่า pH ใกล้เคียงกัน คือ หม้าที่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณกรด 1.78% (น้ำหนักหม้าแห้ง) ค่า pH 5.73 และหม้าที่หมักธรรมชาติมีปริมาณกรด 1.76%(น้ำหนักหม้าแห้ง) ค่า pH 5.75 ซึ่งทั้ง 2 ค่านี้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 0-3 จนกระทั่งในวันที่ 5 ของการหมักจะมีปริมาณกรดมากที่สุดซึ่งทำให้ค่า pH ต่ำสุด คือ หม้าที่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณกรด 3.36%(น้ำหนักหม้าแห้ง) pH 3.97 ส่วนหม้าที่หมักธรรมชาติมีปริมาณกรด 3.11%(น้ำหนักหม้าแห้ง)และ pH 4.7

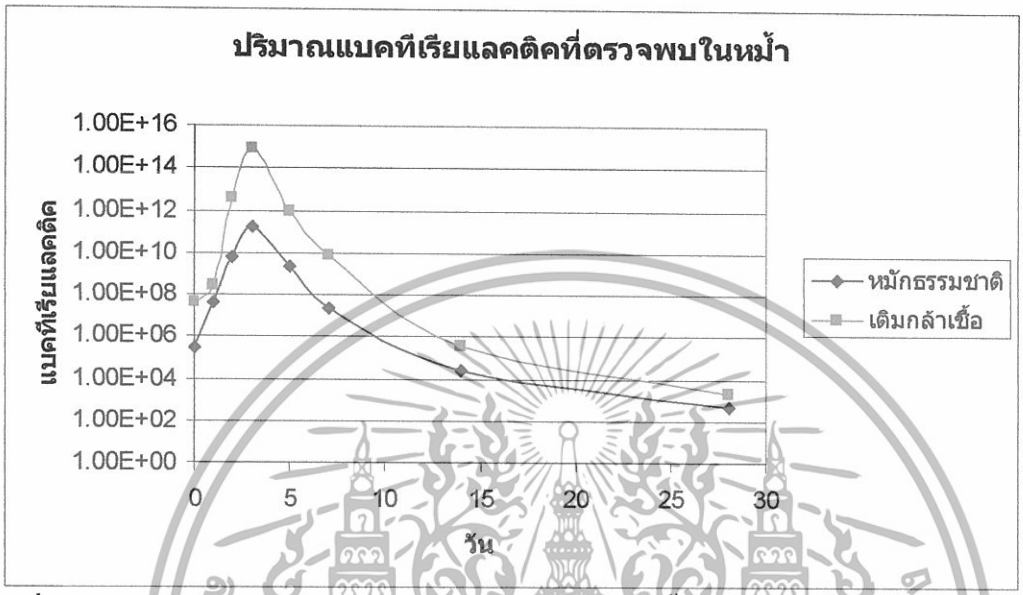
การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกและpH ในระหว่างการหมักหม้าเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติดที่เกิดขึ้นทำให้ส่วนประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในหม้าเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดแลคติก ในช่วง 0-3 วันแรกของการหมัก หม้าจึงมีกรดเพิ่มขึ้นปริมาณมากขณะที่ pH จะลดลงเป็นสัดส่วนผกผันตามปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น จากสาเหตุดังกล่าวจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดและค่า pH ในหม้าที่เติมกล้าเชื้อมีมากกว่าและเกิดขึ้นรวดเร็วกว่าหม้าที่หมักตามธรรมชาติ

เมื่อกระบวนการหมักเสร็จสมบูรณ์โดยสังเกตจากช่วงสุดท้ายของการหมัก(วันที่7-28) ปริมาณกรดแลคติกลดลงเล็กน้อยและค่า pH เพิ่มขึ้น ในสภาวะเช่นนี้จะมีปริมาณกรดอยู่สูงมากทำให้มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* เองและจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ทำให้เกิดโรคหรือทำให้หม้าเน่าเสียไม่สามารถเจริญได้ จึงทำให้หม้าปลอดภัยและสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานานประมาณ 1-3 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้า

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้าทั้ง 2 สูตร พบว่าในสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่ดีกว่าการหมักโดยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แสดงผลดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในหม้าระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

