สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกอีสานและการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน *Lactobacillus plantarum* RS49 ต่อ *Salmonella* Anatum ในระหว่างการหมัก

EFFECT OF THE INGREDIENTS OF THE ISAN SAUSAGES AND *Lactobacillus plantarum* RS49 BACTERIOCIN-PRODUCING ON *Salmonella* Anatum DURING FERMENTATION

T129579

มัลลิกา ไชยวุฒิ

MANLIKA CHAIWUT

วพ 21770

เลขหมู่ 2556
เลขทะเบียน 129579
วัน,เดือน,ปี 7 มี.ค. 2557

b. T129579 2ex
i.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-AI-M-054-172

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF THE INGREDIENTS OF THE ISAN SAUSAGES AND *Lactobacillus plantarum* RS49 BACTERIOCIN-PRODUCING ON *Salmonella* Anatum DURING FERMENTATION

MANLIKA CHAIWUT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013-AI-M-054-172

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2013

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของส่วนผสมของไส้กรอกอีสานและกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* RS49 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อ *Salmonella* Anatum ในระหว่างการหมัก

Effect of the Ingredients of the Isan Sausages and Bacteriocin-Producing *Lactobacillus plantarum* RS49 on *Salmonella* Anatum During Fermentation

ชื่อนักศึกษา นางสาวมัลลิกา ไชยวุฒิ

รหัสประจำตัว 51608053

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 22 เมษายน 2556 เวลา 15.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของส่วนผสมของไส้กรอกอีสานและกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* RS49 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อ *Salmonella* Anatum ในระหว่างการหมัก
นักศึกษา	นางสาวมัลลิกา ไชยวุฒิ
รหัสนักศึกษา	51608053
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2556
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของการหมักไส้กรอกอีสานที่ผลิตจากเนื้อโคพื้นเมืองไทยหมักในไส้หมูและไส้คอลลาเจนโดยสภาวะการหมักแบบสด (นำตัวอย่างทั้งสองไส้บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2 วัน) และสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง (นำตัวอย่างทั้ง 2 ไส้หมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 65% เป็นเวลา 2 วัน) สภาวะการหมักและชนิดไส้ที่บรรจุแตกต่างกันโดยแยกเป็นไส้หมูสภาวะการหมักแบบสด ไส้หมูสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง ไส้คอลลาเจนสภาวะการหมักแบบสดและไส้คอลลาเจนสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลกติก ค่าพีเอช เปอร์เซ็นกรดแลคติก ค่าความชื้นและค่า Aw พบว่าปัจจัยเรื่องไส้บรรจุไม่มีอิทธิพลต่อคุณภาพด้านต่างๆของไส้กรอกอีสาน แต่ด้านสภาวะในการหมักแบบสดมีอิทธิพลให้ค่าความชื้นและ Aw สูงกว่าการหมักแบบกึ่งแห้ง และเมื่อทดสอบความชอบของผู้บริโภคด้านประสาทสัมผัส พบว่าทั้งสี่ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยผู้ชิมมีแนวโน้มให้คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมเฉลี่ยไส้หมูแบบกึ่งแห้งมากที่สุด แต่คุณสมบัติด้านกลิ่น ผู้ชิมให้คะแนนความชอบไส้กรอกหมักไส้คอลลาเจนแบบกึ่งแห้งมากที่สุด เมื่อพิจารณาแล้วว่าไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้คอลลาเจนหมักแบบกึ่งแห้งมีแนวโน้มที่จะได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคในไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเทียบกับไส้กรอกอีสานที่ทำการหมักตามธรรมชาติ ทำการศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* Anatum ที่พบมากในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยศึกษาผลแบคแทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานร่วมกับกรดแลคติกของในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ระดับพีเอช 5.5 5.0 4.5 และ 4.0 พบว่า แบบจำลองไส้กรอกอีสานที่พีเอช 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นประมาณ 400 AU/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ตลอด 30 ชั่วโมงของการทดลอง สำหรับแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ระดับพีเอช 4.5 และ 4.0 ที่ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นประมาณ 400 AU/ml มีผลในการยับยั้ง *S.* Anatum ในชั่วโมงที่ 18 แต่ยังสามารถตรวจพบเชื้อเชื้อ *S.* Anatum ได้ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อทำการทดลองการยับยั้งเชื้อ *S.*Anatum ด้วยโซเดียมไนไตรทความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม และกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในแบบจำลองไส้กรอกอีสาน พบว่า เชื้อ *S.