การศึกษาคุณลักษณะและการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม

Characterization and Selection of Probiotic Bacterial Strains for Use as Starter Culture in Nham Production

นางสาวช่อทิพย์ เรืองอุดม

นางสาวศศิธร สุภา

นางสาวอภิญญา ประจง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2551

Characterization and Selection of Probiotic Bacterial Strains for Use as Starter Culture in Nham Production

Miss Chortip Ruangudom

Miss Sasithorn Supa

Miss Apinya Prajong

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2008

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาคุณลักษณะและการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม

Characterization and selection of probiotic bacterial strains for use as starter culture in nham production

ชื่อนักศึกษา นางสาวช่อทิพย์ เรืองอุดม

นางสาวศศิธร สุภา

นางสาวอภิญญา ประจง

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	
กรรมการ อาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาคุณลักษณะและการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม

ชื่อนักศึกษา ช่อทิพย์ เรืองอุดม รหัสนักศึกษา 48050536
ศศิธร สุภา รหัสนักศึกษา 48050567
อภิญญา ประจง รหัสนักศึกษา 48050571

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2551

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 มีกิจกรรมการย่อยแป้ง มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนเล็กน้อย แต่ไม่มีกิจกรรมการย่อยไขมัน และกิจกรรมของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส มีเพียงแบคทีเรีย *P. pentosaceus* P0805 เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ นอกจากนี้ *P. pentosaceus* P0805 มีการเจริญและการหมักดีกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิดในอาหาร Nham Model Broth (NMB) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักของ *P. pentosaceus* P0805 คือ สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0 ถึง 2 ในสารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ร่วมกับการตอบสนองการเจริญ และการหมักในอาหาร NMB พบว่า *P. pentosaceus* P0805 เป็นแบคทีเรียที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม เพื่อที่จะศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อที่ระดับต่าง ๆ ต่อคุณภาพแหนม จึงได้เติม *P. pentosaceus* P0805 ลงในแหนมปริมาณต่าง ๆ ดังนี้คือ 10^2, 10^4 และ 10^6 เซลล์ต่อกรัม และตรวจวิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างแหนมทั้งหมดด้านจุลินทรีย์ เคมี และประสาทสัมผัส ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมทุกทรีตเม้นต์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการหมัก โดยในแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^4 เซลล์ต่อกรัม และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อกรัม มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด (1.26×10^9-1.26×10^{10} โคโลนีต่อกรัม) และมีปริมาณกรดทั้งหมดมากที่สุด (ร้อยละ 1.08 และ 1.12) และมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุดโดยค่าพีเอช

ลดลงถึง 4.61 และ 4.62 ตามลำดับหลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่า TBARS ของแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ทุกระดับเพิ่มขึ้นมากกว่าค่า TBARS ของแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อกรัมมีการปลดปล่อยน้ำมากที่สุดและมีค่า a_w ลดลงมากที่สุดเป็น 0.961 เมื่อทำการหมักจนครบ 96 ชั่วโมง แหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับและมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ดีโดยตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus Salmonella* ยีสต์และเชื้อรา ดังนั้น *P. pentosaceus* P0805 ที่ระดับของการเติมเชื้อ 10^4 ถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัมจึงสามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม

Special Project Title	Characterization and selection of probiotic bacterial strains for use as starter culture in nham production		
Student	Chortip	Ruangudom	Student ID. 48050536
	Sasithorn	Supa	Student ID. 48050567
	Apinya	Prajong	Student ID. 48050571
Degree	Banchelor of science		
Major	Industrial Microbiology		
Academic Year	2008		
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat		

ABSTRACT

In this study, suitable species of lactic acid bacteria for use as starter cultures in Nham production was selected. *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 and *Pediococcus pentosaceus* P0805 showed amylolytic activity, slightly proteolytic activity but no lipolytic activity and nitrate reductase activity. Only *P. pentosaceus* P0805 was able to produce catalase. In addition, *P. pentosaceus* P0805 grew and fermented in Nham Model Broth (NMB) better than the other two bacteria. Optimum condition for growth and fermentation of *P. pentosaceus* P0805 was 0-2% NaCl, 2% garlic extract in NMB at 30°C. Considering enzyme-producing ability, growth and fermentation response in NMB, *P. pentosaceus* P0805 was the most suitable lactic acid bacteria to be used as a starter culture. To study effect of starter culture at different inoculation levels on quality of nham, *P. pentosaceus* P0805 was added into nham at different levels (10^2, 10^4 and 10^6 cell/g). All nham samples were determined for their microbiology, chemical and sensory quality during fermentation at 30°C. During fermentation, the number of lactic acid bacteria in all nham samples rapidly increased. After 48 hours fermentation, nham samples inoculated with *P. pentosaceus* P0805 at 10^4 cell/g and 10^6 cell/g had the highest counts of lactic acid bacteria (1.26×10^9- 1.26×10^{10} CFU/g) and the highest amount of total acidity (1.08-1.12%), and showed the greatest rate of pH drop to 4.61 and 4.62 respectively. TBARS values of nham inoculated with *P. pentosaceus* P0805 at all levels increased greater than those of uninoculated samples. Among

all treatments, nham with 10^6 cell/g inoculation had the highest amount of released water, and showed the greatest decreasing of a_w to 0.961 at 96 hours of fermentation. Nham samples inoculated with *P. pentosaceus* P0805 showed acceptable sensory quality and good microbiological quality with no yeast and mold, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* detected. Therefore, *P. pentosaceus* P0805 at 10^4-10^6 cell/g inoculation could be used as a potential starter for nham fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุม รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นในด้านต่างๆที่เป็นประโยชน์ตลอดจนความช่วยเหลือ คำชี้แนะและแก้ไขให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบหัวข้อโครงงานพิเศษที่ให้คำชี้แนะในการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงาน

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ

และที่สำคัญ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวเรืองอุดม ครอบครัวสุภา และครอบครัวประจง ที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนด้านกำลังทรัพย์

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ผู้จัดทำขอมอบให้แด่ คุณพ่อ คุณแม่ อาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจน ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ฐ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงาน.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก.....4
2.2 การหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก.....4
2.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....6
2.4 กล้าเชื้อจุลินทรีย์.....7
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก.....8
2.6 สารยับยั้งที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก.....9
2.7 แบคเทอริโอซิน.....10
2.8 อาหารหมัก.....26
2.9 เคมีด้านกลิ่นรสในไส้กรอกหมัก.....27
2.10 ชนิดของการเกิดการหืน (Type rancidity).....41
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
3.1 อุปกรณ์
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์.....49

สารบัญ (ต่อ)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 49
3.1.3 สารเคมี..... 49
3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 49
3.2 วิธีการทดลอง
3.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก..... 50
3.2.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก..... 50
3.2.1.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส..... 50
3.2.1.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส..... 50
3.2.1.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส..... 51
3.2.1.5 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส..... 51
3.2.1.6 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส..... 51
3.2.1.7 การหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส..... 51
3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว Nham model broth (NMB) เพื่อนำมาเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักแหนม..... 52
3.2.2.1 การเตรียมสารสกัดกระเทียม..... 52
3.2.2.2 ผลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญและการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก.....52
3.2.2.3 การศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของแหนม.....53
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์
4.1 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....60
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว Nham model broth.....61
4.2.1 ผลของอุณหภูมิ เกลือ และสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก.....61

4.2.2 ผลของอุณหภูมิ เกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติก.....61
4.3 การศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพแหนม.....64
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมระหว่างการหมัก.....64
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด.....65
4.3.3 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในแหนม.....68
4.3.4 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแหนม ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยระหว่างการหมักและปริมาณน้ำอิสระ.....69
4.3.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าสีในแหนมระหว่างการหมัก.....71
4.3.6 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนม.....72
4.3.7 การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแหนม.....74
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....77
เอกสารอ้างอิง.....79
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทำเจือจาง.....84
ภาคผนวก ข การใช้เครื่องมือ.....98
ภาคผนวก ค การคำนวณ.....104
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง.....114
ภาคผนวก จ แบบประเมินทางประสาทสัมผัส.....134

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสดและเนื้อหมักที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิต..... 9
2.2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหาร..... 11
2.3 การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการทำงานของแบคเทอริโอซิน เมื่อใช้ hurdle technology..... 12
2.4 ความแตกต่างของแบคเทอริโอซินและยาปฏิชีวนะ..... 14
2.5 วิธีทดสอบแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน..... 15
2.6 สภาวะแวดล้อมเพื่อการผลิตและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก..... 18
2.7 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการถนอมอาหาร..... 23
2.8 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จาก nisin 25
2.9 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารทะเล ธัญพืช และเนื้อผสม..... 29
2.10 ข้อมูลที่รวบรวมได้จากรดสายสั้นในไส้กรอกหมัก..... 34
2.11 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการบ่มไส้กรอกหมัก..... 37
2.12 แอลดีไฮด์ (aldehyde) ที่ตรวจพบในไส้กรอกหมัก..... 43
2.13 สารประกอบคีโตน (ketone) ที่ตรวจพบในไส้กรอกหมัก..... 44
2.14 สารประกอบที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ที่พบในกลิ่นรสของเนื้อหมักและบทบาทของแบคทีเรียด้านกิจกรรมทางชีวเคมีนอกเซลล์..... 46
4.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ..... 61
4.2 การเจริญโดย *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส..... 63
4.3 การหมักโดย *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกันที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส..... 64
4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน..... 69

สารบัญตาราง (ต่อ)

4.5 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแหนมปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยระหว่างการหมัก และปริมาณน้ำอิสระในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....70
4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าสีในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....72
4.7 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....73
4.8 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....75
ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐาน TEP.....108
ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากการหาค่า TBA ของแหนมหมูที่เติม TEP บริสุทธิ์.....109
ค.3 ค่าปริมาณ malonaldehyde ในแหนมหมูที่เติมสาร TEP และค่า percent recovery.....111
ง.1 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1).....115
ง.2 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2).....115
ง.3 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย).....116
ง.4 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1).....116
ง.5 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2).....117
ง.6 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย).....117

สารบัญตาราง (ต่อ)

ง.7 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1)..... 118

ง.8 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2)..... 118

ง.9 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย)..... 119

ง.10 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)..... 119

ง.11 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)..... 120

ง.12 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)..... 120

ง.13 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)..... 121

ง.14 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)..... 121

ง.15 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus* 4IS17 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)..... 122

ง.16 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)..... 122

ง.17 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)..... 123

ง.18 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)..... 123

ง.19 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน..... 130

สารบัญตาราง (ต่อ)

ง.20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....130
ง.21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....130
ง.22 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....131
ง.23 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....131
ง.24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน 131
ง.25 การเปลี่ยนแปลงค่าสีในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....132
ง.26 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน 133
ง.27 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน.....133

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

2.1 กลไกการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียกรดแลคติก
แบบ Homofermentative และ Heterofermentative.....5

2.2 การเปลี่ยนแปลงของเฮกโซส แลคเตต และความเข้มข้นของอะซิเตต
ระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียม.....33

2.3 การเปลี่ยนแปลงของ sarcoplasmic และ myofibrillar protein ที่สกัดได้
ระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียม.....36

2.4 การเปลี่ยนแปลงของ ∝-อะมิโนไนโตรเจนอิสระและพันธะ∝-อะมิโนไนโตรเจน
แอมโมเนียระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียมรมควัน.....36

2.5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันอิสระระหว่างการบ่มไส้กรอกรมควัน
เบลเยียม (Belgiam cold- smoked sausage).....40

2.6 ระยะเวลาที่พบกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในไส้กรอกรมควันเบลเยียม
(Belgiam cold- smoked sausage).....40

4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (รูป a) ค่าพีเอช (รูป b)
และปริมาณกรดทั้งหมด (รูป c) ในแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus*
P0805.....67

ข.1 ระบบทางสี L* a* b* และพิกัดสี ▲ E*ab.....100

ค.1 กราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)
รูป a: ครั้งที่ 1 ; รูป b: ครั้งที่ 2.....109

ค.2 แสดงจุดตัดของกราฟความเข้มข้นของสารมาลโลนาลดีไฮด์ในตัวอย่างกับค่าการ
ดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร.....110

ง.1 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3
ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30
และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1.1A-1.2C).....124

สารบัญภาพ (ต่อ)

ง.2 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.1A-2.2C).....125

ง.3 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.1A-3.2C).....126

ง.4 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.1A-4.2C).....127

ง.5 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5.1A-5.2C).....128

ง.6 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6.1A-6.2C).....129

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

แหนมเป็นอาหารหมักของไทยที่ทำจากเนื้อหมูซึ่งได้รับความนิยม การหมักแหนมแบบดั้งเดิมยังคงอาศัยแบคทีเรียที่มีอยู่ในธรรมชาติ จุลินทรีย์เริ่มต้นในแหนมส่วนมากจะอยู่ในเนื้อหมูสด แบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการเจริญระหว่างการหมักแหนมโดยเฉพาะ *Lactobacillus* (*L. sake, L. plantarum* และ *L. pentosus*) และ *Pediococcus* (*P. acidilactic* และ *P. pentosaceus*) แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์จากคาร์โบไฮเดรต และเป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของพีเอช ส่งผลให้เกิดการเกาะตัวเป็นแหนมและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่จำเป็น (Visessanguan และคณะ, 2004)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย สามารถเมแทบอไลซ์น้ำตาลได้ทั้งแบบ homofermentative และ heterofermentative เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ถึงแม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่จัดเป็นพวกที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) หรือเป็นพวกที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (moderate thermophile) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 30 และ 42 องศาเซลเซียส ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีทั้งรูปร่างท่อนและรูปร่างกลม การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูงและทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc* (Wood และ Holzapfel, 1997; Hutkins, 2006)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลากหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก และอื่น ๆ กล้าเชื้อเป็นแบคทีเรียที่ใช้เติมลงในอาหารโดยตรง เพื่อให้เจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในวัตถุดิบ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ต้องการในผลิตภัณฑ์สุดท้าย การเปลี่ยนแปลงนี้ยังอาจรวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น ช่วยเพิ่มคุณภาพการเก็บรักษา ลดความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยของอาหาร ปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ เพิ่มคุณสมบัติทางด้านประสาทสัมผัส และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ (Hutkins, 2006) โดยนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา ชีวเคมี และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแหนม (Visessanguan และคณะ 2006; Luxananil และคณะ, 2009; Riebroy และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะพัฒนาคุณภาพของ

แหนมให้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะในด้านคุณภาพทางเคมี จุลินทรีย์ และประสาทสัมผัส จึงควรทดลองนำกล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมมาใช้เติมลงในแหนม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาคุณสมบัติของ *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P08O5 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมัก คัดเลือกแบคทีเรียที่เหมาะต่อการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ และศึกษาผลของการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกในปริมาณต่าง ๆ กัน ต่อคุณภาพทางเคมี จุลินทรีย์ และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมที่ผลิตได้

วัตถุประสงค์ของโครงงาน

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว Nham Model Broth (NMB) เพื่อนำมาเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักแหนม
3. เพื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* และ *Pediococcus pentosaceus* พร้อมกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก เพื่อคัดเลือกมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีทั้งด้านเคมี จุลินทรีย์ และประสาทสัมผัส

ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ในการทดลองนี้จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Lactococcus lactis* 13IS3 แยกได้จากปลาสด, *Enterococcus faecalis* 4IS17 แยกได้จากกุ้งจ่อม และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสด นำมาศึกษาหากิจกรรมการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทส ไลเปส อะไมเลส โปรติเอส และหากิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือ กระเทียม และอุณหภูมิ ต่อการเจริญและหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมที่มีคุณภาพดี และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก ซึ่งช่วยย่นระยะเวลาการหมัก และได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศน้อยมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักโดยเปลี่ยนแป้งเป็นแลคเตต แบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วยรูปร่างกลม คือ *Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Tetragenococcus, Streptococcus, Enterococcus* และแบบท่อนคือ *Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium* ในสมัยก่อน *Clostridium* และ *Bacillus* ถูกจัดเป็นพวกแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นกลุ่มยูแบคทีเรียแกรมบวก จีนัส *Bifidobacterium* และจีนัสที่พบบ่อย *Lactobacillus* จัดเป็นแบคทีเรียโบราณกลุ่มที่ 2 ในพวกยูแบคทีเรียแกรมบวก และต่อมามีการเพิ่มเติมพวก *Propionibacterium*, *Microbacterium* และ *Brevibacterium* แต่เมื่อมีการศึกษาถึงระดับส่วนประกอบ และเชื้อสายของแบคทีเรียที่ไม่ผลิตกรดแลคติก โดยอาศัยข้อมูลทางชีวเคมี สรีระวิทยา และชีววิทยาในระดับพลาสมิดของแบคทีเรียกรดแลคติกรวมถึงผลงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงจากนักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ คน จึงมีการจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกใหม่ (Vuyst และ Vandamme, 1994)

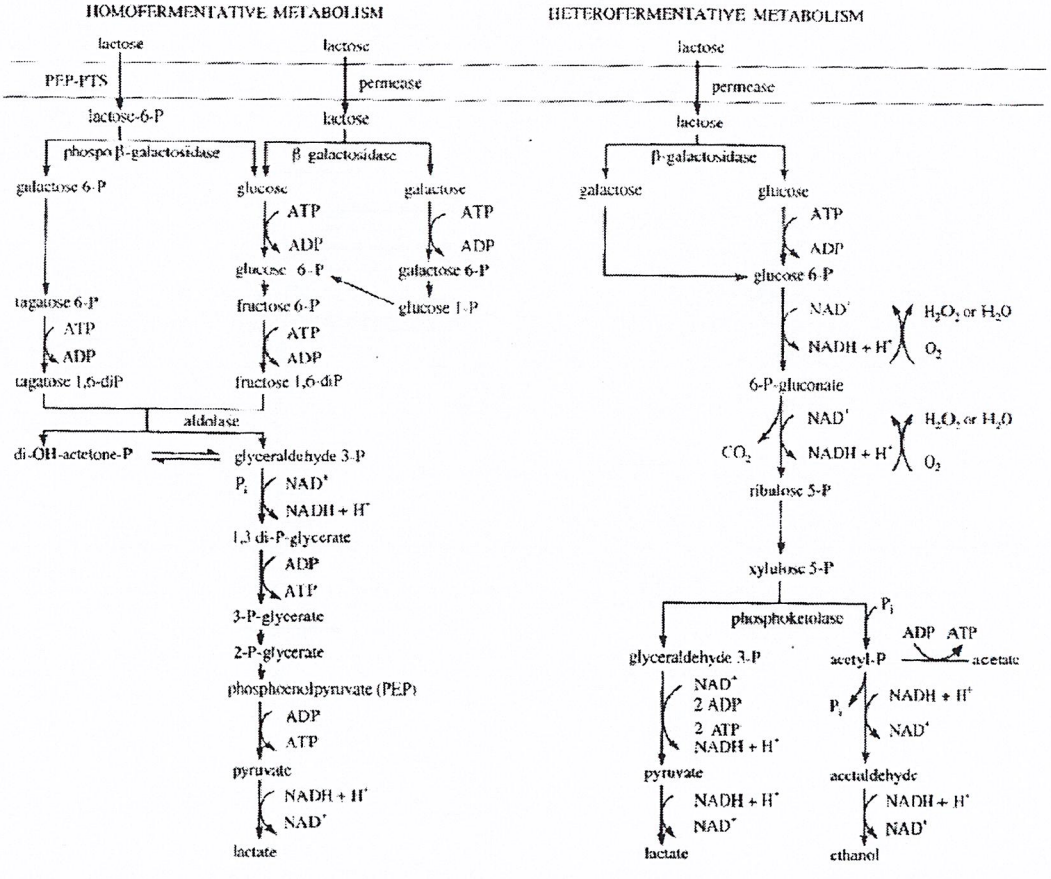
2.2 การหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก

การหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารจากธัญพืช ผัก และผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเล ถือเป็นเทคโนโลยีสำคัญที่ส่งผลต่อความปลอดภัย และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ซึ่งเพียงพอที่จะใช้เป็นแนวทางในการเก็บรักษาอาหารยามที่ขาดแคลน การหมักในปัจจุบันมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น โดยมีการปรับปรุงให้ถูกสุขลักษณะจากอาหารของคนจน และการพัฒนาของโลกที่สอนต่อกันมาในแบบง่าย ๆ ทำให้ผู้คนมีความรู้ที่เป็นประโยชน์เพิ่มมากขึ้น (Lee, 1997)

การหมัก หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ หรือตัวเร่งทางชีวเคมี ซึ่งผลิตมาจากจุลินทรีย์ชนิดที่จำเพาะ แหล่งของคาร์โบไฮเดรตจะถูกใช้โดยแบคทีเรียกรดแลคติกประเภท heterofermentative lactobacilli เช่น *Lactobacillus brevis* และประเภท homofermentative lactobacilli เช่น *Lactobacillus plantarum* จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรดซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก

การทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติกจะก่อให้เกิดกรดอย่างช้า ๆ ปฏิกิริยาการหมักเริ่มตั้งแต่การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกจนทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลงสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกตามลักษณะการหมักออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 2.1) คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria คือแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมให้กรดแลคติกร้อยละ 85 ถึง 95 ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตส ผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphenol-Piruvate-Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) ทำให้น้ำตาลแลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตอยู่ในรูปของ lactose-6-phophate



ภาพที่ 2.1 กลไกการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแบบ Homofermentative และ Heterofermentative

ที่มา: Vuyst และ Vandamme (1994)

จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phospho-β-galactosidase ไฮโดรไลซ์เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ PEP-PST ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate จะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็นแลคเตตส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น glucose-1-phosphate และจะถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็นแลคเตตในที่สุด เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus, L. casei, L. plantarum* และ *L. acidophilus*

2. Heterofermentative lactic acid bacteria คือแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลให้ได้กรดแลคติกในปริมาณต่ำ และได้สารประเภทอื่น ๆ เช่น เอทธิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก เช่น *Lactobacillus accinosterus, L. brevis* และ *Leuconostoc* sp. เป็นต้น โดยเป็นแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและเอทธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 20 ถึง 25 และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20 ถึง 25 แบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยน pentose-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase ไปเป็น triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดย triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็นแลคเตต และส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehyde และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกอาจใช้กระบวนการอื่น ๆ ในการผลิตสารต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น (Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.3 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามอวัยวะของร่างกายโดยเฉพาะในกลุ่มของ *Lactobacillus* เช่น *L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii, Bifidobacterium bifidum* และ *Enterococcus faecium* บางชนิดที่กล่าวมานี้พบบริเวณกระเพาะอาหาร ซึ่งเชื่อว่ามีประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ *Lactobacilli* ยังมีความสำคัญในด้านโภชนาการ และการป้องกันโรคต่าง ๆ คือ

2.3.1 ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น ช่วยเพิ่มปริมาณไลซีนในการหมักธัญพืช

2.3.2 ช่วยกระตุ้นการเมแทบอลิซึมทั้งหมดโดยการผลิตวิตามิน เช่น กรดโฟลิค และเอนไซม์เช่น แลคเตต

2.3.3 มีความคงทนต่อจุลินทรีย์เจ้าบ้านที่พบตามลำไส้รวมถึงแบคทีเรียก่อโรค เช่น จุลินทรีย์จำพวก *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. พวกก่อโรคในลำไส้ และแข่งขันเพื่อแย่งสารอาหาร

2.3.4 ช่วยป้องกันลำไส้และการติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ เช่น ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ lactoperoxidase

2.3.5 สามารถช่วยลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในเลือด โดยดูดซับคลอเรสเตอรอลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเกลือของน้ำดี และปรับปริมาณคลอเรสเตอรอลที่มีความเข้มข้นสูงให้ต่ำลง

2.3.6 ลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยทำลายสารก่อมะเร็งและสารพิษ หยุดปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำลายสารอาหารที่เป็นประโยชน์ เช่น การยับยั้งของ trypsis, glucosinolates, phytic acid เป็นต้น และลดกากของเอนไซม์ที่ก่อมะเร็ง เช่น Beta-glucuronidase, azoreductase และ nitroreductase

2.3.7 ลดการเกิดเนื้องอกจากการผลิต marcophages ของระบบภูมิคุ้มกัน (Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.4 กล้าเชื้อจุลินทรีย์

การใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้น เริ่มขึ้นหลังจากการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนมหมัก โดยเริ่มใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* หมักไส้กรอกเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1955 กล้าเชื้อที่ใช้เป็นไลโอฟิลไลส์มีชื่อทางการค้าว่า ACCEL และในปี 1958 American Meat Institute Foundation ของสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับการใช้กล้าเชื้อดังกล่าว จึงมีการใช้ในโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อกันอย่างแพร่หลายในยุโรป และอเมริกา (Bacus และ Brown, 1981)

2.4.1 คุณสมบัติของกล้าโดยทั่ว ๆ ไป

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ดีควรมีคุณสมบัติโดยทั่ว ๆ ไปดังนี้

1. สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบ และผลิตกรดได้ในระยะเวลาอันสั้นและปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้น ๆ

2. ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้น ๆ

3. อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปเป็นกล้าเชื้อจะสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้

4. คุณสมบัติที่สำคัญมากที่สุดข้อหนึ่ง คือ การปลอดจากฟาจก์ (phage) ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ เตรียมกล้าในรูปเชื้อผสม โดยมีเหตุผลว่าในขณะนำไปใช้หากเชื้อ

สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่มีความเฉพาะกับฟาจก์ชนิดนั้น พอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมักต่อไปได้ การใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกันไป การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อฟาจก์ เช่น การใช้สายพันธุ์ผ่าเหล่า (phage resistant mutant) เตรียมกล้าโดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของฟาจก์ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณกล้าก่อนใช้งาน (bulk starter) ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของฟาจก์ (นภา, 2534)

2.4.2 ชนิดของกล้าเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรม

การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนตัวอย่างหนึ่ง ที่ได้มีการพัฒนาจนมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยนอกจากจะแบ่งชนิดของกล้าเชื้อออกตามความเหมาะสมที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต่างกันแล้ว ยังแบ่งกล้าเชื้อออกเป็น

1. กล้าเชื้อที่นำไปใช้ได้เลยโดยไม่ต้องมีการเพิ่มปริมาณเชื้อ (direct set) เช่น กล้าเชื้อที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งเชดดา (cheddar cheese) คอตเตจชีส (cottage cheese) และโยเกิร์ต (yogurt) ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น

2. กล้าเชื้อที่ต้องนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนใช้ (bulk set) กล้าเชื้อชนิดนี้ก่อนนำไปใช้โรงงานอาหารหมักแต่ละแห่งจะต้องนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอ กล้าเชื้อที่เพิ่มปริมาณเชื้อแล้วนี้เรียก bulk starter ซึ่งเฉพาะโรงงานอุตสาหกรรมนมหมักเท่านั้นที่นิยมผลิต bulk starter โดยต้องมีวิธีการป้องกันการปนเปื้อนของฟาจก์

3. กล้าเชื้อทั้งสองชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว มีทั้งแบบที่เป็นกล้าเชื้อเข้มข้น (concentrate starter) และกล้าเชื้อที่ไม่เข้มข้น (unconcentrate starter) ในรูปแบบต่าง ๆ กัน เช่น เป็นกล้าเชื้อที่อยู่ในรูปแช่แข็ง (frozen culture) ไลโอฟิไลส์ (freez-dried culture) และเชื้อผงแห้ง (dried culture) (นภา, 2534)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก

หลักสำคัญ ต้องให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้รวดเร็วและสร้างกรดแลคติก ทำให้ค่าพีเอชลดลงเป็นผลให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ถูกกำจัดออกไป ปัจจัยที่ควรพิจารณาคือ ต้องหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะในการหมัก เช่น ข้าวสุก ข้าวคั่ว สารอินทรีย์ที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ วิตามิน เกลือแร่ กรดอะมิโนจากเนื้อปลา (สัตว์น้ำ) สภาพไร้อากาศ (anaerobiosis) อุณหภูมิที่พอเหมาะค่อนข้างสูง 20-35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเกลือที่พอเหมาะ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และค่าพีเอช (กรดแลคติก) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พวกแบคทีเรียกรดแลคติกมีความทนทานดีต่อคาร์บอนไดออกไซด์ สารประกอบอย่างอื่นที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ความเป็นกลางของอาหาร คาร์โบไฮเดรตที่ใส่ลงไปต้องพอเหมาะ ถ้าอยู่ในสภาพเป็นกรด

พีเอช 5 ถึง 6 อาจเสียได้ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในตอนเริ่มต้นควรมีปริมาณมาก และปริมาณของแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นคู่แข่งในตอนเริ่มต้นหมักควรมีปริมาณน้อย (มัทนา, 2538)

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

ตารางที่ 2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสดและเนื้อหมักที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิต

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรียกรดแลคติก
Semi-dry fermented sausages	
Lebanon bologna	เชื้อผสมระหว่าง *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum*
Pok roll	*P. cerevisiae*
Dry fermented sausages	
Dry sausages	*P. cerevisiae*
Salami	*Lactobacillus* sp.
Ferment snack sausage	
Hot bar sausage	*P. cerevisiae*
Processed meat products	
Bacon	*Lactobacillus plantalum*
Frankfurters	*Micrococcus* sp.
Fermented poultry sausages	
Semi-dry turkey sausage	*P. cerevisiae*

ที่มา : Smith และ Palumbo (1981)

2.6 สารยับยั้งที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการหมัก ยังสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ สารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีดังนี้

2.6.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำปฏิกิริยากับ endogenousthiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ intermediary oxidation ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2.6.2 ไดอะซิติล (diacety 2,3-butanedione) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน

2.6.3 รูทีรีน (reuterin) เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน และสามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย

2.6.4 Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลคติก

2.6.5 แบคเทอริโอซิน เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีหลายชนิดจัดเป็นโปรตีนที่มีผลการยับยั้งในช่วงแคบ เป็นแบคทีเรียที่ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน รวมถึงแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เช่น ไนซิน (nisin), เพดิโอซิน (Pediocin) เป็นต้น (Dasechel, 1989)

2.7 แบคเทอริโอซิน

แบคทีเรียเป็นแหล่งของ antimicrobial peptides ซึ่งได้ถูกนำมาตรวจสอบถึงการใช้ประโยชน์ในด้านความปลอดภัยของอาหารทางจุลินทรีย์ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ของแบคทีเรียแกรมลบได้ถูกศึกษาเป็นอันดับแรก โคลิซิน (colicins) ของ *Eschericia coli* ถูกศึกษากันมากที่สุด โคลิซินประกอบไปด้วยกลุ่มของโปรตีนที่ต่อต้านแบคทีเรีย ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียด้วยกลไกต่าง ๆ ดังเช่น ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ยับยั้งการผ่านเข้าออกของสารสู่เยื่อหุ้มเซลล์ หรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ Rnase และ Dnase ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก แบคเทอริโอซินเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้ประโยชน์สำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร (Cleveland และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหาร

แหล่งอาหาร	สายพันธุ์	การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์
ผลิตภัณฑ์ประเภทโพไบโอติกทางการค้า	*Streptococcus* sp. CNCM 1-841	*Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes*
Bulgarian yellow cheese	*Lactobacillus delbrueckii* sp.	*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*
Radish	*Enterococcus mundtii*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R	*L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* และ *Leuconostoc* spp.
French mold-ripened soft cheese	*Lactobacillus plantarum* BFE905 *Carnobacterium piscicola* CP5	*L. monocytogenes* *Carnobacterium*, *Listeria* และ *Enterococcus* spp.
ถั่วงอก	*L. lactis* subsp. *lactis* (Nis Z)	*L. monocytogenes*
Munster cheese	*L. plantarum* WHE92 (PedAcH)	*L. monocytogenes*
แฮมที่เน่าเสีย	*C. piscicola* JG126	*L. monocytogenes*
Traditional French cheese	*E. faecalis* EFS2	*L. inocua*
ไส้กรอกแห้ง	*L. plantarum* UGI	*L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*
Irish kefir grain	*L. lactis* DPC3147	*Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc* spp.
ไส้กรอกหมักแห้ง	*L. lactis* (Nis A)	*L. monocytogenes*
ไส้กรอกหมัก	*L. plantarum* SA6	*Lactobacillus* spp.

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหาร (ต่อ)

แหล่งอาหาร	สายพันธุ์	การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์
Red smear cheese	*Brevibacterium lines* M18	*Listeria* และ *Corinebacterium* spp.
เนื้อสัตว์	*Leuconostoc carnosum* TaMA (LeuA)	*L. monocytogenes*
Sour doughs	*L. bavaricus* (bavA)	*L. monocytogenes*
Whey	*E. faecalis* 226	*L. monocytogenes*
นมแพะ	*L. mesenteroides* Y105	*L. monocytogenes*
Sauerkraut	*L. lactis* subsp. lactis (Nis)	*L. monocytogenes*

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

ดังที่ได้กล่าวในข้างต้นโปรตีนต้านจุลินทรีย์หรือเปปไทด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่เรียกว่าแบคเทอริโอซิน ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยไรโบโซมและการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องบทความนี้เน้นแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและมีความเป็นไปได้ที่จะมีประสิทธิภาพในการถนอมอาหาร แบคเทอริโอซินถูกนำมาใช้ประโยชน์ใน hurdle technology ซึ่งมีการใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อเสริมฤทธิ์กัน เพื่อการถนอมอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการทำงานของแบคเทอริโอซินเมื่อใช้ hurdle technology

แบคเทอริโอซิน	ปัจจัยอื่น ๆ	ผลกระทบ
nisin A	N_2; CO_2; อุณหภูมิต่ำ	ผลกระทบต่อ *L. monocytogenes*; มีการเพิ่มขึ้นของ lag phase (400 IU/ml.); การยับยั้งการเจริญ (1250 IU/ml.)
pediocin AcH	hydrostatic pressure	การใช้ร่วมกันระหว่างความดัน (345 MPa) อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และแบคเทอริโอซินเป็นผลทำให้เกิดการลดลงของการอยู่รอดของ *S. aureus*
nisin A	Milk lactoperoxidase (LP) และ อุณหภูมิต่ำ	*L. lactis* ที่ผลิตไนซินทำงานร่วมกันกับ LP ในการทำให้ *L. monocytogenes* ลดจำนวนลง

ตารางที่ 2.3 การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการทำงานของแบคเทอริโอซินเมื่อใช้ hurdle technology (ต่อ)

แบคเทอริโอซิน	ปัจจัยอื่น ๆ	ผลกระทบ
nisin A	calcium alginate gel	Gel-immobilized nisin ถูกผลิตขึ้นมากกว่าไนซินบริสุทธิ์ และยับยั้งการเจริญของ *B. thermosphacta* บน beed carcasses
pediocin AcH	sodium diacetate	pediocin และ sodium diacetate เมื่อทำงานร่วม กันจะมีประสิทธิภาพเสริมฤทธิ์กันในการต่อต้านการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิต่ำ
nisin	sucrose fatty acid esters	การทำงานร่วมกันต่อต้าน *L. monocytogenes* , *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum* และ *S. aureus*
nisin	carbondioxide	เกิดการทำงานร่วมกันเพื่อใช้ต่อต้าน wild-type *L. monocytogenes* และ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ที่ต้านไนซิน
nisin	pulsed electric field	กิจกรรมการทำงานร่วมกันต่อต้าน *B. cereus* (0.06 μg/ml. ของ nisin และ 16.7 kV/cm., 100 μs duration PEF)
nisin	modified atmosphere packaging (MAP)	การใช้ร่วมกันมีผลดีกว่าการทำงานเพียงลำพังในการป้องกันการเจริญของ *L. monocytogenes*
pediocin AcH	emulsifier (Tween 80) หรือ encapsulation ของ pediocin ภายในไลโซโซม	pediocin AcH มีกิจกรรมการต่อต้าน listeria ในส่วนที่ข้นของนมปราศจากไขมัน ไขมันนม หรือ เนื้อสัตว์ เมื่อมีอยู่ในรูปของ encapsulated หรือในสภาพที่มี Tween 80

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

ตั้งแต่มีการแยกแบคเทอริโอซินออกจากอาหาร ดังเช่นพวกเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์นมเนย ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่บริโภคกันโดยไม่รู้ตัวกันมาเป็นศตวรรษ การศึกษาของ *L. lactis* ทั้ง 40 สายพันธุ์แสดงให้เห็นว่ามี 35 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไนซิน (nisin) ไนซินเป็นที่ยอมรับในการใช้ประโยชน์มากกว่า 40 ประเทศและมีการนำมาใช้ในการถนอมอาหารมานานกว่า 50 ปี (Cleveland และคณะ, 2001)

ในเอกสารมักจะสับสนระหว่างคำว่าแบคเทอริโอซินกับยาปฏิชีวนะการนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารอาจถูกจำกัดเนื่องจากมีกฎข้อบังคับด้านกฎหมายอาหาร แบคเทอริโอซินแตกต่างกับยาปฏิชีวนะโดยแบคเทอริโอซินมีความปลอดภัยและใช้ได้ผลดีในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (Cleveland และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.4 ความแตกต่างของแบคเทอริโอซินและยาปฏิชีวนะ

ลักษณะจำเพาะ	แบคเทอริโอซิน	ยาปฏิชีวนะ
การนำไปใช้ประโยชน์	ด้านอาหาร	ด้านการรักษาโรค (Clinical)
การสังเคราะห์	Ribosomal	สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)
กิจกรรม	Narrow Spectrum	Varying Spectrum
สร้างภูมิคุ้มกัน Host	สร้าง	ไม่สร้าง
กลไกการต่อต้านเซลล์เป้าหมาย	มักมีการปรับตัวที่มีผลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	มักจะมีการถ่ายโอนทางพันธุกรรมซึ่งมีผลกระทบที่ต่างพื้นที่ ขึ้นอยู่กับรูปแบบของปฏิกิริยา (mode of action)
เงื่อนไขการเกิดปฏิกิริยา	บางครั้งลดจำนวนโมเลกุล	มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย
รูปแบบของปฏิกิริยา (mode of action	ส่วนใหญ่ทำให้เกิดรูแต่ในบางครั้งเกิดการสร้างผนังเซลล์	ทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หรือ intracellular target
ความเป็นพิษ และผลข้างเคียง	เท่าที่ทราบยังไม่มี	มี

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

2.7.1 การตรวจและวิเคราะห์หากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

วิธีการตรวจหากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นวิธีที่นำมาจากการศึกษาจากแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสารตัวแรกที่พบคือโคลิซิน (colicins) วิธีการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้กันมากอาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

ไปพร้อม ๆ กับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ หรือเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินก่อนแล้วเททับด้วยจุลินทรีย์ที่ทดสอบ วิธีเหล่านี้ได้แก่

2.7.1.1 การหยดหรือแตะน้ำหมัก (culture supernatant) ลงบนเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบซึ่งได้เทไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (indicator lawns)

2.7.1.2 การขีดเชื้อแบคทีเรีย (cross streaking bacteria)

2.7.1.3 การเททับด้วยจุลินทรีย์ที่ทดสอบลงบนเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินซึ่งได้เพาะเลี้ยงไว้ล่วงหน้า (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 วิธีทดสอบแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

การประยุกต์ใช้	วิธีการ	ขั้นตอน
ส่วนใสที่ได้จากน้ำหมัก (culture supernatant)	1. spot on lawn test (spot test)	หยดหรือแตะน้ำหมัก (supernatant) ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองจุลินทรีย์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ
	2. Agar well diffusion	เติมน้ำหมักที่ปรับให้มีฤทธิ์เป็นกลาง และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองจุลินทรีย์ ลงในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ
	3. การตรวจวัดกิจกรรม	หยดหรือแตะน้ำหมักที่ทำเจือจาง (serial dilution) ซึ่งปรับให้มีฤทธิ์เป็นกลาง และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองจุลินทรีย์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมจุลินทีย์ที่ใช้ทดสอบ
โคโลนีของแบคทีเรีย	1. Flip plate method	เลี้ยงเชื้อให้เจริญขึ้นเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง จากนั้นกลับจานเพาะเชื้อ เพื่อให้อาหารเข้าไปอยู่ในฝาจานและเททับด้วยเชื้อที่ใช้ทดสอบ
	2. Sandwich overlay	ปิเปตเชื้อที่มีแบคทีเรียที่ได้ทำการเจือจางใส่ในจานเพาะชื้อแล้วเททับด้วยอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป นำไปบ่มจนกระทั่งมองเห็นโคโลนีเจริญ และเททับด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (indicator lawn)
	3. Lutri-Plate	ใช้จานเพาะเชื้อพิเศษที่เทอาหารไว้ 2 ด้าน คือ ด้านหนึ่งเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเป็นโคโลนี ส่วนอีกด้านหนึ่งเททับด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ที่มา: Muriana และ Luchansky (1993)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีหลายวิธีที่ใช้ประมาณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน แต่วิธีที่ใช้กันมาก คือ วิธีการทำเจือจาง (Critical dilution method) กล่าวโดยย่อคือ จะนำส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture supernatant) ซึ่งมีแบคเทอริโอซินมาทำการเจือจาง แล้วหยดลงบนเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับทดสอบ (indicator lawn) บนจานอาหาร และค่ากิจกรรมในหน่วยของ Arbitrary unit (AU) (Muriana และ Luchansky, 1993)