จากการตรวจนับแบคทีเรียแลคติกในหม้า โดยนับจำนวนโคโลนีในอาหารสูตร MRS-$CaCO_3$ 0.5 % พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นในหม้าที่ทำการหมักโดยจุลินทรีย์จากธรรมชาติจะมีค่าเท่ากับ 3.34×10^5 cfu/g ส่วนหม้าที่ทำการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อจะมีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 4.83×10^7 cfu/g ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งในช่วงของการหมักวันที่ 0-3 จะมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในวิธีที่ใช้การเติมกล้าเชื้ออาจใช้เวลาในการปรับสภาพในวันแรกแล้วจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นในช่วงวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก โดยวันแรกของการหมักทั้ง 2 วิธีจะมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อผ่านช่วงของการหมักในวันที่2และ3 เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* มีการเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้เห็นความแตกต่างของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญมากสุดในการหมักโดยวิธีการเติมกล้าเชื้อและวิธีหมักแบบธรรมชาติ คือ 7.95×10^{14} cfu/g และ 1.57×10^{11} cfu/g ตามลำดับ

การที่แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก(0-3วัน) เนื่องมาจากการที่หม้ามีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญแบคทีเรียแลคติก คือ มีปริมาณความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั่วไป มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากน้ำเลือดและสารอาหารอื่นๆที่อยู่ในเนื้อที่เป็นส่วนประกอบของหม้าที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในขณะเดียวกันแบคทีเรียแลคติกที่เจริญจะสร้างกรดแลคติก สารแบคเทอริโอซิน และสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วงหลังของการหมัก(วันที่ 5-28) ปริมาณความชื้นลดลงต่ำและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และส่งผลให้ยับยั้งตัวแบคทีเรียแลคติกเองด้วย ทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการหมัก 28 วัน โดยแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจนับทั้งจากการหมักโดยการใช้กล้าเชื้อและการหมักโดยวิธีธรรมชาติในวันที่ 28 เท่ากับ 2.18×10^3 cfu/g และ 5.45×10^2 cfu/g ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 ผลการศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ในการหมักหม่ำเปรียบเทียบกับการหมักแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

5.1ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิระหว่างการหมักหม่ำที่ผลิตขึ้น โดยเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์และการใช้เชื้อจากธรรมชาติพบว่าอุณหภูมิภายในหม่ำตั้งแต่เริ่มทำการหมักจนถึงวันที่ 28 ของการหมัก จะมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25.5- 31.5 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการหมักเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส

5.2 ปริมาณความชื้นของหม่ำที่ทำการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อและหมักแบบธรรมชาติในวันเริ่มต้นของการหมักมีค่าใกล้เคียงกันคือ 71.50 และ 72.82 ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าที่ใกล้เคียงกันจนถึงวันที่ 28 ของการหมักจะมีปริมาณความชื้นอยู่ที่ 16.70 และ 16.45 ตามลำดับ

5.3 ค่า A_w ของหม่ำที่หมักทั้ง 2 สูตรมีค่าใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 0.940ในการหมักวันแรกและมีแนวโน้มที่ลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าที่ใกล้เคียงกันตลอดเวลาของการหมักทั้ง 28 วัน โดยในวันที่ 28 มีค่า A_w อยู่ที่ 0.617 ในสูตรการหมักแบบเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์และ 0.590 ในสูตรการหมักแบบธรรมชาติ

5.4 pH ในวันเริ่มต้นหมักของหม่ำที่หมักโดยการเติมกล้าเชื้อและหมักแบบธรรมชาติมีค่าใกล้เคียงกันคือ 5.73 และ 5.75 ตามลำดับ หลังจากนั้นการหมักในวันที่ 1,2,3 และ 5 ของการหมักพบว่า pH ลดลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะการหมักที่เติมกล้าเชื้อจะมี pH ต่ำกว่าที่หมักแบบธรรมชาติ และ pH จะต่ำที่สุดในวันที่ 5 ของการหมัก หลังจากนั้น pH จะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 28 ของการหมัก