* Anatum ที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ถูกยับยั้งทำลายในช่วง 18 ชั่วโมงของการหมัก โดยรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ 3200 Au/ml และระดับพีเอช 4.24 (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก 0.53 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษาการใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (*Lb. plantarum* RS49) ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานเทียบกับไส้กรอกอีสานที่ทำการหมักตามธรรมชาติ ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในไส้กรอกอีสานตลอดระยะเวลาในการหมัก 2 วัน ปริมาณค่า MPN *Escherichia coli* มีปริมาณค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (< 3 MPN/g) การปนเปื้อนปริมาณ coagulase positive *Staphylococcus aureus* พบการปนเปื้อนในช่วงการหมักวันที่ 1 และตรวจไม่พบในช่วงการหมักวันที่ 2 พบการปนเปื้อนของยีสต์ 2 log cfu/ml ในวันที่ 2 ของการหมัก และไม่พบการปนเปื้อนของราเมื่อสิ้นสุดการหมัก เมื่อศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระหว่างกระบวนหมักไส้กรอกอีสานด้วยวิธี พีซีอาร์อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic, RAPD) ผลการศึกษาพบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้จากกระบวนการหมักแหนมวันที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 66.07 เปอร์เซ็นต์ คือ มีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 4 ขนาด โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 200 bp, 500 bp 700 bp และ 1500 bp เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธี triangle test พบว่าผู้บริโภคให้ผลการยอมรับไส้กรอกอีสานที่หมักทั้ง 2 แบบไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) จึงมีแนวโน้มในการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Lb. plantarum* RS49 มาใช้ในการพัฒนาด้านคุณภาพของไส้กรอกอีสานและทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากเชื้อ *S.* Anatum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of the ingredients of the Isan sausages and bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* RS49 on *Salmonella* Anatum during fermentation
Student	Miss Manlika Chaiwut
Student ID.	51608053
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2013
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Effect of types of casing (hog intestine and collagen casing) and fermentation methods (fresh and semi - dried fermentation) on Thai traditional fermented sausage (Sai – Krog Isan) made from Thai native beef were studied. For the fresh fermentation, after stuffing in the casing, the sausage was left to ferment at 30°C in sealed plastic bag for 2 days, whereas for the semi-dried fermentation at 30°C in 65% relative humidity chamber for 2 days and the samples were measured their lactic acid bacteria (LAB) growth, chemical properties and preferable acceptance of consumer. The results revealed that casing has no effect to the study measured. The fermentation methods, fresh fermentation showed increased of Aw and moisture content higher than semi-died fermentation in both casing. For the preferable acceptance among these four products, it was implied that there was no significantly difference. But panelists tended to prefer the taste, appearance, texture, and overall acceptance in the products stuffed in hog intestine casing with semidried fermentation but the odors preference was belonged to the product stuffed in collagen casing with semidried fermentation. Moreover, the preferable acceptance from producers also implied non-significantly difference among these four types of Isan sausages. The results, thus, implied the possibility of using collagen casing instead of hog intestine casing to produce these Isan sausages which using *Lb. plantarum* RS49 bacteriocin-producing as starters compare to natural fermentation Isan sausages. A study of the survival of the bacteria *Sal.* Anatum which most found in fermented meat. By using Isan sausages Model Broth (ISMB) to study the effect under different pH (5.5 5.0 4.5 and 4.0) in addition of crude bacteriocin produced from *Lb.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plantarum RS49. It was revealed that The Model Broth at pH. 5.0 and 5.5 with or without bacteriocin at the concentration of 400 AU/ml cannot inhibit *Sal.* Anatum within 30 hours of study, but ISMB at pH 4.5 with or without bacteriocin at the concentration of 400 AU/ml can diminish *Sal.* Anatum from the broth within 18 hours but still detected in 30 hours. The inhibition of *Sal.* Anatum with concentration of 10^4 cfu/ml in ISMB contained with 5% sterilized chopped fresh garlic, 100 ppm sodium nitrite and *Lb. plantarum* RS49 as starters at the concentration of bacteria 10^6 cfu/ml . The results revealed that *Sal.* Anatum was eliminated within 18 hours in ISMB. At this 18 hour of ISMB fermentation period, the concentration of bacteriocin in ISMB was 3200 AU/ml and pH of the broth was 4.24 (0.53 percent acidity).