2.7.2 การผลิตแบคเทอริโอซิน

ก. การผลิตแบคเทอริโอซินบนอาหารแข็ง

โดยส่วนใหญ่การศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตเริ่มต้นโดยการหากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง โดยปกติจะเทเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (indicator cells) ลงบนเชื้อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง (หยดหรือแตะ) บนผิวหน้าอาหารแข็งหรือจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกยังผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และสารต้านการเจริญชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ปัญหาที่พบมากเกิดขึ้นเมื่อแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกเพื่อศึกษาถึงความไวต่อแบคเทอริโอซินเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างกรดแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่จะมีความไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบ จึงมีการดัดแปลงวิธีการเพื่อลดปัญหาการยับยั้งที่เกิดจากกรด ได้แก่ การทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นบัฟเฟอร์ การลดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อจะใช้ในการหมักได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ การใช้จุลินทรีย์ที่ทดสอบซึ่งไม่ไวต่อกรด ปัญหาของฟาจก์ (phage) สามารถกำจัดได้โดยการหากิจกรรมของแบคเทอริโอซินหลังจากการแพร่บนอาหารแข็ง และผลของการยับยั้งโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขจัดออกได้โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปกติแล้วเมื่อทำการหากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ ในระยะแรกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่าในอาหารเหลว เพราะการสร้างแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในอาหารแข็งและแบคเทอริโอซินจะถูกทำให้เข้มข้นบริเวณรอบ ๆ เซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น ดังนั้นการใช้อาหารที่เติมวุ้นจึงช่วยให้การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นง่ายขึ้น (Muriana และ Luchansky, 1993)

ข. การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว

การผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจะสังเกตเห็นได้ง่ายบนอาหารแข็ง แต่การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งในขั้นต่อไปสามารถทำได้ง่ายโดยเมื่อมีการผลิตในอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวถูกควบคุมได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวจะทำให้สามารถรักษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินได้สูงสุด การศึกษาเพื่อหา

สภาวะที่เหมาะสมเพื่อที่จะให้มีแบคเทอริโอซินหยาบ (crude bacteriocin) ผลิตขึ้นมาก จะช่วยให้การได้กลับคืน (recovery) ของแบคเทอริโอซินในขั้นตอนต่อไปง่ายขึ้น (Muriana และ Luchansky, 1993)

จากการศึกษาต่าง ๆ เกี่ยวกับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญคล้ายกับผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง เช่น น้ำนม มีผู้รายงานว่ามีการผลิต acidolin, acidophilin และ bulgarican ในนมโดยเชื้อ lactobacilli แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดเจริญไม่ดีในอาหารที่มีนม เหตุผลข้อนี้ทำให้มีการใช้ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (dehydrated culture media) และอาหาร defined synthetic media ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อผลิตแบคเทอริโอซิน (Muriana และ Luchansky, 1993)

ในการศึกษาสารยับยั้งที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป หรืออาหารสำเร็จรูปที่ได้มีการดัดแปลงเพื่อให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารที่มีคุณค่าสูงสำหรับการเจริญเติบโต (ตารางที่ 2.6) ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus helveticus* สายพันธุ์ LP27 ผลิต lactocin 27 ได้ในระดับปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว APT แต่ถ้าใช้อาหาร BHI, trypticase soy broth หรือ thioglycollate broth พบว่าได้ผลิตผลที่ต่ำกว่า เช่นเดียวกับ *Lactobacillus casei* GR-1 และ *Lactobacillus acidophilus* 76 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* Hu 734 ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่าการทำไดอะไลซิส (dialysis) อาหาร MRS broth ก่อนที่จะเติมเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินเพื่อขจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากออกไปจะช่วยทำให้ pediocin AcH บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น (Muriana และ Luchansky, 1993)

สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน มีผู้ศึกษาการผลิต lactotacin B, helveticin และ lactacin F ในอาหาร MRS-based media ที่ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.0-7.5 โดยการเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ปริมาณ helveticin J ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus helveticus* 481 สูงสุดที่ pH 5.5 lactacin B (ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* N2) สูงสุดที่ pH 6.0 และ lactacin F (ผลิตโดย *L. acidophilus* 11088) มีปริมาณสูงสุดที่ pH 7.0 แสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน และมีความผันแปรขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสายพันธุ์ที่มีความเกี่ยวข้องกันมาก (closely related strains) และได้มีผู้ทดลองปรับสูตรอาหาร MRS broth เพื่อให้ได้สาร pediocin AcH (ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* H) ในปริมาณที่สูง ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพ และทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ในปริมาณมาก (Muriana และ Luchansky, 1993)

ตารางที่ 2.6 สภาวะแวดล้อมเพื่อการผลิตและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

เชื้อจุลินทรีย์	แบคเทอริโอซิน	อาหารเลี้ยงเชื้อ[a]	วิธีการทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
Carnobacterium				
C. piscicola LV17	NN[b]	APT, pH 6.5	AS, dialysis	ND[c]
C. piscicola UAL26	NN	APT, pH 6.5	UF	ND
C. piscicola LV16	NN	D-MRS (MRS ที่ไม่มี acetate, pH 8.5)	NP[d]	ND
Lactobacillus				
L. acidophilus 11088	Lactacin F	MRS (pH 7.0)	AS, GF, HPLC, SDS-PAGE	6.3
L. acidophilus N2	Lactacin B	MRS (pH 6.0)	IEX, UF, GF	6.0
L. acidophilus LAPT 1060	Acidophilucin A	MRS (0.5% กลูโคส, 0.5% แลคโตส)	NP	ND
L. brevis B37	Brevicin 37	TJM & SM-2_P (synthetic medium)	NP	ND
L. brevis BB155	NN	TSA (ไม่มีกลูโคส และมี 0.5% Yeast Extract)	NP	ND
L. casei B80	Caseicin 80	TJM & SM-2 (synthetic medium)	UF, CEX, GF-FPLC	~41
L. delbrueckii JCM1248	Lacticin B	MRS (0.5% กลูโคส, 0.5% แลคโตส)	NP	ND
L. fermenti 466	NN	MRS dialysate	Vacuum concentrated, dialysis, GF, CEX	ND
L. gasseri strains	Gassericin A	MRS	NP	ND

ตารางที่ 2.6 สภาวะแวดล้อมเพื่อการผลิตและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	แบคเทอริโอซิน	อาหารเลี้ยงเชื้อ[a]	วิธีการทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
L. gasseri strains	Gassericin A	MRS	NP	ND
L. helveticus 481	Helveticin J	MRS (pH 5.5)	AS, GF, SDS-PAGE.	~37
L. helveticus LP27	Lacticin 27	ATP ไม่มี Tween 80	GF, $CHCL_3$ precipitation, SDS-PAGE	12.4
L. plantarum C-11	Plantaricin A	MRS	Concentrated cy dialysis	ND
L. plantarum NCDO1193	Plantaricin B	MRS (0.5% กลูโคส)	NP	ND
L. reuteri LA6	Peutericin 6	MRS	UF, dialysis	ND
L. sake Lb706	Sakacin A	MRS-0.2 (0.2% กลูโคส)	Dialysis, vacuum aoncentrated	ND
L. sake L45	Lactocin S	MRS	AS, GF, IEX, HIC, HPLC	ND
L. sake 148	NN	MRS	NP	ND
Lactobacillus sp. 100-37	NN	MRS	AS, dialysis	ND
Lactococcus				
L. cremoris 346	Diplococcin	M17 broth และ M17 agar	AS, CEX, dialysis, SDS-PAGE	5.3
L. cremoris LMG2130	Lactococcin A	M17 broth และ M17G agar	AS, CEX, HIC, FPLC	5.8
L. diacetylactis S50	Bacteriocin S50	M1	7G	NP

ตารางที่ 2.6 สภาวะแวดล้อมเพื่อการผลิตและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	แบคเทอริโอซิน	อาหารเลี้ยงเชื้อ[a]	วิธีการทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
L. lactis ADRIA-85LO30	Lactococcin	GC broth และ M17G agar	Dialysis, CEX, GF, DSD-PAGE	2.3
L. lactis DRC 1	Dricin	SL1 broth	NP	1.7
L. lactis CNRZ 481	Lacticin 481	Elliker (ไม่มี gelatin, pH 5.5)	AS, GF, HPLC, SDS-PAGE	ND
L. lactis	Nisin	Commercial preparation	GF, ultracen-trifugation	3.5
Leuconostoc				
L. gelidum UAL187	Leucocin A-UAL187	CAA broth (semidefined)	AS, AP, HIC, GF, HPLC, SDS-PAGE	3.9
L. gelidum 139	NN	BM broth (MRS ที่ไม่มีซิเตรต และอะซิเตต	Dialysis	ND
L. mesenteroides UL5	Mesenterocin 5	MRS	AS, Dialysis, UF,SDS-PAGE	4.5
L. paramesen teroides OX	Leuconocin S	ATP	SDS-PAGE	ND
Pediococcus				
P. acidilactici H	Pediocin AcH	TGE	AS, GF, IEX, SDS-PAGE	2.7
P. acidilactici PALC10	Pediocin PA-1	MRS	AS, dialysis, GF, IEX	16.5

ตารางที่ 2.6 สภาวะแวดล้อมเพื่อการผลิตและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	แบคเทอริโอซิน	อาหารเลี้ยงเชื้อ[a]	วิธีการทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)
P. acidilactici PO2	NN	APT	NP	ND
P. acidilactici JD1-23	NN	MRS ที่เติม 2% Yeast Extract	NP	ND
P. pentosaceus FBB61	Pediocin A	MRS	NP	ND

[a]ตัวย่อ: MRS, APT, M17 และ Elliker เป็นอาหารสำเร็จรูป; TJM คือ tomato juice medium; TSA คือ tryptic soy agar; อาหาร M17G, M17-กลูโคส; SM-2, CG,SLI, CAA, BM, TGE และ D-MRS broths คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ดัดแปลง; As คือ ammonium sulfate precipitation; AP คือ acid precipication; GF คือ gel filtration; IEX คือ ion exchange; CEX คือ cation exchange; HPLC คือ high performance liquid chromatography; UF คือ ultrafiltration; FPLC คือ fast protein liquid chromatography; HIC คือ hydrophobic interaction chromatography; SDS-PAGR คือ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

[b]NN, ยังไม่ได้รับการตั้งชื่อ

[c]ND, ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

[d]NP, ไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์

ที่มา: Muriana และ Luchansky (1993)

2.7.3 การจำแนกแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินสามารถแบ่งได้เป็น 3-4 กลุ่ม ไนซิน (nisin) ค้นพบในปี ค.ศ. 1928 และซับทิลิน (subtilin) พบในปี ค.ศ. 1948 เป็นสารที่คล้ายไนซินต่างกันโดย 12 กรดอะมิโน ทั้งคู่จัดอยู่ใน Class I เรียกว่าเป็นแลนติไบโอติก (lantibiotics) การจำแนกแบคเทอริโอซินในปัจจุบันมีการปรับปรุง แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างซึ่งสังเกตได้ในโมเลกุลที่ค้นพบใหม่ Class I แบ่งย่อยเป็น Class Ia และ Class Ib โดยทั่วไปเปปไทด์ของ Class I มีกรดอะมิโน 19 ชนิดถึงมากว่า 50 ชนิด กรดอะมิโน แบคเทอริโอซิน Class I ถูกจัดจำแนกโดยอาศัยกรดอะมิโนที่ต่างออกไป (unusual amino acid) ตัวอย่างเช่น lanthioninie, methyl-lanthionine, dehydrobuthyrin Class Ia จะรวมถึงไนซินด้วย ประกอบด้วย cationic และ hydrophobic peptides ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นรูใน target membrane และมี

โครงสร้างที่ยืดหยุ่นได้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงร่างแข็งของ Class Ib bacteriocins ซึ่งเป็นเปปไทด์รูปกลม (globular peptides) (Cleveland และคณะ, 2001)

Class II ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่คงตัวต่อความร้อนและสามารถแบ่งย่อยได้เป็น Class IIa รวมถึงเปปไทด์ที่คล้าย pediocin ที่แอคทีฟกับเชื้อ *Listeria* ที่มีลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ต่อกับ Tyr-Gly-Asn-Gly-Val และต่อกับ 2 cyteinnes ทำให้เกิด s-s brige ใน N-terminal ครึ่งหนึ่งของสายเปปไทด์แบคเทอริโอซิน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายที่ต่างกัน ประกอบกันจัดเป็น Class IIb สายเปปไทด์ 2 สายของแบคเทอริโอซินจำเป็นทั้งคู่ในการเกิดกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ลำดับของกรดอะมิโนสายแรกของเปปไทด์นั้นแตกต่างกัน แม้ว่าแต่ละอันจะถูกกำกับไว้โดยยีนของตัวเองที่อยู่ใกล้เคียงกันแต่มีเพียงยีนเดียวซึ่งจำเป็นที่เป็นยีนภูมิคุ้มกัน แบคเทอริโอซิน Class IIc เริ่มแรกถูกเสนอขึ้นว่าถูกปล่อยโดย general sec-system และแบคเทอริโอซิน Class III เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อน สำหรับแบคเทอริโอซิน Class III นี้ยังมีข้อมูลไม่มากนัก สำหรับแบคเทอริโอซิน Class ที่ 4 ได้ถูกเสนอว่าอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

2.7.4 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหาร

ถึงแม้ว่าผลการทดลองในอาหารเหลวได้แสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายแล้ว ก็จะต้องทำการศึกษาในเชิงประยุกต์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในอาหาร การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินในอาหาร ได้มีการรายงานไว้แล้วว่าองค์ประกอบทางเคมีอาหารและกระบวนการทางกายภาพมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ตัวอย่างเช่น ไนซินสามารถละลายได้ดีที่พีเอช 2 มากกว่าพีเอช 8 ถึง 228 เท่า (Cleveland และคณะ, 2001)

ในปัจจุบันมีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก บางกรณีมีการใช้แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินตามธรรมชาติ เช่น *Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidilactici* และ *Enterococcus faecalis* ในการศึกษาเหล่านั้น เช่นมีรายงานว่า *Listeria monocytogenes* Ohio ในผลิตภัณฑ์ Manchego Cheese ที่มีการใส่เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินก็คือ *Enterococcus faecalis* ได้ลดจำนวนลง 6 logs ภายใน 7 วัน (Cleveland และคณะ, 2001)

2.7.5 การนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไปใช้ประโยชน์

2.7.5.1 ระบบการถนอมอาหารชีวภาพ (Biopreservation Systems)

ได้มีการประเมินแบคเทอริโอซิน ถึงความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย แม้ว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งจุลินทรีย์จะถูกพิสูจน์แล้วในอาหารที่ถูกสังเคราะห์ (synthetic media) แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่นอนว่าแบคเทอริโอซินจะให้ผลแบบเดียวกันในอาหาร ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันดีที่สุด ซึ่งมีแต่ไนซิน

เท่านั้นที่เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ในอาหาร ในสหรัฐอเมริกาไนซินถูกนำมาใช้ใน cheese spreads ที่ผ่านการพาสเจอไรส์เพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์ *Clostridium botulinum* ในทั่วโลกไนซินได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายรวมถึงนมพาสเจอไรซ์นมปรุงแต่ง และนมที่มีอายุการเก็บยาวนาน รวมทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่มและเนยแข็งที่ผ่านการแปรรูป ผักกระป๋องและซุปกระป๋อง เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นที่ต้องการในไวน์และเบียร์ แต่การใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางของไนซินในอาหารบางครั้งก็ถูกจำกัด เพราะว่าไนซินมีความสามารถในการละลายต่ำ ราคาแพง และมีความผันแปรในแง่ของความไวต่อแบคทีเรียเป้าหมายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของไนซิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพยายามมุ่งไปสู่การทำให้ไนซินบริสุทธิ์ และจัดจำแนกแบคเทอริโอซินชนิดอื่น ๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหาร (Muriana และ Luchansky, 1993)

ตารางที่ 2.7 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการถนอมอาหาร

แบคเทอริโอซิน	การประยุกต์ใช้	สรุปผล
nisin A	การเติมไนซินลงใน meat binding system	การเติม nisin ทำให้ลดจำนวนของแบคทีเรียที่ไม่เป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์เนื้อขึ้นรูป (restructured meat product)
pediocin AcH	การใช้ *Lactobacillus plantarum* pediocin AcH โดยฉีดพ่นบน Munster cheese เมื่อเริ่มต้นการบ่ม	การฉีดพ่นป้องกันการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes*
enterocin A	การใช้ประโยชน์จาก *Enterococcus faecalis* INIA4 ที่ผลิต enterocin เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตเนยแข็ง Manchego	การใช้ *Enterococcus faecalis* INIA4 ยับยั้ง *L. monocytogenes* Ohio แต่ไม่ใช่ *L.monocytogenes* scott A
liniocin M-18	การใช้ประโยชน์จาก *B. Lines* เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตเนยแข็ง red smear	เป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของจำนวนเชื้อ *L. iranovi* และ *L. monocytogenes* 2 log

ตารางที่ 2.7 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการถนอมอาหาร (ต่อ)

Bacteriocin	การประยุกต์ใช้	สรุปผล
nisin A	การใช้ประโยชน์ของ nisin ในการควบคุม *L. monocytogenes* เนยแข็ง ricotta	nisin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ *L. monocytogenes* เป็นเวลา 8 สัปดาห์
piscicolin126	การใช้ piscicolin 126 ในการควบคุม *L. monocytogenes* ในdevilled ham paste	มีประสิทธิภาพมากกว่าแบคเทอริโอซินที่จำหน่ายทางการค้า
leucocin A	การใช้ประโยชน์ของ *Leuconostoc gelidum* UAL187 ที่สร้าง leucocine ในการควบคุมการเน่าเสียของเนื้อสัตว์	การเติมเชื้อที่มีการสร้างแบคเทอริโอซินลงไปในเนื้อที่บรรจุแบบสุญญากาศช่วยชะลอการเน่าเสียจาก *Lactobacillus sake* ได้นานถึง 8 สัปดาห์
lactocin 705	การใช้ประโยชน์จาก lactocin 705 เพื่อลดการเจริญของ *L. monocytogenes* ในเนื้อวัวบด	lactocin 705 มีผลยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในเนื้อวัวบด
pediocin AcH	การใช้ประโยชน์จาก *P. acidilactici* เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes*	กล้าเชื้อของ *P. acidilactici* (Ped^+) ส่งผลให้มีการลดลงของ *L. monocytogenes* ระหว่างการผลิตไส้กรอกไก่
pediocin	การแสดงออกของ pediocin operon ใน *Saccharomyces serevisiae*	เป็นไปได้ที่จะมีการนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในการถนอมไวน์และผลิตภัณฑ์ขนมอบ
pediocin AcH	เติม pediocin ลงในเนื้อไก่สด	ควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่ 5°C 28 วัน

ตารางที่ 2.7 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการถนอมอาหาร (ต่อ)

Bacteriocin	การประยุกต์ใช้	สรุปผล
pediocin PA-1	การใช้ประโยชน์ *P. acidilactici* (Ped^+) เป็นกล้าเชื้อในไส้กรอกหมัก	ผลของ pediocin ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง *L. monocytogenes*
enterocin	เติม enterocin ในแฮม เนื้อหมู เนื้อไก่ pate ไส้กรอก	สามารถควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* ภายใต้สภาวะที่หลากหลาย

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จาก nisin

ประเทศ	อาหารที่อนุญาตให้เติม	ระดับสูงสุดที่ใช้ได้ (IU/g)
Argentina	เนยแข็งแปรรูป(processed cheese)	500
Australia	เนยแข็ง เนยแข็งแปรรูป มะเขือเทศกระป๋อง	ไม่จำกัด
Belgium	เนยแข็ง	100
Cyprus	เนยแข็ง เนยแข็งคอตเตท ผักกระป๋อง	ไม่จำกัด
EU	E234 อาจติดฉลากว่า "สารถนอมอาหารจากธรรมชาติ"	ผันแปรขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์และประเทศสมาชิก
France	เนยแข็งแปรรูป	ไม่จำกัด
Italy	เนยแข็ง	500
Mexico	nisin เป็นสารเจือปนอาหารที่อนุญาตให้ใช้ได้	ไม่จำกัด
Netherlands	เนยแข็งจากโรงงาน เนยแข็งแปรรูป เนยแข็งผง	800
Peru	nisin เป็นสารเจือปนที่อนุญาตให้ใช้ได้	ไม่จำกัด
Russia	เนยแข็งแปรรูป ผักกระป๋อง	8,000
UK	เนยแข็ง อาหารกระป๋อง ครีมคอตเตท	ไม่จำกัด
US	Processed cheese spread ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์	10,000

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

2.7.5.2 การนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ถึงแม้ว่าจะมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในอาหารหลายชนิดแต่อาหารก็ไม่ควรถูกถนอมไว้ด้วยแบคเทอริโอซินอย่างเดียวเท่านั้นควรใช้ควบคู่ไปกับการควบคุมด้วยสภาวะต่าง ๆ ด้วย เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกปกติพบได้ทั่วไปในเนื้อ แบคเทอริโอซินผลิตโดยแบคทีเรียชนิดนี้จึงได้ถูกศึกษาและคัดแยกออกมา แม้ว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหาร แต่ก็อาจไม่มีประสิทธิภาพในอาหารทุกชนิดอย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินหลายชนิดมีศักยภาพโดยสามารถนำมาใช้ได้ในอาหาร เมื่อมีการควบคุมภายใต้สภาวะต่าง ๆ อย่างเหมาะสมตัวอย่างสำคัญที่สนใจคือการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อปกติใช้ไนเตรตในการป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ในเนื้อสัตว์ แต่มีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยในแง่ของการมีไนไตรต์จึงทำให้อุตสาหกรรมอาหารพยามที่จะหาวิธีอื่นมาทดแทน เช่น การนำไนซินมาใช้ หรือใช้ไนซินร่วมกับไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่ำลงสามารถป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ได้ (Cleveland และคณะ, 2001)

2.8 อาหารหมัก

แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะจีนัส *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มดั้งเดิมที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหารและเครื่องดื่ม เพราะแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยเสริมการพัฒนากลิ่นรสและทำให้การเน่าเสียเกิดขึ้นได้ช้าลง การหมักถือเป็นความรู้ที่สืบทอดกันมาแต่โบราณเพื่อใช้เก็บรักษาอาหาร ลักษณะทางจุลชีววิทยาและชีวเคมีของจุลินทรีย์จึงเป็นเหตุให้มีการพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ และสารอาหารอย่างเงียบ ๆ ความเป็นมาของอาหารหมักเกิดจากการทดลองและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติในอาหารดิบ โดยจะสังเกตได้ว่าอาหารดิบจะมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อสัมผัส และคุณสมบัติของประสาทสัมผัสต่าง ๆ ซึ่งส่งผลในด้านความหลากหลายของอาหารให้การเก็บรักษามีคุณภาพสูงขึ้น การสูญเสียสารอาหารระหว่างการหมักเกิดขึ้นได้น้อยมาก และกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยลดจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาศัยอยู่ในอาหารได้ กระบวนการหมักที่เกิดตามธรรมชาติได้ถูกปรับปรุงเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาได้อย่างเหมาะสม หรืออาจมีการเพิ่มเติมวิธีการใหม่ ๆ การผลิตอาหารหมักและเครื่องดื่มในปัจจุบันมีการทำอย่างแพร่หลาย จากผลิตภัณฑ์ดิบทางการเกษตร รวมถึงนม เนื้อ ผลไม้ ผัก และธัญพืช เป็นต้น

ปัจจุบันการหมักอาหารและเครื่องดื่มกำลังเป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีการปรับปรุงวิธีการและเทคนิคที่ใช้ในการหมักให้รวดเร็วยิ่งขึ้น บางครั้งอาจทำการปรับปรุงจากวิธีดั้งเดิมซึ่งการพัฒนาจำเป็นต้องควบคุมสภาวะด้วยความระมัดระวังโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมนม การใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอ และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพเช่นเดียว

กับอุตสาหกรรมเนื้อ ผัก และขนมปังที่มีการพัฒนาไปข้างหน้าอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในการผลิต อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อจะส่งผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส และการเก็บรักษาตามธรรมชาติจะมีการสร้างสารยับยั้ง เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดแลคติก กรดอะซิติก และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Vuyst และ Vandamme, 1994)

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำไปใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์ผักและผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง เช่น ผักกาดดอง และใช้ในผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม และยังใช้ในผลิตภัณฑ์สัตว์ด้วย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนี้ยังมีการทำหญ้าหมัก เพื่อให้ได้คุณภาพดีมีคุณค่าสูงเหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ในการทำอาหารหมักดองโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมีรายละเอียดดังนี้

2.8.1 ผลิตภัณฑ์ทำนม (Fermented milk)

ผลิตภัณฑ์นมมักเตรียมได้จากนมหลายชนิดอาจเป็นนมสด นมขาดมันเนย นมผงหรือนมข้นก็ได้ นำมาผ่านการโฮโมจีโนซ์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลง แล้วนำมาฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลซ์แล้วหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์หรือทั้งสองชนิดมาร่วมกัน ในการหมักนมเกิดได้ 2 แบบ คือ เป็นการหมักที่ให้กรดเพียงอย่างเดียวกับ kifir type เป็นการหมักที่ให้กรดก๊าซและมีแอลกอฮอล์เกิดขึ้นเล็กน้อย หลักการของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักก็คือ การสร้างกรดแลคติกของกล้าเชื้อในการหมักให้มีพีเอชลดลง และทำให้เกิดการจับตัวของโปรตีนในนมเกิดเป็น curd คือทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น อย่างเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivayius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* การผลิตโยเกิร์ตจะมีการหมักเกิดขึ้นภายในเวลา 4 ชั่วโมง และจะเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.3 ถึง 6.5 เป็น 5.5 ของการเจริญ *streptococci* จะลดลงและ *lactobacilli* จะเจริญขึ้นเมื่อสิ้นสุดการหมักความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์และจำนวนเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้มีประมาณร้อยละ 0.90 ถึง 0.95 นอกจากนี้ยังมีการหมักที่ทำให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย คือ นมหมักที่เรียกว่า คีโตเฟอร์ ซึ่งเกิดจากการหมักนมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในการหมักครั้งนี้จะประกอบด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่ยึดเกาะกันเป็นสารที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว การอยู่ร่วมกันของกล้าเชื้อคีเฟอร์เป็นแบบ symbiotic ถ้าหากเชื้อคีเฟอร์อยู่ในน้ำนมสามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ การหมักคีเฟอร์ที่เกิดจากยีสต์ และแบคทีเรียแลคติกจะทำหน้าที่ในการหมักนมให้เป็นสารประกอบหลายอย่าง ได้แก่ กรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์และเอธานอลเล็กน้อย และนอกจากนี้ยังจะได้สารที่มีกลิ่นหอม กลิ่นรสจากคีเฟอร์และนมหลายชนิดจะมีกลิ่นที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของนมที่จะใช้ในการหมัก องค์ประกอบของไขมันในนม องค์ประกอบของกล้า

เชื้อในคีเฟอร์ตลอดจนการใช้เทคโนโลยีในการผลิตในแต่ละครั้ง ซึ่งจะเกิดประโยชน์ที่ได้จากการหมักนมที่เป็นเครื่องดื่มต่อสุขภาพ รักษาความผิดปกติของเมทาบอลิซึม รักษาโรคภูมิแพ้ และยังมีประโยชน์ในการลดการเจริญเติบโตของมะเร็ง ใช้เป็นอาหารของทารกได้และยังมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย (Guzel-seydim และคณะ, 2000; Beshkova และคณะ, 2002)

2.8.2 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว (Fermented vegetable products)

การทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้ให้บริโภคได้นาน โดยการนำมาแปรรูปและยังรวมไปถึงการนำผลไม้มาดองด้วย ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก ผักที่นิยมมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ เป็นต้น ส่วนผลไม้ที่นิยมใช้ในการดอง ได้แก่ มะขาม มะม่วง เป็นต้น ปัจจุบันการดองเป็นอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1995)

2.8.3 ผลิตภัณฑ์หมักจากธัญพืช (Fermented cereal products)

การหมักธัญพืชเป็นการหมักที่นอกเหนือจากผักและผลไม้ แต่เป็นการหมักธัญพืชซึ่งเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้ศึกษาการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักธัญพืชมีหลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เช่น ซีอิ้ว ซึ่งในการหมักส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก เช่น *Aspergillus oryzae, Pediococcus halophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* อาหารหมักชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องปรุงรสในกลุ่มของการ fermented bean เป็นอาหารหมักของคนญี่ปุ่นที่ทำจากถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและใช้แป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Aspergillus, Streptococcus* และ *Pediococcus* (Tanasupawat และคณะ, 1998)

2.8.4 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Fermented fish products)

การหมักปลาเป็นการหมักที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ปลาร้า ปลาส้ม หลักในการหมักจะประกอบด้วย ปลา เกลือ เช่นในการผลิตน้ำปลาจะประกอบด้วยปลาและเกลือเท่ากับ 3:1 ผสมให้เข้ากัน แล้วบรรจุใส่ในโอ่งแล้วปล่อยให้เกิดการหมัก 18 เดือนหรือมากกว่าก็ได้ ในระหว่างที่ทำการหมักปลา ปลาจะมีการสลายตัวเอง โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลาได้ผลผลิตเป็นของเหลวสีน้ำตาลออกมา ซึ่งของเหลวที่ออกมานี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน โปรตีนและนิวคลีโอไทด์ที่จะทำให้น้ำปลามีคุณค่าและคุณภาพทางโภชนาการมากขึ้น และยังนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบและถนอมอาหารหลายประเภท แบคทีเรียที่พบในอาหารหมักของปลา *Lactobacillus farcimni, L. pentosus, L. plantarum, Lactobacillus* sp. และ *Leuconostos* sp. จุลินทรีย์ที่ดีต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อเกลือได้ดีและสามารถเจริญได้เล็กน้อยในระหว่างการหมัก จึงมีการช่วยเสริมรสชาติของการหมักได้เป็นอย่างดี (Tanasupawat และคณะ, 1998)

2.8.5 ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Fermented meat products)

การหมักเนื้อเป็นการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการหมัก เช่น แหนม ไส้กรอก ซึ่งแหนมเป็นการหมักที่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์อื่น เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการทำสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตจากเนื้อหมู หนังหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่น ๆ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติก ในปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำในระหว่างการหมักมีกรดแลคติกเกิดขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง (Adam และ Moos, 1995)

นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วยซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากสารที่ผลิตของกล้าเชื้อหรือแบคทีเรียที่พบในแหนมเช่น ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อนี้จะทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นอกจากนี้บางผลิตภัณฑ์ยังใช้ *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ถูกรีดิวซ์ในเตรตซึ่งมีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนมากยิ่งขึ้น (Swetwiwthana และคณะ, 2003)

2.8.5.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้หมักเนื้อ

การเก็บรักษาเนื้อสัตว์ที่ตายแล้วให้สดอยู่เสมอสามารถทำได้โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกช่วยในการหมักซึ่งมีการเติมคาร์โบไฮเดรต เกลือ ข้าว อาหารสัตว์ แป้งสาลีและน้ำตาล ก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้ ดังตารางที่ 2.9 แสดงให้เห็นถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้หมักเนื้อที่ผลิตในแต่ละประเทศ ในบางประเทศมีการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โดยการเติมธัญพืช อาหารทั้งหมดจะมีการเติมคาร์โบไฮเดรตและเกลือในตอนแรก เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการเจริญ และเพื่อให้อาหารที่เก็บมีคุณภาพ การหมักไส้กรอกจะคล้ายกับการทำ salami ในแถบยุโรป และยังมีการทำกันในบางประเทศทางแถบตอนใต้ของเอเชีย หัวเชื้อที่ใช้ในการทำ salami จะแยกได้จากการหมักผลิตภัณฑ์จำพวกปลาในเกาหลี รวมไปถึงประเทศอื่น ๆ ในเอเชียด้วย (Lee, 1997)

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารทะเล ธัญพืช และเนื้อผสม

Product name	Country	Major ingredients	Microorganisms	Usage
Sikhae	Korea	Sea-water fish, cooked millet, salt	*L. mesenteroides*, *L. plantarum*	Side-dish
Narezushi	Japan	Sea-water fish, cooked millet, salt	*L. mesenteroides*, *L. plantarum*	Side-dish
Burong-isda	Philippines	Fresh-water fish, rice, salt	*L. brevis*, *Streptococcus* sp.	Side-dish
Pla-ra	Thailand	Fresh-water fish, salt, roasted rice	*Pediococcus* sp.	Side-dish
Balao-balao	Philippines	Shrimp, rice, salt	*L. mesenteroides*, *P. cerevisiae*	Condiment
Kungchao	Thailand	Shrimp, salt, sweetened rice	*P. cerevisiae*	Side-dish
Nham	Thailand	Pork, garlic, salt, rice	*P. cerevisiae*, *L. plantarum*, *L. brevis*	Pork meat in banana leaves
Sai-krok-prieo	Thailand	Pork, rice, garlic, salt	*L. plantarum*, *L. sauvarius*, *P. pentosaccus*	Sausage
Nem-chua	Vietnam	Pork, salt, cooked rice	*Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp.	Sausage
Salami	Europe	Pork	*Lactobacillus*, *Micrococcus*	Sausage

ที่มา: Lee (1997)

2.8.5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Dick และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกของ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus curvatus* ในการผลิตไส้กรอกอิตาเลียนจากเนื้อนกกระจอกเทศ โดยทดลองผลิตไส้กรอกหมักจากเนื้อนกกระจอกเทศโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ 423 และ *Lactobacillus curvatus* สายพันธุ์ DF126 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน plantaricin 423 และ curvacin DF126 ตามลำดับ โดยพบว่ากิจกรรมของ plantaricin 423 จะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่เมื่อทำการลดค่าพีเอชลงตั้งแต่ 6.5 ถึง 3.5 จะส่งผลให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลง เช่นเดียวกับกิจกรรมของ curvacin DF126 ที่จะเพิ่มขึ้นในสภาวะเดียวกัน แต่จะมีความคงตัวตลอดระยะเวลาการเจริญ ปริมาณ curvacin DF126 และ plantaricin 423 ที่ผลิตได้สูงสุดอยู่ในช่วงการเพาะเลี้ยงที่พีเอชประมาณ 4 ค่า spectra ที่วัดจากกิจกรรมการยับยั้งของ plantaricin 423 และ curvacin DF126 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ไม่ใช่แบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* sp. MC50 ผลการยับยั้งยังขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินดังกล่าว curvacin DF126 และ plantaricin 423 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในไส้กรอกอิตาเลียนได้ อย่างไรก็ตามหลังจากทำการหมักเป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* LM1 ที่รอดชีวิต พบจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากแบคเทอริโอซินมีกิจกรรมลดลงและยังมีการพัฒนาของเซลล์ทำให้ทนต่อฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก

Riebroy และคณะ (2008) ศึกษาคุณสมบัติและการยอมรับของปลาส้มฟักในประเทศไทย โดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อในการหมัก มีการศึกษาถึงความแตกต่างของชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมัก และคุณภาพของปลาส้มฟักที่ใช้ปลากะพงข้างเหลือง (bigeye snapper) เป็นตัวทดสอบ ในการทดลองผลิตปลาส้มฟักจะใช้เชื้อ *Pediococcus acidilactici* (PA104) ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^4 เซลล์ต่อกรัม พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นที่ยอมรับมากกว่าการใช้ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus acidilactici* ที่ความเข้มข้น 10^4 หรือ 10^6 เซลล์ต่อกรัม และผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมโดยปราศจากเชื้อ ระหว่างการหมักโดย PA104 แสดงให้เห็นถึงอัตราการหมักที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวควบคุมซึ่งดูได้จากค่าพีเอชที่ลดลง และปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเมื่อปรับพีเอชประมาณ 4.5 การหมักจะเกิดได้สมบูรณ์หลังทำการหมักเป็นเวลา 48 และ 36 ชั่วโมง สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมและ PA104 ตามลำดับ เนื่องจากมีการผลิตกรดที่เพิ่มสูงขึ้น จึงส่งผลต่อเนื้อสัมผัสอย่างเห็นได้ชัด ปลาส้มฟักที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งและเหนียวกว่าผลิตภัณฑ์ควบคุม เมื่อทำการประเมินค่าเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture profile analysis

(TPA) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus acidilactici* จะใช้เวลาในการหมักน้อยกว่า และยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของปลาสัมฟัก ดังนั้น *Pediococcus acidilactici* จึงมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตปลาส้มฟัก

Hu และคณะ (2008) ได้ศึกษาคุณลักษณะของไส้กรอกปลาลิ่นโดยใช้เชื้อผสมเป็นกล้าเชื้อในการปรับปรุงพัฒนาคุณลักษณะและบทบาทหน้าที่ต่าง ๆ และการเพิ่มขึ้นของกล้าเชื้อในปลา มีกล้าเชื้อผสม 3 กลุ่มที่ใช้ในงานวิจัยนี้ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum*-15, *Staphylococcus xylosus*-12 และ *Pediococcus pentosaceus*-ATCC33316 [S-PXP] กลุ่มที่สองประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum*-15, *Staphylococcus xylosus*-12 และ *Lactobacillus casei* subsp. *casei*-1.001 [S-PXC] และกลุ่มที่สามประกอบด้วย *Staphylococcus xylosus*-12, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*-1.001 [S-PXC] และ *Pediococcus pentosaceus*-ATCC33316 [S-XCP] โดยเติมกล้าเชื้อลงในเนื้อปลาลิ่นสับ ในการผลิตไส้กรอกปลาหมักระหว่างการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื้อปลาที่เติมกล้าเชื้อมีค่าพีเอชลดลง สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของค่ากรดไทโอบาทูริก (TBARS) การระเหยของไนโตรเจน (TVB-N) ไตรเมทิลเอมีน (TMA) และการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร เชื้อก่อโรคและความขาวสว่างที่มากกว่าชุดควบคุม (ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ) โดยมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) การเปลี่ยนแปลงใน SDS-PAGE แสดงให้เห็นถึงการไฮโดรไลซิสของโปรตีนในเนื้อปลาอย่างมากระหว่างกระบวนการหมัก งานวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้กล้าเชื้อผสมเติมลงไปในเนื้อปลาลิ่นเพื่อใช้ทำผลิตภัณฑ์ สามารถมีส่วนช่วยปรับปรุงในเรื่องของรสชาติความสามารถในการย่อย และถูกหลักโภชนาการ

Visessanguan และคณะ (2004) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบและบทบาทหน้าที่ของโปรตีนและผลของการบ่งชี้คุณลักษณะของแหนม (ไส้กรอกหมักไทย) พบว่าชิ้นส่วนของสารละลายอัลคาไลน์ (alkaline-soluble) ประกอบกันขึ้นเป็นองค์ประกอบของโปรตีนในแหนม จำนวนของโปรตีนแต่ละส่วนในแหนมขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการหมัก ระหว่างที่เกิดกระบวนการหมักองค์ประกอบของโปรตีนซาโคพลาสมิค (sarcoplasmic) และไมโอไฟบริลลา (myofibrillar) จะลดลงอย่างเป็นลำดับ และตามมาด้วยการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนสารละลายอัลคาไลน์ ค่าพีเอชลดลงถึง 4.6 ระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นผลของการเจริญของแบคทีเรีย และการรวมตัวของกรดแลคติกซึ่งมีผลกับโมเลกุลของโปรตีนในกล้ามเนื้อและส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของบทบาทหน้าที่ของโปรตีน ผลของการผลิตกรดดูได้จากการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลาย ความสามารถในการยึดเกาะกันของน้ำ ลักษณะด้านเนื้อสัมผัส และคุณลักษณะของสี กระบวนการย่อยโปรตีน (proteolysis) ใน

แหนมเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งดูได้จากผลของสารประกอบ TCA ที่เพิ่มขึ้น และกรดอะมิโนอิสระ (∝-amino acids) ซึ่งสิ่งนี้จะส่งผลให้เกิดกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์แหนม