5.5 ปริมาณกรดแลคติกในวันเริ่มต้นของการหมักแบบการหมักแบบเติมกล้าเชื้อและการหมักแบบธรรมชาติคือ 2.07 และ 1.88 ตามลำดับ โดยปริมาณกรดในช่วง 0-5 วันแรกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นยังคงมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อทำการหมักจนถึงวันที่ 28

5.6 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นในการหมักหม่ำแบบธรรมชาติมีค่าเท่ากับ3.34×10^5 cfu/g ส่วนหม่ำที่หมักโดยการเติมกล้าเชื้อจะมีแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 4.83×10^7 cfu/g โดยในช่วงวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และในวันที่ 3 ของการหมักจะมีปริมาณมากที่สุดทั้งการหมักแบบธรรมชาติและการหมักโดยเติมกล้าเชื้อ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.57×10^{11}cfu/g และ 7.95×10^{14}cfu/gหลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียแลคติคจะเริ่มลดลงเมื่อทำการหมักจนถึงวันที่ 28 จะมีแบคทีเรียแลคติคคงเหลือเท่ากับ 5.45×10^2และ 2.18×10^3 cfu/g ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติของอาหารหมัก พบว่า การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีทั้งสองวิธียังไม่แตกต่างกันมากนัก อาจเป็นเพราะปริมาณกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในการหมักมีน้อยเกินไป ซึ่งอาจจะยังเจริญแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ไม่ดีนัก จึงทำให้เวลาที่ใช้ในการหมักโดยเติมกล้าเชื้อใกล้เคียงกับการหมักโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

2. การผลิตหม้ำเพื่อการค้าควรจะมีการเติมสารไนไตร์ทไนเตรทเพื่อให้สีของหม้ำไม่คำคล้ำเมื่อผ่านการหมักซึ่งไม่เป็นที่สนใจของผู้บริโภค

3.ในขณะทำการหมักควรรักษาสภาวะของการหมักให้คงที่ เนื่องจากความชื้นในหม้ำจะค่อยๆลดลง ถ้าเก็บไว้ในที่อากาศไม่ถ่ายเทอาจทำเกิดการเจริญของเชื้อราได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติวรรณ ยอดรักษ์.2546.**ผลของโซเดียมไนไตรท์ โซเดียมแอสคอร์เบท และการรมควันต่อคุณภาพและอายุการเก็บของหม่ำ.**วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

งามนิจ นนทโส.2539 . **การศึกษาชนิด ปริมาณแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักมั่ม.**รายงานการวิจัย.ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2527. **ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.** มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,สงขลา.

นงเยาว์ ชัยยินดีภูมิ. 2535. **การศึกษาพันธุศาสตร์เบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติคและการนำไปหมักไส้กรอกเปรี้ยว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546. **การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้า.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์.2536.**เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.**สหมิตออฟเซต,กรุงเทพฯ

วริพัสย์ อารีกุล . 2535 . **บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักและผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์** . สัมมนาระดับปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

วริพัสย์ อารีกุล . 2536 . **การศึกษาคุณสมบัติพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์นมหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547. **การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทนร้อนที่ผลิตไบโอจีนิกจากอาหารหมักไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุรีย์รัตน์ เงินดวง. 2545. **การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุเมธ เพียยุระ. 2548. **การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน และคุณภาพทางจุลชีววิทยาในระหว่างการหมักหม่ำ.** สัมมนาปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

โสภา สีชอล์ค. 2541.**ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมเริ่มต้น โซเดียมกลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และ โซเดียมไนไตรต์ต่อการลดลงของ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2543 . ประโยชน์ของงานวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักดองประเภทเนื้อของไทย. **เอกสารประกอบการประชุมระดมความคิด เรื่อง "การยกระดับคุณภาพแหนมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ"** สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. **การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลา และการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อำนาจ ภักดีโต. 2545. **การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างไดอะซีติล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง,กรุงเทพฯ.

Acton, J.C. 1977 . Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. **J. Food Sci.** 42:74

Adams, M. R. and M. O. Moss. 1995. **Food Microbiology**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. Pp. 232-248

Andres, C. 1979. Starter culture reduces residual nitrite in bacon. **Food Processing.** 40(5) :56-58.