An experiment of Isan sausages fermentation by using *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/g as starter culture compare to natural fermentation of Isan sausages. The study of *Salmonella* in Isan sausages revealed that no detection of *Salmonella* within 2 days of fermentation. The obtained results of MPN *Escherichia coli* in Isan sausages revealed that both of studied exhibited lower-standard number for MPN *Escherichia coli* (> 3 MPN/g). The study of coagulase positive *Staphylococcus aureus* revealed was not found to contaminate with coagulase positive *Staph. aureus* within 2 days of fermentation. The sample showed no detection of yeasts and molds in the end of fermentation. The detection of starter culture growth of *Lb. plantarum* RS49 during fermentation process of Isan sausages by PCR-RAPD technique. The results showed 4 distinct DNA bands of 200 bp, 500 bp 700bp and 1500 bp which were corresponding to DNA fingerprint of the starter culture. For the preferable acceptance among these two products by triangle test method, it was implied that there was no significantly difference. These results, thus, imply the potential of using *Lb. plantarum* RS49 as starters for Isan sausage production in order to improve both quality and safety of this product.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ผู้ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมถึงตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบรูณ์ อีกทั้งยังให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. กิตติชัย บรรจง และคณาจารย์คณะ อุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาและแนวคิดตลอดในการดำเนินงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์ และ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งใน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำนักงานกองสนับสุนนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเนื้อโคพื้นเมืองและเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณงานทุนการศึกษา สำนักทะเบียนและประมวลผล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนการทำวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีการศึกษา 2555

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้อง ๆ นักศึกษาปริญญาโท ปริญญาตรี นายจักรารัตน์ ติโลกวิชัย นางสาวสรัญญา เที่ยงธรรม นายชูเกียรติ แก้วสุข นายธีรธร ลิ้มสมบูรณ์ นาวสาวธิตินันท์ ชยวัชรกุล นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจตลอดการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อยัน เบห์เรนส์ คุณแม่ และครอบครัว สำหรับความรักความเอาใจใส่ สนับสนุนช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ประโยชน์อันใดที่ได้จากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