นอกจากนี้ในประเทศไทยยังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

วิลาวัณย์ และอังคณา (2541) ได้ศึกษาถึงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว จากการศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกเปรี้ยวได้ 83 สายพันธุ์ เป็น *Lactobacillus* 57 สายพันธุ์และ *Pediococcus* 26 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทำหมดมาทดสอบการยับยั้งโดยใช้ agar spot method พบว่า 81 สายพันธุ์แสดงผลการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium 3292 และ *S.* Enteritidis 3294 และเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 24 สายพันธุ์ที่แสดงผลการยับยั้ง *Salmonella* ที่ใช้ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ *S.* Anatum, *S.* Enteritidis 3289 และ 3294, *S.* Typhi 3299, *S.* Typhimurium 3292 และ 3230 ได้สูง (มีส่วนใสการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร) ไปทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อ *S.* Typhimurium โดยบ่มในสภาพไม่มีออกซิเจน และใช้อาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 0.2 เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ พบว่ามีเพียง *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์และ *Pediococcus* 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่แสดงผลการยับยั้งเล็กน้อย และเมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์มาปรับพีเอชให้เป็นกลางและมีการเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี well diffusion assay พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่แสดงผลการยับยั้งต่อ *S.* Typhimurium

2.9 เคมีด้านกลิ่นรสในไส้กรอกหมัก

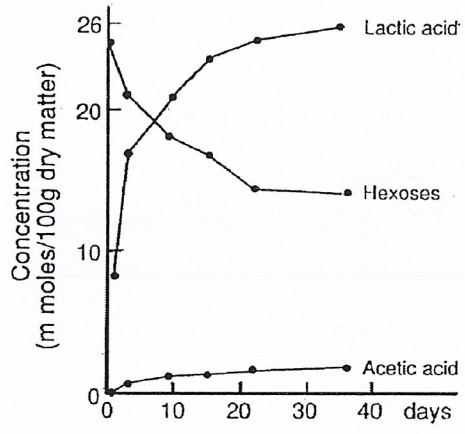
กลิ่นรสเป็นสิ่งหนึ่งที่ซับซ้อนในทางประสาทสัมผัสซึ่งรวมถึงการตอบสนองด้านรสชาติ กลิ่น ลักษณะเนื้อสัมผัส และความรู้สึกในปาก เคมีในอาหารยังเป็นจุดเริ่มต้นหลักของการวิจัยไม่น้อยเกี่ยวกับไส้กรอกหมัก ไส้กรอกหมักจะมีกลิ่นรสที่ดีหรือไม่ดีขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด และมีคุณสมบัติเฉพาะตัวขึ้นอยู่กับส่วนผสม และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักและกระบวนการทำแห้งหรือการบ่ม

2.9.1 ไกลโคไลซิส (Glycolysis)

เนื้อดิบที่นำมาใช้ในการหมักไส้กรอกจะมีปริมาณกรด L-lactic ร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักร่วมกับกลูโคสเล็กน้อยเพียงร้อยละ 0.1 และสารตัวกลางในกระบวนการไกลโคไลซิส (phosphorylated glycolytic intermediates) กลูโคสและสารตัวกลางบางตัวที่มีหมู่ฟอสเฟตร่วมกับคาร์โบไฮเดรตที่เติมเข้าไปในส่วนผสมจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ หรือกล้าเชื้อที่เติมลงไปสำหรับเป็นแหล่งพลังงาน

ในการเจริญเติบโต ผลที่ตามมาก็คือเกิดการสะสมของกรดแลคติกปริมาณมากซึ่งมีทั้ง 2 ไอโซเมอร์ คือ L-lactic acid และ D-lactic acid ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลัก (Dainty และ Blom, 1995)

ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตแลคเตตและการใช้น้ำตาลเฮกโซสดูได้จากกราฟ ในภาพที่ 2.2 จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักเบลเยียม (Belgiam cold-smoked product) เห็นได้ชัดว่ามีการผลิตแลคเตตเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่าของปริมาณกรดแลคติกเริ่มต้นซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่และขึ้นอยู่กับชนิดผลิตภัณฑ์ แลคเตตอาจผลิตได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน พบมากถึงร้อยละ 10 ในการนำผลิตภัณฑ์ของประเทศเบลเยียมมาศึกษา (Dainty และ Blom, 1995)



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงของเฮกโซส แลคเตต และความเข้มข้นของอะซิเตตระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียม

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)

กรดอะซิติกเป็นกรดอีกชนิดหนึ่งที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักและเชื่อกันว่าเป็นผลมาจากจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.10) โดยส่วนมากผลิตภัณฑ์ที่ตรวจสอบมีความเข้มข้นของกรดชนิดต่าง ๆ ซึ่งคล้ายคลึงกับผลิตภัณฑ์ที่พบในประเทศเบลเยียม ยกเว้นในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก *Cervelatwurst* ที่พบปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าเกือบ 5 เท่า อาทิเช่น มีปริมาณกรดอะซิติก 10 มิลลิโมลต่อไส้กรอก 100 กรัม ในกรณีของกรดแลคติกเชื่อกันว่าน้ำตาลเฮกโซสและกรดอะมิโนเป็นแหล่งของอะซีเตต แต่แบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกสามารถผลิตอะซิเตตจากเพนโทส เช่น ที่ได้จาก ATP ร่วมกับการผลิตแลคเตตได้ (Dainty และ Blom, 1995)

ตารางที่ 2.10 ข้อมูลที่รวบรวมได้จากกรดสายสั้นในไส้กรอกหมัก

กรด	สารประกอบที่ตรวจพบจากการศึกษา (ครั้งที่)						
	1	2	3	4	5	6	7
Formic	X	X	X				
Acetic	X	X	X	X	X	X	X
Propanoic	X	X	X	X	X		
Butanoic	X	X	X	X	X	X	X
Pentanoic		X			X		
Hexanoic						X	X
2-Methylpropanoic	X	X			X		
2-Methylbutanoic	X				X	X	
2-Methylpentanoic						X	X
3-Methylpentanoic							X
Butenoic						X	
Propandioic						X	
Butandioic						X	
Methylenebytandioic						X	

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)

อย่างไรก็ตามมักมีผู้แนะนำว่าแลคเตตและอะซิเตตเป็นกรดที่สำคัญในการทำให้เกิดกลิ่น (aroma) และรส (taste) ในไส้กรอกหมัก ซึ่งกลิ่นรส (flavour) เช่นนี้เป็นคุณลักษณะของไส้กรอกทางยุโรปตอนเหนือและโดยเฉพาะที่เกิดการหมักอย่างรวดเร็ว ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างกลิ่นรส และกรด 2 ชนิดนี้ดูเหมือนว่าจะเป็นเหตุผลที่ดี และปริมาณของกรดอะซิติกที่ตรวจพบนั้นสูงกว่าระดับความเข้มข้นของ Flavour threshold detection ในระบบที่มีน้ำและไขมัน อย่างไรก็ตามการผลิตกรดในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดรสเปรี้ยวจัดซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ และได้มีผู้รายงานถึงกลิ่นรสผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับความเป็นกรดจากปริมาณของ D-lactic acid ที่มากเกินไป (Dainty และ Blom, 1995)

ผลกระทบโดยตรงของการเพิ่มขึ้นของแลคเตตซึ่งมีบทบาทในการทำให้ค่าพีเอชลดลงและมีผลต่อการละลายของโปรตีน สิ่งเหล่านี้ถูกพิจารณาว่ามีบทบาทสำคัญในการพัฒนาคุณสมบัติของไส้กรอก

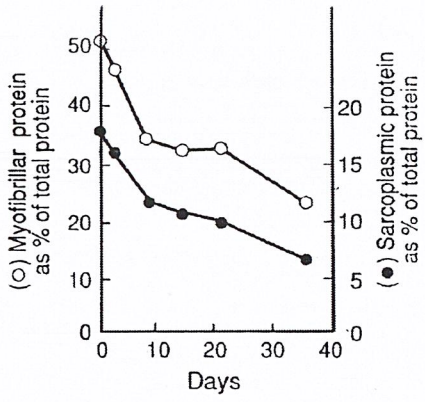
ด้านลักษณะเนื้อสัมผัส และความรู้สึกเมื่ออยู่ในปาก (mouthfeel) ซึ่งมีผลต่อความชอบรวมด้านกลิ่นรส (Dainty และ Blom, 1995)

กรดชนิดอื่นได้รายงานไว้ในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท (ตารางที่ 2.10) มีความเข้มข้นที่ผันแปรโดยมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณกรดอะซิติก 100-1000 เท่า มีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบเหล่านี้มีบทบาทในการพัฒนากลิ่นรสในผลิตภัณฑ์บางชนิดซึ่งไม่ควรมองข้าม กรดที่มีคาร์บอน 4 อะตอม และ 5 อะตอมมีลักษณะเฉพาะในการเกิดกลิ่น และมีระดับความเข้มข้นในการรับรู้รสต่ำ (low threshold) แหล่งที่มาของกรดเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่กรดโมโนคาร์บอกซิลิก (monocarboxylic acids) ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม เป็นสารเมแทบอไลซ์จากจุลินทรีย์ที่ทราบกันดีซึ่งเกิดขึ้นโดยอาศัยกระบวนการสร้างและสลายหมู่อะมิโนไปเป็น ∝-keto acid ร่วมด้วย และเกิดการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลในท้ายสุด (Dainty และ Blom, 1995)

2.9.2 โปรติโอไลซิส (Proteolysis)

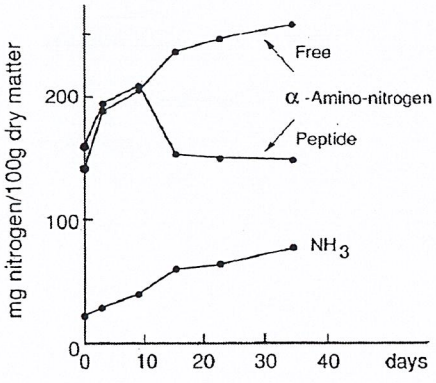
พีเอชมีอิทธิพลอย่างมากต่อการสกัดโปรตีนในเนื้อสัตว์และอาจมีผลต่อความรู้สึกในปาก รวมถึงลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกหมักดังที่กล่าวข้างต้น ภาพที่ 2.3 สารสกัดโปรตีนมีสัดส่วนลดลงมากในรูปของซาโคพลาสมิกโปรตีน (sarcoplasmic protein) หรือไมโอไฟบริลลาโปรตีน (myofibrillar protein) โดยใช้วิธีมาตรฐาน ขอบเขตความสามารถในการถูกสกัดออกมาของโปรตีน 2 ตัวนี้สูญเสียไปในระหว่างกระบวนการบ่มได้มีการแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์ (Dainty และ Blom, 1995)

อีกนัยหนึ่ง จากหลักฐานที่พบในปีที่ผ่าน ๆ มาได้พิสูจน์ให้เห็นถึงขบวนการโปรติโอไลซิสในไส้กรอกแต่ละชนิด ได้มีผู้ให้ข้อมูลโดยอาศัยการวัดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งละลายได้ เช่น ∝-อะมิโนไนโตรเจนในเปปไทด์และกรดอะมิโนหลายชนิด ปริมาณของแอมโมเนียหรือปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิด ข้อมูลจากกราฟในภาพที่ 2.4 และตารางที่ 2.11 แสดงให้เห็นถึงคุณภาพและปริมาณเกี่ยวกับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกของเบลเยียม การเพิ่มขึ้นของ ∝-อะมิโนไนโตรเจนในกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์แอมโมเนียและกรดอะมิโนแต่ละชนิดเป็นหลักฐานที่เห็นได้ชัด ในแง่ของความหลากหลายของสูตรผลิตภัณฑ์ก็คาดว่าจะมีความแตกต่างกันของอุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่ม การรมควันหรือการทำแห้ง ความแตกต่างกันเกี่ยวกับด้านพลังงานจลน์และกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงสังเกตเห็นได้ว่ามีการสร้างกรดอะมิโนอิสระได้เร็วกว่าแอมโมเนีย และสายเปปไทด์ในไส้กรอกเบลเยียมดังกล่าว และจากการศึกษาไส้กรอก *Cervelatwurst* พบว่าเกิดการผลิตแอมโมเนียได้ก่อนและเร็วกว่าการผลิตกรดอะมิโนอิสระ (Dainty และ Blom, 1995)



ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงของ sarcoplasmic และ myofibrillar protein ที่สกัดได้ระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียมรมควัน

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)



ภาพที่ 2.4 การเปลี่ยนแปลงของ∝-อะมิโนไนโตรเจนอิสระและพันธะ∝-อะมิโนไนโตรเจนแอมโมเนียระหว่างการบ่มของไส้กรอกเบลเยียมรมควัน

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)

อย่างไรก็ตาม เคยมีผู้ทำการวิจัยและประสบความล้มเหลวในการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในไส้กรอกสเปน สิ่งที่ค้นพบนี้แตกต่างจากการค้นพบโดยนักวิจัยหลายท่าน ซึ่งได้พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนและกรดอะมิโนมีคามเข้มข้นเพิ่มขึ้นระหว่าง 2 ถึง 12 เท่า (ตารางที่ 2.11) โดยปกติแล้วพบกรดอะมิโนรวมถึงวาลีน (valine) ลิวซีน (leucine) ไอโซลิวซีน

(isoleucine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และเมทไทโอนีน (methionine) มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมากที่สุด (Dainty และ Blom, 1995)

ตารางที่ 2.11 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการบ่มของไส้กรอกหมัก

กรดอะมิโนอิสระ	∝-อะมิโนไนโตรเจน (มิลลิกรัม/100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)	
	วันที่ 0	วันที่ 36
Aspartic acid	0.74	5.30
Threonine	0.82	25.20
Serine	1.73	9.10
Glutamic acid	19.00	5.60
Proline	0.0	5.50
Glycine	3.00	8.80
Alanine	10.20	25.20
Valine	1.44	8.85
Methionine	0.56	3.84
Isoleucine	1.60	5.45
Leucine	1.06	13.30
Phenylalanine	0.93	5.25
Lysine	2.07	6.35
Histidine	0.73	0.01
Tyrosine	0.77	0
γ-Aminobutyric acid	0	4.07
Orinithine	1.16	0

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)

จากงานวิจัย 2 ชิ้นแสดงให้เห็นถึงหลักฐานที่ตรงกันเกี่ยวกับโปรติโอไลซิสซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ข้อมูลแสดงให้เห็นถึงการแตกสลายของไมโอซิน (myosin) แอคติน (actin) และโทรโพนิน T (troponin T) ที่เป็นองค์ประกอบในไมโอไฟบริล (myofibrils) และน้ำหนักมวลโมเลกุลของพันธะเปปไทด์ขนาดเล็กที่ได้จากการย่อยโดย

เอนไซม์คาเทปซิน (cathepsins) ในเนื้อสัตว์ มีผู้ชี้ให้เห็นว่าค่าพีเอชที่ลดลงถึง 4.8-5.0 ในผลิตภัณฑ์และอุณหภูมิการบ่ม (15-20 องศาเซลเซียส) ซึ่งเหมาะสมสำหรับกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์นี้และสภาวะที่เหมาะสมนี้ใช้ในกระบวนการปรับสภาพของเนื้อได้ สิ่งนี้เป็นที่น่าสนใจเพราะความสำคัญขอ' กระบวน การโปรติโอไลซิสโดยจุลินทรีย์ และกระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์เป็นที่กล่าวถึงกันบ่อยแต่ยังคงไม่กระจ่างแน่ชัด จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาที่ใช้แบคทีเรียต่างสายพันธุ์เติมลงไปในไส้กรอก หรือรวมถึงแอนติไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ชัดเจนว่าเป็นบทบาทของจุลินทรีย์ ซึ่งมักพบว่าแบคทีเรีย micrococci เป็นจุลินทรีย์ที่อ้างอิงถึงมากที่สุด อย่างไรก็ตามการที่พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในขณะที่มีการเพิ่มของปริมาณกรดอะมิโน เช่นเดียวกันนั้นเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของ lactobacilli มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าไส้กรอกที่เติมเชื้อ pediococci มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนไม่ใช่โปรตีนมากกว่าไส้กรอกในชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมเชื้อนี้ (Dainty และ Blom, 1995)

นักวิจัยหลายท่านได้กล่าวว่า ปรากฏการณ์เกี่ยวกับการย่อยสลายโปรตีนมีความสำคัญต่อการพัฒนากลิ่นรสและผลิตภัณฑ์ เรายังไม่พบเอกสารที่สามารถยืนยันข้อสรุปนี้และคาดเดาว่าอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสของกรดอะมิโนและสายเปปไทด์ซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นของระหว่างการบ่ม (ภาพที่ 2.3) อย่างไรก็ตามกรดอะมิโนส่วนใหญ่ดังกล่าวข้างต้นซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสูงสุดถูกบันทึกไว้ว่าให้คุณลักษณะของกลิ่นรสขม (bitter flavour) นอกจากนี้แอมโมเนียที่เกิดขึ้นระหว่างการทำแห้งของไส้กรอกหลายชนิดนอกจากจะทำให้มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสของสารประกอบที่มีหมู่ที่แตกตัวเป็นไอออน (ionisable groups) มีหลักฐานของการผลิตแอมโมเนีย (ภาพที่ 2.3) และกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนขั้นต่อไป เกิดในระหว่างการทำแห้งไส้กรอกสเปนเป็นเวลานาน ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมนั้นมีการได้กล่าวถึงมาแล้ว ก็คือกรดไขมันสายสั้นที่ระเหยได้ซึ่งตรวจพบได้ในหลายผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 2.10 (Dainty และ Blom, 1995)

ได้มีรายงานถึงการรวมตัวหลาย ๆ แบบของเอมีนหลายชนิดในไส้หรอกหมักรวมถึงสิ่งที่เรียก ว่าตัวกระตุ้นทางชีววิทยาหรือ pressor amine เช่น ฮิสตามีน (histamine) ไทรามีน (tyramine) ทริพตามีน (tryptamine) พิวเทรสซีน (putrescine) คาดาวารีน (cadaverine) ไดอะมิโนโพรเพน (diaminopropane) และ 2-ฟีนิลไทลามีน (2-phenylthylamine) ตามปกติสารประกอบเหล่านั้นเกิดจากกิจกรรมการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดอะมิโนของแบคทีเรีย รวมไปถึงแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดจากเนื้อสัตว์ (Dainty และ Blom, 1995)

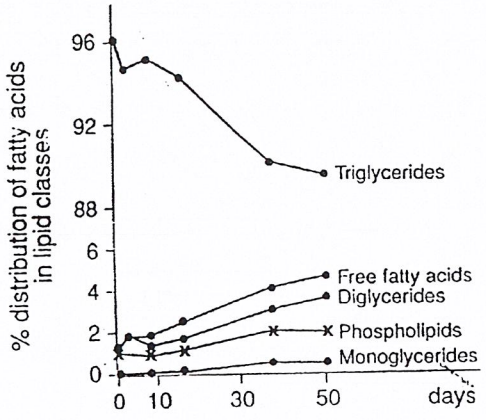
การผลิตกรด γ- อะมิโนบิวทิริก (γ-aminobutyric acid) จากกรดกลูตามิค (glutamic acid) ผลิตภัณฑ์ที่พบในบางชนิดอาจเกิดขึ้นโดยมีกลไลที่เหมือนกัน และการรายงานของนักวิจัยหลายท่าน พบว่าการใช้กรดกลูตามิคในการเป็นสารช่วยเพิ่มกลิ่นรส (flavour enhancer) มีประสิทธิภาพดี ในบรรดาเอมีนเหล่านี้มีเพียงพิวเทรสซีนซึ่งเกิดขึ้นจากอาร์จินีน โดยผ่านออร์นิทีนและคาดาวารีนที่สร้างขึ้นจากไลซีนเท่านั้นที่ให้ลักษณะด้านประสาทสัมผัส อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสงสัยถึงปริมาณที่ผลิตได้ (ปกติมีปริมาณมากถึง 300 ไมโครกรัมต่อกรัมของไส้กรอก) ว่าควรจะมีปริมาณเท่าใดจึงจะเพียงพอที่จะทำให้เกิดคุณลักษณะเกี่ยวกับรสและกลิ่น สิ่งนี้อาจนำมาสู่การเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์และอีกหนึ่งเป้าหมายของการทำงานวิจัยนี้คือ การผลิตกล้าเชื้อโดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สร้างสารประกอบเหล่านั้นและมีผู้รายงานเกี่ยวกับการมีกลิ่นแรงของไดเมทิลเอมีน (dimethylamine) ในสารระเหยที่อยู่ใน headspace (headspace volatile) ของไส้กรอกหมักที่ทดลอง (Dainty และ Blom, 1995)

2.9.3 การย่อยสลายไขมัน (Lipolysis)

การย่อยสลายไขมันเป็นการสลายพันธะของกรดไขมันสายยาวจากสารพวกฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และคลอเรสเตอรอล (chloresterol) ได้เป็นหัวข้อในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างทำการบ่มไส้กรอก พบว่าการเพิ่มปริมาณกรดไขมันอิสระสูงถึงประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดเป็นสิ่งที่ค้นพบโดยปกติตัวอย่างของช่วงเวลาที่มีการปล่อยออกมาของกรดไขมัน ดังภาพที่ 2.5 ข้อมูลดังกล่าวได้จากการศึกษาไส้กรอกเบลเยียม (Belgian sausages) แสดงความเข้มข้นของกรดอิสระที่เพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการเก็บตัวอย่างกับปริมาณมากสุดที่พบก่อนเสร็จสิ้นกระบวนการในงานวิจัยอื่นของ Spanish chorizo ยังคงมีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันที่จุดสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง และมีผู้ที่ศึกษาวิจัยพบว่า เมื่อปริมาณกรดอิสระที่เพิ่มขึ้นมีการเพิ่มของปริมาณสิ่งที่ถูกเอสเทอริไฟด์ เมื่อปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride)ลดลงในขณะที่ปริมาณไดกลีเซอร์ไรด์ (diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เพิ่มขึ้น (ดังภาพที่ 2.5) ในช่วงระยะเวลาเดียวกันไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในฟอสโฟลิปิด (Dainty และ Blom, 1995)

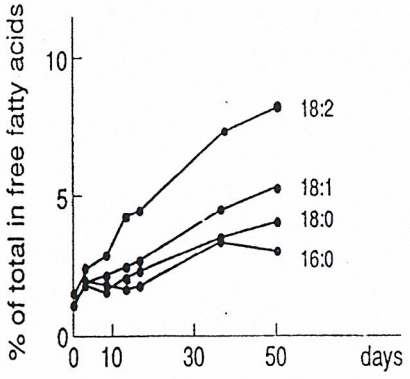
นอกจากนี้การเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานานอาจนำไปสู่การปล่อยของกรดจากผลิตภัณฑ์ได้ดี โดยมีการบันทึกไว้ถึงการปลดปล่อยของกรดที่จับกับคลอเรสเตอรอล ดังภาพที่ 2.6 แสดงให้เห็นถึงอัตราการปล่อยเฉพาะของกรดแต่ละชนิด ซึ่งมีการลดลงตามลำดับจากลำดับมากไปหาน้อยดังนี้ คือ กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) และกรดปาล์มิติก (plamitic acid) ในการศึกษาของไขมันไม่อิ่มตัวในตำแหน่งที่ 3 เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอร์ไรด์ของไขมันหมู (porcine fat) ให้ผลที่บ่งบอกถึงความจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme specificity) ซึ่งเป็น

ลักษณะของการย่อยสลายไขมันโดยแบคทีเรียที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และได้มีการค้นพบที่คล้าย ๆ กันโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม (Dainty และ Blom, 1995)



ภาพที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดไขมันอิสระระหว่างการบ่มไส้กรอกรมควันเบลเยียม (Belgian cold- smoked sausage)

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)



ภาพที่ 2.6 ระยะเวลาที่พบกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในไส้กรอกรมควันเบลเยียม (Belgiam cold-smoked sausage)

ที่มา: Dainty และ Blom (1995)

อย่างไรก็ตามไม่พบหลักฐานของความจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าว ในการศึกษาของชาวสเปน วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมันที่มีการยอมรับส่วนใหญ่ นิยมใช้แบคทีเรียต่างชนิดกันเป็นกลุ่ม

เชื้อ เนื่องจากพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดไขมันอิสระ และจำนวนของแบคทีเรียที่ย่อยไขมันมีบทบาทสำคัญเชื่อกันว่า *Micrococcus* มีบทบาทสำคัญเช่นเดียวกับราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์บางชนิด ในด้านของผลที่เกิดขึ้นจากการสะสมของกรดไขมันอิสระต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสนั้น ยังไม่มีความเห็นเกี่ยวกับเรื่องนี้ในการศึกษาใด ๆ ก็ตามและที่จริงแล้ว กรดโอเลอิก และกรดลิโนเลอิกเป็นกรดไขมันที่ไม่มีกลิ่น บางทีอาจมีเหตุผลที่เสนอว่าสารในกลุ่มคาร์บอกซิลของ deesterified acid อาจช่วยเพิ่มรสชาติของรสเปรี้ยวจากกรดในผลิตภัณฑ์ และอย่างไรก็ตามสิ่งที่ถูกพิจารณาว่าสำคัญที่สุดสำหรับกลิ่นรส (flavour) ก็คือบทบาทหลักของกรดไขมันเหล่านี้รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งมีบทบาทในฐานะของ precursor ของสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าซึ่งมีคุณสมบัติสูงที่ให้คุณลักษณะของกลิ่นรส (Dainty และ Blom, 1995)

การย่อยสลายไขมันในไส้กรอกแห้งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่ยังไม่ได้มีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการย่อยกรดไขมัน ซึ่งมีบทบาทโดยตรงที่เกี่ยวข้องด้านกลิ่นรสกรดไขมันสายสั้นมีรสเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์ แต่ลักษณะทางประสาทสัมผัสดังกล่าวจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มสายอะตอมคาร์บอน การเติมไลเปสช่วยเพิ่มความเข้มข้นของพวกกรดไขมันอิสระอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงช่วยลดระยะเวลาที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสมบูรณ์ (mature product) โดยไม่ได้เกิดการปรับปรุงกลิ่นรสกลิ่นที่เข้มข้นเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของกรดอะซิติก กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโนอิก (propionic acid) หลังจากการเติมเอนไซม์ไลเปสที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *Aspergillus* และกล้าเชื้อ หรืออัลดีไฮด์(aldehyde) เมื่อทำการเติมเอนไซม์จากตับอ่อน (pancreatic enzyme) การวิจัยในตอนเริ่มต้นพิจารณาว่าจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากมีหลักฐานเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน และการเจริญอย่างมากของจำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยไขมันในไส้กรอกแห้ง *Lactobacillus* ย่อยสลายไขมันได้ไม่ดีส่วนจุลินทรีย์ที่มีการย่อยสลายไขมันได้ดี ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีนัส *Micrococcus* หรือ *Staphylococcus* สายพันธุ์ของ *Staphylococcus saprophyticus* และ *Staphylococcus warneri* สามารถย่อยไขมันหมูได้ดีกว่าสายพันธุ์ *Staphylococcus carnosus* และ *Staphylococcus xylosus* เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียเหล่านี้ทำงานได้ดีที่พีเอชสูงกว่า 7.5 ยีสต์และราสามารถย่อยสลายไขมันได้ (Montel และคณะ, 1998)

บทบาทของแบคทีเรียต่อการย่อยไขมันในผลิตภัณฑ์จะลดลง เนื่องจากเมื่อเติมเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยไขมันสูงลงในไส้กรอกแห้งปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นน้อยมากเช่นเดียวกัน มีนักวิจัยท่านหนึ่งกล่าวว่า การย่อยสลายไขมัน (lipolysis) ร้อยละ 30 มาจากเชื้อ *S. xylosus* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยไขมันที่เติมในส่วนผสมของมันหมู และเนื้อหมูไม่ติดมันและมีผู้พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการย่อยไขมันเมื่อเติมเชื้อ *Staphylococcus* sp. กับ *Lactococcus plantarum* อย่างไรก็ตามเมื่อเติม *Staphylococcus* sp. เพียงอย่างเดียวโดยไม่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก มีการเพิ่มขึ้น

ของกรดไขมันอิสระ 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งอธิบายได้ว่าให้ผลเกิดการสร้างกรด (pH 5.3) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งยับยั้งการย่อยสลายไขมันของเชื้อ *Staphylococcus* และมีผู้พบว่าการยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียโดยการเติมยาปฏิชีวนะไม่มีผลทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระในไส้กรอกลดลง ดังนั้นการย่อยสลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในไส้กรอกแห้งส่วนใหญ่มาจากเอนไซม์ไลเปสจากมันหมู และฟอสโฟไลเปสจากเนื้อหมู นอกจากนี้กิจกรรมการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียดูเหมือนจะไม่จำเป็นต่อการพัฒนากลิ่นที่แรงของไส้กรอกแห้ง *S. xylosus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ย่อยสลายไขมันได้ไม่ดีมีความสามารถในการให้กลิ่นที่แรงของไส้กรอกแห้งจำลอง (dry sausage model) (Montel และคณะ, 1998)

2.9.4 การออกซิเดชันไขมัน (Lipid oxidation)

มีการบันทึกหลักฐานการลดลงของปริมาณของกรดไขมันสายยาวที่เป็นองค์ประกอบสำคัญรวมถึงกรดโอเลอิกระหว่างช่วงท้ายของการบ่ม pure pork salami และเขาได้กล่าวว่าการลดลงของปฏิกิริยาการออกซิเดชันส่วนหนึ่งได้นำไปสู่การสะสมของกรดไขมันสายสั้นซึ่งอาจมีจำนวนอะตอมคาร์บอนถึง 10 อะตอม (C_{10}) และได้จำแนกชนิดของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 อะตอม (C_{12}) ว่าเป็น α-butenyl-β-ketooctaroic acid และกรดไขมันที่คาร์บอน 11 อะตอม (C_{11}) คือกรดไขมันที่มีชื่อว่า α,α-dimethyl-or-α-ethyl-undecanoic acid และยังได้ทำการศึกษาต่อพบว่าการลดลงของกรดโอเลอิกเกิดขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของกรดอื่นๆ ที่มีกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl group) ถึงแม้ว่าจะไม่มีการจำแนกชนิดกลุ่มของสารประกอบที่มีคาร์บอนสายตรง9 ถึง20 อะตอม ($C_9 - C_{20}$) กลุ่มอะลิฟาติก (aliphatic straight –chain compound) และยังพบ 2-methyl-derivertive ($C_8 - C_{13}$) ซึ่งมีfunctional group อื่นๆที่ไม่เคยบันทึกไว้พร้อมด้วย C_{16} Cyclic ketone, dodecene, tetradecene, tidecadiene และ tetradecadiene สารประกอบเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาออโทออกซิเดชัน (autooxidation) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้มีผู้ศึกษาค้นพบการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ลำดับแรกของปฏิกิริยาออโทออกซิเดชันระหว่างวันแรกของการบ่ม (ripening) เมื่อกรดโอเลอิกมีการเพิ่มขึ้น และมีการลดลงอย่างรวดเร็วของเปอร์ออกไซด์ในขณะที่ปริมาณของกรดโอเลอิกลดลงอย่างช้า ๆ โดยมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันระหว่างกระบวนการบ่ม ซึ่งทดสอบโดยวิธีการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide values) ค่าทีบีเอ (TBA numbers) ค่าเบนซิดีน (benzidine numbers) สำหรับอัลดีไฮด์และการวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometric) และการทำโครมาโตกราฟิค (chromatographic) เพื่อหาปริมาณของสารคาร์บอนิกทั้งหมดการค้นพบสารประกอบที่ได้ถูกจำแนกชนิดแล้วแสดงในตารางที่ 2.12 และ 2.13

ในบรรดาสารประกอบที่มีผู้รายงานไว้พบว่า methanal (acetaldehyde), pentanal, 2- butanone, 2-pentanone และ 2,3-butanedione (diacetyl) มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแต่ 3-metylbutanal มีความเข้มข้นลดลงมีการพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ 2-hexanal, methanal, ethanal, 2-propanone (acetone) และ 2,3-butanedione และมีผู้แนะนำได้ใช้ carbonyl index ในการควบคุมคุณภาพ ในการศึกษาครั้งต่อมาได้พบสารคาร์บอนิลปริมาณมากในผลิตภัณฑ์ Salami และ Cervelatwurst และได้แสดงให้เห็นว่าไส้กรอกที่มีกลิ่นที่ดีที่สุดมีปริมาณสารคาร์บอนิลมากที่สุดซึ่งเป็นสารคาร์บอนิลที่มีอะตอมคาร์บอนระหว่าง 6 ถึง 12 คาร์บอนอะตอม (ตารางที่ 2.12 และ 2.13)

ตารางที่ 2.12 แอลดีไฮด์ (aldehyde) ที่ตรวจพบในไส้กรอกหมัก

	Compound found in study*						
Aldehyde	1	2	3	4	5	6	7
Methanal		×	×	×			
Ethanal	×	×	×	×		×	
Propanal	×	×	×	×			
Butanal	×	×	×				
Pentanal	×		×	×		×	×
Hexanal		×	×	×	×	×	×
Heptanal		×	×	×	×	×	
Octanal		×	×	×	×		
Nonanal			×		×	×	×
Decanal			×		×		
2-Butenal		×					
2-Pentenal			×				
2-Hexenal		×	×	×		×	
2-Heptenal			×	×			×
2-Octenal			×				×
2-Decenal			×				
2-Undecenal			×				
2,4-Hexadienal				×			
2,4-Heptadienal				×			
2,4-Octadienal						×	
2-Methylpropanal	×	×	×	×		×	
2-Methylbutanal				×		×	
3-Methylbutanal	×			×		×	×
2-Methyl-2-butenal					×		
2-Methyl-2-pentenal					×		
Methylpentanal			×				
2-Pentenal (branched)				×			
2-Hexenal (branched)				×			

ที่มา: Dainty และBlom (1995)

แม้ว่า ethanal, propanal และ 2-propanone เป็นสารคาร์บอนิลที่พบมากในไส้กรอกหมักของสวีเดน Swedish fermented sausage แต่สารเหล่านี้มีผลเล็กน้อยต่อกลิ่น เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยระหว่างการบ่ม ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแห้งหรือไส้กรอกรมควันก็ตาม แต่อีกนัยหนึ่งยังพบการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของ octanal, 2-hexenal และ 2-heptanal ในไส้กรอกแห้งและเชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกันอย่างมากในการทำให้เกิดกลิ่นรสซึ่ง flavour threshold อยู่

ในปริมาณระหว่าง 5 ถึง 60 ppb และกลิ่นรสที่แตกต่างกันอธิบายได้ว่าเป็นกลิ่นรสที่เรียกว่า green, metallic, fruity และ fatty ผลในด้านของการรมควัน ต่อการสร้างสารประกอบเหล่านี้ได้ถูกอธิบายว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างสารคาร์บอนิล โดยกระบวนการออโทออกซิเดชันในแง่ของคุณสมบัติด้านการต้านออกซิเดชันของสารที่เป็นองค์ประกอบภายในควันเช่น สารฟีนอลต่าง ๆ มีการกล่าวถึงความสำคัญของสารคาร์บอนิลอื่น ๆ เช่น สาร dienal ที่มีคาร์บอน 6 และ 7 อะตอม (C_6 และ C_7 dienals) ซึ่งสารทั้งสองลดลงทั้งคู่ในระหว่างกระบวนการบ่มไส้กรอกแห้ง (Dainty และ Blom, 1995)

ตารางที่ 2.13 สารประกอบคีโตน (ketone) ที่ตรวจพบในไส้กรอกหมัก

	Compound found in study*						
Ketone	1	2	3	4	5	6	7
Propan-2-one	×	×	×	×		×	
Butan-2-one	×	×	×	×		×	
Pentan-2-one			×	×	×	×	
Hexan-2-one			×			×	
Heptan-2-one			×		×	×	×
Octan-2-one			×		×	×	×
Nonan-2-one			×		×		×
Decan-2-one			×				
Undecan-2-one			×		×		
Tridecan-2-one			×				
Pentdecan-2-one			×				
Pentan-2-one	×			×	×		
Octan-3-one							×
4-Methylpentan-2-one					×		×
3-Methylhexan-2-one						×	
5-Methylhexan-2-one					×		
6-Methyl-5-hepten-2-one						×	×
Dimethyloctenone					×		
Butan-2,3-dione	×	×		×		×	×
Pentan-2,3-dione							×
Octan-2,3-dione						×	
3-Hydroxybutan-2-one						×	×

ที่มา: Dianty และ Blom (1995)

แม้ว่ากรดไขมันสายยาวมีผลกระทบจำกัดต่อกลิ่นรสแต่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดการออกซิเดชันก็มีกลิ่นรสที่เด่นชัด ผลิตภัณฑ์ที่เกิดการออกซิเดชันจะทำให้เกิดกรดไขมันในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารพวกอัลเคน (alkane) อัลคีน (alkene) อัลดีไฮด์ (aldehyde) แอลกอฮอล์ (alcohol) คีโตน (ketone) และกรดกลุ่มต่าง ๆ แม้ว่าการสร้างสารประกอบเหล่านี้จะมีปริมาณน้อยมากในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (หน่วยเป็น ppm) แต่การที่สารเหล่านี้มี sensory threshold ที่ต่ำ (ยกเว้นอัลเคนและอัลคีนซึ่งไม่มีกลิ่น) ดังนั้นสารประกอบเหล่านี้

จึงมีผลกระทบอย่างแท้จริงหลังจากที่เติมแบคทีเรียในปริมาณต่าง ๆ ลงในไส้กรอกจะให้กลิ่นที่หลากหลายนอกเหนือจากเมทิลอัลดีไฮด์ (methylaldehydes) ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นกลิ่นของไส้กรอกแห้งอาจมาจาก 2-เมทิลคีโตน (2-methyl ketone) เช่น 2-pentanone, 2-hexanone และ 2-heptanone กลิ่นนี้เกี่ยวข้องกับการมี *Staphylococcus carnosus* และ *S. xylosus* และอีกนัยหนึ่งกลิ่นเหม็นหืนเกิดขึ้นเนื่องจากการมีอัลคานอล (alkanal) เช่น hexanal และ nonanal หรือสารพวกแอลกอฮอล์บางชนิดเช่น 1-pentene-3-ol, 1-octene-3-ol และอาจรับรู้ถึงกลิ่นเหล่านี้ได้ในสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์หรือสภาพที่มี *S. warneri* และ *S. saprophyticus* ปริมาณความเข้มข้นของเฮกซานอลใน cured products (0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) น้อยกว่าใน non- cured products (12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) (Montel และคณะ, 1998)

กรดไขมันเมื่อเกิดการออกซิไดส์จะได้สารพวก aldehyde, alkane, alcoholและ ketone โดยกระบวนการทางเคมี (auto-oxidation) หรือเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ (β-oxidation) ตารางที่ 2.14 แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่า Micrococci ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถถูกทำลายโดยกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสซึ่งพบใน *Staphylococcus* และ *Kocuria* นอกจากนี้ *Lactobacillus sake* และ *L. plantarum* สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ แต่ไม่พบใน *L. curvatus* เอนไซม์คะตะเลสเป็นพวก hemedependent และถูกรีดิวซ์โดย NaCl และไนไตรต์ ยีสต์และราสร้างคะตะเลสและ superoxide dismutase ได้ไนไตรต์มีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีดังนั้นกิจกรรมของไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) ของแบคทีเรียซึ่งจะไปออกซิไดส์ไนไตรต์นั้นจึงไปช่วยจำกัดการเกิดออกซิเดชัน *S. carnosus* และ *S. xylosus* หลายสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสซึ่งขณะที่ *S. warneri* และ *S. saprophyticus* บางสายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์ชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมเชื้อ *S. warneri* และ *S. saprophyticus* จะพบอัลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงบางส่วนเป็นผลมาจากการขาดเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสแบคทีเรียกรดแลคติกเช่น *Leuconostoc, Pediococcus* และ *L. plantarum* มีกิจกรรมของไนเตรตรีดัคเทส (nitrate reductase) และเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียไม่มีสิ่งที่ช่วยต้านการเกิดออกซิเดชัน (enzymatic antioxidant material) (Montel และคณะ, 1998)

2.9.5 การสร้างสารประกอบเอสเทอร์ (Ester production)

ลักษณะของกลิ่นมีลักษณะคล้ายกลิ่นของผลไม้ (fruity aroma) พบในเนื้อหมักเป็นกลิ่นของเอทิลเอสเทอร์ (ethyl esters) แต่ยังไม่ทราบถึงต้นกำเนิดของโมเลกุลแยกสารเหล่านี้ถูกตรวจสอบในแฮมที่บ่มเป็นเวลานานซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียน้อยต้นกำเนิดน่าจะเกี่ยวข้องทางเคมีในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแห้งพบว่าสาเหตุของการเกิดกลิ่นนี้อาจมาจากแบคทีเรีย จากการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus warneri* และ *S. saprophyticus* มีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เลส (esterase) มากสำหรับการไฮโดรไลส์และเกิดเป็นเอสเทอร์มากกว่าเชื้อ *S. carnosus* การเกิดสารประกอบเอสเทอร์