Association of official Analytical Chemists. 1995. **Official Methods of Analysis**. 16th ed.,Virginia : The Association of Official Analytical Chemists.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria. **In: Lactic Acid Bacteria**, S. Salminen and A.V. Wright(eds.), pp. 20-37 ,128-130 . New York: Marcel Dekker, Inc.

Axelsson, L. 1998. **Lactic Acid Bacteria: classification and physiology**, pp. 1-72 .In S. Salminen and A. von Wright(eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional aspects. Marcel Dekker, Inc., New York

Bacus, J. 1984. Update meat fermentation 1984. **Food Tech.** 38 : 59-63

Bacus , J.N., and W.L. Brown 1981 .Use of microbial culture_: meat products. **Food Technol.** 35(1) : 74-83

Brock, T.D., D.W. Smith and M.T. Madigan.1984 . **Biology of Microorganisms.** 4th ed. New Jersey : Prentice-Hall, Inc.847 pp.

Chakamas Wongklalaung,Malai Boonyaratanakornkit.(1986).**Fermented foods in Thailand and similar products in Asian and elsewhere.**Institute of Food research and product development.Kasetsart University,Bangkok

Collins, M.D, J. Samelis, J. Metaxopoulos and S.Wallbanks.1993. "Taxonomix studies on

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

some leuconostoc-like organisms from fermented sausages : description of a new genus Weissella for the leuconostoc paramesenteriodes group of species." **J.Appl. Bacteriol**. 75: 595-603

Dunn, C.G. and S.C. Prescott. 1959 . **Industrial Microbiology**. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 945 pp.

Fernandez, M., L. de la Hoz, O. Diaz, M. I. Cambero and J. Ordonez. 1995a. **Effect of the addition of pancreatic lipase on the ripening of dry fermented sausage**: part I. microbial, physico- chemical and lipolytic changes. Meat Sci. 40 : 159-170

Frazier, W.C. and D.C. Westhoff 1988. **Food Microbiology**. 4th ed. Singapore : McGraw-Hill Co. 539 pp.

George, J. 1983 . **Basic food microbiology**. USA: Saybrook Press, Inc. 781 pp.

Goepfert, J. M. and G. T. Chung. 1970. Growth of *Salmonella sp.* at low pH. **J. Food Sci**. 35: 326-328

Harvey, R.J. and E.B. Collins 1961 . Role of citratase in acetoin formation by *Streptococcus diacetilactics* and *Leuconostoc citrovorum*. **J. Bacctiriol**. 82: 954-959

Hong , I . S. and R.Y. Pyun. 1999 . Inactivation kinetics of Lactobacillus plantarum by high pressure carbon dioxide. **J.Food Sci**. 64(4):728-733

Ingram, M. 1975 . The Lactic Acid Bacteria- A Broad View. In: **Lactic acid bacteria in baverage and food**, J. G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting(eds.), pp. 1-7 London; William Clowes&Sons Limited.

Jay, J. M. 1996. **Modern food microbiology**. 5th ed. Chapman and Hall, New York

Kandler , O. and N. Weiss. 1983. Genus *Lactobacillus* Beijerinch 1901, pp. 1209-1234. In P.A . Sneath(ed.). **Bergy' mannual of systematic bacteriology vol. 2** Williams and Wilkins, Baltimore.

Kramlich,W.E. 1960. The science of meat and meat productions. pp. 484 – 512. In J.F. Price and B.S. Schweigert, eds. **Sausage Products**. 2nd ed. W.H. Freeman and Company,San Francisco

Law , B . A . and J. Kolstad 1983. **Proteolytic systems in Lactic acid bacteria** . Antonie van Leeuwenhoek. 49: 225-245

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewenstein, A., G. Frigerio and M. Monori.1979."Biological properties of SF 68, a new approach to the treatment of diarrheal diseases" **Curr. Ther. Res.** 26:967-981

Lucke , F . K . 1998. Fermented sausage, pp 441-447 In B.J.B. Wood(ed). **Microbiology of Fermented Foods.** 2nd ed. Blackie Academic&Profestional London.

Galves, A. ,E. Valdivia, H. Abriovel, E. Camafeita, E. Mendez, B. M. Martinez. and M. Maqueda. 1998. **Isolation and characterization of enterocin E 197** , a bacteriocin produced by *Enterococcus feacalis* E 197.