มัลลิกา ไชยวุฒิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญภาพ.....ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 บทนำ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตไส้กรอกอีสาน.....4
2.2 ส่วนผสมที่ทำให้เกิดการหมักของไส้กรอกอีสาน.....5
2.3 การบรรจุ.....10
2.4 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเนื้อสัตว์.....11
2.5 การใช้กล้าเชื้อในอาหารหมัก.....12
2.7 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก.....14
2.8 แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus*.....19
2.9 *Lactobacillus plantarum*.....19
2. 10 *Salmonella* spp.....20
2.11 หลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส Polymerase chain reaction (PCR).....20
2.12 องค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส.....22
2.13 เอแอฟแอลพี (AFLP, Amplified fragment length polymorphism).....24
2.14 พีซีอาร์อาร์เอพีดี.....24
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....25
บทที่ 3อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....27
3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานเนื้อโค.....27
3.2 ไส้ที่ใช้บรรจุส่วนผสมไส้กรอกอีสานเนื้อโค.....27
3.3 เชื้อจุลินทรีย์.....27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ 28
3.5 สถานที่ทำการทดลอง 31
3.6 วิธีการดำเนินการทดลอง 31
3.6.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 31
3.6.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา 32
3.6.3 การเตรียม Isan Sausage Model Broth (ISMB) 32
3.6.4 ศึกษาการควบคุมสภาวะการหมักต่อสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา เคมี บางประการและความชอบของผู้บริโภคต่อคุณภาพของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคที่ใช้ไส้คอลลาเจนและไส้หมูสด 32
3.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantarum* RS49 34
3.6.6 การศึกษาการใช้กรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้งเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 34
3.6.7 ศึกษาผลของไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้ง *Sal.* Anatum ในแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 35
3.6.8 การศึกษาคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน 36
3.6.9 ตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกในการหมักไส้กรอกอีสาน โดยเทคนิค PCR-RAPD 37
3.6.10 การประเมินคุณภาพไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 39
บทที่ 4ผลการทดลองและวิจารณ์ 40
4.1 ผลการควบคุมสภาวะการหมักต่อสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา เคมีบางประการและความชอบของผู้บริโภคต่อคุณภาพของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคที่ใช้ไส้คอลลาเจนและไส้หมูสด 40
4.1.1 ผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสาน 40
4.1.2 ผลการวิเคราะห์ ความชื้นของผลิตภัณฑ์ และปริมาณน้ำอิสระ 41
4.1.3 การวิเคราะห์ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก 43
4.1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantarum* RS49 45
4.3 ผลของกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้งเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอก 46
4.3.1 ผลการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 46
4.3.2 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 48
4.4 ผลไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้ง *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 49
4.4.1 ผลของไนไตรทในการยับยั้ง *Sal.* Anatum ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 50
4.4.2 ผลของกระเทียมในการยับยั้ง *Sal.* Anatum ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 51
4.4.3 ผลของการใช้ไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 52
4.4.4 ผลการเจริญของ *Lb. plantarum* RS49 ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นกรดแลคติกในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 54
4.4.5 ผลศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Lb.* plantarum RS 49 ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีเชื้อ *S.* Anatum 56
4.4.6 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 58
4.5 การศึกษาคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมัก 60
4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก 60
4.5.2 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกและพีเอชในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน 60
4.5.3 ผลการศึกษาค่า Aw ในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก 61
4.5.4 ผลการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ห้ามพบในส่วนผสมไส้กรอกอีสาน 62
4.6 ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติก *Lb. plantarum* RS49 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานโดยเทคนิค PCR-RAPD 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.7 ผลการประเมินคุณภาพไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 70
5.1 สรุปผลการทดลอง 70
5.2 ข้อเสนอแนะ 70
บรรณานุกรม 71
ภาคผนวก 80
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 81
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี 90
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ทางชีวภาพ 92
ภาคผนวก ง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก 98
ภาคผนวก จ ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก 100
ภาคผนวก ฉ แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส 109
ประวัติผู้เขียน 111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 สูตรการผลิตไส้กรอกอีสานเนื้อโค 10 กิโลกรัม 33
3.2 สารต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 38
4.1 ค่าเฉลี่ยทางสถิติของไส้ที่ใช้บรรจุต่อสมบัติด้านต่างๆ 40
4.2 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานเนื้อโคพื้นเมืองที่บรรจุในไส้หมูสดและไส้คอลลาเจนทำการหมักที่สภาวะต่างกัน 44
4.3 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับค่าพีเอชที่ 4.0 และ4.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน 48
4.4 การผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลก *Lb. plantarum* RS49 ระหว่างกระบวนการหมักในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีการศึกษาเชื้อ *Sal.* Anatum 57
4.5 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นและไนไตรท ร่วมและไม่ร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 59
4.6 การวิเคราะห์ค่า Aw ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน 62
4.7 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน 63
4.8 ผลการเลือกตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่มีความแตกต่าง 69
ภาคผนวก ค-1 ตารางเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา 93
ภาคผนวก ง- 1 ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 0 ของการหมัก 101
ภาคผนวก ง-2 ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 2 ของการหมัก 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 การแตกตัวให้สารไนตริกออกไซด์ของไนเตรท 6
2.2 : Alliin + Allinase enzyme and water = Allcin + Pyruvate 9
2.3 วิถีทางเคมีการหมักของแบคทีเรียแลคติก 14
2.4 รูปแบบจำลองการผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน 18
2.5 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 22
4.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูในระหว่างการหมักและการเก็บรักษาในตู้เย็น 41
4.2 ค่าความชื้น และปริมาณน้ำอิสระของไส้กรอกอีสานในระหว่างการหมักและเก็บรักษาในตู้เย็น 42
4.3 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของไส้กรอกอีสานในระหว่างการหมักและเก็บรักษาในตู้เย็น 43
4.4 ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* RS49 ที่มีผลต่อ *Lb. sakei* (JCM 1157^{T}) 45
4.5 ผลของค่าพีเอชและแบคเทอริโอซินต่อเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 47
4.6 ผลของไนไตรทและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 51
4.7 ผลของกระเทียมและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 52
4.8. ผลของไนไตรทร่วมกับกระเทียมและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *Sal.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 53
4.9 ผลของไนไตรทและกระเทียมต่อปริมาณเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน 55
4.10 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีการเติมเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 55
4.11 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน 61
4.12 การเปลี่ยนแปลงพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแยกได้ในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในกระบวนการหมักวันที่ 0 เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 64