สะสมขึ้นเกี่ยวข้องกับการมีเชื้อ *S. carnosus* และ *S. xylosus* แต่ไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *S. warneri* และ *S. saprophyticus* สารเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นในไส้กรอกแห้งจะลดลงเมื่อมีเชื้อ *Pediococcus* อาจเป็นเพราะการลดลงของค่าพีเอชกิจกรรมของเอสเทอร์เลสของ *Staphylococcus* ถูกยับยั้งเมื่อพีเอชลดลงต่ำกว่า 5.5 (Montel และคณะ, 1998)

ตารางที่ 2.14 สารประกอบที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ที่พบในกลิ่นรสของเนื้อหมักและบทบาทของแบคทีเรียด้านกิจกรรมทางชีวเคมีนอกเซลล์

Compounds	*Flavour note*	*Threshold (ppm)*	*Reaction enzymes*	*Bacteria involved*
From carbohydrate fermentation				
D L Lactate			Homofermentation	*L. sake*$^{+++}$, *L. curvatus*$^{++}$, *L. plantarum Pediococcus*
Acetate	Vinegar, pungent	22 to 54		*S. warneri, S.carnosus*$^{+}$
Ethanol			Heterofermentation	*Leuconostoc*
Acetaldehyde	Green		Pyruvate catabolism	*L. plantarum*
2, 3-butanedione (acetoine)	Buttery	2·5		*S. saprophyticus*$^{+++}$, *S. warneri*$^{++}$,
2, 3-butanediol	Buttery	0·002	Pyruvate catabolism	*S. xylosus, S. carnosus* *Pediococcus*$^{+}$, *L. plantarum*$^{+}$
From amino acid metabolism				
3-methyl butanal (leucine)	Malty, bit fruity	0·06	Amino transferase	
2-methyl butanal (isoleucine)	Malty, bit fruity	0·1	Ketoacid decarboxylase	
2-methyl propanal (valine)		0·1		*S. carnosus*$^{++}$
Phenylacetaldehyde	Floral			*S. xylosus*$^{++}$
3-methyl butanol	Fruity	4·75		*S. saprophyticus*$^{++}$, *S. warneri*$^{++}$
2-methyl butanol	Socks chitney		Alcohol dehydrogenase	*C. piscicola*$^{+++}$
2-methyl propanol	Alcohol			*L. sake*$^{+}$, *L. curvatus*$^{-}$, *L. plantarum*$^{+}$,
Benzaldehyde	Almond, acre	0·35		
3-methyl butanoic	Sweat socks	0·07		*P. acidilactici*$^{+}$
2-methyl butanoic	Socks, cheesy		Aldehyde or	
2-methyl propanoic	Cheesy		α-ketoacid dehydrogenase	
Phenylacetate	Floral			
Dimethyl disulfide (methionine)	Cauliflower	0·12		
Acetaldehyde (threonine)				
From lipid and fatty acids				
Butyric acid	Rancid, cheesy	0·3 to 0·7	Limit auto-oxidation by	
Hexanoic acid	Pungent, cheese	5 to 15		
Octanoic acid	Wax, soap, goat,	10 to 350		
	Rancid, fruity	5 to 15	• Nitrate reductase	*S. xylosus*$^{++}$, *S. carnosus*$^{+++}$
Pentanal	Fruity			
Hexanal, heptanal	Rancid, green leaves	0·015	• Catalase	*Staphylococcus*$^{+++}$, *L. sake*$^{+}$, *L. plantarum*$^{+}$, *Pediococcus*$^{+}$
Nonanal, decanal	Pelargonium, rancid		• Anti-oxidant material from bacteria	
1-pentanol, 1-nonanol	Fruity			
octene-2-ol	Green	0·018		
1-octene-3-ol	Mushroom			
2-pentanone	Fruity, acetone	22		
2-hexanone	Floral, fruity	4·7		
2-heptanone	Fruity, cheesy	0·15 to 1	β oxidation of fatty acid	Yeast, moulds
2-octanone, 2-nonanone	Fruity, musty	0·23 to 0·77		
3-octene-2-one	Mushroom	0·0009		Bacteria?
From glucide, carbohydrate, amino acid–fatty acid metabolism				
Ethyl butanoate	Fruity, strong	5		
Ethyl acetate	Pineapple	0·009		
Ethyl pentanoate	Fruity			*S. saprophyticus*$^{+++}$,
Ethyl 2- or 3-methyl butanoate	Fruity, apple		Esterases	*S. warneri*$^{+++}$, *S. xylosus*$^{++}$, *S. carnosus*$^{+}$
Ethyl 2-methyl propanoate	Fruity apple			*Lactobacillus*?
2-methyl propyl acetate	Fruity			
2-methyl butyl acetate				

ที่มา: Montel และคณะ (1998)

2.10 ชนิดของการเกิดการหืน (Type of rancidity)

2.10.1 Hydrolytic rancidity

การเกิด Hydrolytic rancidity มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์เนื้อ ปฏิกิริยาไฮโดรลิซีสอาจเกิดขึ้นโดยกระบวนการทางเคมีหรือกิจกรรมเอนไซม์ อย่างไรก็ตามค่าพีเอชของเนื้อสัตว์อยู่ในช่วงพีเอชเป็นกลาง พีเอชอยู่ในช่วง 7.0 ถึง 7.2 ในสัตว์ที่มีชีวิตและจะลดลงเป็น 5.5 ถึง 6.5 หลังจากสัตว์ตายพีเอชต่ำสุดในเนื้อสัตว์บางครั้งอาจต่ำถึง 5.0 เพียงบางกรณีเท่านั้นในกล้ามเนื้อสัตว์มีคุณสมบัติต้านทานการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้ดี (high buffering capacity) เกิดการเปลี่ยนแปลงและยิ่งกว่านั้นมีความเป็นไปได้ของการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างไขมันในเนื้อเยื่อไขมัน (fatty tissue) และกรดในกล้ามเนื้อ (muscular tissue) เล็กน้อย ดังนั้น Hydrolytic rancidityในเนื้อไม่ค่อยจะเกิดขึ้นมากนัก (Ranken, 1994)

2.10.2 การหืนเนื่องจากการออกซิเดชัน (Oxidative rancidity)

การหืนเนื่องจากการออกซิเดชันมักพบทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อมากกว่า การหืนโดย Hydrolytic rancidity หลักการทางเคมีทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อเหมือนกับในอาหารอื่นถึงแม้ว่าอาจมีการดัดแปลงในด้านของผลกระทบอื่นเนื่องมาจากธรรมชาติของโครงสร้างเนื้อและสาเหตุอื่น ๆ ซึ่งอาจคาดคะเนได้จากหลักการพื้นฐาน

หลักการแรก คือเมื่อมีไขมันอิ่มตัวปริมาณมากก็มีแนวโน้มในการออกซิเดชันมากกว่า เพราะฉะนั้นจึงเกิดการหืนได้เร็วกว่าโดยไขมันปลาเกิดออกซิเดชันได้เร็วที่สุดรองลงมาคือ ไขมันไก่ ไขมันหมู และไขมันวัวหรือไขมันแกะ สัตว์ต่างชนิดกันดังกล่าวจะมีความแข็งของไขมันต่างกันนอกจากนี้ไขมันรอบอวัยวะภายในของร่างกายสัตว์ยังมีความแข็งมากกว่า ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูงและมีจำนวนพันธะที่ไม่อิ่มตัวน้อยกว่าในไขมันที่ชั้นผิวด้านนอก เช่นเดียวกันไขมันชั้นในมีความแข็งมากกว่าไขมันชั้นนอก (body fat) ในเนื้อหมูจะมีผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อไขมันบางกว่าในไขมันเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยไขมันอิ่มตัว ดังนั้นจึงเป็นไขมันที่แข็งกว่าเนื้อเยื่อที่มีไขมันอิ่มตัวแต่ผนังเซลล์บางจะมีลักษณะนุ่มกว่าบริเวณที่ประกอบด้วยไขมันไม่อิ่มตัวส่วนของเนื้อบริเวณต่างกัน จะมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ต่างกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการมีไขมันที่ไม่อิ่มตัวแตกต่างกันแต่ก็อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นด้วย หลักการที่สอง สำหรับการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจำเป็นต้องมี oxidative reagent และต้องสามารถเข้าดึงไขมันได้ดี oxidizing agent ได้แก่ออกซิเจนในอากาศ การบรรจุในสภาพสุญญากาศหรือการลดความเข้มข้นของออกซิเจนโดยการบรรจุในสภาพสุญญากาศ อาจช่วยป้องกัน

หรือลดการเกิด oxidative rancidity ได้แต่อีกนัยหนึ่งการบดเนื้อมีผลช่วยให้ไขมันสัมผัสกับออกซิเจนได้ดีขึ้นจึงทำให้ออกซิเจนเกิดได้มากขึ้นในกรณีของฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ในไขมันจากเนื้อ ฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมีแนวโน้มเกิดการออกซิเดชันได้ง่าย ซึ่งมีอยู่ในเนื้อเยื่อไขมันหรือที่ผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อไขมันดังนั้นจึงเกิดออกซิเดชันได้เมื่อเนื้อเยื่อไขมันถูกทำลายส่วนฟอสโฟลิปิดอื่นที่พบกระจายในเนื้อแดง (เนื้อที่ปราศจากไขมัน) หรือในระบบกล้ามเนื้อก็เกิดการออกซิเดชันได้เช่นกัน (Ranken, 1994)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้มีทั้งหมด 3 ชนิดได้แก่ *Lactococcus lactis* 13IS3 แยกได้จากปลาสด *Pediococcus pentosaceus* P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสด และ *Enterococcus faecalis* 4IS17 แยกได้จากกุ้งจ่อม

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่ deman Rogosa Sharpe Medium (MRS Broth/MRS agar, Difco Laboratories), Nham Model Broth (NMB), Skim milk agar, Starch agar, Plate count agar (PCA), Tributyrin agar, Violet red bile agar (Himedia Laboratories Pvt. Ltd.), Potato dextrose agar (PDA, Scharlau Chemie S.A.), Baird-Parker agar (BPA, Difco), Brain Heart Infusion Broth (BHI, Scharlau Chemie S.A.), Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA), Lactose Broth (LB), Rappaport-Vassiliadia (RV) Broth (RV, Difco), Tetrathionate Broth (TT, Scharlau Chemie S.A.), Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV, Difco), Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD, Difco), Lysine Indole Motility (LIM) Medium (LIM, Biomark Laboratories), Triple Sugar Iron agar (TSI, Difco), และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.1.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กรดไทโอบาบิทูริก (thiobabituric acid) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) กลีเซอรอล (glycerol) กรดอะซีติก (acetic acid) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate) สารละลายกรดซัลฟานิลิค (sulphanilic acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 1,1,3,3 เตตราอิทอกซีโพรเพน (1,1,3,3, tetraethoxypropane, Sigma-Aldrich, Inc., Germany) สารละลายไอโอดีน (iodine) ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) แอลกอฮอล์ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ซาฟรานิน (safranin) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 (hydrogen peroxide) N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride อะโซเคซีน (azocasein, Fluka) และไตคลอโรอะซีติกแอซิด (trichloroacetic acid)

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (Boss Tech, VT 90) เครื่องตีป่น (stomacher masticator) หม้อนึ่งความดัน (TOMY ES-315) เครื่องเขย่า (shaker, Gallenkamp)

เครื่องวัดพีเอช (testo 205) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, Shimadzu UV-1601) เครื่องวัด a_w (AquaLab series 3 TE) ตู้บ่มเชื้อ (Memmert) เครื่องนับโคโลนี (Reichert) เครื่องวัดสี (Minolta R-300) กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH 30) ลูป (loop) เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร (whatman เบอร์ 4, Whatman International Ltd.) และอุปกรณ์เครื่องแก้วที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด (*Lactococcus lactis* 13IS3, *Pediococcus pentosaceus* P0805 และ *Enterococcus faecalis* 4IS17) ลงในอาหาร MRS agar slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก slant ลงในอาหาร MRS broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดที่เจริญในอาหารเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งไปล้างเซลล์ 2 ครั้ง โดยในการล้างแต่ละครั้งทำได้โดยปิเปต สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เป็นการสิ้นสุดการล้างเซลล์ 1 ครั้ง จากนั้นล้างเซลล์อีก 1 ครั้งโดยทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนได้ตะกอนของเซลล์แล้วทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมจะได้เป็นสารละลายแขวนลอยของเซลล์ที่จะใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.1.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิดจาก MRS slant ลากลงบนผิวหน้าของอาหาร Skim milk agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบผลโดยการราดกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 บนผิวหน้าอาหาร สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Thapa และคณะ, 2006)

3.2.1.3 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิดจาก MRS slant ลากลงบนผิวหน้าอาหาร Starch agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบผลโดยการนำสารละลายไอโอดีนมาหยดลงบนผิวหน้าอาหารให้ทั่ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ทำการสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Thapa และคณะ, 2006)

3.2.1.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิดจาก MRS slant ลากลงบนผิวหน้าของอาหาร Tributyrin agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ โคโลนี (Thapa และคณะ, 2006)

3.2.1.5 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ทำการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามวิธีของ Miralles และคณะ (1996) โดยเทอาหาร MRS agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งแล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 นำไปปรับความขุ่นด้วยสารละลาย Mcfarland standard เบอร์ 4 โดยมีความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายเป็น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมาปริมาตร 30 ไมโครลิตรใส่ลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยราดด้วยสารละลาย NIT 1 [เตรียมโดยสารละลายกรดซัลฟานิลิค (sulphanilic acid) 0.8 กรัมในสารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร] และ NIT 2 [เตรียมโดยชั่ง N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride 0.6 กรัม ในสารละลายกรดอะซีติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร] ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต ถ้ามีไนไตรต์จะเกิดสีแดงรอบ ๆ หลุมที่ใส่สารแขวนลอยของเซลล์ที่แสดงถึงการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.2.1.6 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส

ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสตามวิธีของ Doelle (1969) หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ที่สะอาดเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิดจาก MRS slant มาแตะลงบนสารละลาย สังเกตการเกิดฟองก๊าซทันที ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันทีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส และถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส

3.2.1.7 การหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ก) การเตรียมสารละลายเอนไซม์โปรติเอส

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคในอาหาร Nham Model Broth (NMB) (ประกอบด้วยเนื้อสกัด (meet extract) 10 กรัม ทริปโตน (tryptone) 10 กรัม โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (sodium tripolyphosphate) 3 กรัม กลูโคส 10 กรัม โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) 0.1 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) โดยเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าฟลาสก์อย่างต่อเนื่องที่ความเร็วรอบการเขย่า 180 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีของ Thapa และคณะ(2006)

ข) การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำส่วนใสที่ได้ในขั้นตอนแรกไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมด้วยอะโซเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรด trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, Shimadzu UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ โดยกำหนดให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ 0.1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว Nham model broth (NMB) เพื่อนำมาเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักแหนม

3.2.2.1 การเตรียมสารสกัดกระเทียม

นำกระเทียมสดทั้งหัวมาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปอกเปลือกในตู้เขี่ยเชื้อแล้วนำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นให้ละเอียด จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเช่นเดียวกับข้างต้น นำส่วนใสที่ได้ไปผสมกับอาหารเหลว NMB ให้ได้ปริมาณกระเทียมสกัดตามต้องการ ระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดกระเทียมหลังจากตีป่นกระทั่งผสมในอาหาร NMB และเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 60 ถึง 90 นาที

3.2.2.2 ผลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญและการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. lactis* 13IS2, *P. pentosaceus* PO805 และ *E. faecalis* 4IS17 ตามวิธีการดังข้อ 3.2.1.1 แต่ละสายพันธุ์ที่ทำการปรับความขุ่นโดยใช้ Mcfarland standard เบอร์ 5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแต่ละชนิดมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรเติมลงในอาหาร NMB 100 มิลลิลิตร ที่มีอัตราส่วนของความเข้มข้นของเกลือต่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียม (ร้อยละ) ดังนี้ 0:0, 0:1, 0:2, 1:0, 1:1, 1:2, 2:0, 2:1 และ 2:2 ทำซ้ำ 2 ชุดการทดลอง นำบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รวมทั้งหมด 18 ทรีตเม้นต์) วัดค่าพีเอชและค่าความขุ่นของอาหาร NMB ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, Shimadzu UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลาของการหมัก 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลการเจริญและการหมักของเชื้อแต่ละชนิด คัดเลือกชนิดของเชื้อที่เหมาะสมเพื่อนำมาทดลองในขั้นต่อไป

3.2.3 การศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพแหนม

ทำการผลิตแหนมที่มีส่วนผสมดังนี้ เนื้อหมูร้อยละ 67.0 หนังหมูร้อยละ 18.0 เกลือ ร้อยละ 2.2 ข้าวสุกร้อยละ 8.0 กระเทียมร้อยละ 4.4 น้ำตาลร้อยละ 0.2 ผงชูรสร้อยละ 0.2 โดยในการทดลองแต่ละซ้ำได้ผลิตแหนมที่มีส่วนผสมทั้งหมด 3,600 กรัม ในการผลิตแหนมทำตามวิธีการดังนี้ นำเนื้อหมูสดมาล้างให้สะอาดซับน้ำให้แห้ง นำไปบดให้ละเอียด ส่วนหนังหมูนำมาลวกในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที หั่นเป็นเส้นเล็ก ๆ แล้วซับน้ำให้แห้ง จากนั้นนำเนื้อหมูบดและหนังหมูผสมเข้ากับส่วนผสมทั้งหมดด้วยเครื่องนวดผสม kitchen aid ที่ความเร็วระดับ 2 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแบ่งส่วนผสมที่เข้ากันดีแล้วออกเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วนที่ 1 นำมาเติมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 10^6 เซลล์ต่อกรัม ส่วนที่ 2 เติมสารแขวนลอยเซลล์ชนิดเดียวกันให้มีความเข้มข้นเป็น 10^4 เซลล์ต่อกรัม ส่วนที่ 3 เติมสารแขวนลอยเซลล์ชนิดเดียวกันให้มีความเข้มข้นเป็น 10^2 เซลล์ต่อกรัม และส่วนที่ 4 ไม่เติมสารแขวนลอยของเซลล์ดังกล่าว (ชุดควบคุม)

ในการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อ ทำตามวิธีการข้อ 3.2.1.1 ปรับความขุ่นโดยใช้สารละลาย Mcfarland standard เบอร์ 5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตรจากนั้นเจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ระดับความเข้มข้นเซลล์ 3 ระดับได้แก่ 10^8, 10^6 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะใช้เติมลงในส่วนผสมของแหนมส่วนที่ 1 ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 ตามลำดับ โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 9 มิลลิลิตรเติมลงในแหนมแต่ละส่วน (900 กรัม) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายในแหนมส่วนที่ 1 ส่วนที่ 2 และส่วนที่ 3 เป็น 10^6, 10^4 และ 10^2 เซลล์ต่อกรัมตามลำดับ ผสมสารแขวนลอยเซลล์ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับส่วนผสมของแหนม นำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก ถุงละ 40 กรัม อัดให้แน่นแล้วมัดด้วยยาง นำตัวอย่างแหนมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างแหนมทุก ๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 96 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด ค่าไทโอบาบิทูริก (TBA) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด สำหรับค่าสี น้ำหนักที่สูญเสียไป (weight loss) ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (release water content) และค่า a_w ทำการวิเคราะห์เฉพาะที่เวลาเริ่มต้นการหมัก และที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก และทำการตรวจคุณภาพทาง จุลินทรีย์ของแหนมโดยตรวจหาเชื้อ *Salmonella* เชื้อ *Staphylococcus aureus* จำนวน Enterobacteria ทั้งหมด จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนยีสต์ราทั้งหมด รวมทั้งประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเมื่อค่าพีเอชของแหนมลดลงจนถึง 4.5 วิธีการวิเคราะห์ทั้งหมดมีดังนี้

ก) การวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในแหนม

ทำตามวิธีของ AOAC (2000) โดยชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัมใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำแหนมที่ได้ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงในถุงตีป่น ทำการตีป่นเป็นเวลา 1 นาทีด้วยความเร็วปานกลาง จากนั้นทำการเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจางถึง 10^{-4} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อแล้วเททับด้วยอาหาร MRS หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้อาหารกระจายทั่วจาน ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี ทำการคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในรูปโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

ข) การวัดค่าการเกิดปฏิกิริยาของกรดไทโอบาบิทูริก

การวัดค่าการเกิดปฏิกิริยาของกรดไทโอบาบิทูริกตามวิธีของ Kirk และ Sawyer (1991) ทำได้โดยนำตัวอย่างแหนมมา 10 กรัมและทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วชะล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร เทใส่ลงในฟลาสก์สำหรับกลั่น เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมลูกแก้วเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรงจากนั้นให้ความร้อนด้วยเตาไฟฟ้า ทำการกลั่นและเก็บสารละลายที่ได้จากการกลั่นได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิดเติมสาร TBA ความเข้มข้น 0.01995 โมลต่อลิตร (ชั่งกรดไทโอบาบิทูริก 0.2883 กรัมละลายใน 100 มิลลิลิตรของสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 90) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรปิดจุกเขย่าให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง ผสมและนำไปทำการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 35 นาที โดยตัวอย่างที่ได้จะเกิดสีแดง หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer, Shimadzu UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร การเตรียมแบลงค์ (blank) ทำได้โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรแทนสารละลายที่กลั่นได้ จากนั้นทำการทดลองขั้นต่อไปเช่นเดียวกับการหาค่า TBA ของตัวอย่างทุกประการ ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตรของตัวอย่างเปรียบเทียบกับแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้มาคูณกับค่า K จะได้ค่า TBA ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของมาลโลนาลดีไฮด์ (malonaldehyde) ที่มีอยู่ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง (mg MAD/kg sample) ซึ่งค่า K หาได้จากกราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) (วิธีการหาค่า K แสดงในภาคผนวก ก.) ค่า TBA (thiobarbituric acid) ที่คำนวณได้แสดงอยู่ในรูปของค่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) ซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของมาลโลนาลดีไฮด์ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (mg MAD/kg sample)

ค) วัดค่า a_w

ทำการวัดค่า a_w ด้วยเครื่องวัด a_w (Aqualab Serie 3 TE) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยแบ่งตัวอย่างแหนม 3 กรัมใส่ในตลับสำหรับวัดค่า a_w ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรตลับ นำไปเข้าเครื่องวัดรอให้เครื่องอ่านค่า (รอจนสัญญาณดัง)

ง) การวัดค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด

แบ่งตัวอย่างแหนมที่อยู่ในถุงไปวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (testo 205) สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดทำตามวิธีของ Benjakul และคณะ (1997) ซึ่งทำได้ดังนี้ นำตัวอย่างแหนม 5 กรัมใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำที่ผ่านการต้มเพื่อไล่คาร์บอนไดออกไซด์ 40 มิลลิลิตร นำไปทำการตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทตัวอย่างทั้งหมดลงในหลอด centrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 4 นำส่วนใสที่ได้ไปทำการไท เทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร โดยหยดฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ 3 หยดก่อนทำการไทเทรต สังเกตจุดยุติโดยดูจากตัวอย่างจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีชมพูอ่อน แล้วจึงบันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างแหนมแต่ละครั้ง นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกจากสูตร (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ค)

จ) การวัดค่าสี

ทำการวิเคราะห์สีของแหนมด้วยเครื่อวัดสีของมินอลต้า รุ่น CR-300 วัดค่าสีระบบ CIE ค่าที่วัดได้แสดงในรูปของค่า L* a* b* โดยใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์สีปริมาตร 10 กรัม โดยนำหลอดฉายแสงวางลงบนแหนม กดปุ่ม measure บนเครื่องประมวลผลข้อมูล เครื่องวัดสีจะทำการวัด 3 ครั้ง ข้อมูลที่วัดได้จะแสดงเป็นค่าความสว่าง (L*) ความเป็นสีแดง (a*) (ค่า + หมายถึง ความเป็นสีแดง และค่า – หมายถึง ความเป็นสีเขียว) ความเป็นสีเหลือง (b*) (ค่า + หมายถึงความเป็นสีเหลือง และค่า – หมายถึง ความเป็นสีน้ำเงิน)

ฉ) การหาน้ำหนักที่หายไป (weight loss)

การหาน้ำหนักที่หายไปตามวิธีของ Riebroy และคณะ (2008) โดยสุ่มตัวอย่างแหนมในแต่ละชุดมาชั่งหาน้ำหนักก่อนหมัก และหลังทำการหมักเป็นเวลา 98 ชั่วโมง โดยใช้ตัวอย่างแหนมก้อนเดียวกัน ผลต่างของน้ำหนักก่อนหมักและหลังหมักคือน้ำหนักที่หายไป

ช) การหาปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมา (released water content)

การหาปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยตามวิธีของ Riebroy และคณะ (2008) โดยสุ่มตัว อย่างแหนมในแต่ละชุดมาชั่งหาน้ำหนักรวมถุงพลาสติก (A) จากนั้นจึงนำแหนมออกจากถุง พลาสติก แล้วนำมาซับน้ำที่ปล่อยออกมาที่ผิวจนแห้งด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (B) ชั่งน้ำหนักถุงพลาสติกเปล่า (C) คำนวณหาร้อยละของน้ำที่ปลดปล่อยออกมาจากสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมา(ร้อยละ)} = 100 \times \{(A-B)-C\}/(A-C)$$

ซ) การตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนม

- <u>การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด</u>

หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธีของ Marturin และคณะ (2001) โดยชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจาง 10^{-7} ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-5} 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อแล้วเทอาหาร PCA ที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสลงไป หมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งคว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ในรูป โคโลนี ต่อกรัมของตัวอย่าง

-<u>การวิเคราะห์หาจำนวน Enterobacteria ทั้งหมด</u>

วิเคราะห์หาจำนวน Enterobacteria ทั้งหมดตามวิธีของ Feng และคณะ (2002) เตรียมตัวอย่างและทำการเจือจางเช่นเดียวกับการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ปิเปตตัว อย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร Violet Red Bile Agar ที่แห้งสนิท เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวน 25-250 โคโลนี คำนวณในรูป โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

- <u>การวิเคราะหาจำนวนเชื้อราและยีสต์</u>

วิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ตามวิธีของ Tournas และคณะ (2001) โดยเตรียมตัวอย่าง และทำการเจือจางเช่นเดียวกับการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีการเติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผิวหน้าอาหารแห้งสนิทเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจาน นับโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวน 10-150 โคโลนี คำนวณในรูป โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง ถ้าหากมีโคโลนีขึ้นบนจานเพาะเชื้อซึ่งไม่ใช่ลักษณะของเชื้อรา ให้เขี่ยเชื้อมาทำการย้อมแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตลักษณะของเซลล์

- <u>การวิเคราะห์หาจำนวน *Staphylococcus aureus*</u>

วิเคราะห์หาจำนวน *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ Bennett และคณะ (1998) เตรียมตัวอย่างและเจือจางเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} โดยปิเปตแต่ละระดับความเจือจางลงบนผิวหน้าอาหาร Baird-Parker agar ที่เติมโพแทสเซียมเทลลูไรส์และไข่แดงจานละปริมาตร 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรตามลำดับ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ คว่ำจานแล้วนำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีสีเทาดำกลมเรียบอาจมีหรือไม่มี opaque zone เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* ลงในอาหาร BHI ผสมให้เข้ากันดีกับอาหารเหลว และลากลงบนผิวหน้าอาหาร TSA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดสอบยืนยัน

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกลูเลสทำได้โดยปิเปตโคแอกลูเลสพลาสมาปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร BHI ที่มีเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการณ์จับตัวเป็นลิ่มของพลาสมาเนื่องจากเอนไซม์โคแอกลูเลสที่ *S. aureus* สร้างขึ้น

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ที่สะอาดเขี่ยเชื้อ *S. aureus* จาก TSA slant มาแตะลงบนสารละลาย สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นทันที ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันทีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส และถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส

การทดสอบการใช้กลูโคสในสภาพไร้อากาศ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อจาก TSA slant ลงในอาหาร TYEA ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5 โดยให้เชื้อบางส่วนตกลงที่ก้นหลอด ปิดผิวหน้าของอาหารด้วยน้ำมันพาราฟินปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ถ้าอินดิเคเตอร์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่ามีการสร้างกรดในสภาพไร้อากาศ ชี้ให้เห็นถึงการมีเชื้อ *S. aureus* ควรมีเชื้อ *S. aureus* บริสุทธิ์ทดสอบควบคู่กันไป

- การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella*

ทำการตรวจหา *Salmonella* ตามวิธีของ Andrews (2007) โดยชั่งตัวอย่างแหนม 25กรัม ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมอาหาร Lactose Broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที ถ่ายส่วนผสมที่ตีป่นแล้วลงในขวดปากกว้างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการถ่ายลงอาหาร Selective Enrichment media โดย ปิเปตตัวอย่างที่บ่มแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว RV (Rappaporot–Vassiliadis broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ และปิเปตตัวอย่างอาหารเดิมอีก 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว TT (Tetrathionate broth) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

ผสมอาหารที่บ่มแล้วข้างต้นให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมใช้ลูปปราศจากเชื้อแตะลงในอาหาร Tetrathionate broth (TT) ที่บ่มแล้วนำไปลากลงบนอาหาร selective agar จำนวน 1 ลูปเต็ม ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหาร Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) และใช้ลูป

แตะอาหาร TT แล้วแตะลงบนผิวหน้าอาหาร Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV) จำนวน 5 จุด สำหรับอาหารRappaporot– Vassiliadis broth (RV) ที่บ่มแล้วทำเช่นเดียวกันกับอาหาร TT นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหาร MSRV ทำการบ่มโดยไม่ต้องคว่ำจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะตรงกลางโคโลนีเบา ๆ ถ่ายเชื้อลงใน Triple Sugar Iron (TSI) slant โดยการลาก (streak) ที่ผิวหน้าของ slant และแทง (stab) ลงไปจนถึงก้นหลอด จากนั้นใช้เข็มอันเดิมไม่ต้องเผาไฟ แทงลงในหลอดอาหาร Lysine Indole Motility (LIM) medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คลายฝาหลอดอาหารเพื่อให้มีอากาศใน TSI เชื้อ *Salmonella* จะทำให้ส่วนของบริเวณที่ลาดเอียง (slant) มีสีแดง (alkaline) และส่วนก้น (butt) มีสีเหลือง (acid) โดยมีหรือไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สังเกตจากการที่วุ้นมีสีดำ ถ้าพบลักษณะดังกล่าวเก็บหลอดอาหาร TSI ไว้ทดสอบทางซีโรวิทยาต่อไป ในอาหาร LIM ทดสอบ 3 ชนิดคือ ไลซีน (lysine) อินโดล (indole) และการเคลื่อนที่ (motility) โดยจะตรวจดูสีของอาหารก่อนเพื่อดูผลของการทดสอบไลซีน เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่จะให้ผลของไลซีนเป็นบวกคือมีสีม่วง แต่ถ้าผลลบจะมีสีเหลือง จากนั้นตรวจดูการเคลื่อนที่สังเกตจากความขุ่นของอาหารรอบรอยแทงยกเว้น *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum ซึ่งไม่มีแฟลกเจลลาทำให้ผลการเคลื่อนที่เป็นลบ อาหารจะไม่มีขุ่น จากนั้นทดสอบอินโดลโดยเปิดฝาหลอดทดลองแล้วหยดโคแวกซ์รีเอเจนท์ปริมาตร 0.2-0.3 มิลลิลิตร (3-4 หยด) ลงไปบนผิวหน้าของอาหาร LIM ถ้าเป็น *Salmonella* จะต้องให้ผลลบคือเกิดสีเหลือง ถ้าให้ผลบวกจะเกิดสีแดง เลือกเชื้อในหลอด TSI ที่คาดว่าจะเป็น *Salmonella* จำนวน 3 หลอดที่ถ่ายเชื้อมาจากอาหาร RV และอีก 3 หลอดจากอาหาร TT มาทดสอบทางชีวเคมีและทางซีโรวิทยาเพื่อจำแนกชนิดของ *Salmonella*

การทดสอบทางซีโรวิทยา (serological test) โดยวิธี Slide agglutination ทำได้โดยหยดแอนติซีรัม Polyvalent A – 67 และ Polyvalent A-I บนสไลด์อย่างละ 1 หยด และเขี่ยเชื้อจากหลอด TSI มาทดสอบกับแอนติซีรัมทั้ง 2 ชนิด กวนให้เข้ากันดีกับแอนติซีรัมจากนั้นเอียงสไลด์ไปมาหลายๆครั้ง สังเกตปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มที่เกิดขึ้นจะเห็นภายในเวลา 30-60 วินาที เนื่องจากอาจเป็นเชื้อในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งระหว่างกลุ่ม A ถึง กลุ่ม I ในกรณีที่ให้ผลบวกกับ Polyvalent A-I แต่ถ้าให้ผลลบ กับ Polyvalent A-I แต่ให้ผลบวกกับ *Salmonella* Polyvalent A-67 แสดงว่าเชื้อนี้อาจอยู่ในระหว่าง *Salmonella* กลุ่ม J ถึง *Salmonella* กลุ่ม 67 ให้นำมาทดสอบกับแอนติซีรัมแต่ละกลุ่มคือแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อกลุ่ม A, B, C, D และ E ถ้าให้ผลบวกหรือเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อกลุ่มใดรายงานว่าเป็น *Salmonella* กลุ่มนั้น

ฌ) การวัดคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมทำได้โดยนำแหนมตัวอย่างทั้ง 4 ทรีตเม้นต์ ที่ทำการหมักจนได้พีเอชประมาณ 4.5 ไปทำการทอดโดยใช้ไฟปานกลางเป็นเวลา 10 นาทีจน

แหนมสุก หั่นให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตรนำไปทดสอบด้านประสาทสัมผัส กับผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ด้วยวิธี 9-point hedonic scale test โดยทดสอบด้านสี (color) กลิ่นรส (flavor) ความเปรี้ยว (sour) ความเค็ม (salty) ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) และความชอบรวม (overall acceptance) โดยการประเมินคะแนนตามความชอบ 9 ระดับ คือ 9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง 6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (ตัวอย่างแบบสอบถามใน ภาคผนวก จ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำคะแนนมาวิเคราะห์ทางสถิติ แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ย

ญ) การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และ Duncan's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละทรีตเม้นต์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ของ *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 (ตารางที่ 4.1) พบว่ามี *Pediococcus pentosaceus* P0805 เพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิด นี้ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยไขมัน ไนเตรทรีดักเทสและไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ในหางนม แต่มีกิจกรรมการย่อยสลาย starch (amylolytic activity) ในการหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพียงเล็กน้อยโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* 4IS17 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (0.92 U/ml) รองลงมาเป็น *Lactococcus lactis* 13IS3 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805

ในการทดสอบความสามารถการผลิตเอนไซม์ Essid และคณะ (2009) พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนมากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ โดยเฉพาะในโปรตีนของเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* และ *L. casei* ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำในการย่อยเนื้อหมู อีกทั้งการย่อยกรดอะมิโนยังมีบทบาทสำคัญในการพัฒนากลิ่นรส ซึ่งเกิดจาก valine และ acylamidase จึงนิยมใช้ *Lactobacillus* เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมัก อย่างไรก็ตาม Khedid และคณะ (2009) ที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมอูฐ พบว่า *Lactococcus lactis* สามารถผลิตกรดจากเคซีน โดยกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์จนได้เป็นสารประกอบแอลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ คีโตน เอสเตอร์ กรดอะมิโน และสารประกอบซัลเฟอร์ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดี

ในการคัดเลือกกล้าเชื้อ การสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ถือเป็นหลักการแรกที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก เพราะเป็นปฏิกิริยาที่ส่งผลต่อการเกิดสีในอาหาร ซึ่งเกิดจากการที่สารประกอบไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ โดยปริมาณไนเตรตจะลดลงในระหว่างการหมัก และการทำให้สุก (Droinos และคณะ, 2005) จากผลการทดลองที่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส สอดคล้องกับ Bonomo และคณะ (2008) ที่ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติก และพบว่า *P. pentosaceus*, *L. plantarum* และ *L. brevis* ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรต

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	Catalase activity	Nitrate reductase	Lipolytic activity	Amylolytic activity	Proteolytic activity	Protase activity assay (U/ml)
L. lactis 13IS3	-[a]	-	-	+[b]	-	0.80
E. faecalis 4IS17	-	-	-	+	-	0.92
P. pentosaceus P0805	+	-	-	+	-	0.75

[a] คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา

[b] คือ เกิดปฏิกิริยา

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว Nham model broth

4.2.1 ผลของอุณหภูมิ เกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญและการหมักของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.2) พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสังเกตจากระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ จนกระทั่งได้ค่าความเข้มข้นสูงสุด จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสส่วนใหญ่จนได้ค่าความขุ่นสูงสุด ใช้เวลาสั้นกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นเกลือและสารสกัดกระเทียมที่ใช้ พบว่าเชื้อ *L. lactis* 13IS3 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ในสารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 เนื่องจากระยะเวลาที่ได้ค่าความขุ่นสูงสุดคือใช้เวลาหมัก 2 วัน สำหรับเชื้อ *Enterococcus faecalis* 4IS17 พบว่าสภาวะที่ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดคือที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1 ในสภาพที่เติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 ส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 เนื่องจากใช้เวลาน้อยที่สุด 2 วันในการให้ค่าความขุ่นสูงสุด

4.2.2 ผลของอุณหภูมิ เกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อสังเกตการลดลงของค่าพีเอชของเชื้อ *L. lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB ที่ระดับความเข้มข้นเกลือและสารสกัดกระเทียมที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.3) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส *L. lactis* 13IS3 และ *E. faecalis* 4IS17 ใช้เวลาในการลดลงของค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 ใกล้เคียงกัน (1 วัน) โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0 ถึง 1 ที่ไม่มีสารสกัด

กระเทียมส่วนการหมักด้วยเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่มีการลดลงของค่าพีเอชจนได้ค่าพีเอชน้อยกว่า 4.5 เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0 ถึง 1 ในสภาพที่ไม่เติมสารสกัดกระเทียมและสภาพที่เติมสารสกัดกระเทียมความเข้มข้นร้อยละ 2 มีค่าพีเอชลดลงน้อยกว่า 4.5 เร็วที่สุดคือ 1 วัน และเมื่อเปรียบเทียบการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 3 ชนิด พบว่าส่วนใหญ่ *E. faecalis* 4IS17 มีการหมักได้เร็วกว่า *L. lactis* 13IS3 และ *P. pentosaceus* P0805 แต่เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีเพียง *P. pentosaceus* P0805 เท่านั้นที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ จึงคัดเลือก *P. pentosaceus* P0805 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมัก และสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักโดยเชื้อชนิดนี้ในอาหาร NMB คือสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1 และสารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเกลือและสารสกัดกระเทียมช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อพิจารณาจากการเจริญและการลดลงของพีเอชของเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 พบว่าที่สภาวะสารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 ให้ผลดีกว่าสภาวะที่มีสารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 ถึง 1 เนื่องจากในอาหาร NMB ที่เติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 และหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ใช้เวลาลดลงของค่าพีเอชจนต่ำกว่า 4.5 น้อยกว่าในอาหาร NMB ที่เติมสารสกัดกระเทียมร้อยละ 1 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดกระเทียมมีผลกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 มีนักวิจัยหลายท่าน แสดงให้เห็นว่าแมงกานีสมีผลกระตุ้นการหมักเป็นอย่างมาก (Raccach และ Marshall, 1985) ได้พบการลดลงของระยะเวลาการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus lactis*, *L. casei*, *L. plantarum* และ *L. casei* subsp. *alatosus* เมื่อมีการหมักให้แมงกานีส ไม่นานมานี้ Bruyneel และคณะ (1990) พบว่า *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารของ Woolford และ Wilkins (1974) มีอัตราการเจริญและการสร้างกรดแลคติกเพิ่มขึ้น เมื่อมีปริมาณแมงกานีสเพิ่มขึ้นถึง 50 ppm โดย *L. plantarum* มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า หลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นสุดท้ายของกรดแลคติก หลังจากหมักเป็นเวลา 10 วัน เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจากความเข้มข้นเดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเช่นเดียวกับการศึกษาผลของการเติมเครื่องเทศลงในผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการเติมกล้าเชื้อพบว่าปริมาณกรดทั้งหมดที่ผลิตขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณแมงกานีสในสารสกัดซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.0 ถึง 0.6 ppm (Zaika และ Kissinger, 1984) การเติมแมงกานีสปริมาณ 0.5 ppm ส่งผลให้ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* มีการผลิตกรดเพิ่มขึ้น 7 และ 3 เท่า ตามลำดับ Font de Valdez และคณะ (1986) ได้ศึกษาอิทธิพลของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการฟื้นคืนสภาพเป็นแบคทีเรียที่มีชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการแช่เย็นแห้งพบว่าในสภาวะที่มีแมงกานีสช่วยส่งเสริมอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนี้ Hardman และ Pritchard (1987) พบว่าเอนไซม์ L-lactate dehydrogenase ที่สร้างโดย *Streptococcus faecalis* ถูกกระตุ้นโดยแมงกานีสที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในกระเทียมมี

เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) He และคณะ (2008) ได้แยกเอนไซม์จากกระเทียมซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ มีความสำคัญต่อเซลล์ทั้งที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถลดการเกิด superoxide anionic ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโมเลกุลของออกซิเจน (Zweier และคณะ, 1986;Li และคณะ, 1991) เชื่อกันว่า superoxide (O_2^-) เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทางหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงผลกระทบการจับอนุมูลอิสระ (Scavenging effect) ของ superoxide คืออาศัยการกระทำของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้แมงกานีสอิออน (Mn^{2+}) ตรวจจับซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^- scavenger) ซึ่งสิ่งนี้อาจใช้อธิบายได้ถึงความต้องการแมงกานีสอย่างมาก เนื่องจาก manganese-dependent enzyme ถูกทำให้อิ่มตัวที่ความเข้มข้นต่ำมาก (Kandler, 1983)

ตารางที่ 4.2 การเจริญโดย *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์(%)	30°C			35°C		
	การเจริญสูงสุด[a]	จำนวนวันที่ได้ค่า OD_{600} สูงสุด	%สารสกัดกระเทียม[b]	การเจริญสูงสุด[a]	จำนวนวันที่ได้ค่า OD_{600} สูงสุด	%สารสกัดกระเทียม[b]
Lactococcus lactis 13IS3						
0	1.507	4	0	1.447	4	0
1	1.533	2	2	1.448	4	1
2	1.412	3	2	1.479	4	2
Enterococcus faecalis 4IS17						
0	1.305	3	0	1.365	4	0
1	1.315	1	1	1.154	4	1
2	1.414	4	0	1.088	4	0
Pediococcus pentosaceus P0805						
0	1.200	2	2	1.202	3	1
1	1.514	4	1	1.148	4	1
2	1.065	3	2	1.349	4	2

[a]ค่า OD สูงสุดที่แต่ละความเข้มข้นของเกลือ

[b]ความเข้มข้นของกระเทียมที่มีการเจริญสูงสุด

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และสารสกัดกระเทียมในอาหาร NMB ที่หมักโดย *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสต่อระยะที่พีเอชลดลงถึงน้อยกว่า 4.5

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ระยะเวลาที่ pH ลดลงน้อยกว่า 4.5 (วัน)					
	30°C			35°C		
	สารสกัดกระเทียม			สารสกัดกระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%
Lactococcus lactis 13IS3						
0	1	1	2	1	2	2
1	1	2	3	1	2	2
2	2	2	2	3	1	2
Enterococcus faecalis 4IS17						
0	1	2	2	1	1	1
1	1	1	2	1	1	2
2	1	2	4	1	2	1
Pediococcus pentosaceus P0805						
0	2	2	1	2	1	2
1	1	3	1	3	2	2
2	4	3	2	3	2	2

4.3 การศึกษาผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพแหนม

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมระหว่างการหมัก

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นในแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 มีจำนวนมากกว่าในแหนมชุดควบคุม 0.37 ถึง 2.26 log unit (2.34 ถึง 1.82×10^2 โคโลนีต่อกรัม) และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมทุกชุดเพิ่มจำนวนมากขึ้นตลอดระยะเวลาของการหมัก ภาพที่ 4.1(a) แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 จำนวน 10^4 และ 10^6 เซลล์ต่อกรัม มีจำนวนมากกว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีจำนวนมากกว่าถึง 1.14 ถึง 2.03 log unit (1.38×10^1 ถึง 1.07×10^2 โคโลนีต่อกรัม) หลังจากหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทุกทรีตเม้นต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นระหว่างการหมัก จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก โดยแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2

เซลล์ต่อกรัม มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด คือเพิ่มขึ้น 0.98 log unit (9.55 โคโลนีต่อกรัม) ส่วนแหนมที่มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มมากรองลงมาคือแหนมชุดควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 10^4 เซลล์ต่อกรัมและแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 10^6 เซลล์ต่อกรัม เมื่อทำการหมักจนครบ 96 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีจำนวนอยู่ระหว่าง 8.59 ถึง 9.8 log CFU ต่อกรัม (3.89×10^8 ถึง 6.31×10^{10} โคโลนีต่อกรัม)

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากหมักจนกระทั่งครบ 48 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกใช้สารอาหารซึ่งเป็นส่วนผสมของแหนมได้แก่ เนื้อหมู ข้าวสุก น้ำตาล และอื่น ๆ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นซับสเตรตทั้งในการเจริญและการหมักโดยจะส่งผลให้มีการลดลงของพีเอช อัตราการสร้างกรดและระยะเวลาในการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไป (Lücke, 1986) Kandler (1983) ได้อธิบายถึงการเมแทบอไลซ์คาร์โบไฮเดรตของ แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพอร์มีเอส (permeases) สำหรับย่อยสลายพวกแซคคาไรด์ (saccharide) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ภายในเซลล์ เอนไซม์ไกลโคซิเดส (glycosidase) ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์และในที่สุดได้เป็นโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ซึ่งจะผ่านกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phophorylated) และถูกเมตาบอไลซ์โดยกระบวนการ Emden-Meyerhoff pathway ทั้งนี้การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของแบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละทรีตเม้นต์อาจเกี่ยวข้องกับการมีแร่ธาตุที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเช่น แมงกานีส ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ที่พบในกระเทียม (He และคณะ, 2008) Vandevoorde และคณะ (1992) ได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าปริมาณของเหล็ก และแมงกานีสมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อผสม โดยปริมาณของแมงกานีสเพียงเล็กน้อยสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อ *Lactobacillus* และการทำลายสารพิษที่เกิดจากออกซิเจน

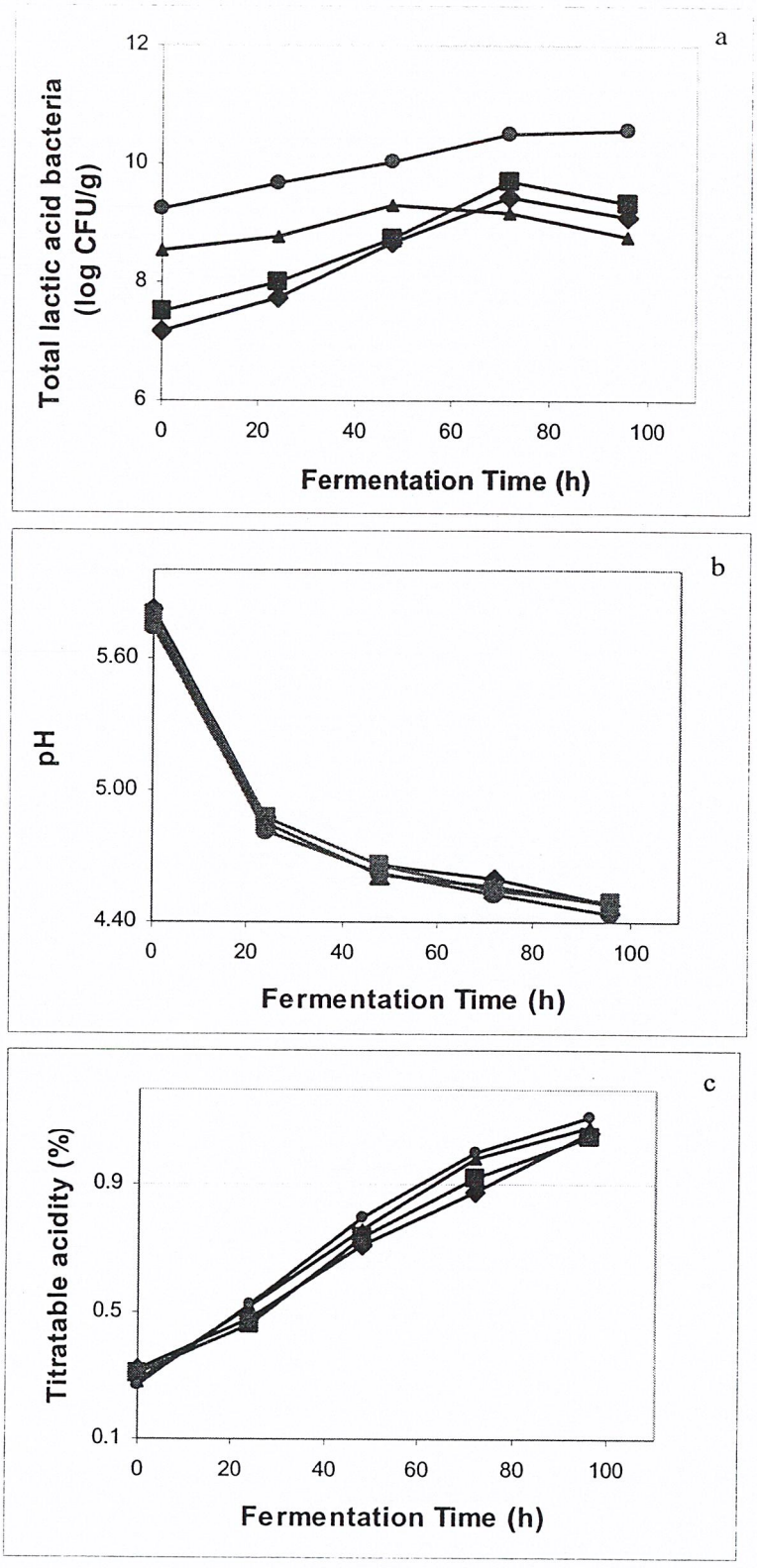
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในแหนมที่เติม *P. pentosaceus* P0805 ระดับต่าง ๆ และแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อดังกล่าว พบว่าพีเอชของแหนมลดลงและปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยค่าพีเอชในตัวอย่างแหนมลดลงอย่างรวดเร็วจาก 5.74 ถึง 5.82 ที่ระยะเวลาเริ่มต้นของการหมักจนมีค่าพีเอชอยู่ที่ 4.61 ถึง 4.66 เมื่อหมักจนครบเวลา 48 ชั่วโมง โดยตัวอย่างแหนมที่มีค่าพีเอชค่อนข้างต่ำ (4.61 ถึง 4.62) คือตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^4 และ 10^6 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.76 ถึง 0.80 หลังจากนั้นค่าพีเอชลดลงอีกเล็กน้อยหลังจากสิ้นสุดการหมักจนครบเวลา 96 ชั่วโมง จากผลการ

ทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อสิ้นสุดการหมัก ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัมมีค่าพีเอชต่ำสุด (4.44) และปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด (ร้อยละ 1.12) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดของแหนมแต่ละทรีตเม้นต์

การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดและการลดลงของค่าพีเอชในแหนม อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการหมักโดยแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่มีอยู่ในวัตถุดิบร่วมกันกับแบคทีเรียกรดแลคติก (*P. pentosaceus* P0805) ที่เติมลงไป จากการทดลองของพัชรีและสุนิสา (2550) ซึ่งได้แยกเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 จากเนื้อหมูสด และพบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* P0805 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มของ homofermentative ที่ผลิตกรดแลคติกได้เป็นส่วนใหญ่จากกระบวนการหมัก Hutskins (2006) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม homofermentative เมแทบอไลต์น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (hexoses) โดยอาศัยเอนไซม์จากวิถี glycolytic Embden-Meyerhof (EMP pathway) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้คือได้ไพรูเวท 2 โมเลกุลและได้ ATP 2 โมเลกุล ต่อเฮกโซส 1 โมล จากนั้นไพรูเวทถูกรีดิวซ์ไปเป็น L- หรือ D-แลคเตท ด้วยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ในระหว่างกระบวนการ เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในกลุ่มของ homofermentative สารตั้งต้นมากกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณสารตั้งต้นทั้งหมดถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก

โดยทั่วไปค่าพีเอชของแหนมจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มมากขึ้น การลดลงอย่างรวดเร็วของค่าพีเอชในช่วง 24 ชั่วโมงแรก อาจเกิดจากกรดอินทรีย์ซึ่งส่วนใหญ่คือ กรดแลคติกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก ขณะเดียวกันปริมาณกรดทั้งหมดก็มีปริมาณพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้นซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Visesssanguan และคณะ (2004) ที่ได้พบว่าแหนมมีค่าพีเอชลดลงถึง 4.6 ภายในเวลา 60 ถึง 72 ชั่วโมง แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งทำให้เกิดการลดลงของค่าพีเอชและการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมัก กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ตรวจพบได้เป็นส่วนมากในแหนม รองลงมาคือกรดอะซิติกและกรดออกซาลิกตามลำดับส่วนกรดบิวทิริก กรดซัคซินิก และกรดชนิดอื่น ๆ เป็นที่น่าสนใจน้อยกว่ากรดแลคติกในแหนม มักพบว่ากรดแลคติกและกรดอะซิติกมีส่วนสำคัญที่ก่อให้เกิดกลิ่นเฉพาะของกรดและก่อให้เกิดรสชาติในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักและแหนม และมีความเป็นไปได้ว่ากรดแลคติกและกรดอะซิติกมีส่วนก่อให้เกิดกลิ่นที่ค่อนข้างฉุนจัด ในผลิตภัณฑ์แหนมทางการค้าที่ได้นำมาทดสอบการชิมพบว่า ตัวอย่างแหนมที่มีความเข้มข้นของกรดแลคติกและกรดอะซิติกสูงจะได้รับคะแนนการยอมรับสูง



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (รูป a) ค่าพีเอช (รูป b) และปริมาณกรดทั้งหมด (รูป c) ในแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 สัญลักษณ์; ชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ), ปริมาณเชื้อ 10^2 cell/g, ปริมาณเชื้อ 10^4 cell/g และ ปริมาณเชื้อ 10^6 cell/g

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในแหนม

จากการศึกษาผลของการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus pentosaceus* P0805 ที่ปริมาณ 10^2 ถึง 10^6 เซลล์ต่อกรัม ลงในแหนมที่ควบคุมกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงให้ผลการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS (ตารางที่ 4.4) จะเห็นได้ว่าแหนมทุกทรีตเม้นต์มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นเมื่อหมักจนถึง 48 ชั่วโมง โดยทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นในช่วง 0.80 ถึง 2.44 มิลลิกรัมของมาลโลนาลดีไฮด์ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (mg MAD/kg) ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่า TBARS เพิ่มขึ้น 0.67 (mg MAD/kg) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *P. pentosaceus* P0805 ที่ใช้ในการหมักแหนมมีผลในการเพิ่มการเกิดออกซิเดชันของแหนม เมื่อทำการหมักจนถึง 72 ชั่วโมงพบว่าค่า TBARS ในแต่ละทรีตเม้นต์มีแนวโน้มลดลงโดยทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อมีการลดลงของค่า TBARS 0.51 ถึง 1.36 (mg MAD/kg) ซึ่งลดลงมากกว่าชุดควบคุมที่มีการลดลงเพียง 0.15 (mg MAD/kg) และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 96 ชั่วโมงพบว่าค่า TBARS ของแหนมทุกทรีตเม้นต์มีค่าเพิ่มขึ้นโดยมีค่า TBARS อยู่ในช่วง 2.27 ถึง 2.81 (mg MAD/kg) ทรีตเม้นต์ที่มีค่า TBARS สูงสุดคือ PP102 (แหนมที่เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2 เซลล์ต่อกรัม) มีค่า TBARS อยู่ที่ 2.81 (mg MAD/kg) ซึ่งมากกว่าค่า TBARS ของแหนมที่เติมเชื้อปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัมแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากผลการทดลองพบว่าแหนมที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก มีค่า TBARS สูงกว่าชุดควบคุมอาจเป็นไปได้ว่าแหนมในทรีตเม้นที่มีการเติมเชื้อมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมากกว่าในชุดควบคุม จึงอาจมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์มากกว่าแหนมชุดควบคุมซึ่ง KrÖckel (1995) กล่าวว่าในระหว่างการเกิดออกซิเด ชันของไขมัน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพเนื่อง จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไปกระตุ้นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ให้เปลี่ยนไปเป็นอนุมูล prophyrin cation radical ซึ่งไปเป็นตัวเริ่มต้นของปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) นอกจากนี้ Ammor และ Mayo (2007) ได้กล่าวว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยมีผลต่อการเพิ่มของกลิ่นหืนและการซีดของสีของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.4 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า TBARSในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ค่า TBARS (mg MAD/ kg)[a] ±SD				
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
PP0[b]	1.73±0.16A[f]	2.08±1.11A	2.10±1.48A	2.25±1.26A	2.27±1.18A
PP102[c]	1.19±0.47A	2.69±0.99A	3.43±2.29A	2.07±0.74A	2.81±2.33A
PP104[d]	1.88±0.49A	2.45±1.26A	2.68±1.93A	2.17±1.78A	2.43±1.72A
PP106[e]	1.44±0.31A	2.14±1.64A	3.43±3.20A	2.75±1.93A	2.71±2.01A

[a] ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b]PP0 คือ ตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

[c]PP102 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^2 เซลล์ต่อกรัม

[d]PP104 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^4 เซลล์ต่อกรัม

[e]PP106 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^6 เซลล์ต่อกรัม

[f] คือ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.4 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแหนม ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยระหว่างการหมักและปริมาณน้ำอิสระ

การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแหนมระหว่างการหมักมีความสัมพันธ์อย่างเห็นได้ชัดกับปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกระหว่างการหมัก จากการทดลองตัวอย่างแหนมที่มีน้ำหนักที่หายไปมากที่สุดคือตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม โดยพบว่าน้ำหนักหลังหมักหายไปถึงร้อยละ 3.12 ซึ่งน้ำหนักที่หายไปรองลงมาคือแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ 10^4 เซลล์ต่อกรัม แหนมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อและแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^2 เซลล์ต่อกรัม (น้ำหนักหลังหมักหายไปร้อยละ 1.37, 1.03 และ 0.44 ตามลำดับ) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมาหลังหมักโดยพบว่าตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม มีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.50 ซึ่งมากกว่าปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยของแหนมที่มีเติมกล้าเชื้อ 10^4 เซลล์ต่อกรัม แหนมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^2 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยร้อยละ 4.35, 3.62 และ 3.59 ตามลำดับน้ำหนักที่หายไปในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนมากเป็นผลอันเนื่องมาจากความสามารถในการยึดจับกันของโมเลกุลของน้ำในเนื้อสัตว์ ส่วนปริมาณน้ำที่สูญเสียไประหว่างการหมักส่วนมากมักจะเกี่ยวโยงถึงปริมาณน้ำที่ถูก

เก็บไว้บนผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นหากปริมาณน้ำที่สูญเสียไปของตัวอย่างแหนมเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลทำให้ค่าของน้ำหนักที่หายไปเพิ่มมากขึ้น (Riebroy และคณะ, 2008)

จากการวัดค่าปริมาณน้ำอิสระพบว่าค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักที่หายไปและปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย ซึ่งพบว่าตัวอย่างแหนมที่เวลาเริ่มต้นของการหมักมีค่า a_w ค่อนข้างสูงโดยวัดค่า a_w ของตัวอย่างแหนมทุกชุดการทดลองได้เท่ากับ 0.971 หลังหมักครบ 96 ชั่วโมง แหนมทุกทรีตเม้นต์มีค่า a_w ลดลงเล็กน้อยโดยแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 10^6, 10^4 และ 10^2 เซลล์ต่อกรัม มีค่า a_w ลดลงอยู่ที่ 0.961, 0.962 และ 0.964 ตามลำดับ สำหรับแหนมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อมีค่า a_w ลดลงเท่ากับ 0.960 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเติมกล้าเชื้อปริมาณมากมีผลทำให้ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมาและค่า a_w ลดลง มากกว่าการเติมกล้าเชื้อปริมาณน้อย ดังงานวิจัยของ Hu และคณะ (2008) ที่ได้ทำการทดลองทำไส้กรอกโดยใช้ปลาลิ่นมาทำการหมักซึ่งมีการเติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีค่า a_w เริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 0.91 และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักค่า a_w มีค่าลดลงอยู่ที่ระหว่าง 0.82-0.89 ซึ่งตัวอย่างที่มีการเติมกล้าเชื้อจะมีค่า a_w ลดลงมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของแหนม ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยระหว่างการหมักและปริมาณน้ำอิสระในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	น้ำหนักของแหนม (กรัม)[a]		น้ำหนักที่หายไป (ร้อยละ)	ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (ร้อยละ)[a]		a_w[a] (25°c)	
	0 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง		0 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
PP0[b]	38.03	37.64	1.03	1.45	3.62	0.971	0.960
PP102[c]	42.79	42.60	0.44	0.51	3.59	0.971	0.964
PP104[d]	40.16	39.61	1.37	1.13	4.35	0.971	0.962
PP106[e]	42.00	40.69	3.12	0.85	5.50	0.971	0.961

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b]PP0 คือ ตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805

[c]PP102 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^2 เซลล์ต่อกรัม

[d]PP104 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^4 เซลล์ต่อกรัม

[e]PP106 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^6 เซลล์ต่อกรัม

การที่แหนมเกิดการสูญเสียน้ำหนัก มีปริมาณที่ปลดปล่อยออกมามากขึ้นและมีค่า a_w ลดลง หลังหมัก อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดปฏิกิริยาการหมักทำให้มีการสะสมกรด แลคติก ให้อยู่ในระดับที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน (coagulate) และโปรตีนที่ละลายได้ เป็นผลให้เกิดการลดลงของความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-binding capacity) ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งได้ง่ายขึ้น (Holzapfel และคณะ, 2003) และความสามารถที่ลดลงในการอุ้มน้ำของโปรตีนในเนื้อสัตว์นี้ ช่วยให้ผลิตภัณฑ์เกิดการแห้งเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากมีการสูญเสียน้ำออกไป ทำให้ค่า a_w ลดลง ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการช่วยยับยั้งให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ไม่สามารถเจริญได้ และช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการให้สั้นลงอีกด้วย (Lücke, 1986)

4.3.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าสีในแหนมระหว่างการหมัก

จากการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าสีของแหนมในระหว่างการเก็บรักษาในขณะก่อนการหมักและหลังการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L*) ของแหนมมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลอง นั่นคือสีของแหนมหมูมีความสว่างมากขึ้น โดย เฉพาะแหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^4 เซลล์ต่อกรัมมีค่า L* โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 13.16 รองลงมาคือแหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม แหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^2 เซลล์ต่อกรัมและแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อโดยมีค่า L* เพิ่มขึ้น 11.71, 11.60 และ 11.49 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นสีเหลือง (b*) แหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^4 เซลล์ต่อกรัมมีค่า b* โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 3.92 รองลงมาคือแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ แหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^2 เซลล์ต่อกรัมและแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อกรัม โดยค่า b* เพิ่มขึ้น 3.29, 1.86 และ 0.86 ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นสีแดง a* พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า a* ในระหว่างการเก็บรักษามีแนวโน้มลดลงในทุกทรีทเม้นต์ โดยแหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^4 เซลล์ต่อกรัมมีค่า a* โดยเฉลี่ยลดลงมากที่สุดถึง 1.49 รองลงมาคือแหนมที่เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม แหนมที่เติมกล้าเชื้อ 10^2 เซลล์ต่อกรัมและแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อโดยมีค่า a* ลดลง 1.14, 0.83 และ 0.51 ตามลำดับ

Vernam และ Sutherland (1995) ได้กล่าวว่า คุณลักษณะของสีในเนื้อสัตว์เป็นผลมาจากเม็ดสีในเนื้อสัตว์และคุณสมบัติการกระจายตัวของแสง (Light-scatteing property) ในเส้นใยกล้ามเนื้อ สีแดงของแหนมอาจเป็นผลมาจาก nitrosylmyoglobin ซึ่งเป็นเม็ดสีปกติในเนื้อสัตว์ที่ยังสดอยู่ จำนวนรูปแบบที่หลากหลายของ myoglobin ในแหนมระหว่างการหมักแสดงถึง nitric oxide myoglobin ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในแหนมระหว่างการผสม และมีประมาณ 90% ของจำนวนฮีโมโกลบินทั้งหมด (total heme pigment)

Myoglobin เป็นสารประกอบของโปรตีน (globin) ที่ละลายน้ำได้ซึ่งรวมกับสาร ประกอบเชิงซ้อนของ pyrrole (pyrrole complex) เรียกว่า ฮีม (haem) ฮีมประกอบด้วยอะตอมของเหล็กซึ่งสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของ oxidation state ระหว่าง Fe^{II} ไปเป็น Fe^{III} กิจกรรมทางกายภาพ

ของไมโอโกลบินที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อของสัตว์มีชีวิตประกอบด้วยการขนส่งออกซิเจนจากกระแสเลือดซึ่งออกซิเจนถูกขนส่งโดยฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ไปยังจุดที่มีกิจกรรมการใช้พลังงานภายในกล้ามเนื้อในเนื้อสัตว์ เมื่อสัตว์ตายลงคุณณสมบัติการขนส่งออกซิเจนของไมโอโกลบินยังคงมีความสำคัญสำหรับช่วยให้เนื้อสัตว์ยังคงมีความสดและมีสีแดงอยู่ (Ranken, 1994)

Myoglobin สามารถขนย้ายหรือปล่อยออกซิเจนเมื่อธาตุเหล็กในฮีมอยู่ในสภาพของ Fe^{II} (Fe^{II} state) โมเลกุลของไมโอโกลบินเช่นนี้อาจอยู่ในรูปแบบใดที่มีการเพิ่มออกซิเจน (oxygenated form) มีออกซิเจน 1 โมเลกุลจับอยู่อย่างหลวมหรืออยู่ในรูปไม่มีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจน (unoxygenated form) สีของเนื้อสดรูปแบบแรกคือที่มีออกซิเจนจะมีสีแดงสว่าง (bright cherry red) ส่วนสีของเนื้อในรูปแบบที่ไม่มีออกซิเจนจะมีสีแดงม่วงเข้ม (deep purple red) ถ้าธาตุเหล็กถูกออกซิไดส์ได้เป็น Fe^{III} สารประกอบของเชิงซ้อนของฮีมจะไม่สามารถละลายน้ำได้ สีของเนื้อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีออกซิเจนจับอยู่ ซึ่งสีที่ถูกออกซิไดส์นี้เรียกว่า met-myohlobin (Ranken, 1994) การที่ค่าสีแดง (a*) ของแหนมลดลงหลังการหมักอาจเป็นเพราะปริมาณออกซิเจนในแหนมลดลงจึงทำให้ไมโอโกลบินเปลี่ยนเป็นเมทไมโอโกลบินเป็นผลให้ค่าสีแดงลดลง ค่าความสว่าง (L*)และค่าความเป็นสีเหลือง (b*) เพิ่มขึ้น ซึ่ง Ranken (1994) กล่าวว่า ปฏิกิริยา oxidation ของไมโอโกลบินให้กลายเป็น เมทไมโอโกลบินพบเมื่อออกซิเจนมีความเข้มข้นต่ำ

ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าสีในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ก่อนหมัก[a]			หลังหมัก[a]		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
PP0[b]	55.33[f]±2.31A	+4.77±1.09A	+4.05±2.51A	66.82±3.40A	+4.26±1.13A	+7.34±1.52A
PP102[c]	54.96±0.90A	+5.08±1.42A	+4.88±1.40A	66.56±2.82A	+4.24±0.40A	+6.73±1.75A
PP104[d]	53.28±2.98A	+5.85±1.75A	+3.58±2.96A	66.44±3.52A	+4.36±1.48A	+7.50±1.23A
PP106[e]	53.89±1.90A	+5.04±1.25A	+6.11±1.78A	65.60±3.40A	+3.90±1.18A	+6.97±1.79A

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b]PP0 คือ ตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805

[c]PP102 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^2 เซลล์ต่อกรัม

[d]PP104 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^4 เซลล์ต่อกรัม

[e]PP106 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^6 เซลล์ต่อกรัม

4.3.6 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนม

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในแหนมภายหลังทำการหมักพบว่า แหนมแต่ละทรีตเม้นต์มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแตกต่างกัน คือมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 2.4×10^{7}-1.1×10^{9} โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 4.7) โดยในตัวอย่างที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^{6} เซลล์ต่อกรัมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุด (1.1×10^{9} โคโลนีต่อกรัม) แหนมที่มีจุลินทรีย์ทั้งหมดรองลงมาได้แก่ แหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^{4} เซลล์ต่อกรัม แหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^{2} เซลล์ต่อกรัม และแหนมชุดควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ)

ในการวิเคราะห์จำนวน Enterobacteria พบว่าแหนมในแต่ละชุดตัวอย่างมีปริมาณของ Enterobacteria ใกล้เคียงกัน โดยตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^{6} เซลล์ต่อกรัมจะพบจำนวนของ Enterobacteria มากที่สุด (3.6×10^{4} โคโลนีต่อกรัม) ส่วนแหนมอีก 3 ทรีตเม้นส์ มีจำนวน Enterobacteria ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 3.6×10^{3}-4.8×10^{3} โคโลนีต่อกรัม นอกจากนี้ไม่พบยีสต์ เชื้อรา *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* ในแหนมทุกทรีตเม้นต์

ตารางที่ 4.7 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ปริมาณของเชื้อที่พบ[a] (CFU/g)				
	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด	จำนวน Enterobacteria ทั้งหมด	Yeast Mould	*S. aureus*	*Salmonella*
PP0[b]	2.4×10^{7}	3.6×10^{3}	-[f]	-	-
PP102[c]	9.6×10^{7}	4.0×10^{3}	-	-	-
PP104[d]	2.2×10^{8}	4.8×10^{3}	-	-	-
PP106[e]	1.1×10^{9}	3.6×10^{4}	-	-	-

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b]PP0 คือ ตัวอย่างชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805

[c]PP102 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^{2} เซลล์ต่อกรัม

[d]PP104 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^{4} เซลล์ต่อกรัม

[e]PP106 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^{6} เซลล์ต่อกรัม

[f]คือ ไม่พบการเจริญ

การที่ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *S. aureus* และ *Salmonella* ในแหนมอาจเป็นไปได้ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคเทอริโอซิน

กรดอินทรีย์ ไดอะซิติล (diacetyl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารอื่น ๆ (Helander และคณะ, 1997) ดังเช่นการทดลองของ Essid และคณะ (2009) ที่พบว่า *Lactobacilllus plantarum* ที่แยกได้จาก Tunisian traditional salted meat ส่วนใหญ่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด (*Salmonella* arizone, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeuroginosa* และ *Escherichia coli*) ได้เช่นกัน นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่ *P. pentosaceus* P0805 จะสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นเดียวกับการทดลองของ Manca de Nadra และคณะ (1998) ซึ่งพบว่า *P. pentosaceus* ที่แยกได้จากไวน์สามารถผลิตแบคเทอริโอซินชื่อ pediocin N5p ได้ ซึ่ง pediocin นี้มีกิจกรรมการต้านการเจริญทั้งของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

เช่นเดียวกับการไม่พบเชื้อรา อาจเนื่องมากจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการผลิตกรดชนิดต่าง ๆ ดังรายงานของ Gerez และคณะ (2009) ที่พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกและกรดฟีนิลแลคติก ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยกรดฟีนิลแลคติกเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด

4.3.7 การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแหนม

จากผลการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแหนมในด้าน สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว ความเค็ม ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบทางด้านสีของแหนมแต่ละทรีตเม้นต์ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.54 ถึง 6.90 คืออยู่ในระดับความชอบเล็กน้อย แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นทรีตเม้นต์ PP102 (แหนมที่เติม *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2 เซลล์ต่อกรัม) ซึ่งผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบด้านสีมากกว่าทรีตเม้นต์อื่น (ตารางที่ 4.8) Toldrá และคณะ (2001) กล่าวว่าลักษณะที่มองเห็นได้ภายนอกเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อผู้บริโภคต่อการประเมินคุณภาพและความน่ารับประทาน (palatability) ของเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ลักษณะของสีมีอิทธิพลต่อการยอมรับ แม้ว่าสีของเนื้อเองจะได้รับผลกระทบจากปริมาณความชื้น ปริมาณไขมันที่มีอยู่ในเนื้อ และปริมาณ hemoprotein ที่มีในเนื้อโดยเฉพาะไมโอโกลบิน (myoglobin) และความสัมพันธ์ของไมโอโกลบินกับสภาพแวดล้อม

เมื่อพิจารณาลักษณะความชอบด้านกลิ่นรส พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนด้านกลิ่นรสอยู่ในช่วง 6.13 ถึง 6.42 ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นรสอยู่ในระดับความชอบเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ทรีตเม้นต์ที่ได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสจากผู้ทดสอบชิมสูงกว่าทรีตเม้นต์อื่นคือทรีตเม้นต์ PP104 (แหนมที่เติม *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 เซลล์ต่อกรัม) Toldrá และคณะ (2001) กล่าวว่าคุณลักษณะด้านกลิ่นรส (flavour) ของไส้กรอกหมักส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการสลายโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตโดยการกระทำของจุลินทรีย์และเอนไซม์ในเนื้อ แต่อาจมีสาเหตุมาจากสารอื่นที่เติมลงในเนื้อด้วย ตัวอย่างเช่นเกลือและเครื่องเทศต่างๆ ที่เติมลงไปซึ่งมีความสำคัญต่อกลิ่นรสนอกจากนี้อาจมาจากการเกิดปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่น ออโทออกซิเดชัน (autoxidation) ซึ่งทำให้

เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสโดยไม่มีเอนไซม์เข้าร่วมในปฏิกิริยาด้วย และเมื่อพิจารณาความชอบทางด้านความเปรี้ยวและความเค็มของแหนม ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวและความเค็มในระดับความชอบเล็กน้อยคือคะแนน 6.29 ถึง 6.52 และ 6.03 ถึง 6.23 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างกันของความเปรี้ยวและความเค็มระหว่างแหนมแต่ละทรีตเม้นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แม้ว่าทรีตเม้นต์ชุดควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) จะได้รับคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวและความเค็มสูงกว่าทรีตเม้นต์อื่น

สำหรับลักษณะเนื้อสัมผัสพบว่า ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบด้านลักษณะเนื้อสัมผัสอยู่ในช่วง 5.62 ถึง 5.87 โดยในทรีตเม้นต์ที่ได้รับคะแนนความชอบด้านลักษณะเนื้อสัมผัสมากที่สุดคือชุดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ลักษณะเนื้อสัมผัสของแหนมก่อนทำการหมักจะมีลักษณะยุ่ยไม่เป็นเนื้อเดียวกันหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วแหนมที่ได้มีลักษณะแน่นและเกาะกันเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น เมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสแล้วมีความนุ่มไม่กระด้างจนเกินไป การที่ผลการทดลองได้ผลเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติมลงไปในแหนมตัวอย่างเกิดการสร้างกรดทำให้ค่าพีเอชลดลงเมื่อค่าพีเอช ลดลงจนถึงจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectrical point) ทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลงช่วยเพิ่มความเหนียว (consistency) ให้กับแหนมและเร่งให้ผลิต ภัณฑ์ปลดปล่อยน้ำออกมา เพราะฉะนั้นกระบวนการสร้างกรดจึงมีความจำเป็นต่อการทำให้แหนมสามารถหั่นเป็นชิ้น ๆ ได้ และเกลือที่เติมลงไปยังช่วยให้แหนมมีลักษณะที่แน่นเกาะกันได้อย่างเหมาะสมในระหว่างที่โปรตีนละลายออกมาซึ่งทำให้เนื้อรวมตัวกันได้ดี (Toldrá และคณะ, 2001)

ตารางที่ 4.8 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส[a] ±SD					
	สี	กลิ่นรส	ความเปรี้ยว	ความเค็ม	ลักษณะเนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
PP0[b]	6.68±1.43A[f]	6.32±1.56A	6.52±1.51A	6.23±1.57A	5.87±1.83A	6.82±1.45B
PP104[c]	6.90±1.36A	6.18±1.47A	6.31±1.48A	6.11±1.42A	5.62±1.88A	6.51±1.52AB
PP106[d]	6.87±1.34A	6.42±1.60A	6.51±1.66A	6.22±1.52A	5.82±1.69A	6.43±1.64AB
PP108[e]	6.54±1.36A	6.13±1.60A	6.29±1.60A	6.03±1.62A	5.70±1.76A	6.29±1.83A

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b]PP0 คือ ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อ

[c]PP102 คือ ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^2 เซลล์ต่อกรัม

[d]PP104 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^4 เซลล์ต่อกรัม

[e]PP106 คือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 10^6 เซลล์ต่อกรัม

[f] คือ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คะแนนความชอบรวมที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของแหนมแต่ละทรีตเม้นต์ให้ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.29 ถึง 6.82 โดยทรีตเม้นต์ที่ให้ผลคะแนนความชอบรวมสูงสุด คือ ชุดควบคุมและพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การประเมินความชอบรวมนี้ขึ้นอยู่กับความชอบส่วนบุคคลซึ่งแตกต่างกันไป ซึ่งผู้ทดสอบอาจชอบระดับความเปรี้ยวน้อยมากต่างกัน ผลคะแนนความชอบรวมนี้เป็นผลประเมินคะแนนความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ซึ่งผู้ทดสอบส่วนมากให้คะแนน ชุดควบคุมมากสุด

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ของ *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17 และ *Pediococcus pentosaceus* P0805 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไม่สร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ไลเปส สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำ โดย *Enterococcus feacalis* 4IS17 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด (0.92 U/ml) และมีเพียง *P. pentosaceus* P0805 ชนิดเดียว ที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมัก พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญและการหมักได้ดีกว่าที่ 35 องศาเซลเซียส โดยสังเกตจากระยะเวลาในการเจริญ และการลดลงของพีเอช เมื่อพิจารณาเฉพาะการหมัก *E. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus* P0805 ใช้เวลาในการทำให้พีเอชน้อยกว่า 4.5 ภายใน 1 วัน หลังทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0 ถึง 2 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 0 และสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0 ถึง 1 สารสกัดกระเทียมร้อยละ 2 ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ พบว่า *P. pentosaceus* P0805 มีคุณสมบัติเหมาะสมกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด จึงได้คัดเลือกเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 มาเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม

ในการตรวจจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด พบว่าทรีตเม้นต์ที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม และทรีตเม้นต์ที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม มีจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าตัวอย่างชุดควบคุม ($P<0.05$) และแบคทีเรียกรดแลคติกจะเพิ่มจำนวนสูงสุดเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2 โคโลนีต่อกรัม จะมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุดคือ มีจำนวนเพิ่มขึ้น 0.98 log unit (9.55 โคโลนีต่อกรัม)

จากการสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด พบว่าหลังทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม และทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม มีการลดลงของพีเอชอย่างรวดเร็ว (4.61-4.62) และจะมีค่าพีเอชลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 4.44 หลังทำการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม ขณะเดียวกันยังเป็นทรีตเม้นต์เม้นที่มีการเพิ่มของปริมาณกรดมากที่สุด โดยในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณกรดถึงร้อยละ 1.12

ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS พบว่า ตัวอย่างที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 จะมีค่า TBARS เพิ่มขึ้นในช่วง 0.88 ถึง 2.44 มิลลิกรัมของมาลโลนาลดีไฮด์

ต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม (mg MAD/kg) ซึ่งมากกว่าในชุดควบคุม หลังสิ้นสุดการหมักพบว่าทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2 โคโลนีต่อกรัม มีค่า TBARS มากที่สุดคือ 2.81 mg MAD/kg แม้จะไม่พบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละทรีตเม้นต์ ($P>0.05$)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่สูญเสียไป ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมามีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำอิสระ (a_w) เห็นได้จากทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม มีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมาหลังการหมักมากที่สุดคือร้อยละ 5.50 น้ำหนักที่หายไปถึงร้อยละ 3.13 และส่งผลให้ a_w ที่วัดได้ลดลงมากกว่าทรีตเม้นต์อื่น โดยค่า a_w ลดลงมาที่ 0.961 จากที่มีค่าเริ่มต้น 0.971

การเปลี่ยนแปลงค่าสีของแหนมระหว่างการเก็บรักษา มีค่าความสว่าง (L*) ค่าสีเหลือง (b*) เพิ่มขึ้น และค่าสีแดง (a*) ลดลง โดยเฉพาะทรีตเม้นต์ที่มีการเติม *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าสีมากที่สุดคือมีค่า L* เพิ่มขึ้นถึง 13.16 เช่นเดียวกับค่า b* ที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 3.92 และมีการลดลงของค่า a* ถึง 1.49

จากผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ พบว่าแหนมทุกทรีตเม้นต์มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.4×10^7-1.1×10^9 โคโลนีต่อกรัม และมีปริมาณของ Enterobacteria ใกล้เคียงกัน โดยทรีตเม้นต์ที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Enterobacteria มากที่สุดคือ 1.1×10^9 และ 3.6×10^4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ขณะที่ไม่พบยีสต์เชื้อรา *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella*

เมื่อนำตัวอย่างแหนมทุกทรีตเม้นต์มาทำการวิเคราะห์คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบทางด้านสีในทรีตเม้นต์ที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^2โคโลนีต่อกรัม และความชอบทางด้านกลิ่นรสในทรีตเม้นต์ที่เติม *P. pentosaceus* P0805 ปริมาณ 10^4 โคโลนีต่อกรัม มากกว่าทรีตเม้นต์อื่น โดยมีคะแนนในด้านสีและกลิ่นรสอยู่ที่ 6.90 และ 6.42 ตามลำดับ แม้ว่าแหนมชุดควบคุมจะได้คะแนนความชอบสูงสุดในด้านความเปรี้ยว ความเค็ม ลักษณะเนื้อสัมผัสและความชอบรวม ทั้งนี้ผลการประเมินขึ้นอยู่กับความชอบส่วนบุคคลซึ่งแตกต่างกันไป

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการหมักโดยใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในสภาวะที่มีการเติมเกลือและกระเทียมจะช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้เกิดการหมักได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก และส่วนประกอบของเครื่องเทศเช่น เกลือ กระเทียม เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ทั้งทางด้านจุลินทรีย์ เคมีและประสาทสัมผัส *Pediococcus pentosaceus* P0805 จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเพื่อให้เกิดการหมักอย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: หจก.พับบลิชชิ่ง.