Goepfert , J.M. and G. T. Chung. 1970. Growth of Salmonella sp. At low pH. **J. Food Sci.** 35 : 326-328

Goutefongea,R. 1992 . Salting ang curing,pp. 115-137. In J.P. Girard, ed. **Technology of meat and meat products.** Ellis Horwood Limited,London

Niskamen, A. and E. Nurmi. 1976. **Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and termonuclease production in dry sausage.** Appl. Environ. Microbial. 31: 11-20

Niinivaara, F . P ., M . S . Pohja and S . E . Komulainen. 1964 . Some aspects about using bacterial pure cultures in the manufacture of fermented sausages. **Food Technol.** 18 : 147-153

Niskamen, A. and E. Nurmi. 1976. **Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and termonuclease production in dry sausage.** Appl. Environ. Microbiol. 31: 11-20

Nurmi, E. 1966. **Effect of bacterial inoculation on characteristics and microbial flora of dry sausage.** Sanoma Osakeyhtio, Heisinki. 315 p.

Pearson , M. A. and R.T. Dutson. 1986 . **Advanced in meat research : meat and poulrty microbiology**. Vol. 2. AVI Publishing Company.,Inc., Westport Connecticut.pp123-143.

Rice , S., R.R Eitenmiller and P.E. Kocher.1975. Histamine and tyramine content of meat products. **J. Milk Food Technol.**38 : 256-258

Reddy , S . G , M . L . Chen and P . J . Patel . 1975. Infulence of lactic cultures on the biochemical , bacterial, and organoleptic changes in beef. **J. Food Sci** . 40: 314-318

Vernam,A.H. and J.P. Sutberland.1995.**Meat and meat products:technology,chemistry and microbiology**.Chapman and Hall,London

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smith , J.L. and S.A. Palumbo. 1983 . Microorganisms as food additives. **J . Food Prot** . 44: 936-937

Stiles. M.E. 1989. Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria. In : M.P. Doyle(editor). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, pp. 673-733

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

Thomas, L.V., M.R. Clarkson. and J. Delves-Broughton. 2000. **Nisin In (eds)**. Natural Food Antimicrobial Systems.

Thomas, T . D . and O . E . Mills.1981 . Probiolytic enzymes of starter bacteria. Neth. **Milk Dairy J.** 35 : 255-273

Tsutomu, K.,Y. Watanabe and S. Hideki. 1991 . Characteristics of diacetyl production. **Applied and Environmental Microbiology**. 57(10) :3040-3042.

Ushe, T.C. and B. Nagy. 1985. " Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic Escherichia coli by Streptococcus faecium M74 in pigs." Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B181,pp.374-382.

Zaika, L.L.,T.E. Zel, J.L. Smith, S.A. Palumbo and J.C. Kissinger.1976. The role of nitrite in Bebanon bologna, a fermented sausage. **J. Food Sci** . 41 : 1457-1460.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC,1995)

วิธีการทดลอง

1. นำ alumminium can อบที่อุณหภูมิ 130 ± 3 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดใส่ใน aluminium can
3. นำไปอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 103-105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมงจนน้ำหนักคงที่
4. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
5. ชั่งน้ำหนัก
6. คำนวณหาปริมาณความชื้นโดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

1.2 ค่า water activity

วิธีการทดลอง

1. ทำการ calitrate เครื่องวัด A_w ก่อน
2. นำตัวอย่างใส่ในตลับวัด A_w ประมาณ ¾ ของตลับ
3. นำตลับที่ใส่ตัวอย่างเข้าเครื่องวัด A_w ทิ้งไว้รอให้ตัวเลขที่อ่านค่าได้จากเครื่องนิ่ง
4. อ่านค่าที่ได้จากเครื่องแล้วทำการบันทึก

1.3 ค่าความเป็นกรด (AOAC,1995)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยกระดาษกรอง นำน้ำส่วนใสที่ได้ไปต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
3. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึง end point จะเกิดสีชมพู
5. คำนวนปริมาณกรดแลคติคตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติค} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1000 \times \text{กรัมของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaoH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท(มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ค่า pH

วิธีการทดลอง

1. นำตัวอย่าง 20 กรัมบดให้ละเอียด
2. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
3. นำไปวัดด้วยเครื่อง pH-meter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 .ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้า

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงในน้ำเกลือเจือจาง (NaCl 0.85 %) 225 มิลลิลิตร
2. ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นแบบ 10 fold dilution จนถึงระดับ $1 : 10^{14}$
3. ปิเปตด้วยตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ใส่บน MRS agar + 0.5 %$CaCO_3$ใน จานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วตัว L ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว spread plate ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ
4. นำไปบ่มเชื้อใน anaerobic jar หรือ candle jar ที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. ตรวจนับโคโลนีที่มีขอบใส(clear zone) รอบๆโคโลนีของเชื้อที่เจริญในระดับความเจือจางต่างๆ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 MRS – $CaCO_3$

Peptone	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Diammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
$CaCO_3$	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมผง $CaCO_3$ 5 กรัมลงใน MRS ผงสำเร็จรูป(52 กรัม) ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลาย จากนั้นจึงบรรจุในขวด ๆ ละ ประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิแช่เย็น เมื่อต้องการนำไปใช้สำหรับการ spread plate ควรทำให้ MRS – $CaCO_3$ มีอุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส และเขย่าขวดให้ผง $CaCO_3$ กระจายทั่วทั้งขวด แล้วจึงเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร หมุนจานไปมาเพื่อให้ $CaCO_3$ กระจายทั่วในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 สารละลาย 0.85 % โซเดียมคลอไรด์(NaCl)

Sodium Chloride (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมSodium Chloride 8.5 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร(Volumetric Flask) 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ขวด ๆ ละ225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)

Sodiumhydroxide	4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสม Sodiumhydroxide 4 กรัม ลงกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) จากนั้นเก็บรักษาในขวดบรรจุทึบแสง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ง1 อุณหภูมิในการหมักหม้ำเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยทำการบันทึกทุก ๆ 4 ชั่วโมง

Day	Nature ferment	starter ferment
0	20.0	20.0
0	31.5	31.5
0	26.5	26.5
0	25.5	25.5
1	26.0	26.0
1	26.0	26.0
1	27.0	27.0
1	26.5	26.5
1	26.0	26.0
1	26.0	26.0
2	26.0	26.0
2	26.0	26.0
2	26.5	26.5
2	27.5	27.5
2	27.5	27.5
2	27.0	27.0
3	27.0	27.0
3	27.0	27.0
3	28.0	28.0
3	28.0	28.0
3	28.0	28.0
3	27.5	27.5
4	27.5	27.5
4	27.0	27.0
4	28.0	28.0
4	27.0	27.0
4	27.0	27.0
4	27.0	27.0
5	27.0	27.0
5	27.0	27.0
5	27.5	27.5
5	29.0	29.0
5	28.0	28.0
5	27.5	27.5
6	27.5	27.5
6	27.0	27.0
6	28.5	28.5
6	29.0	29.0
6	28.0	28.0
6	27.5	27.5
7	27.5	27.5
7	27.0	27.0
7	28.5	28.5
7	28.0	28.0
7	28.0	28.0
7	28.0	28.0
8	27.5	27.5
8	27.5	27.5
8	28.5	28.5
8	28.5	28.5
8	29.0	29.0
8	28.5	28.5
9	28.0	28.0
9	27.0	27.0
9	26.0	26.0
9	27.5	27.5
9	27.5	27.5
9	27.0	27.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10	26.0	26.0
10	25.5	25.5
10	25.5	25.5
10	27.0	27.0
10	27.5	27.5
10	27.0	27.0
11	26.5	26.5
11	26.0	26.0
11	26.5	26.5
11	26.5	26.5
11	27.0	27.0
11	26.5	26.5
12	26.5	26.5
12	26.0	26.0
12	26.5	26.5
12	27.0	27.0
12	27.0	27.0
12	26.5	26.5
13	26.5	26.5
13	26.0	26.0
13	27.0	27.0
13	27.0	27.0
13	27.5	27.5
13	27.0	27.0
14	27.0	27.0
14	26.5	26.5
14	27.5	27.5
14	27.5	27.5
14	27.5	27.5
14	27.5	27.5
15	27.5	27.5