พัชรี ตรีบวรกุศล และสุนิสา กิตติศรีโสภิต. 2005. การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเหล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2538. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นนทบุรี: โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซท.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ. 2541. ผลการยับยั้งซัลโมเนลลาของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว. วารสารมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วทท. 20(4). หน้า 429-436.

Adam, M. R., & Moss, M. O. (1995). *Food microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

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

Andrews, W. H. & Jacobson, A. (2007). *Salmonella.* In: Bacteriological Analylical Manual Online. U.S. Food and Drug Administration, Center for food safety and Applied Nutrition, http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html

AOAC. (2000). *Official methods of analysis* (17yh ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.

Bacus, J. N., & Brown, W. L. (1981). Use of microbial culture: Meat Products. *Food Technology, 35*(1), 74-83.

Benjakul, S., Seymour, T. A., Morissey, M. T., & An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science, 62*, 729-733.

Bennett, R. W., & Lancette, G. A. (2001). *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analylical Manual Online. U.S. Food and Drug Administration, Center for food safety and Applied Nutrition, http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html

Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., & Sapzov, Z. N. (2002). Pure culture for making kefir. *Food Microbiology, 19,* 537-544.

Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., & Salzano, G. (2008). Molecular and traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science, 80,* 1238-1248.

Bruyneel, B., Vande Woestyne, M., & Verstraete, W. (1990). Manganese as a controlling factor in mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and enterobacteriaceae. *Antonie van Leewenhoek Journal of Microbiology and Serology, 57,* 119-122.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikidas, M. L. (2001). Bacteriocin:safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbology, 7,* 1-20.

Dainty, R., & Blom, H. (1995). Flavour chemistry of fermented sausages. In G. Camphell-Platt, & P. E. Cook. *Ferment meat* (pp. 177-193). Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Dasechel, M. A., & Klaenhammer, T. R. (1989). Association of a megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology, 50,* 1538-1541.

Dicks, L. M. T., Mellett, F. D., & Hoffman, L. C. (2003). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science, 66,* 703–708.

Doelle, H. W. (1969). *Bacterial metabolism.* London: Academic Press.

Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science, 69,* 307–317.

Essid, I., Medini, M., & Hassouna, M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science, 81,* 203-208.

Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A. (2002). Enumeration of *Escherichia coli* and the colifrom bacteria. In: Bacteriological Analylical Manual Online. U.S. Food and Drug Administration, Center for food safety and Applied Nutrition, www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html.

Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G., Pesce de Ruiz Holgado, A., & Oliver, G. (1986). Composition of the recovery medium and its influence on the survival of freeze-dried lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft, 41,* 286-288.

Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollan, G., & Valdez, G. F. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control, 20*, 144-148.

Guzel-seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Bodin, A. B. (2000). Determination of organic acid and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis, 13*, 35-43.

Henlander, I. M., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. -M. (1997). Polential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology, 8*, 146-150.

Hardman, M.J., & Pritchard, G.G. (1987). Kinetics of activation of L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis* by fructose 1,6-biphosphate and by metal ions. *Biochemica et Biophysica Acta, 912*, 185-190.

He, N., Li, Q., Sun, D., & Ling, X. (2008). Isolation, purification and characterization of superoxide dismutase from garlic. *Biochemical Engineering Journal, 38*, 33–38.

Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*. Iowa: Blackwell Publishing.

Hu, Y., Xia, W., & Ge, C. (2008). Characterization of fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter culture. *LWT, 41*, 730-738.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoel, 49*, 209-224.

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

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., & Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research, 164*, 81-91.

Kröckel, L. (1995). Bacterial fermentation of meat. In G. C.-Patt, & P. E. Cook, *Ferment meat* (pp.69-109). Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Lee, C. H. (1997). Lactic acid fermented foods and their benefit in Asia. *Food Control, 5*, 259-269.

Li, X.J., Yan, L.J., & Zhao, B.L.(1991). Effects of oxygen radicals on the conformation of sulfhydryl groups on human polymer pronuclear leukocyte membrane, *Cell Biology International Representation. 12*, 667–675.

Lücke, F.-K. (1986). Fermented sausages. In B. J. B., Wood, *Microbiology of fermented foods* (Vol. 2) (pp. 41-83), London, New York: Elsevier Applied Science.

Luxananil, P., Promchai, R., Wanasen, S., Kamdee, S., Thepkasikul, P., Plengvidhya, V., Visessaguan, W., & Valyasevi, R. (2009). Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of nham, a traditional Thai pork sausage. *International Journal of Food Microbiology, 129*, 312-315.

Manca de Nadra, M. C., Sandino de Lamelas, D., & Strasser de Saad, A. M. (2009). Pediocin N5p from *Pediococcus pentosaceus*: adsorption on bacterial strains. *International Journal of Food Microbiology, 39*, 79–85.

Maturin, L. J., Peeler, J. T. (2001). Aerobic plate count, In: Bacteriological Analylical Manual Online, www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html.

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

Montel, M. C., Masson, F., & Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science, 49*, 111-123.

Muriana, P. M., & Luchansky, J. B. (1993). Biochemical methods for purification of bacteriocin. In D. G. Hoover, & L. R. Steenson, *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. San diego: Academic Press.

Raccach, M., & Marshall, P.S. (1985). Effect of manganese ions on the fermentative activity of frozen-thawed *Lactobacilli*. *Journal of Food Science, 50*, 665-669.

Ranken, D. M. (1994). Rancidity in meats. In J. C. Allen, & R. J. Hamiton, *Rancidity in foods* (Vol. 3) (pp. 190-202). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Riebroy, S., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2008). Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starter. *LWT, 41*, 569-580.

Smith, J. L., & Palumbo, S. A. (1981). Microorganism as food additives. *Journal of Food Protection, 44*, 936-937.

Steinkrus, K. (1995). Handbook of indogenous fermented foods. (2^{ed}). USA: Marcel Dekker, Inc.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nayamaha, J., & Sonomoto, K. (2003). *Brazillian Congress of Meat Science and Technology, 49*, 322-324.

Tanasupawat, S., Okada, S., & Komagata, K. (1998). Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *Meat Science, 16*, 289-296.

Thapa, N., Pal, J., & Tamang, J. P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolate from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology, 107*, 33-38.

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

Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A., Bandler, R. (2001). Yeast, Mould and mycotoxins. In: Bacteriological Analylical Manual Online. U.S. Food and Drug Administration, Center for food safety and Applied Nutrition, www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-18.html.

Vandevoorde, L., Woestyne, M. V., Bruyneel, B., Christiaenes, H., & Verstraete, W. (1992). Critical factors governing the competitive behaviour of lactic acid bacteria in mixed cultures. In B.J. B. Wood, *The lactic acid bacteria.* (Vol. 1) (pp. 447-475). London: Elsevier Science Publishers Ltd.

Vernam, A. H., & Sutherland, J. P. (1995). *Meat and meat products: technology, chemistry, and microbiology*. New York: Chapman & Hall.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., & Thepkasikul, P. (2004). Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to nham characteristics. *Meat Science, 66*, 579-588.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P., & Panya, A. (2006). Changed in microbiological, biochemical and physicochemical properties of nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. *LWT, 39*, 814-826.

Vuyst, L. D., & Vandamme, E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. New York: Blackie Academic & Professional.

Wood, B., J. B., & Holzapfel, W. H. (1997). *The Lactic Bacteria: the genera of lactic acid bacteria.* New York: Blackie Academic & Professional.

Woolford, M.K., & Wilkins, R.J. (1974). Preliminary experiments with simulated silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 26*, 141-148.

Zaika, L.L., & Kissinger, J.C. (1984). Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *Journal of Food Science, 49*, 5-9.

Zweier, J. L., Rayburn, B. K., & Flaherty, J. T. (1986). The effects of superoxide dismutase on free radical concentration in post are chemic myocardium. *Circulation, 74*, 371–380.

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมสารเคมี

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Baird-Parker (BPA) agar

ส่วนประกอบ

อาหารพื้นฐาน (Basal medium)

Tryptone	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Peptone	7	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithium Chloride.6 H_2O	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Egg Yolk tellurite enrichment

ล้างไข่สดให้สะอาด แช่ไข่ทั้งเปลือกในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 10 นาที นำไข่ไปวางไว้บนจานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นทำให้แตกด้วยเทคนิกปราศจากเชื้อ แยกไข่แดงออกจากไข่ขาว เอาไข่แดงออกด้วย syringe ปราศจากเชื้อ หรือปิเปตปากกว้างใส่ลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ (เพื่อวัดปริมาตรของไข่แดง) ผสมไข่แดงกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ลงไปในอัตราส่วน 3:7 โดยปริมาตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช่ส่วนผสมนี้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเทลลูไรส์ (potassium tellurite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องกรองจุลินทรีย์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งใช้

วิธีเตรียม Baird-Parker (BPA) agar ที่มี Egg Yolk tellurite enrichment

ชั่งส่วนผสมทุกชนิดตามสูตร ผสมให้เข้ากันดี ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้ายเท่ากับ7.0±0.2 ถ้าอาหารแข็งแล้ว แต่ยังไม่ใช้ทันที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน หลอมเหลวก่อนใช้ ถ้าต้องการใช้ทันทีทำให้อาหารเย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 48-50 องศาเซลเซียส เติม Egg Yolk tellurite enrichment ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Baird-

Parker agar ที่ยังหลอมเหลงอยู่ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน อย่าให้เกิดฟองอากาศ เท อาหาร 15-18 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งก่อนใช้

Brain Heart Infusion Broth

ส่วนประกอบ

Medium 1

Calf brain infusion	200	กรัม
Beef huart infusion	250	กรัม
Proteose peptone หรือ Polypeptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Medium 1

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนละลาย แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7.4±0.2

Medium 2

Brain huart infusion	6	กรัม
Peptic digest of animal tissue	6	กรัม
NaCl	5	กรัม
Dextrose	3	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	14.5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Medium 2

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนโดยต้ม 1 นาทีเพื่อให้ละลายอย่างสมบูรณ์ แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 7.4±0.2

ในการเตรียม Brain Heart Infusion Agar ให้เติมวุ้น 15 กรัม ลงใน Brain Heart Infusion Broth ปริมาตร 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ถ้าใช้สำหรับเพาะเลี้ยง *Vibrio* ที่ชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือเท่ากับร้อยละ 2-3

de Man Rogosa and Sharpe medium (MRS agar)

ส่วนประกอบ

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Triammonium Citrate	2	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	200	มิลลิกรัม
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	50	มิลลิกรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม de Man Rogosa and Sharpe medium (MRS agar)

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนพร้อมคนจนวุ้นละลายและปรับพีเอชเป็น 6.2-6.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Lactose Broth

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Lactose	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Lactose Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดเข้าด้วยกัน แบ่งอาหาร 225 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 225 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 6.9±0.2

Lysine Indole Motility (LIM) Medium

ส่วนประกอบ

Peptone	10	กรัม	Yeast extract	0.5	กรัม
Pancreatic digest of casein	10	กรัม	Dextrose	1	กรัม
Ferric Amonium Citrate	0.5	กรัม	วุ้น	2	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
L-lysine HCL	10	กรัม			

วิธีเตรียม Lysine Indole Motility (LIM) Medium

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 6.6±0.2

Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV)

ส่วนประกอบ

Trytose	4.59	กรัม
Cosein hydrolysate (acid)	4.59	กรัม
Sodium chloride	7.34	กรัม
Monopotassium dihydrogen phosphate	1.47	กรัม
Magnesium chloride (anhydrous)	10.93	กรัม
Malachilte green oxalate	0.037	กรัม
วุ้น	2.7	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดลงในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คนจนส่วนผสมละลาย พีเอชสุดท้าย 5.2±0.2

Nham Model Broth (NMB)

ส่วนประกอบ

Meet extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium tripolyphosphate	3	กรัม
Glucose	10	กรัม

Sodium nitrite	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Nham Model Broth (NMB)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น คนให้ส่วนผสมละลายจนหมด และปรับพีเอช 6.8±0.2 บรรจุลงฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 110 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Plate count agar (PCA)

ส่วนประกอบ

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Plate count agar (PCA)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย บรรจุใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.0±0.2

Potato Dextrose Agar

ส่วนประกอบ

Potato infusion	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Potato Dextrose Agar

เตรียม Potato infusion โดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัมใส่ภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้ม 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้คือ Potato infusion เติมวุ้น และ dextrose ลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 5.6±0.2

Potato Dextrose Agar, Acidified

วิธีเตรียม Acidified Potato Dextrose Agar

เตรียมอาหาร PDA นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ เพื่อให้กรดผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่างให้เกิดฟองอากาศ จะทำให้ค่าพีเอชของ PDA ลดลงถึง 3.5

Rappaport-Vassiliadia (RV) Broth

อาหารเหลวพื้นฐาน

Tryptone	5	กรัม
NaCl	8	กรัม
K_2HPO_4	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

สารละลาย Magnesium chloride

$MgCl_2.6H_2O$	400	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง $MgCl_2.6H_2O$ จากขวดที่เพิ่งเปิดใหม่เพราะ $MgCl_2.6H_2O$ ดูดความชื้อได้ดีมาก ละลายในน้ำกลั่นแล้วเก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 1 ปี

สารละลาย Malachite green oxalate

Malachite green oxalate	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ควรใช้ malachite green oxalate ของบริษัท Merck เพราะถ้าใช้ของบริษัทอื่นอาจมีประสิทธิภาพไม่เท่ากัน เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

วิธีเตรียม Rappaport-Vassiliadia (RV) Broth

ผสมอาหารเหลวพื้นฐาน 1,000 มิลลิลิตร สารละลาย magnesium chloride 100 มิลลิลิตร และสารละลาย malachite green oxalate 10 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,110 มิลลิลิตร (ควรเตรียมอาหารเหลวพื้นฐานในวันที่จะผสมสารละลายทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน) ปิเปตอาหาร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่

อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.5±0.2 เก็บไว้ในตู้เย็น ใช้ภายใน 1 เดือน

Skim milk agar

ส่วนประกอบ

อาหาร MRS	55	กรัม
Skim milk	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม

วิธีเตรียม Skim milk agar

ผสมอาหาร MRS และวุ้นลงในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร ให้ความร้อนพร้อมคนจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผสม Skim milk ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร บรรจุลงขวดแก้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทส่วนผสมของ Skim milk ลงในอาหาร MRS ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซียส ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ: ระวังอย่าให้เกิดฟอง

Starch Agar

ส่วนประกอบ

Soluble starch	10	กรัม
Beef extract	3	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Starch Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ปรับพีเอช 7.5±0.2 ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย บรรจุใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tetrathionate Broth (TT)

ส่วนประกอบ

Polypeptone	5	กรัม
Bile salts	1	กรัม
Calcium carbonate	10	กรัม

Sodium thiosulfate.$5H_2O$	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tetrathionate Broth (TT)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนเดือด อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (สิ่งที่ตกตะกอนจะไม่ละลายอย่างสมบูรณ์) เก็บที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส พีเอชสุดท้ายเท่ากับ 8.4±0.2

Tributyrin agar

ส่วนประกอบ

อาหาร MRS (broth)	1,000	มิลลิลิตร
Thibutyrin	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม

วิธีเตรียม Tributyrin agar

เตรียมอาหาร MRS broth 1000 มิลลิลิตร เติม Thibutyrin และวุ้น นำไปต้มจนวุ้นละลาย บรรจุลงขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Triple Sugar Iron (TSI) agar

ส่วนประกอบ

Medium 1

Polypeptome	20	กรัม	$FE(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	5	กรัม	$Na_2S_2O_3$	0.2	กรัม
Lactose	10	กรัม	Phenol red	0.025	กรัม
Sucrose	10	กรัม	วุ้น	13	กรัม
Glucose	1	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

Medium 2

Beef extract	3	กรัม	$FeSO_4$	0.2	กรัม
Yeast extract	3	กรัม	NaCl	5	กรัม
Peptone	15	กรัม	$Na_2S_2O_3$	0.3	กรัม
Proteose peptone	15	กรัม	Phenol red	0.024	กรัม
Glucose	1	กรัม	วุ้น	12	กรัม
Lactose	10	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร
Sucrose	10	กรัม			

วิธีเตรียม Triple Sugar Iron (TSI) agar

อาจใช้สูตรของ Medium 1 หรือ Medium 2 ในการเตรียมก็ได้

ผสมส่วนผสมของ medium 1 ลงในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนเป็นครั้งคราว ต้ม นาน 1 นาที เพื่อละลายส่วนผสม เติมลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตรประมาณ 1/3 ของปริมาตรหลอด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.3±0.2

สำหรับ medium 2 เตรียมทำนองเดียวกับ medium 1 แต่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.4±0.2 ก่อนอาหารแข็งตัว นำหลอดมาเอียงให้มีความยาวของส่วน slant 4-5 เซนติเมตร และส่วนของ butt ยาว 2-3 เซนติเมตร

Tryptic Soy Broth (TSB)

ส่วนประกอบ

Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone	5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tryptic Soy Broth (TSB)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและคนจนวุ้นละลาย ต้ม 1 นาที แบ่งใส่ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 7.3±0.2

หมายเหตุ: ถ้าใช้กับ *Vibrio* spp. ซึ่งชอบเจริญในสภาพที่มีเกลือ ให้เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 2-3

Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA)

ส่วนประกอบ

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Glucose	10	กรัม
Bromcresol purple	0.04	กรัม
วุ้น	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Tryptone Yeast Extract Agar (TYEA)

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย ปิเปตลงหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หากยังไม่ใช้ทันที ให้เก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Violet Red Bile (VRB) agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	3	กรัม
Peptone	7	กรัม
NaCl	5	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Neutral	0.03	กรัม
Crystal violet	0.002	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม Violet Red Bile (VRB) agar

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.4±0.2 คนขณะให้ความร้อน ต้มจนเดือดนาน 2 นาที อย่านำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar

ส่วนประกอบ

L-lysine	5	กรัม	Yeast extract	3	กรัม
Xylose	3.75	กรัม	Lactose	7.5	กรัม
Ferric Amonium Citrate	0.8	กรัม	NaCl	5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม	Sucrose	7.5	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม	วุ้น	2	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม	น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนจนวุ้นละลาย ให้ความร้อนจนเดือดแล้วยกลง อย่าให้ความร้อนมากเกินไป ทิ้งให้เย็นลงจนถึง 50 องศาเซลเซียส เทลงใน

จานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง 2 ชั่วโมง เปิดฝาเล็กน้อย จากนั้นจึงปิดฝา พีเอชสุดท้าย 7.4±0.2 อย่าเก็บไว้นานเกิน 1 วัน

การเตรียมสารเคมี

สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ส่วนประกอบ

Peptone	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ชั่งเปปโตน 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร บรรจุลงขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร

ส่วนประกอบ

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.40	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.40 กรัม ผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Kovacs' Reagent

ส่วนประกอบ

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5	กรัม
Amyl alcohol (normal)	75	มิลลิลิตร
HCL (เข้มข้น)	25	กรัม

วิธีเตรียม Kovacs' Reagent

ละลาย *p*-Dimethylaminobenzaldehyde 5 กรัม ในเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก (เข้มข้น) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Malonaldehyde standard curve

ในการทำกราฟมาตรฐานเริ่มจากการเตรียมสารละลาย stock solution ของสาร TEP จนได้ระดับความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} โมลต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางต่อเพื่อให้ได้สารละลายของ TEP ที่มีความเข้มข้นของมาลโลนาลดีไฮด์ 8 ระดับคือ 1×10^{-8} ถึง 8×10^{-8} โมลของมาลโลนาลดี

ไฮด์ในสารละลาย 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานของ TEP ที่ความเข้มข้นของมาลโลนาลดีไฮด์ทั้ง 8 ระดับ ระดับละ 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมสาร TBA (thiobarbituric acid) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที และนำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร และทำการเตรียมแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรแทนสาร TEP นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรกับปริมาณสารมาลโลนาลดีไฮด์ในสารละลาย 5 มิลลิลิตร จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาค่า K ได้ (ภาคผนวก ค)

ภาคผนวก ข
การใช้เครื่องมือ

1. การวัดค่าพีเอช

วิธีการใช้เครื่องวัดพีเอช (testo 205)

1. ดึงเครื่องออกจาก storage cap อย่างระมัดระวัง (มือซ้ายจับ storage cap ไว้มือขวาค่อยๆ ดึงเครื่องมือออก ใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางประคองเครื่องไว้ ง้างปลาย storage cap เล็กน้อยเพื่อดันเครื่องขึ้นมา

2. กดปุ่ม ON (กดแล้วปล่อยทันทีเพื่อปิดเครื่อง)

3. ทำการ calribrate โดยกด Cal เครื่องจะบอกให้ calibrate ที่ pH 4 ได้(ตัวอักษร Cal ที่หน้าปัดจะกระพริบ) จุ่ม probe ลงใน buffer pH 4 (อย่าให้ probe สัมผัสกับภาชนะที่ใส่ buffer) รอจนค่านิ่งกดปุ่ม Cal อีกครั้ง(ตัวอักษร "Auto" จะกระพริบ รอเสียงสัญญาณดังติ๊ด แสดงว่าเครื่อง Calibrate เสร็จแล้ว) ล้างProbe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

4. ทำการ calibrate ที่ค่า pH 7 ต่อไปจุ่ม probe ลงใน buffer pH 7 รอจนค่านิ่ง กดปุ่ม Cal อีกครั้ง ตัวอักษร "Auto" จนกระพริบ รอเสียงสัญญาณดังติ๊ด เมื่อการ calibrate เสร็จสิ้น เครื่องจะแสดงปริมาณ gradient และ offset value ที่หน้าปัด (หน่วยมิลลิโวลต์) จากนั้นล้าง probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

5. เปลี่ยนไปสู่โหมดการวัดกดปุ่ม Cal อีกครั้ง (ตัวอักษร "Auto Hold" จะกระพริบ) จึงทำกาวัดค่า pH ของตัวอย่างได้

6. จุ่ม probe ลงในตัวอย่างรอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อวัดเสร็จแล้วก่อนจะวัดตัวอย่างต่อไป ล้าง probe ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่

7. เมื่อจะวัด pH ของตัวอย่างถัดไป ให้จุ่ม probe ลงในตัวอย่างแล้วกดปุ่ม ON HOLD อีกครั้งเพื่อให้เครื่องทำการวัด pH ของตัวอย่าง รอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้

8. เมื่อเลิกใช้เครื่องมือให้ปิดเครื่องโดยกดปุ่ม ON HOLD ค้างไว้สัก 25 ถึง 3 นาที จนตัวเลขที่หน้าปัดจะหายไป

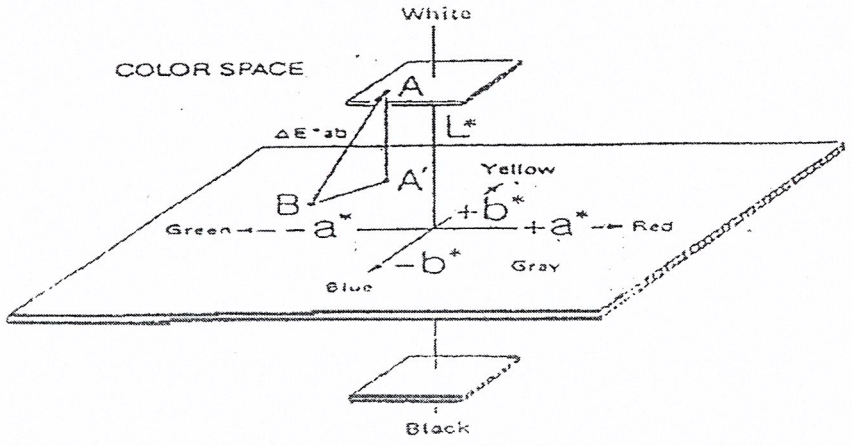
9. ทำความสะอาด probe โดยล้างด้วยน้ำสบู่เจือจาง ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส (ห้ามใช้น้ำยาทำความสะอาดแรงเกินไป) ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดเครื่องให้สะอาดด้วยผ้าที่สะอาดหรือกระดาษทิชชู่ชุบน้ำพอหมาดๆ ห้ามถู

10. เสียบหัว probe ลงใน storage cap ที่มี electrolyte gel (สีส้ม) อยู่ โดยเสียบเครื่องเข้าทางขวาของ storage cap

หมายเหตุ : หัว probe ต้องจุ่มใน electrolyte gel ขณะปิดเครื่องต้องรักษาให้ electrolyte gel ให้สะอาดอยู่เสมอ ถ้า probe อยู่นอก electrolyte gel เป็นเวลานาน จะต้องจุ่มหัว probe ลงใน electrolyte gel เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อ regenerate

2. การวัดสี

เครื่องวัดสีของมินอลต้ารุ่น CR-300 แสดงความแตกต่างสี 5 ระบบ สำหรับการวัดสมบูรณ์โครมาติคซิตี้ (charomaticity absolute) [CIE Yxy, L* a* b* และ L* C* H*] และความแตกต่างความหนาแน่น (colouimetric) [▲(Dx Dy Dz) ความแตกต่างค่าสัมบูรณ์▲ E*ab ก็จะถูกแสดงด้วยเมื่อความแตกต่างสีถูกวัดในรูป L* a* b* หรือ L* C* H* ของระบบสี



A = สีที่กำหนด

B = สีของตัวอย่าง

A' = ระดับความเบาที่เท่ากันของสีที่กำหนดให้

ภาพที่ ข.1 ระบบทางสี L* a* b* และพิกัดสี ▲E*ab

ที่มา: คู่มือเครื่องวัดสีของมินอลต้ารุ่น CR-300

ระยะทางเท่ากันในแผนภาพ CIE x, y charomaticity ไม่ได้แสดงความแตกต่างของสีที่เท่าเทียมกัน ดังเช่นที่เห็น อย่างไรก็ตาม ระบบสี CIE L* a* b* แสดงความรู้สึกต่อสีของคนได้ใกล้เคียงกว่า ดังแสดงในภาพ ระยะทางที่เท่ากันในระบบนี้ ใกล้เคียงกับความแตกต่างที่ได้รับคือ L* องค์ประกอบของไลท์เนส (lightness factor) a* และ b* คือพิกัดโครมาติคซิตี้ ข้อกำหนด L* a* b* ของสีที่ต้องการอยู่ในช่วงที่ไม่อนุญาต ไม่สามารถวัดได้ L* >107.26, a* หรือ b* >1999.99, L*< 0.09 ในระบบสี L* a* b* โดยการวัดค่า L* แสดงถึงความสว่างของสี a* (มีค่าบวก) แสดงว่าวัตถุมีสีแดง (มีค่าลบ) แสดงว่าวัตถุมีสีเขียว b* (มีค่าบวก) แสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง (มีค่าลบ) แสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน

การวัดค่าสี L* a* b* โดยเครื่องวัดสีของมินอลต้า รุ่น CR-300

วิธีการตั้งค่า

1. เปิดสวิทซ์ POWER
2. กด INDEX SET แสดงเมนูของฟังก์ชัน ใช้ Y/N เพื่อเปลี่ยนการตั้งค่า
   - เลือก " Print" กด Y เป็นการพิมพ์อัตโนมัติหลังจากการวัดแต่ละครั้ง
   - เลือก " Color Space" กด N เมื่อใช้ colour space เดิม
3. กด croll key (↻)
   - เลือก " Data Protect" กด Y เป็นการไม่เก็บค่าที่วัดได้หลังจากมีการวัด 300 ครั้ง
   - เลือก " Milti Measyre" กด Y เป็นการวัด 3 ครั้งแล้วนำค่ามาเฉลี่ย
   - เลือก " Auto select" กด Y เพื่อให้ตัวประมวลผลข้อมูลจะเลือกช่วงปรับแต่งให้ใกล้เคียงกับวัตถุที่จะวัดเพื่ออ้างอิง
   - เลือก" Light Source" CIE illuminate C กดคีย์เคอร์เซอร์เลื่อน (⟵ / ⟶)
4. เมื่อตั้งค่าได้ตามต้องการแล้วกด ENTER

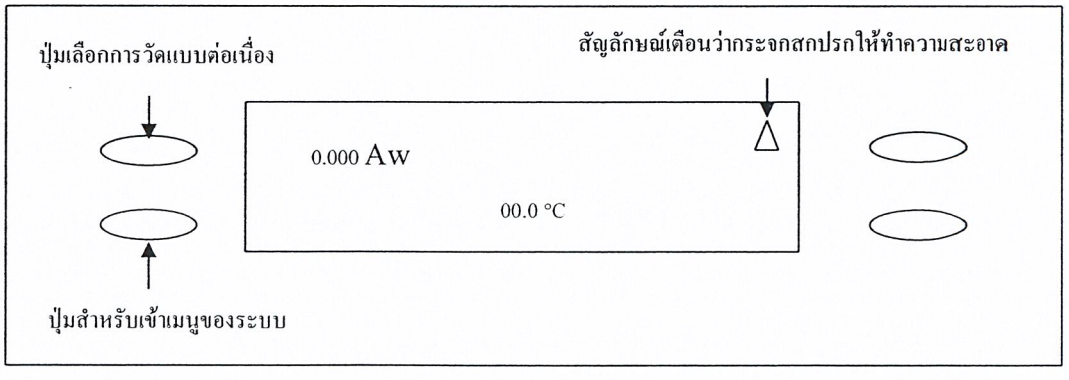
วิธีการ Calibrate เครื่องวัดสีของมินอลต้า รุ่น CR-300

1. เปิดสวิทซ์ POWER
2. กดปุ่ม calibrate หน้าจอแสดงข้อมูล Yxz ที่ได้กำหนดไว้ครั้งล่าสุด ถ้าไม่มีการปรับก่อนหน้านี้ก็จะไม่มีข้อมูลแสดง
3. ใช้ปุ่มเลื่อนเคอร์เซอร์ (⟵ / ⟶) และตัวเลขในการกำหนดค่าการปรับในฟังก์ชัน "ch00"
4. ถ้ายังไม่ได้กำหนดค่าช่วงสี Yxz ให้กดปุ่ม color space select ซ้ำจนกระทั่งปรากฏช่วงสี Yxz
5. กำหนดข้อมูลการปรับ ตามที่ได้แสดงในฝาครอบด้านในแผ่น white calibrate plate โดยปรับตำแหน่งให้ตรงกับค่าที่จะใส่ โดยเลื่อนไปที่ระบบสี L* a* b*
6. เมื่อค่า L* a* b* ตรงกับแหล่งกำเนิดแสง นำหัววัดวางบนพื้นที่ผิวสีขาวมาตรฐานแผ่น (white calibrate plate)
7. กดปุ่ม measure บนเครื่องประมวลผลข้อมูล หลังจากที่มีไฟ READY บนหัววัดปรากฏขึ้นและทำการวัด 3 ครั้ง ติดกันเพื่อนความถูกต้องของข้อมูล(ต้องแน่ใจว่าไม่ได้เคลื่อนหัววัดในขณะที่ทำการวัด)
8. จากนั้นประมาณ 5 วินาที อักษร "CAL" ก็จะถูกรบกวนด้วย "END" กับภาพขวามือเป็นการเสร็จการ Calibrate เรียบร้อยแล้ว
9. ปิด POWER เมื่อหน้าจออยู่ในโหมดการวัดเท่านั้นถ้าไม่อยู่ให้กด BREAK จนอยู่ในโหมดการวัด

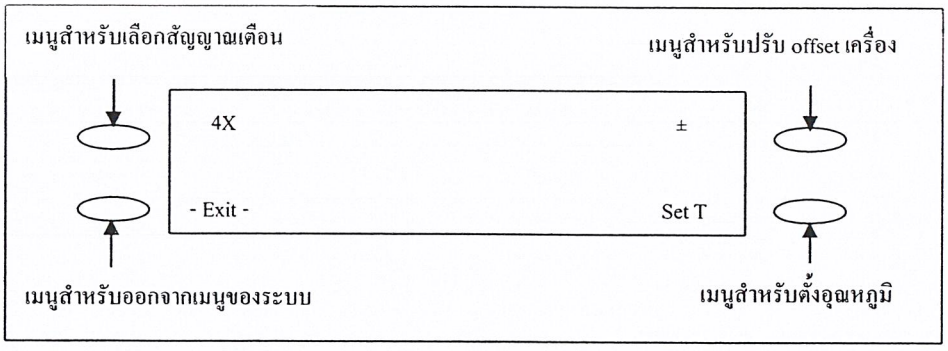
3. การวัด a_w

วิธีการใช้เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water Activity : a_w Serie3TE)

1. การเปิดเครื่อง
   - เสียบปลั๊ก และกดปุ่มสวิทซ์เปิดซึ่งอยู่ด้านหลังเครื่อง (แนะนำให้ใช้ปลั๊กที่มีการต่อสายดิน)
   - เพื่อให้ผลการวัดมีประสิทธิภาพสูงสุดควรทำการวอร์มเครื่องไว้เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
2. การเตรียมตัวอย่าง
   - ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ไม่ควรเกินครึ่งหนึ่งของภาชนะบรรจุ (ปริมาตรประมาณ 7 มิลลิลิตร) ห้ามเติมตัวอย่างจนเต็มหรือล้นภาชนะบรรจุ
   - ปริมาณตัวอย่างที่ใช้น้อยที่สุด ควรให้ครอบคลุมพื้นที่ของก้นภาชนะบรรจุ (ปริมาณเท่ากับฝาภาชนะบรรจุ)
   - ตรวจสอบให้แน่ชัดว่าที่ขอบริมและด้านนอกของภาชนะบรรจุสะอาด
   - ตรวจสอบให้แน่ชัดว่าตัวอย่างที่เตรียมไว้มีอุณหภูมิสูงเกินกว่า 4 องศาเซลเซียส กับอุณหภูมิของ chamber
3. การวัดค่า a_w ของตัวอย่าง
   - ใส่ภาชนะบรรจุลงไปในลิ้นชักใส่ตัวอย่าง ปิดลิ้นชักด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตัวอย่างหก
   - หมุนปุ่มของลิ้นชักจากตำแหน่ง OPEN/LOAD ไปยังตำแหน่ง READ เครื่องจะเริ่มทำการวัดค่า a_w
   - เมื่อเครื่องเริ่มทำการวัดค่า a_w จะมีสัญญาณเตือน 1 ครั้ง
   - เครื่องจะแสดงผลของค่า a_w ที่อ่านได้ครั้งแรก เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 40 วินาที
   - เมื่อเครื่องทำการวัดค่า a_w เสร็จเรียบร้อย จะมีสัญญาณเตือน (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการตั้งโปรแกรมสัญญาณเตือน)
   - ที่หน้าจอ LCD ของเครื่องจะแสดงค่า a_w ที่อ่านได้ค่าสุดท้าย พร้อมอุณหภูมิของตัวอย่าง
4. การเลือกใช้เมนูของเครื่อง Aqulab รุ่น Series 3TE



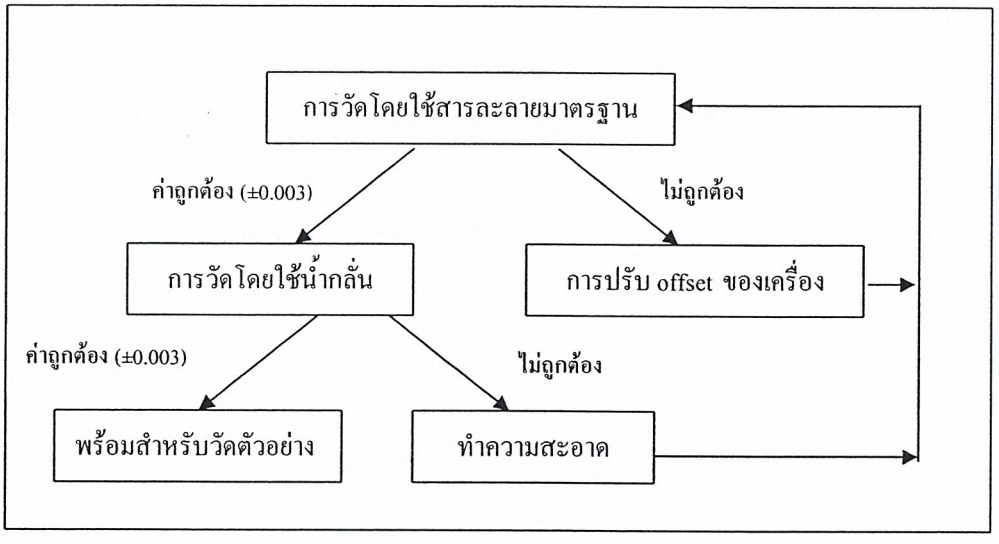
เมนูของระบบ



ปุ่มต่างๆจะทำงานได้เมื่อปุ่มของลิ้นชักอยู่ในตำแหน่ง OPEN/LOAD เท่านั้น

5. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่อง

- ควรตรวจสอบประสิทธิภาพ และความสะอาดของเครื่องทุกวัน (ทุกครั้งที่มีการใช้)
- ใช้สารละลายมาตรฐานและน้ำกลั่นในการปรับเครื่อง



6. ข้อควรระวัง

- ควรป้องกันไม่ให้เครื่องเกิดการปนเปื้อนและถูกทำลาย ห้ามเติมตัวอย่างจนเต็มหรือล้นออกนอกภาชนะบรรจุ
- ห้ามยกหรือเคลื่อนย้ายเครื่อง ในขณะที่มีตัวอย่างอยู่ในลิ้นชักของเครื่อง
- ควรปิดปุ่มพาวเวอร์ และถอดปลั๊กของเครื่องก่อนการเคลื่อนย้ายเครื่อง

7. ข้อความที่แสดงความผิดพลาด และปัญหาที่อาจเกิดขึ้น

- ถ้าอุณหภูมิของตัวอย่างสูงกว่าอุณหภูมิของเครื่องมากกว่า 4 องศาเซลเซียส จะมีผลให้การทำงานของเซ็นเซอร์ของเครื่องอ่านค่าคลาดเคลื่อนได้
- ถ้าตัวอย่างมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.100 จะมีผลทำให้เครื่องอ่านค่าคลาดเคลื่อนได้

ภาคผนวก ค

การคำนวณ

1. การคำนวณจำนวนโคโลนี

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

เมื่อ C = ผลรวมจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจาน

V = ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปในแต่ละจาน

n_1 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางต่ำ

n_2 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางสูง

d = ระดับความเจือจางต่ำที่นับโคโลนีได้

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

2. การคำนวณปริมาณกรดทั้งหมด (%)

จากสูตร $\%$ กรดทั้งหมด $= \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH}\times\text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้}\times MW_{\text{lactic acid}}\times 100}{1{,}000\times\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$

เมื่อ ความเข้มข้นของ NaOH = 0.100704 โมลต่อลิตร

$MW_{\text{lactic acid}}$ = มวลโมเลกุลของกรดแลคติก (เท่ากับ 90.8)

น้ำหนักตัวอย่าง = 5 กรัม

การหาความเข้มข้นของ NaOH

คำนวณหาได้จากการทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (KHP)

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของ NaOH

V_1 = ปริมาตรของ NaOH เริ่มต้น (10 มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของ KHP

V_2 = ปริมาตรของ KHP ที่ใช้ในการไทเทรต

3. การหาปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (Release water)

จากสูตร $\%\text{release water} = \frac{100\times [(A-B)-C]}{A-C}$

เมื่อ A = น้ำหนักตัวอย่าง+ถุง

B = น้ำหนักเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการซับน้ำ

C = น้ำหนักถุงเปล่า

4. การหาค่า K

1. การทำกราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

1.1 การเตรียม stock solution ของสาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) เพื่อทำกราฟมาตรฐาน สาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane มีความหนาแน่นเท่ากับ 0.919 กรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 220.31 กรัม เมื่อมีสารนี้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.1.1 ต้องการทราบมวลของสารสามารถคำนวณหาได้จากสูตร $d = \frac{m}{v}$