15	27.0	27.0
15	27.5	27.5
15	29.0	29.0
15	29.0	29.0
15	28.5	28.5
16	28.5	28.5
16	28.0	28.0
16	28.0	28.0
16	29.5	29.5
16	29.5	29.5
16	29.0	29.0
17	29.0	29.0
17	29.0	29.0
17	29.0	29.0
17	30.5	30.5
17	29.5	29.5
17	29.5	29.5
18	29.5	29.5
18	29.5	29.5
18	30.0	30.0
18	30.0	30.0
18	30.0	30.0
18	30.0	30.0
19	29.5	29.5
19	29.5	29.5
19	31.0	31.0
19	30.0	30.0
19	29.5	29.5
19	30.0	30.0
20	29.5	29.5
20	29.5	29.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20	29.5	29.5
20	29.5	29.5
20	29.5	29.5
20	29.5	29.5
21	29.0	29.0
21	29.0	29.0
21	29.5	29.5
21	29.5	29.5
21	29.5	29.5
21	29.5	29.5
22	29.0	29.0
22	28.5	28.5
22	29.5	29.5
22	30.0	30.0
22	29.5	29.5
22	29.5	29.5
23	29.0	29.0
23	28.5	28.5
23	29.0	29.0
23	29.5	29.5
23	30.0	30.0
23	29.5	29.5
24	29.0	29.0
24	28.0	28.0
24	28.5	28.5
24	29.5	29.5
24	29.5	29.5
24	29.0	29.0
25	28.5	28.5
25	28.0	28.0
25	27.5	27.5

25	29.5	29.5
25	29.0	29.0
25	29.0	29.0
26	28.5	28.5
26	28.5	28.5
26	29.5	29.5
26	29.0	29.0
26	29.5	29.5
26	29.5	29.5
27	29.0	29.0
27	29.0	29.0
27	29.5	29.5
27	29.5	29.5
27	29.5	29.5
27	29.5	29.5
28	29.5	29.5
28	29.0	29.0
28	29.5	29.5
28	30.0	30.0
28	29.5	29.5
28	29.5	29.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ง2 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

Moisture (%)		
วันที่	หมักธรรมชาติ	เติมกล้าเชื้อ
0	72.82 ± 3.33	71.50 ± 1.06
1	61.80 ± 1.98	61.87 ± 0.66
2	58.55 ±1.75	57.38 ± 3.20
3	53.45 ± 3.15	54.96 ± 2.27
5	46.22 ± 0.79	46.68 ± 0.55
7	35.48 ± 1.76	35.78 ± 1.86
14	25.36 ± 0.37	26.66 ± 0.82
28	16.45 ± 1.72	16.70 ± 0.95

ตาราง ง3 การเปลี่ยนแปลงของค่าWater activity ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

Aw		
วันที่	หมักธรรมชาติ	เติมกล้าเชื้อ
0	0.939	0.941
1	0.927	0.921
2	0.903	0.916
3	0.893	0.9
5	0.849	0.84
7	0.781	0.796
14	0.678	0.69
28	0.59	0.617

ตาราง ง4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

ปริมาณกรด(% น้ำหนักหม้ำแห้ง)		
วันที่	หมักธรรมชาติ	เติมกล้าเชื้อ
0	1.76 ± 0.0300	1.78 ± 0.0173
1	1.88 ± 0.0458	2.07 ± 0.0346
2	2.32 ± 0.0173	2.53 ± 0.0300
3	2.73 ± 0.0458	2.98 ± 0.0346
5	3.11 ± 0.0173	3.36 ± 0.0346
7	3.09 ± 0.0346	3.25 ± 0.0173
14	2.92 ± 0.0346	3.11 ± 0.0300
28	3.00 ± 0.0210	3.19 ± 0.0170

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ง5 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในหม้ำระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 28 วัน

pH		
วันที่	หมักธรรมชาติ	เติมกล้าเชื้อ
0	5.75 ± 0.0115	5.73 ± 0.0120
1	5.25 ± 0.0115	4.91 ± 0.0115
2	4.95 ± 0.0058	4.52 ± 0.0153
3	4.71 ± 0.0153	4.15 ± 0.0100
5	4.70 ± 0.0282	3.97 ± 0.0586
7	4.82 ± 0.0153	4.11 ± 0.0115
14	5.00 ± 0.0208	4.56 ± 0.0058
28	5.18 ± 0.0252	4.73 ± 0.0058