เมื่อ d = ความหนาแน่น m = มวล และ v = ปริมาตร

$$0.919\ \text{g/ml} = \frac{m}{100\ \text{มิลลิลิตร}}$$

ดังนั้นมวลของสาร TEP = 91.9 กรัม

1.1.2 ต้องการทราบจำนวนโมลของสาร TEP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อ 220.31 กรัม = 1 โมล

ดังนั้นจำนวนโมลของสาร TEP $= \frac{91.9\ \text{g}}{220.31} = 0.41713$ โมลต่อ 100 มิลลิลิตร

$= 4.1713$ โมล่ต่อลิตร

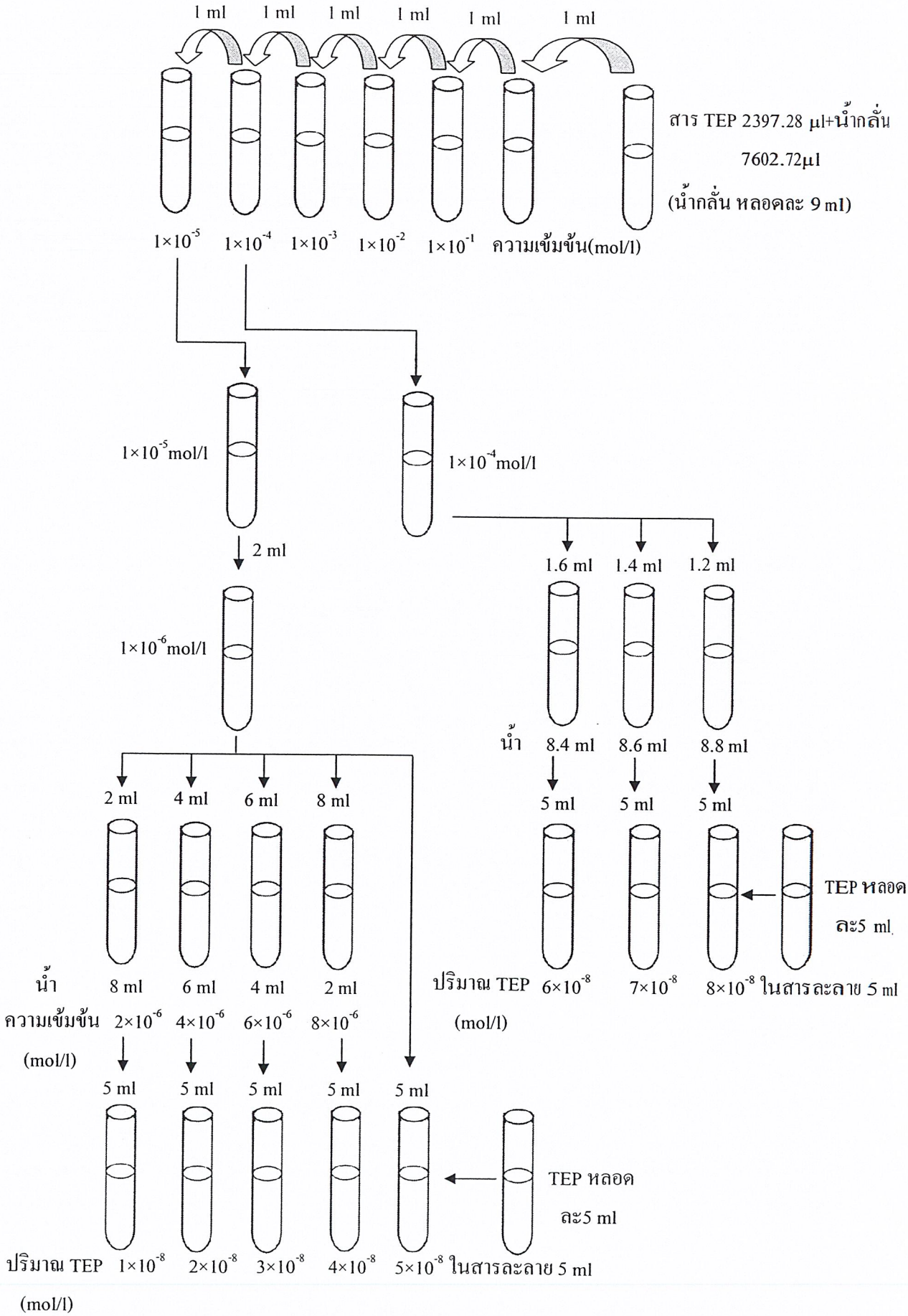
1.1.3 ถ้าต้องการเตรียมสาร TEP ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะต้องปิเปตสาร TEP บริสุทธิ์มาปริมาตรเท่าไร คำนวณได้โดยจากสูตร

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$4.1713V_1 = 1 \times 10$$

$$V_1 = 2.3972\ \text{มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นการเตรียมสาร TEP บริสุทธิ์เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร หรือ 1 โมลาร์ ปริมาตรทั้งหมด 10 มิลลิลิตรจะต้องปิเปตสาร TEP บริสุทธิ์ 2,397.28 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 7,602.72 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรสารละลาย TEP ทั้งหมด 10 มิลลิลิตรแสดงขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้

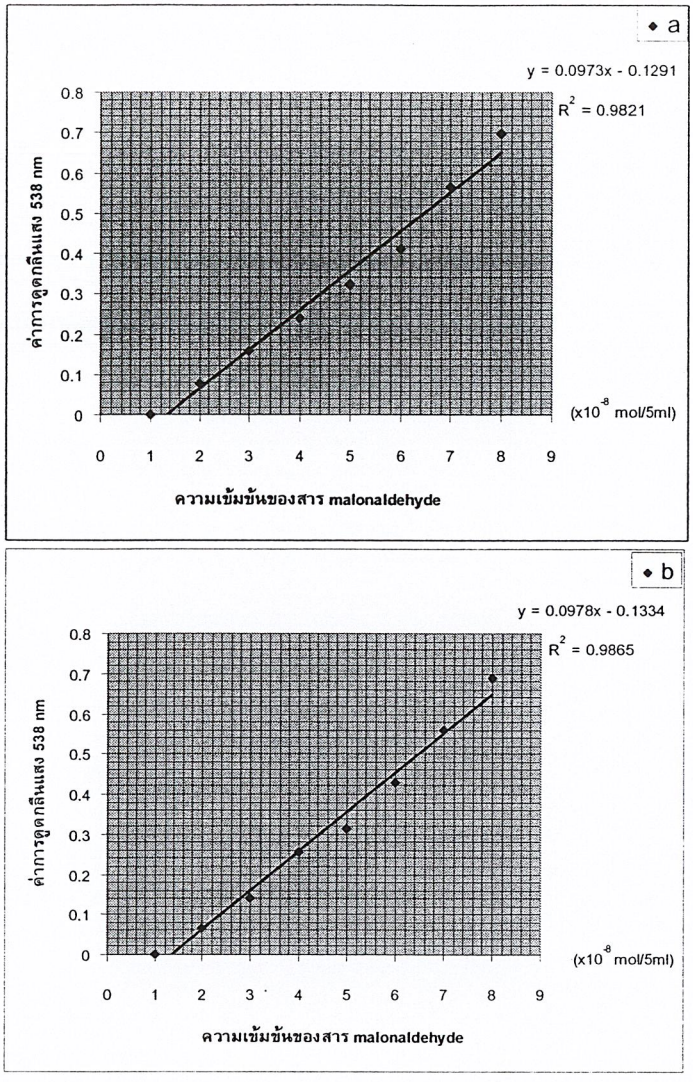

1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
1 ml
สาร TEP 2397.28 µl+น้ำกลั่น 7602.72µl
(น้ำกลั่น หลอดละ 9 ml)
1×10-5
1×10-4
1×10-3
1×10-2
1×10-1
ความเข้มข้น(mol/l)
1×10-5mol/l
1×10-4mol/l
2 ml
1.6 ml
1.4 ml
1.2 ml
1×10-6mol/l
น้ำ
8.4 ml
8.6 ml
8.8 ml
2 ml
4 ml
6 ml
8 ml
5 ml
5 ml
5 ml
TEP หลอด ละ5 ml
น้ำ
8 ml
6 ml
4 ml
2 ml
ปริมาณ TEP
6×10-8
7×10-8
8×10-8 ในสารละลาย 5 ml
ความเข้มข้น
(mol/l)
2×10-6
4×10-6
6×10-6
8×10-6
(mol/l)
5 ml
5 ml
5 ml
5 ml
5 ml
TEP หลอด ละ5 ml
ปริมาณ TEP
1×10-8
2×10-8
3×10-8
4×10-8
5×10-8 ในสารละลาย 5 ml
(mol/l)

การเตรียม Malonaldehyde standard curve

ในการทำกราฟมาตรฐานเริ่มจากการเตรียมสารละลาย stock solution ของสาร TEP จนได้ระดับความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} โมลต่อลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางต่อเพื่อให้ได้สารละลายของ TEP ที่มีความเข้มข้นของมาลโลนาลดีไฮด์ 8 ระดับคือ 1×10^{-8} ถึง 8×10^{-8} โมลของมาลโลนาลดีไฮด์ในสารละลาย 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานของ TEP ที่ความเข้มข้นของมาลโลนาลดีไฮด์ทั้ง 8 ระดับ ระดับละ 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมสาร TBA (thiobarbituric acid) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที และนำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร และทำการเตรียมแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตรแทนสาร TEP นำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรกับปริมาณสารมาลโลนาลดีไฮด์ในสารละลาย 5 มิลลิลิตร จากกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาค่า K

ตารางที่ ค. 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐาน TEP

ความเข้มข้นของสารละลาย TEP (mol/5ml)	OD_{538}	
	ครั้งที่1	ครั้งที่2
0(blank)	0.000	0.000
$1x10^{-8}$	0.078	0.066
$2x10^{-8}$	0.156	0.139
$3x10^{-8}$	0.238	0.256
$4x10^{-8}$	0.322	0.315
$5x10^{-8}$	0.412	0.430
$6x10^{-8}$	0.566	0.559
$7x10^{-8}$	0.697	0.688
$8x10^{-8}$	0.731	0.737



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของสาร 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) รูป a: ครั้งที่ 1 ; รูป b: ครั้งที่2

ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตรที่วัดได้หลังจากการหาค่า TBA ของแหนมที่ เติม TEP บริสุทธิ์

ปริมาณสาร TEP มิลลิกรัมใน แหนมตัวอย่าง 10 กรัม	OD_{538}	
	ครั้งที่1	ครั้งที่2
0.0000	0.145	0.369
0.0919	0.698	1.426
0.1383	0.803	1.453

2. การหาค่า K ครั้งที่ 1

หลังจากที่ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสาร TEP แล้วต้องการทราบค่า percent recovery เพื่อแทนค่าในสมการหาค่า K ดังต่อไปนี้

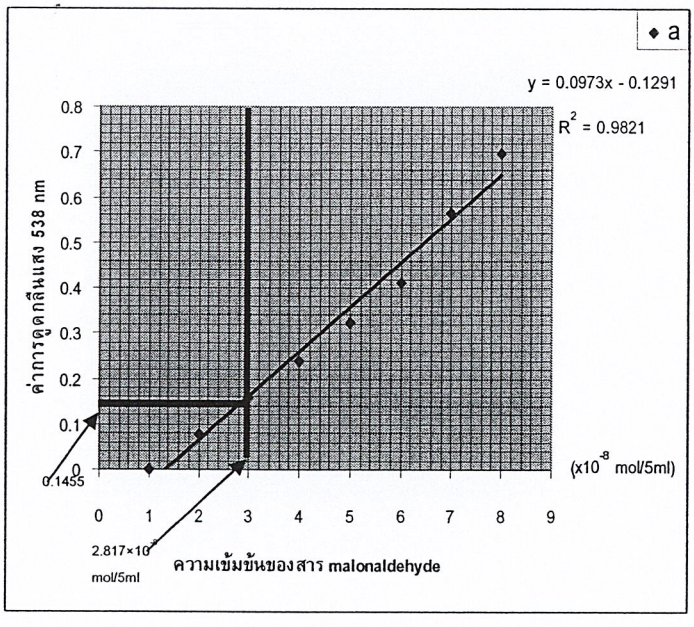
ตัวอย่างการคำนวณเพื่อหา percent recovery

2.1 การคำนวณเพื่อหาปริมาณ percent recovery ที่ได้หลังการกลั่นและทำปฏิกิริยากับ TBA อาจหาได้โดยลากเส้นที่แกน y ณ จุดที่วัดค่า OD_{538} ได้ เช่น วัดได้ 0.145 โดยลากเส้นขนานไปตัดกับกราฟมาตรฐาน ณ จุดตัดนั้นให้ลากเส้นตรงตามแนวดิ่งลงมาตัดที่แกน x ตัดที่จุดไหนอ่านค่าความเข้มข้น ณ จุดนั้น ดังภาพที่ ค.2 หรืออีกวิธีหนึ่งทำได้โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยแทนค่า y ด้วยค่า OD_{538} ที่วัดได้ (เช่นวัดได 0.145) แล้วแก้สมการเพื่อหาค่า x ค่า X ที่ได้คือปริมาณสาร malonaldehyde ที่ได้หลังการกลั่น ดังนี้

จากสมการเส้นตรง y = 0.0973x – 0.1291 แทนค่า y ด้วย 0.145

$$0.145 = 0.0973x - 0.1291$$

$$X = \frac{0.145 + 0.1291}{0.0973} = 2.81\times10^{-8} \text{ โมลต่อ 5 มิลลิลิตร}$$



ภาพที่ ค.2 แสดงจุดตัดของกราฟความเข้มข้นของสารมาลโลนาลดีไฮด์ในตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

ทำการเปลี่ยนหน่วยจากโมลเป็นมิลลิกรัม

สาร TEP 1 โมล = 220.31 กรัม = 220,310 มิลลิกรัม

ดังนั้น 2.81×10^{-8} โมลต่อ 5 มิลลิลิตร $= 220{,}310 \times 2.81\times10^{-8}$

= 0.0062 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

2.2 หา percent recovery ของสาร TEP ที่เติมในแหนม

2.2.1 การเตรียมสาร TEP บริสุทธิ์ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 0.0919 มิลลิกรัม และ 0.1838 มิลลิกรัมในสาร TEP เจือจางปริมาตร 1000 ไมโครลิตรซึ่งมีสาร TEP 0.919 มิลลิกรัม จากนั้นจึงปิเปตสารละลาย TEP เจือจางนี้มา 10 ไมโครลิตร (มีเนื้อสาร TEP = 9.19× 10/1000 = 0.0919 มิลลิกรัม) เติมลงในแหนม 10 กรัม ดังนั้นแหนม 10 กรัมจึงมีสาร TEP เท่ากับ 0.0919 มิลลิกรัมและแหนม 1 กรัมจึงมีสาร TEP เท่ากับ 0.00919 มิลลิกรัม

<u>หมายเหตุ</u> ในสาร TEP ปริมาณ 1 มิลลิลิตร หรือ 1000 ไมโครลิตร มีเนื้อสารเท่ากับ 0.919 กรัมหรือ 919 มิลลิกรัม ดังนั้นถ้าสาร TEP ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมีเนื้อสารนี้เท่ากับ 9.19 กรัมต่อ มิลลิลิตร

2.2.2 เตรียมสาร TEP (0.183 มิลลิกรัมในสารละลาย 10 ไมโครลิตร)

ปิเปตสาร TEP บริสุทธิ์ 20 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่น 980 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลาย TEP เจือจางปริมาตรทั้งหมด 1000 ไมโครลิตรซึ่งมีสาร TEP ปริมาตร 18.38 มิลลิกรัม จากนั้นจึงปิเปตสารละลาย TEP เจือจางนี้มา 20 ไมโครลิตร (มีเนื้อสาร TEP = 18.38 ×20/1000 = 0.1838 มิลลิกรัม) เติมลงในแหนม 10 กรัมดังนั้นในแหนม 10 กรัม จึงมีสาร TEP เท่ากับ 0.1838 มิลลิกรัมและแหนม 1 กรัมจึงมีสาร TEP เท่ากับ 0.01838 มิลลิกรัม

ผลของการคำนวณหาปริมาณ malonaldehyde ในแหนมที่เติมสาร TEP รวมทั้งการหา percent recovery แสดงในตารางที่ ก.3

ตารางที่ ค.3 ค่าปริมาณ malonaldehyde ในแหนมที่เติมสาร TEP และค่า percent recovery

ปริมาณสารTEP เริ่มต้นที่เติมในแหนมหมู(มิลลิกรัมต่อแหนมหมู 10 กรัม)	ครั้งที่	OD_{538}	ปริมาณสาร malonaldehydeหลังกลั่น (ต่อ 5 มิลลิลิตร)		ปริมาณสาร malonaldehyde ที่ได้จริงจากสาร TEP บริสุทธิ์ที่เติมลงไป(มิลลิกรัม)	Recovery(%)	เฉลี่ย
			โมล	มิลลิกรัม			
0.000	1	0.145	2.817×10^{-8}	0.0062	-	-	
	2	0.369	5.137×10^{-8}	0.0113	-	-	
0.0919	1	0.698	8.500×10^{-8}	0.0187	0.0125	13.60	14.91
0.1838	1	1.426	15.945×10^{-8}	0.0351	0.0238	12.94	
0.0919	2	0.803	9.580×10^{-8}	0.0211	0.0149	16.21	13.11
0.1838	2	1.453	16.22×10^{-8}	0.0357	0.0244	13.28	

2.3 ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสาร malonaldehyde และ percent recovery

สาร TEP บริสุทธิ์ปริมาณ 0.0919 มิลลิกรัมที่เติมในแหนม 10 กรัม (ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.697)

จากสมการเส้นตรง y = 0.0973x - 0.1291

แทน y ด้วย 0.698

$$0.698 = 0.0973x - 0.1291$$

$$X = \frac{0.698 + 0.1291}{0.0973}$$

$$= 8.500\times10^{-8} \text{ โมลต่อ 5 มิลลิลิตร}$$

ทำการเปลี่ยนหน่วยจากโมลเป็นมิลลิกรัม

สารTEP 1 โมล = 220.31 กรัม

= 220,310 มิลลิกรัม

ดังนั้น 8.500×10^{-8} โมลต่อ 5 มิลลิลิตร = 0.0187 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

ปริมาณสาร malonaldehyde ที่ได้จริงจากสาร TEP ที่เติมลงในแหนม = 0.0187 –x

เมื่อ x คือ ปริมาณสาร malonaldehyde ที่มีอยู่ในแหนมชุดควบคุม(ไม่มีการเติม TEP)

ดังนั้นปริมาณสาร malonaldehyde ที่ได้จริงจากสาร TEP = 0.0187 -0.0062

= 0.0125 มิลลิกรัม

$$\text{recovery (\%)} = \frac{100(0.0125)}{0.0919}$$

= 13.60 %

เมื่อหา % recovery ครั้งที่2 (คำนวณด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น) ได้ =12.94

ดังนั้น recovery (%) เฉลี่ย $= \frac{13.60+12.94}{2}$

= 14.91

การหาค่า K

ค่า K หาได้จากสมการต่อไปนี้

$$K = (S/A)\times MW\times(10^6/E)\times(100/P)$$

เมื่อ S = ค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสาร TEP (1×10^{-8} โมลใน 5 มิลลิลิตร)

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน TEP (1×10^{-8} โมลใน 5 มิลลิลิตร)

MW = ค่าน้ำหนักโมเลกุลของมาลนาลดีไฮด์ ($C_3H_4O_2$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 72

E = sample equivalent มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งคำนวณได้จากสัดส่วนของน้ำหนักตัวอย่างในสารที่กลั่นได้ที่นำมาใช้ที่นำมาใช้ เช่น ถ้าสารที่กลั่นได้ 50 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่าง 10 กรัม ดังนั้นเมื่อใช้สารที่ได้จากการกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตรซึ่งมาจากตัวอย่าง 1 กรัม

P = percent recovery ซึ่งหาค่าได้โดยเติมสาร TEP ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ทราบปริมาณสารแน่นอนลงในตัวอย่างแหนม 10 กรัมที่เตรียมใหม่ ๆ จากนั้นนำแหนมที่เติมสาร TEP รวมทั้งแหนมที่ไม่ได้เติมสาร TEP ไปหา TBA โดยเตรียมสาร TEP เพื่อใช้เติมลงในแหนมจะเตรียมที่ความเข้มข้น 2 ระดับเพื่อให้มีปริมาณสาร 0.0919 มิลลิกรัม และ 0.1838 มิลลิกรัม ในสารละลาย TEP ปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่จะใช้เติมในแหนม โดยเติมสาร TEP แต่ละระดับความเข้มข้นลงในแหนม 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 กรัม หาค่า TBA ในตัวอย่างดังกล่าวเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น คำนวณหาปริมาณสารมาลโลนาลดีไฮด์ที่ได้หลังกลั่น (หลังหักลบออกจากปริมาณสารนี้แหนมชุดควบคุม) เปรียบเทียบกับปริมาณ TEP เริ่มต้นที่เติมลงไป จะได้ค่า percent recovery)

แทนค่า

S = ค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสาร TEP (1×10^{-8} โมลใน 5 มิลลิลิตร)

A = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน TEP (1×10^{-8} โมลใน 5 มิลลิลิตร) เท่ากับ 0.076

MW = ค่าน้ำหนักโมเลกุลของมาลนาลดีไฮด์ ($C_3H_4O_2$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 72

E = sample equivalent มีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งคำนวณได้จากสัดส่วนของน้ำหนักตัวอย่างในสารที่กลั่นได้ที่นำมาใช้ที่นำมาใช้ เช่น ถ้าสารที่กลั่นได้ 50 มิลลิลิตร มาจากตัวอย่าง 10 กรัม ดังนั้นเมื่อใช้สารที่ได้จากการกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตรซึ่งมาจากตัวอย่าง 1 กรัม

P = percent recovery ซึ่งหาค่าได้โดยเติมสาร TEP ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ทราบปริมาณสารแน่นอนลงในตัวอย่างแหนม 10 กรัม

ดังนั้น ค่า K ครั้งที่ 1 คำนวณได้ดังนี้

$$K = \frac{10^{-8}}{0.076} \times 72 \times \frac{10^{6}}{1} \times \frac{100}{14.91} = 63.54$$

ค่า K ครั้งที่ 2 คำนวณเช่นเดียวกัน ได้ค่า = 72.26

เมื่อทำการคำนวณหาค่า K ทั้ง 2 ครั้ง นำมาทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยที่แท้จริงต่อไปนี้

ดังนั้นค่า K ที่แท้จริง $= \frac{K_1+K_2}{2}$

$$= \frac{63.54+72.26}{2}$$

$$K = 67.9$$

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

ตารางที่ ง.1 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ใน อาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.013	0.014	0.019	1.047	1.173	1.065	1.453	1.214	1.133	1.544	1.128	1.088	1.478	1.148	0.812
1	0.013	0.001	0.019	0.862	0.962	1.053	0.282	0.453	1.206	0.344	0.540	1.278	0.298	1.017	0.985
2	0.015	0.004	0.005	0.015	1.015	0.120	1.075	1.144	1.305	0.892	0.587	1.246	1.166	0.586	1.192
35°C															
0	0.011	0.016	0.011	1.044	1.118	0.746	0.925	1.258	1.090	1.561	1.108	1.131	1.487	0.944	0.904
1	0.012	0.008	0.011	0.732	0.666	1.022	0.115	0.306	1.136	0.138	0.401	1.153	0.072	1.217	0.951
2	0.007	0.008	0.006	0.012	0.895	1.015	0.568	1.113	1.226	0.315	0.453	1.201	1.461	0.490	1.197

ตารางที่ ง.2 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ใน อาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.010	0.001	0.005	1.078	0.780	0.806	1.225	0.869	0.868	1.220	0.885	0.934	1.536	1.011	0.942
1	0.010	0.006	0.015	0.752	1.366	0.936	1.007	1.173	1.860	1.060	1.187	1.082	0.952	1.610	1.057
2	0.015	0.026	0.012	0.575	1.414	0.743	0.784	1.644	0.771	0.788	1.668	1.577	0.688	1.688	1.062
35°C															
0	0.012	0.008	0.004	0.525	0.760	0.707	1.183	0.755	1.080	0.567	1.235	1.189	1.406	0.842	1.168
1	0.006	0.018	0.011	0.636	1.768	0.834	0.984	1.502	0.901	0.888	1.665	0.925	1.096	1.678	1.010
2	0.014	0.008	0.021	0.777	1.409	1.668	1.045	1.548	1.663	0.734	1.628	1.646	1.134	1.927	1.761

ตารางที่ ง.3 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.012	0.008	0.012	1.063	0.977	0.936	1.339	1.042	1.001	1.382	1.007	1.011	1.507	1.080	0.877
1	0.012	0.004	0.017	0.807	1.164	0.995	0.645	0.813	1.533	0.702	0.864	1.180	0.625	1.314	1.021
2	0.015	0.015	0.009	0.295	1.215	0.432	0.930	1.394	1.038	0.840	1.128	1.412	0.927	1.137	1.127
35°C															
0	0.012	0.012	0.008	0.785	0.939	0.727	1.054	1.007	1.085	1.064	1.172	1.160	1.447	0.893	1.036
1	0.009	0.013	0.011	0.684	1.217	0.928	0.550	0.904	1.019	0.513	1.033	1.039	0.584	1.448	0.981
2	0.011	0.008	0.014	0.395	1.152	1.342	0.807	1.331	1.445	0.525	1.041	1.424	1.298	1.209	1.479

ตารางที่ ง.4 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.010	0.013	0.014	1.196	1.117	1.039	0.35	1.170	1.128	1.393	1.199	0.956	1.376	1.172	0.728
1	0.022	0.023	0.013	0.731	1.395	0.993	0.086	0.016	0.957	0.134	0.529	0.956	0.173	1.213	0.827
2	0.014	0.006	0.005	1.280	0.956	0.002	1.208	1.167	0.004	0.832	0.445	0.982	1.229	0.501	1.168
35°C															
0	0.015	0.010	0.014	1.153	1.071	0.915	0.786	1.158	1.034	1.247	1.077	1.055	1.118	0.840	0.912
1	0.021	0.006	0.024	0.655	1.235	0.883	0.010	1.147	0.808	0.0236	0.529	0.720	0.010	1.563	0.760
2	0.008	0.004	0.002	1.121	1.088	0.488	1.054	0.998	1.171	0.682	0.296	1.198	1.112	0.498	1.145

ตารางที่ ง.5 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.008	0.001	0.003	0.947	1.054	1.146	1.502	0.990	1.364	1.217	1.377	1.354	1.168	1.151	1.030
1	0.006	0.033	0.066	0.734	1.235	0.535	0.984	1.479	1.031	0.884	0.838	1.310	1.056	1.168	1.119
2	0.008	0.008	0.011	0.799	0.031	0.813	1.219	0.658	0.673	0.967	1.610	0.942	1.661	1.177	1.139
35°C															
0	0.002	0.005	0.003	0.602	0.973	1.086	1.639	0.901	1.290	0.898	1.322	1.247	1.612	1.136	1.139
1	0.006	0.029	0.015	0.734	0.871	0.790	1.251	0.587	1.355	0.914	0.586	1.330	1.088	0.744	1.059
2	0.013	0.027	0.012	0.540	0.078	0.780	1.027	0.359	0.589	0.886	0.704	0.883	1.063	0.981	0.604

ตารางที่ ง.6 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.009	0.007	0.009	1.072	1.086	1.093	0.926	1.080	1.246	1.305	1.288	1.155	1.272	1.162	0.889
1	0.014	0.028	0.040	0.733	1.315	0.764	0.535	0.748	0.994	0.509	0.684	1.133	0.635	1.191	0.973
2	0.011	0.007	0.008	1.040	0.494	0.408	1.214	0.913	0.339	0.900	1.028	0.962	1.415	0.839	1.154
35°C															
0	0.009	0.008	0.009	0.878	1.022	1.001	1.213	1.030	1.162	1.073	1.200	1.151	1.365	0.988	1.026
1	0.014	0.018	0.020	0.695	1.053	0.837	0.631	0.867	1.082	0.469	0.558	1.025	0.549	1.154	0.910
2	0.011	0.016	0.007	0.831	0.583	0.634	1.041	0.679	0.880	0.784	0.500	1.041	1.088	0.740	0.875

ตารางที่ ง.7 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.010	0.012	0.010	1.159	1.012	1.013	0.586	1.126	1.137	1.398	1.086	0.882	1.401	1.063	0.753
1	0.021	0.017	0.010	0.817	0.388	0.927	0.218	0.016	1.147	0.293	0.566	0.145	0.206	1.738	0.912
2	0.016	0.006	0.004	0.013	0.093	0.062	0.015	1.174	1.091	0.075	0.495	1.102	0.676	0.647	1.074
35°C															
0	0.012	0.012	0.010	1.115	1.057	0.711	0.862	1.108	1.104	1.19	1.237	0.909	1.163	0.874	0.605
1	0.023	0.006	0.011	0.698	1.153	0.992	0.127	0.219	1.018	0.163	0.501	0.734	0.114	1.237	0.904
2	0.007	0.004	0.005	1.132	0.870	0.488	0.986	0.953	1.219	0.786	0.253	1.224	1.078	0.366	1.213

ตารางที่ ง.8 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.001	0.004	0.004	0.581	1.013	1.110	0.964	1.032	1.263	0.599	1.274	1.299	0.802	0.842	0.935
1	0.006	0.008	0.007	0.997	0.846	0.627	1.215	0.696	0.895	0.926	0.693	1.431	1.787	1.289	1.040
2	0.020	0.008	0.026	0.997	0.602	0.051	1.248	0.439	0.587	0.989	0.559	1.027	1.032	0.778	1.044
35°C															
0	0.005	0.002	0.005	0.528	1.011	1.139	1.037	1.022	1.223	0.730	1.167	1.052	1.132	0.954	0.981
1	0.007	0.016	0.013	0.661	0.786	0.853	1.197	0.469	1.263	0.901	0.983	1.349	1.171	1.059	0.820
2	0.019	0.031	0.034	0.718	0.054	1.454	1.060	0.133	1.202	0.925	0.620	0.955	1.063	1.177	1.485

ตารางที่ ง.9 ผลของเกลือและสารสกัดกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	0.006	0.008	0.007	0.870	1.013	1.062	0.775	1.079	1.200	0.999	1.180	1.091	1.102	0.953	0.844
1	0.014	0.013	0.009	0.907	0.617	0.777	0.717	0.356	1.021	0.610	0.630	0.788	0.997	1.514	0.976
2	0.018	0.007	0.015	0.505	0.348	0.057	0.632	0.807	0.839	0.532	0.527	1.065	0.851	0.713	1.059
35°C															
0	0.009	0.007	0.008	0.822	1.034	0.925	0.950	1.065	1.164	0.960	1.202	0.981	1.148	0.914	0.793
1	0.015	0.011	0.012	0.681	0.970	0.923	0.662	0.344	1.141	0.534	0.742	1.042	0.643	1.148	0.862
2	0.013	0.018	0.020	0.925	0.462	0.971	1.023	0.543	1.211	0.856	0.437	1.090	1.071	0.772	1.349

ตารางที่ ง.10 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.70	6.62	6.70	4.46	4.32	4.50	4.19	4.21	4.35	4.10	4.15	4.26	4.08	4.14	4.26
1	6.36	6.44	6.62	4.00	4.42	4.40	3.87	4.30	4.21	3.81	4.29	4.06	3.86	4.17	4.01
2	6.36	6.28	6.29	6.36	4.53	6.17	4.17	4.06	4.06	4.16	4.04	4.04	4.01	4.0	4.00
35°C															
0	6.7	6.62	6.68	4.28	4.39	4.28	4.1	4.27	4.19	4.05	4.21	4.08	4.06	4.18	4.11
1	6.37	6.43	6.60	4.15	5.48	4.34	4.08	4.21	4.16	4.94	4.20	4.03	4.09	4.11	4.05
2	6.35	6.27	6.30	6.33	4.23	4.96	6.06	3.97	4.51	4.41	4.03	4.04	4.28	4.00	4.00

ตารางที่ ง.11 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.75	6.66	6.64	4.30	4.49	4.57	4.20	4.21	4.23	4.12	4.18	4.14	4.01	4.20	4.12
1	6.38	6.45	6.38	4.38	4.73	5.66	4.12	4.27	5.70	3.93	4.05	4.04	3.81	3.99	3.97
2	6.26	6.31	6.28	4.31	4.93	4.41	4.73	4.73	4.31	3.94	4.41	4.12	3.84	4.13	4.00
35°C															
0	6.75	6.65	6.63	4.29	4.64	4.75	4.23	4.36	4.26	4.12	4.19	4.13	3.96	4.16	4.07
1	6.37	6.48	6.39	4.19	5.16	6.34	4.12	4.23	4.18	3.95	4.21	4.05	3.87	4.12	3.95
2	6.25	6.30	6.30	4.31	4.37	4.50	4.19	4.22	4.41	4.10	4.05	4.28	3.94	4.00	4.09

ตารางที่ ง.12 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Lactococcus lactis 13IS3														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.73	6.64	6.67	4.38	4.41	4.54	4.20	4.21	4.29	4.11	4.17	4.20	4.05	4.17	4.19
1	6.37	6.45	6.50	4.19	4.58	5.03	4.00	4.29	4.96	3.87	4.17	4.05	3.84	4.08	3.99
2	6.31	6.30	6.29	5.34	4.73	5.29	4.45	4.40	4.19	4.05	4.23	4.08	3.93	4.07	4.00
35°C															
0	6.73	6.64	6.66	4.29	4.52	4.52	4.17	4.32	4.23	4.09	4.20	4.11	4.01	4.17	4.09
1	6.37	6.46	6.50	4.17	5.32	5.34	4.10	4.22	4.17	4.45	4.21	4.04	3.98	4.12	4.00
2	6.30	6.29	6.30	5.32	4.30	4.73	5.13	4.10	4.46	4.26	4.04	4.16	4.11	4.00	4.05

ตารางที่ ง.13 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.69	6.62	6.67	4.41	4.32	4.36	4.40	4.21	4.17	4.31	4.11	4.12	4.31	4.07	4.09
1	6.38	6.42	6.59	4.29	4.34	4.45	4.26	4.2	4.31	4.13	4.15	4.17	4.12	3.99	4.12
2	6.33	6.31	6.31	4.43	4.29	6.29	4.32	4.13	6.21	4.26	4.14	5.56	4.09	4.09	4.74
35°C															
0	6.68	6.61	6.68	4.43	4.33	4.27	4.47	4.27	4.19	4.43	4.2	4.04	4.43	4.09	4.13
1	6.38	6.43	6.61	4.24	4.39	4.41	4.16	4.27	4.3	4.11	4.22	4.17	4.14	4.11	4.15
2	6.33	6.27	6.30	4.50	4.19	4.14	4.38	4.01	3.94	4.37	4.03	4.02	4.20	4.02	3.99

ตารางที่ ง.14 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.73	6.65	6.65	4.29	4.72	4.66	4.10	4.28	4.28	4.02	4.16	4.15	3.92	4.12	4.09
1	6.16	6.45	6.38	4.10	4.49	5.77	4.02	4.21	4.18	3.80	4.11	4.00	3.73	3.99	3.95
2	6.27	6.31	6.31	4.19	6.22	4.57	3.95	4.52	4.21	3.83	6.38	4.09	3.75	3.96	3.99
35°C															
0	6.74	6.65	6.65	4.23	4.59	4.58	4.00	4.27	4.28	3.90	4.16	4.16	3.88	4.13	3.96
1	6.38	6.46	6.40	4.12	4.41	5.20	3.90	4.24	4.13	3.85	4.33	4.01	3.80	4.01	4.12
2	6.01	6.33	6.33	4.06	6.15	4.44	3.88	4.34	4.16	3.90	4.09	4.05	3.72	3.95	3.97

ตารางที่ ง.15 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Enterococcus faecalis 4IS17														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.71	6.64	6.66	4.35	4.52	4.51	4.25	4.25	4.23	4.17	4.14	4.14	4.12	4.10	4.09
1	6.27	6.44	6.49	4.20	4.42	5.11	4.14	4.21	4.25	3.97	4.13	4.09	3.93	3.99	4.04
2	6.30	6.31	6.31	4.31	5.26	5.43	4.14	4.33	5.21	4.05	5.26	4.83	3.92	4.03	4.37
35°C															
0	6.71	6.63	6.67	4.33	4.46	4.43	4.24	4.27	4.24	4.17	4.18	4.10	4.16	4.11	4.05
1	6.38	6.45	6.51	4.18	4.40	4.81	4.03	4.26	4.22	3.98	4.28	4.09	3.97	4.06	4.14
2	6.17	6.30	6.32	4.28	5.17	4.29	4.13	4.18	4.05	4.14	4.06	4.04	3.96	3.99	3.98

ตารางที่ ง.16 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.69	6.62	6.68	4.42	4.52	4.50	4.40	4.24	4.37	4.30	4.23	4.26	4.27	4.19	4.23
1	6.36	6.43	6.57	4.05	6.05	4.35	3.97	4.60	4.25	3.92	4.35	4.11	3.95	4.08	4.10
2	6.33	6.28	6.30	6.30	6.21	6.20	6.30	4.51	4.24	6.20	4.10	4.17	4.84	4.06	4.09
35°C															
0	6.69	6.61	6.69	4.48	4.34	4.48	4.51	4.29	4.21	4.48	4.15	4.16	4.48	4.20	4.25
1	6.39	6.41	6.59	4.67	4.56	4.38	4.53	4.28	4.18	4.10	4.20	4.04	4.11	4.05	4.00
2	6.35	6.32	6.31	4.60	4.59	5.77	4.49	4.10	4.04	4.44	4.17	4.10	4.29	4.13	4.07

ตารางที่ ง.17 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (ซ้ำที่ 2)

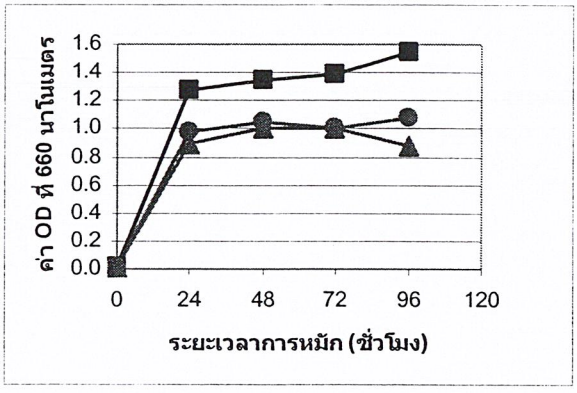
ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.72	6.64	6.64	4.63	4.76	4.48	4.39	4.32	4.41	4.29	4.24	4.25	4.19	4.2	4.19
1	6.39	6.46	6.40	4.31	4.75	4.46	4.29	4.41	4.28	4.11	4.22	4.06	4.04	4.06	3.94
2	6.28	6.35	6.3	4.38	5.11	6.24	4.14	4.52	4.7	4.04	4.1	4.19	3.13	4.09	3.98
35°C															
0	6.72	6.64	6.65	4.42	4.63	4.62	4.28	4.39	4.33	4.24	4.19	4.19	4.15	4.16	4.15
1	6.40	6.44	6.41	4.56	5.08	4.84	4.49	4.32	4.18	4.07	4.1	4.03	3.99	3.97	3.99
2	6.26	6.32	6.3	4.62	4.85	5.54	4.54	4.66	4.42	4.11	4.2	4.31	4.02	3.97	4.16

ตารางที่ ง.18 ผลการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ในอาหาร NMB (เฉลี่ย)

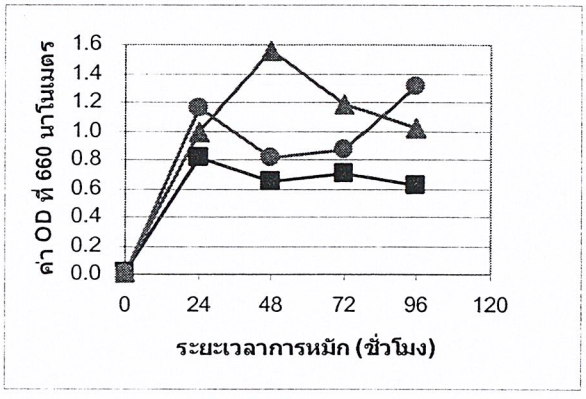
ความเข้มข้นของ NaCl (%)	ค่าพีเอช														
	Pediococcus pentosaceus P0805														
	วันที่ 0			วันที่ 1			วันที่ 2			วันที่ 3			วันที่ 4		
	กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม			กระเทียม		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%	0%	1%	2%
30°C															
0	6.71	6.63	6.66	4.53	4.64	4.49	4.40	4.28	4.39	4.30	4.24	4.26	4.23	4.20	4.21
1	6.38	6.45	6.49	4.18	5.40	4.41	4.13	4.51	4.27	4.02	4.29	4.09	4.00	4.07	4.02
2	6.31	6.32	6.30	5.34	5.66	6.22	5.22	4.52	4.47	5.12	4.10	4.18	3.99	4.08	4.04
35°C															
0	6.71	6.63	6.67	4.45	4.49	4.55	4.40	4.34	4.27	4.36	4.17	4.18	4.32	4.18	4.20
1	6.40	6.43	6.50	4.62	4.82	4.61	4.51	4.30	4.18	4.09	4.15	4.04	4.05	4.01	4.00
2	6.31	6.32	6.31	4.61	4.72	5.66	4.52	4.38	4.23	4.28	4.19	4.21	4.16	4.05	4.12

30°C

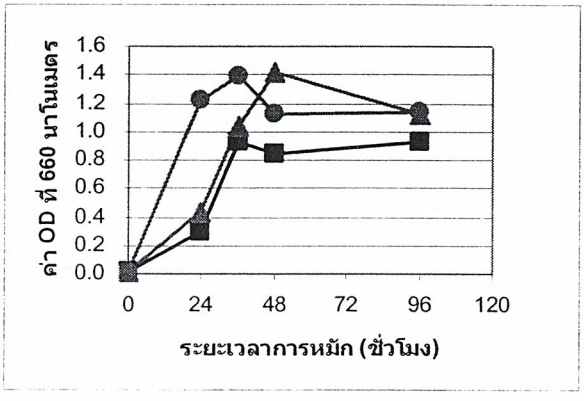
1.1A (เกลือ 0%)



1.1B (เกลือ 1%)

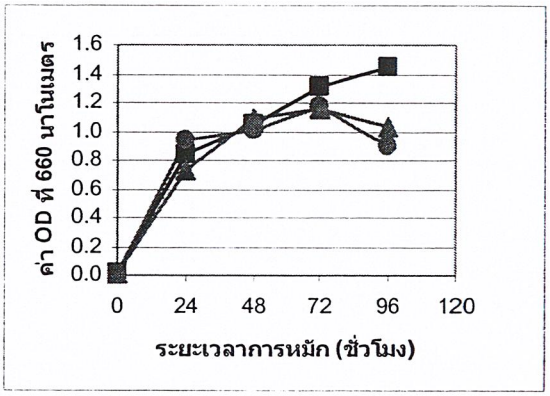


1.1C (เกลือ 2%)

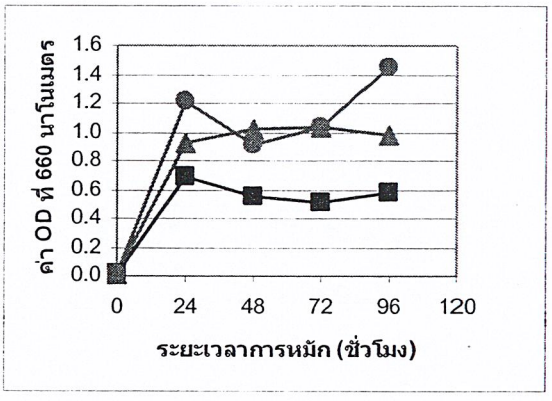


35°C

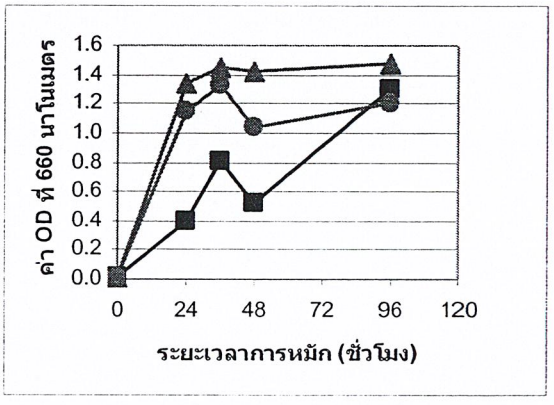
1.2A (เกลือ 0%)



1.2B (เกลือ 1%)



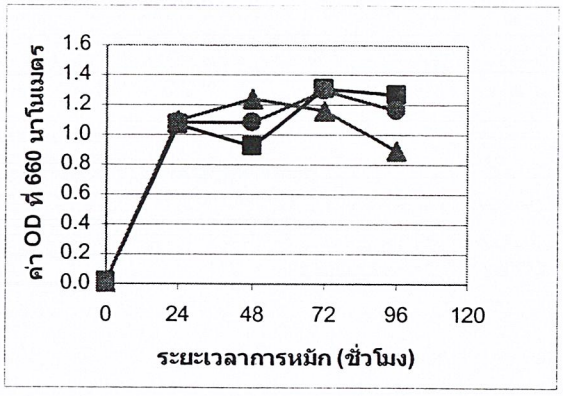
1.2C (เกลือ 2%)



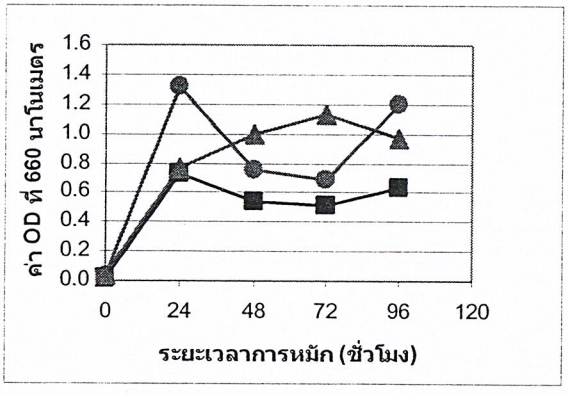
ภาพที่ ง.1 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1.1A-1.2C); —■— กระเทียมร้อยละ 0; —●— กระเทียมร้อยละ 1; —▲— กระเทียมร้อยละ 2

30°C

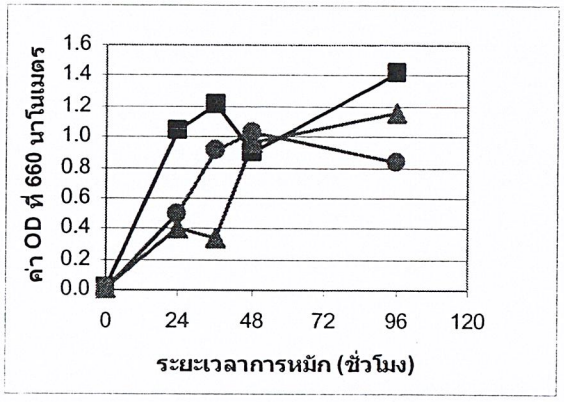
2.1A (เกลือ 0%)



2.1B (เกลือ 1%)

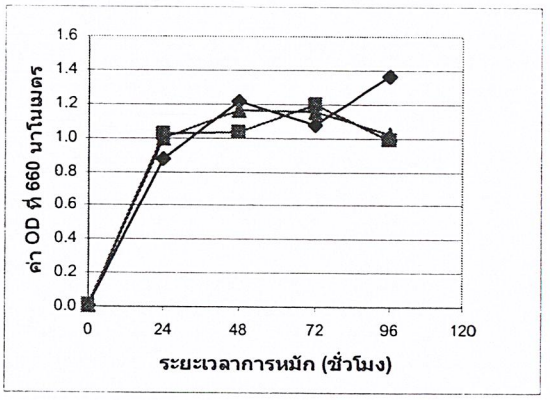


2.1C (เกลือ 2%)

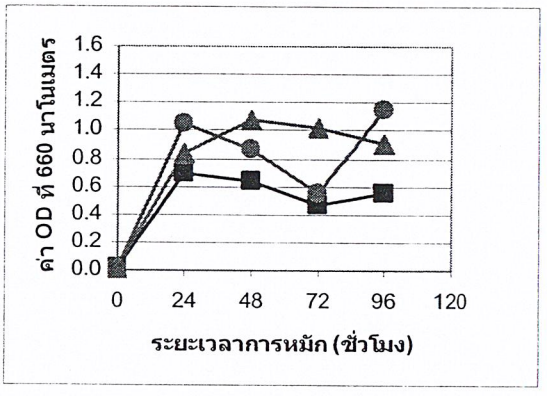


35°C

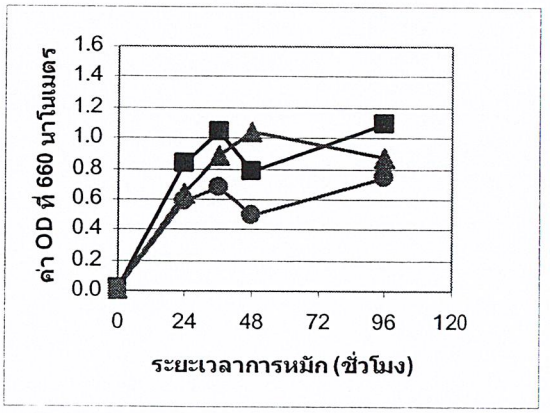
2.2A (เกลือ 0%)



2.2B (เกลือ 1%)



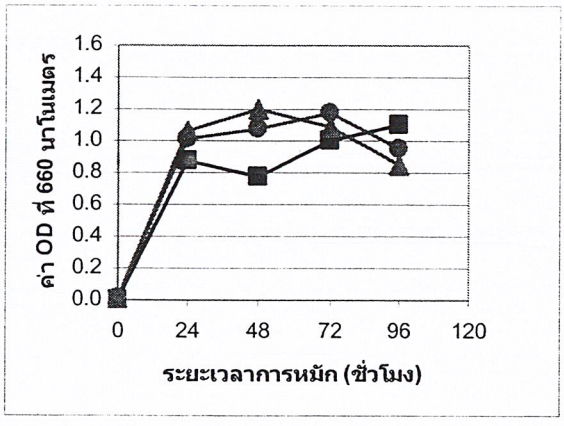
2.2C (เกลือ 2%)



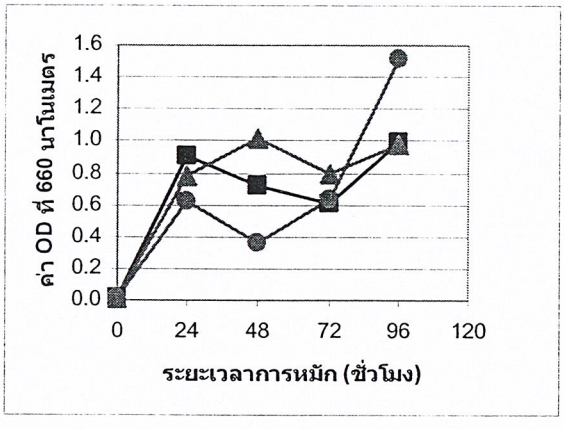
ภาพที่ ง.2 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.1A-2.2C) ; ■ กระเทียมร้อยละ 0; ● กระเทียมร้อยละ 1; ▲ กระเทียมร้อยละ 2

30°C

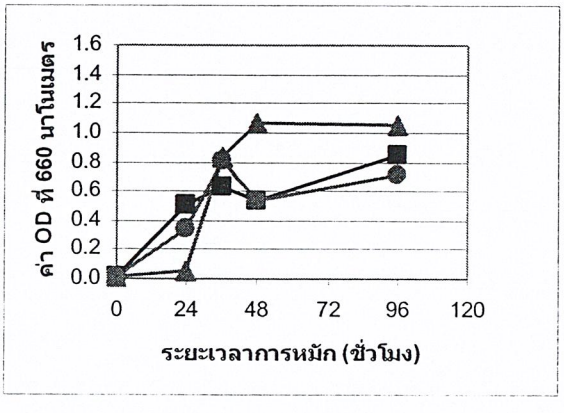
3.1A (เกลือ 0%)



3.1B (เกลือ 1%)

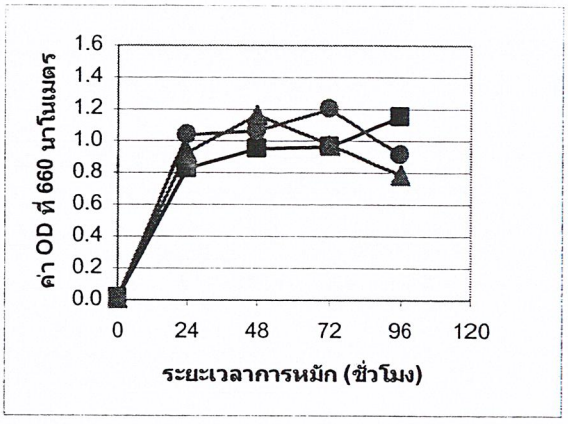


3.1C (เกลือ 2%)

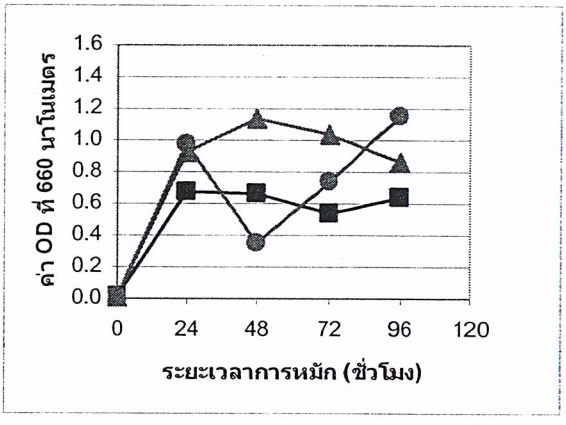


35°C

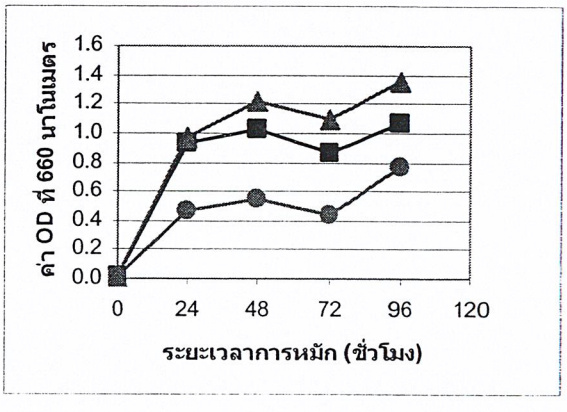
3.2A (เกลือ 0%)



3.2B (เกลือ 1%)



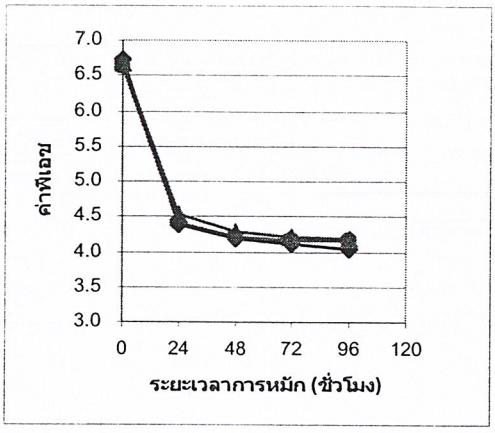
3.2C (เกลือ 2%)



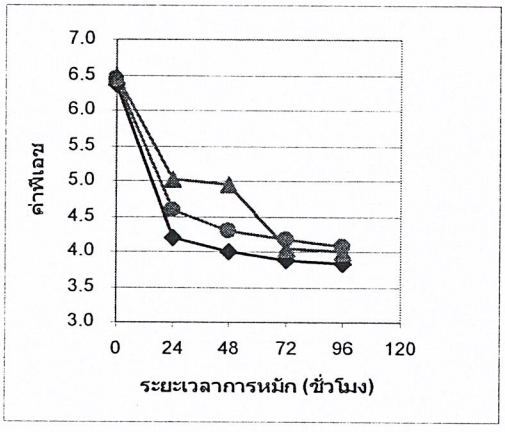
ภาพที่ ง.3 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.1A-3.2C); —■— กระเทียมร้อยละ 0; —●— กระเทียมร้อยละ 1 ; —▲— กระเทียมร้อยละ 2

30°C

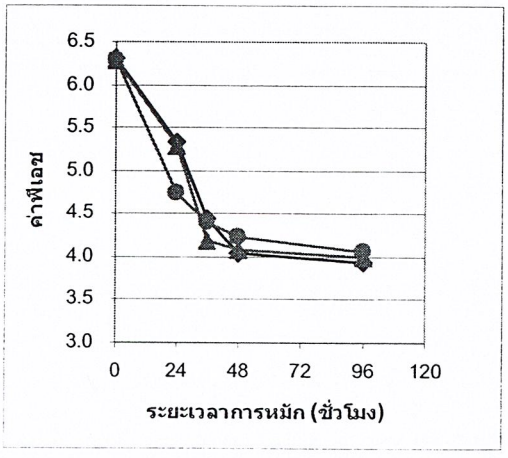
4.1A (เกลือ 0%)



4.1B (เกลือ 1%)

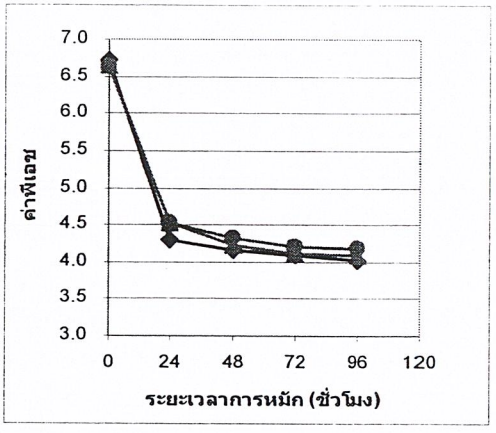


4.1C (เกลือ 2%)

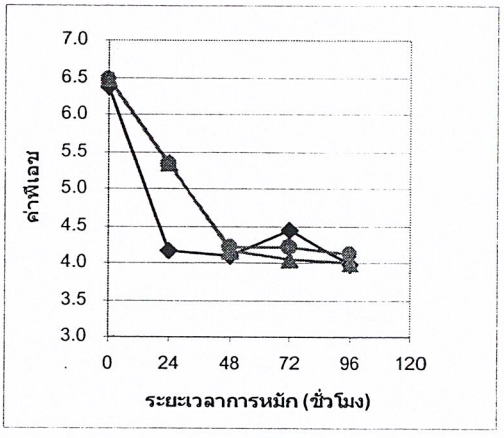


35°C

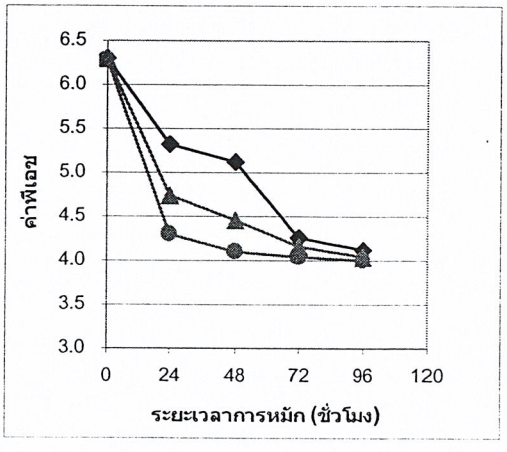
4.2A (เกลือ 0%)



4.2B (เกลือ 1%)



4.2C (เกลือ 2%)

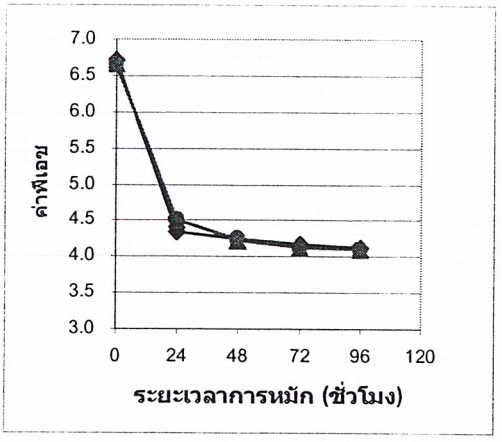


ภาพที่ ง.4 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Lactococcus lactis* 13IS3 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.1A-4.2C); —■— กระเทียมร้อยละ 0; —●— กระเทียมร้อยละ 1; —▲— กระเทียมร้อยละ 2

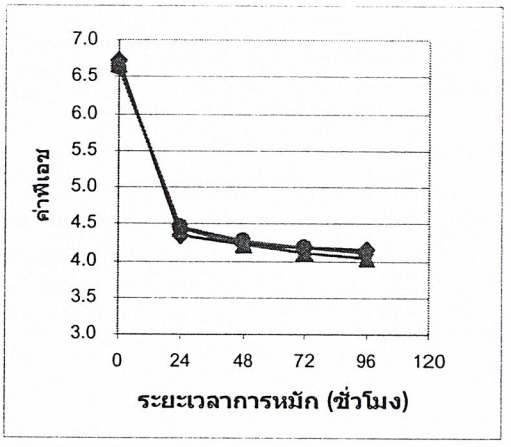
30°C

35°C

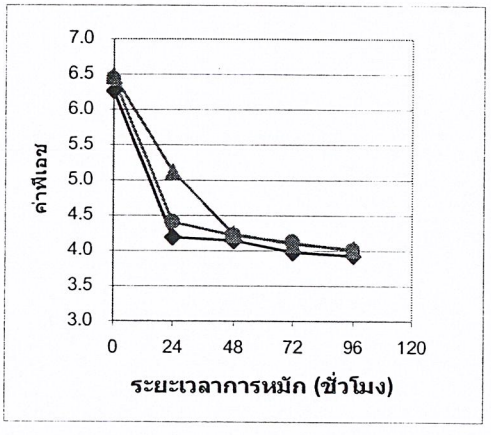
5.1A (เกลือ 0%)



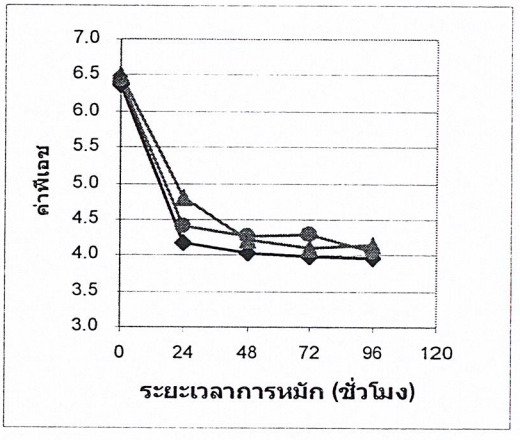
5.2A (เกลือ 0%)



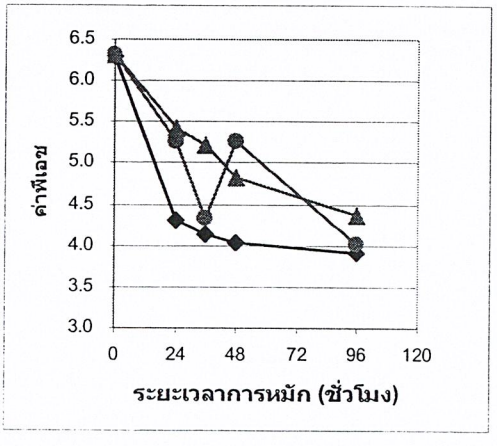
5.1B (เกลือ 1%)



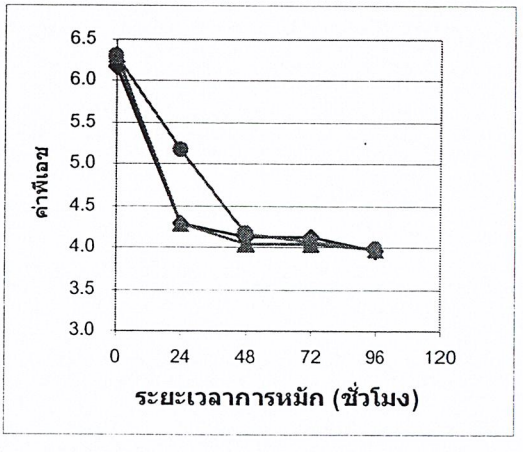
5.2B (เกลือ 1%)



5.1C (เกลือ 2%)



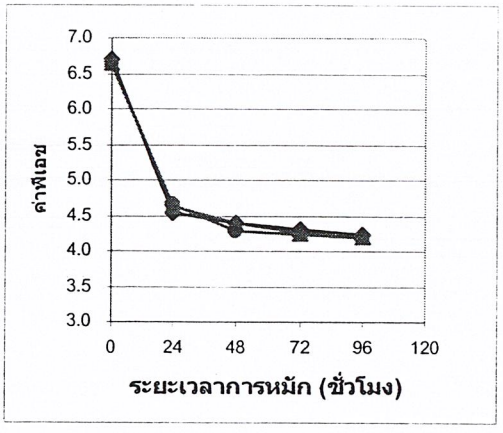
5.2C (เกลือ 2%)



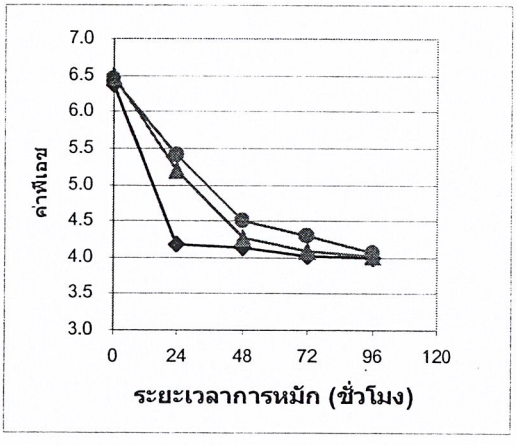
ภาพที่ ง.5 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5.1A-5.2B) ; —■— กระเทียมร้อยละ 0; —●— กระเทียมร้อยละ 1;—▲—กระเทียมร้อยละ 2

30°C

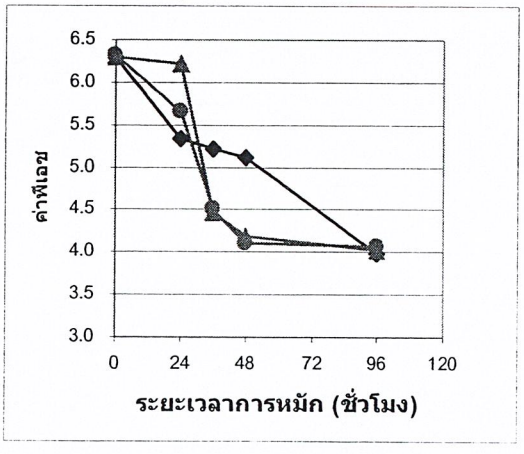
6.1A (เกลือ 0%)



6.1B (เกลือ 1%)

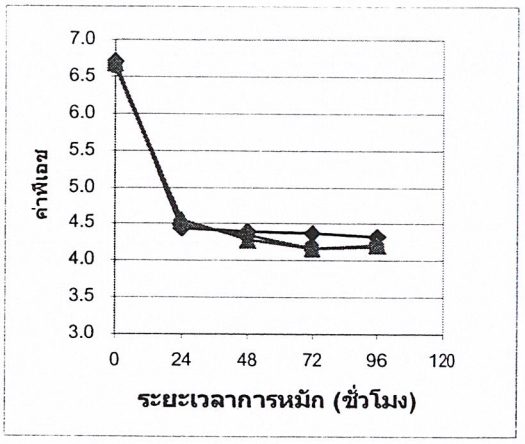


6.1C (เกลือ 2%)

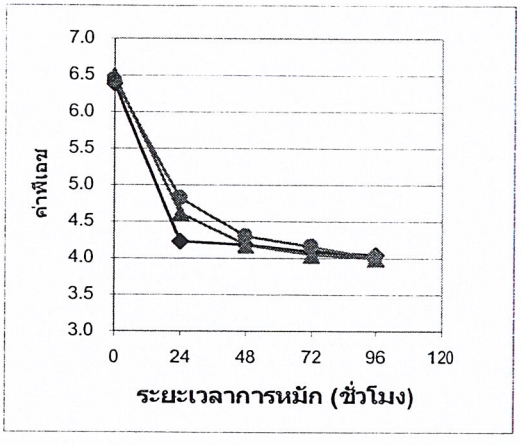


35°C

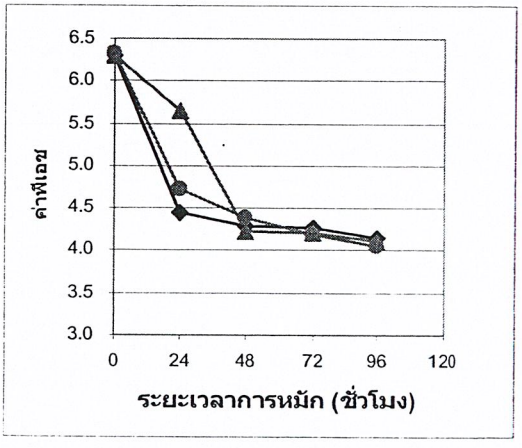
6.2A (เกลือ 0%)



6.2B (เกลือ 1%)



6.2C (เกลือ 2%)



ภาพที่ ง.6 ผลของกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ระหว่างการหมักในอาหาร NMB ที่มีเกลือ ร้อยละ 0, 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6.1A-6.2B); —■— กระเทียมร้อยละ 0; —●— กระเทียมร้อยละ 1 ; —▶— กระเทียมร้อยละ 2

ตารางที่ ง. 19 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ซ้ำที่	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (CFU/g)					ทรีตเม้นต์	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (CFU/g)					
		0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.		ซ้ำที่	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
ชุดควบคุม	1	1.84×10^{7}	8.6×10^{7}	4.40×10^{8}	6.67×10^{9}	3.02×10^{9}	10^{4} cell/g	1	2.8×10^{7}	6.30×10^{8}	2.40×10^{8}	4.90×10^{8}	1.10×10^{8}
	2	2.60×10^{6}	6.80×10^{7}	5.72×10^{8}	1.40×10^{9}	9.00×10^{8}		2	8.9×10^{8}	1.01×10^{9}	4.95×10^{9}	2.76×10^{10}	1.74×10^{10}
	3	1.50×10^{7}	5.30×10^{7}	4.50×10^{8}	2.70×10^{9}	1.31×10^{9}		3	9.2×10^{7}	1.36×10^{8}	8.9×10^{8}	1.62×10^{9}	4.90×10^{8}
	เฉลี่ย	6.45×10^{6}	3.26×10^{7}	2.04×10^{8}	9.78×10^{8}	3.89×10^{8}		เฉลี่ย	1.32×10^{8}	4.47×10^{8}	1.26×10^{9}	2.82×10^{9}	9.78×10^{8}
10^{2} cell/g	1	1.48×10^{6}	9.60×10^{7}	5.30×10^{7}	7.0×10^{8}	1.84×10^{7}	10^{6} cell/g	1	9.20×10^{8}	1.80×10^{9}	8.40×10^{9}	1.22×10^{10}	7.20×10^{9}
	2	4.50×10^{7}	1.24×10^{8}	6.80×10^{8}	9.80×10^{9}	5.40×10^{9}		2	3.80×10^{9}	9.40×10^{9}	1.90×10^{10}	7.41×10^{10}	9.80×10^{10}
	3	5.10×10^{7}	8.40×10^{7}	9.20×10^{8}	4.30×10^{9}	9.80×10^{8}		3	4.70×10^{8}	2.44×10^{9}	6.81×10^{9}	9.60×10^{9}	3.68×10^{8}
	เฉลี่ย	1.51×10^{7}	9.77×10^{7}	3.24×10^{8}	3.09×10^{9}	4.57×10^{8}		เฉลี่ย	5.01×10^{9}	3.47×10^{9}	1.26×10^{10}	2.04×10^{10}	6.31×10^{9}

ตารางที่ ง. 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ซ้ำที่	ค่าพีเอช					ทรีตเม้นต์	ค่าพีเอช					
		0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.		ซ้ำที่	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
ชุดควบคุม	1	5.57	4.87	4.63	4.55	4.41	10^{4} cell/g	1	5.63	4.86	4.62	4.51	4.44
	2	5.68	4.89	4.64	4.59	4.53		2	5.72	4.79	4.59	4.57	4.47
	3	6.22	4.86	4.70	4.65	4.50		3	5.96	4.89	4.64	4.61	4.52
	เฉลี่ย	5.82	4.87	4.66	4.60	4.48		เฉลี่ย	5.77	4.85	4.62	4.56	4.48
10^{2} cell/g	1	5.61	4.88	4.61	4.42	4.40	10^{6} cell/g	1	5.60	4.89	4.63	4.47	4.39
	2	5.69	4.86	4.66	4.58	4.51		2	5.65	4.73	4.61	4.55	4.49
	3	6.07	4.88	4.72	4.64	4.57		3	5.97	4.82	4.62	4.56	4.44
	เฉลี่ย	5.79	4.87	4.66	4.55	4.49		เฉลี่ย	5.74	4.81	4.62	4.53	4.44

ตารางที่ ง. 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ซ้ำที่	ปริมาณกรด (%)					ทรีตเม้นต์	ปริมาณกรด (%)					
		0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.		ซ้ำที่	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
ชุดควบคุม	1	0.29	0.57	0.79	0.95	1.19	10^{4} cell/g	1	0.26	0.57	0.82	1.06	1.13
	2	0.38	0.42	0.70	0.91	1.12		2	0.37	0.49	0.75	1.04	1.21
	3	0.27	0.46	0.64	0.77	0.88		3	0.22	0.49	0.70	0.84	0.90
	เฉลี่ย	0.32	0.43	0.71	0.88	1.06		เฉลี่ย	0.28	0.52	0.77	0.98	1.08
10^{2} cell/g	1	0.26	0.38	0.80	0.99	1.10	10^{6} cell/g	1	0.24	0.53	0.86	1.02	1.17
	2	0.35	0.53	0.73	0.99	1.19		2	0.35	0.48	0.80	1.08	1.23
	3	0.31	0.48	0.66	0.79	0.86		3	0.22	0.57	0.73	0.90	0.95
	เฉลี่ย	0.31	0.46	0.73	0.92	1.05		เฉลี่ย	0.27	0.52	0.79	1.00	1.12

ตารางที่ ง. 22 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ค่า TBARS						ทรีตเม้นต์	ค่า TBARS					
	ซ้ำที่	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.		ซ้ำที่	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
ชุดควบคุม	1	1.560	0.850	0.905	1.646	0.944	10^4 cell/g	1	2.239	1.170	1.014	1.303	0.983
	2	1.872	3.089	3.869	3.705	3.214		2	2.067	3.697	4.797	4.220	4.329
	3	1.763	2.309	2.418	1.412	2.644		3	1.326	2.473	2.223	0.991	1.981
	เฉลี่ย	1.732	2.083	2.397	2.254	2.267		เฉลี่ย	1.877	2.447	2.678	2.171	2.431
10^2 cell/g	1	0.819	1.591	0.889	1.365	0.913	10^4 cell/g	1	1.084	0.920	0.998	1.685	0.975
	2	1.716	3.541	5.320	2.847	5.413		2	1.576	4.001	7.059	4.969	4.914
	3	1.037	2.948	4.087	2.005	2.114		3	1.669	1.505	2.223	1.583	2.270
	เฉลี่ย	1.191	2.694	3.432	2.072	2.813		เฉลี่ย	1.443	2.142	3.427	2.746	2.720

ตารางที่ ง. 23 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	น้ำหนัก (กรัม)			ทรีตเม้นต์	น้ำหนัก (กรัม)		
	ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก		ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก
ชุดควบคุม	1	33.358	32.690	10^4 cell/g	1	37.645	36.841
	2	41.671	41.490		2	34.620	34.511
	3	39.074	38.741		3	48.217	47.480
	เฉลี่ย	38.034	37.640		เฉลี่ย	40.161	39.611
10^2 cell/g	1	39.201	39.021	10^4 cell/g	1	39.547	38.182
	2	36.026	35.872		2	33.879	33.668
	3	53.149	52.896		3	52.583	50.220
	เฉลี่ย	42.792	42.597		เฉลี่ย	42.003	40.690

ตารางที่ ง. 24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย(%)			ทรีตเม้นต์	ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย(%)		
	ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก		ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก
ชุดควบคุม	1	1.217	2.117	10^4 cell/g	1	0.831	2.511
	2	2.918	5.730		2	0.610	7.788
	3	0.217	3.020		3	1.961	2.752
	เฉลี่ย	1.450	3.622		เฉลี่ย	1.134	4.350
10^2 cell/g	1	1.161	2.026	10^4 cell/g	1	0.923	2.880
	2	0.163	6.584		2	0.653	7.703
	3	0.202	2.158		3	0.960	5.926
	เฉลี่ย	0.509	3.590		เฉลี่ย	0.845	5.503

ตารางที่ ง. 25 การเปลี่ยนแปลงค่าสีในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ค่าสี			ทรีตเม้นต์	ค่าสี		
	ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก		ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก
L*				L*			
ชุดควบคุม	1	52.79	67.73	10^4 cell/g	1	51.65	66.82
	2	55.88	69.68		2	56.72	69.75
	3	57.32	63.06		3	51.46	62.74
	เฉลี่ย	55.33	66.82		เฉลี่ย	53.28	66.44
10^2 cell/g	1	53.93	65.55	10^6 cell/g	1	54.20	66.47
	2	55.38	69.75		2	55.61	70.63
	3	55.57	64.39		3	51.85	59.69
	เฉลี่ย	54.99	66.56		เฉลี่ย	53.89	65.59
a*				a*			
ชุดควบคุม	1	+4.07	+3.07	10^4 cell/g	1	+3.83	+2.96
	2	+6.03	+4.39		2	+6.91	+4.22
	3	+4.23	+5.33		3	+6.82	+5.91
	เฉลี่ย	+4.77	+4.26		เฉลี่ย	+5.85	+4.36
10^2 cell/g	1	+3.62	+4.13	10^6 cell/g	1	+3.61	+3.27
	2	+5.16	+3.91		2	+5.84	+3.18
	3	+6.46	+4.68		3	+5.69	+5.26
	เฉลี่ย	+5.08	+4.24		เฉลี่ย	+5.04	+3.90
b*				b*			
ชุดควบคุม	1	+4.59	+7.33	10^4 cell/g	1	+3.40	+7.46
	2	+6.25	+8.86		2	+6.62	+8.76
	3	+1.32	+5.82		3	+0.71	+6.29
	เฉลี่ย	+4.05	+7.34		เฉลี่ย	+3.58	+7.50
10^2 cell/g	1	+5.04	+7.15	10^6 cell/g	1	+4.62	+7.50
	2	+6.19	+8.23		2	+5.61	+8.72
	3	+3.39	+4.81		3	+8.09	+5.13
	เฉลี่ย	+4.88	+6.73		เฉลี่ย	+6.01	+6.97

ตารางที่ ง. 26 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)			ทรีตเม้นต์	ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)		
	ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก		ซ้ำที่	ก่อนหมัก	หลังหมัก
ชุดควบคุม	1	0.979	0.956	10^4 cell/g	1	0.980	0.959
	2	0.958	0.972		2	0.960	0.972
	3	0.975	0.953		3	0.973	0.955
	เฉลี่ย	0.971	0.960		เฉลี่ย	0.971	0.962
10^2 cell/g	1	0.978	0.958	10^6 cell/g	1	0.977	0.960
	2	0.959	0.971		2	0.960	0.971
	3	0.975	0.962		3	0.976	0.953
	เฉลี่ย	0.971	0.964		เฉลี่ย	0.971	0.961

ตารางที่ ง. 27 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* P0805 ปริมาณต่าง ๆ กัน

ทรีตเม้นต์	จำนวนจุลินทรีย์ (CFU/g)					
	ซ้ำที่	Total colony	*Enterobacteria*	Yeast Mould	*S. aureus*	*Salmonella*
ชุดควบคุม	1	1.4×10^7	7.0×10^2	-	-	-
	2	2.1×10^7	5.2×10^3	-	-	-
	3	3.7×10^7	4.8×10^3	-	-	-
	เฉลี่ย	2.4×10^7	3.6×10^3	-	-	-
10^2 cell/g	1	1.4×10^8	1.5×10^3	-	-	-
	2	2.1×10^7	3.5×10^3	-	-	-
	3	1.3×10^8	7.0×10^3	-	-	-
	เฉลี่ย	9.6×10^7	4.0×10^3	-	-	-
10^4 cell/g	1	3.81×10^8	3.7×10^3	-	-	-
	2	1.7×10^8	4.7×10^3	-	-	-
	3	1.1×10^8	6.1×10^3	-	-	-
	เฉลี่ย	2.2×10^8	4.8×10^3	-	-	-
10^6 cell/g	1	1.7×10^8	6.4×10^3	-	-	-
	2	1.6×10^9	1.9×10^4	-	-	-
	3	1.1×10^8	8.4×10^4	-	-	-
	เฉลี่ย	1.1×10^9	3.6×10^4	-	-	-

ภาคผนวก จ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ใบรายงานการทดสอบ

เรื่อง การให้คะแนนความชอบรวม

ชื่อ.....วันที่.....

ผลิตภัณฑ์.....

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนตามความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9 - ชอบมากที่สุด	8 - ชอบมาก	7 - ชอบปานกลาง	6 - ชอบเล็กน้อย
5 - เฉย ๆ	4 — ไม่ชอบเล็กน้อย	3 -ไม่ชอบปานกลาง	2 - ไม่ชอบมาก
1 -ไม่ชอบมากที่สุด			

คะแนนความชอบของตัวอย่าง

ปัจจัย	รหัสตัวอย่าง			
	.....	.....	.....	.....
สี	.....	.....	.....	.....
กลิ่นรส	.....	.....	.....	.....
ลักษณะเนื้อสัมผัส	.....	.....	.....	.....
ความเปรี้ยว	.....	.....	.....	.....
ความเค็ม	.....	.....	.....	.....
การยอมรับรวม	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ .....

.....

.....