ตาราง ง6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักหม้ำเป็นระยะเวลา 28 วัน

ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจพบในหม้ำ		
วันที่	หมักธรรมชาติ	เติมกล้าเชื้อ
0	3.34E+05	4.83E+07
1	4.18E+07	2.79E+08
2	6.85E+09	3.48E+12
3	1.57E+11	7.95E+14
5	2.11E+09	9.65E+11
7	2.60E+07	8.15E+09
14	2.74E+04	3.86E+05
28	5.45E+02	2.18E+03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

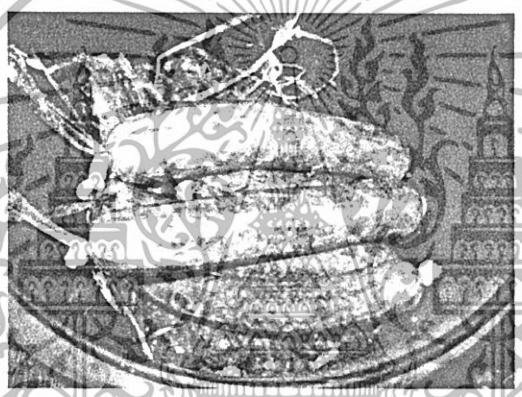
ภาคผนวก จ

รูปภาพ

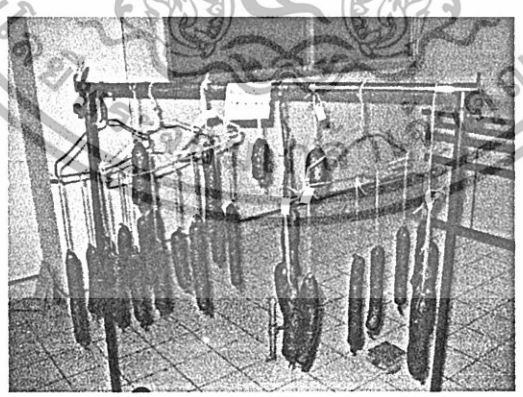
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปภาพ

ภาพที่ จ1 แสดงร้านค้าที่มีการจำหน่ายหม้ำในจังหวัดขอนแก่น



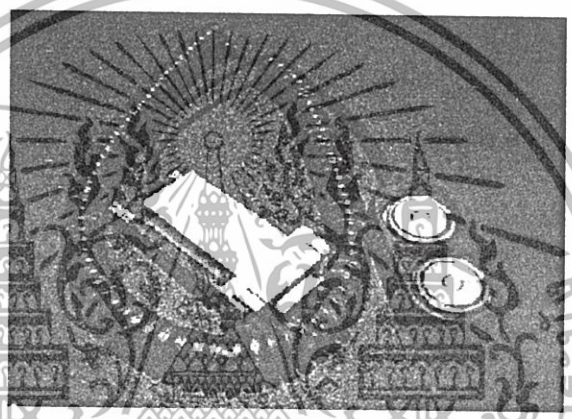
ภาพที่ จ2 แสดงหม้ำที่ทำการผลิตเสร็จพร้อมสำหรับการนำไปหมัก



ภาพที่ จ3 แสดงการแขวนหมักหม้ำที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ จ4 แสดงอุปกรณ์ Data logger ที่ใช้ในการบันทึกอุณหภูมิระหว่างการหมักหม้า



ภาพที่ จ5 แสดงอุปกรณ์เชื่อมต่อคอมพิวเตอร์ของData logger

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพิมพา สุพรรณโกมุท เกิดเมื่อวันที่ 16 กันยายน 2526 วุฒิการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสตรีมหาพฤฒารามในพระบรมราชินูปถัมภ์ และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต(อุตสาหกรรมเกษตร)

นางสาวรุจิรา จันทะโคตร์ เกิดเมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2525 ภูมิลำเนาเดิมจังหวัดนครพนม วุฒิการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้