4.14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแยกได้ในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในกระบวนการหมักวันที่ 2 เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 65

4.15 เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของการทำพีซีอาร์ – อาร์เอพีดี ของโคโลนีที่สุ่มในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานวันที่ 0 66

4.16 เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของการทำพีซีอาร์ – อาร์เอพีดี ของโคโลนีที่สุ่มในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานวันที่ 2 67

ภาพที่ ก.1 ตัวอย่างแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) 89

ภาพที่ ง. 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder plus 98

ภาพที่ ง. 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก 98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักเนื้อพื้นบ้านทางภาคตะออกเฉียงเหนือ หมักจากเนื้อดิบซึ่งส่วนใหญ่เป็นเนื้อหมู ปัจจุบันมีการใช้เนื้อโคในการผลิตแทนเนื้อหมูอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าทางตลาดให้กับเนื้อโค จากรายงานการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารในเนื้อโคดิบและผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonella) (สุมาลี บุญมา และคณะ, 2539; อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2549; พรศิริ พรหมกิ่งแก้ว และ อนิรุธ เนื่องเม็ก, 2548) โดยสายพันธุ์ที่มักตรวจพบในอาหารหมักเนื้อคือ *Salmonella* Anatum (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533; อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ, 2538) และเชื้อซัลโมเนลลายังสามารถปนเปื้อนมากับไส้หมูสดที่ใช้ในการบรรจุส่วนผสมสำหรับไส้กรอกอีสาน (บันฑูรย์ ตระการวีระเดช, 2550) ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาในไส้กรอกอีสานจึงมีสาเหตุมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาที่ติดมากับสำไส้หมูไปยังไส้กรอกอีสาน ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาการใช้ไส้สังเคราะห์หรือไส้คอลลาเจนที่รับประทานได้ ผลิตจากหนังสัตว์หรือส่วนคอเรียมของลำไส้ทดแทนการใช้ไส้หมูสดในการบรรจุส่วนผสม (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

ในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานจะอาศัยแบคทีเรียแลคติกที่ติดมากับวัตถุดิบและแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารเพื่อสร้างกรดแลคติก ทำให้ได้ไส้กรอกที่มีรสชาติออกเปรี้ยว (รุจริน ลิ้มศุภวานิช และจุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2552) ไม่เหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทั้งที่เป็นอันตรายและทำให้อาหารเน่าเสีย สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่มักพบในอาหารหมักเนื้อ คือ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนกรดและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Food safety and section service n, 2005) การผลิตไส้กรอกอีสานทั่วไปมักเป็นการปล่อยให้เกิดการหมักตามธรรมชาติไม่มีการควบคุมทางสุขลักษณะและอุณหภูมิที่เหมาะสม มีข้อเสียคือผลิตผลที่ได้อาจเกิดการเสื่อมเสียและมีโอกาสปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอันตราย รวมทั้งทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นการควบคุมสภาวะการหมักจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการส่งเสริมเพื่อให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (ธีรพร กงบังเกิด, 2546) เชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนอยู่ในไส้กรอกอีสานและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอื่นๆ มักจะถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยกรดแลคติกและสารยับยั้งต่างๆ ที่กลุ่มแบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นระหว่างการหมัก ในประเทศไทยมีผู้ทำการศึกษาคัดแยกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคเทอริโอซินและเกี่ยวข้องในกระบวนหมักอาหารหมักหลายชนิด ได้แก่ แหนม หม้ำ แหนมปลาส้ม และไส้กรอกอีสาน โดยมีรายงานการตรวจพบเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆ เช่น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ผลิต Pediocin PA-1 และ *Lactococcus lactis* N100 ผลิต Nisin Z จากแหนม (Swetwiwathana, 2005) และ *Lactobacillus plantarum* RS49 ผลิต Pediocin-like bacteriocin จากไส้กรอกอีสาน (Swetwiwathana *et al.*, 2007) เป็นต้น แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น และแกรมลบบางชนิด เช่น *Escherichia coli*, Campylobacter และ *Salmonella* (Chen and Hoover, 2003) แต่ฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น กรดแลคติกที่มีความเข้มข้นสูง จะช่วยทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบให้ถูกทำลายเร็วขึ้น (Swetwiwathana *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Swetwiwathana *et al.* (2004) รายงานว่า การเติมกระเทียมลงในแบบจำลองแหนมร่วมกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (Nham model broth, NMB) มีผลทำให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลาการหมักและส่งเสริมการผลิต Pediocin PA-1 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ NMB สูตรอื่น แต่เนื่องจากมีรายงานว่าในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แบคเทอริโอซินมักถูกยับยั้งการทำงานจากเอนไซม์กลูตาไทโอน (Glutathione, GSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ (Rose *et al.*, 1999) เอนไซม์ GSH สามารถทำปฏิกิริยากับแบคเทอริโอซิน กลุ่มไนซิน (Nisin) ทำให้ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อของไนซินลดลง (Gross and Morell, 1971) แต่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของแบคเทอริโอซินกลุ่ม Pediocin และ Plantaricin W (Tilokavichai *et al.*, 2011) Pediocin จึงเป็นแบคเทอริโอซินที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากมีรายงานการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยเฉพาะแหนม แต่ยังไม่พบรายงานการนำเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ซึ่งผลิต Pediocin-like bacteriocin มาเป็นกล้าเชื้อในการหมักเพื่อดูผลการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในไส้กรอกอีสาน ที่อาจต้านการยับยั้งจากเอนไซม์ GSH อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus* ได้ (ณัฐธิดา แป่วกระโทก, 2554; Vatanyoopaisarn *et al.*, 2011) ด้วยเหตุนี้การศึกษานี้จึงได้นำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม Pediocin-Like bacteriocin ที่คัดแยกได้ไส้กรอกอีสานซึ่งก็คือ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อควบคุมคุณภาพของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้คอลลาเจนให้สม่ำเสมอและมีความปลอดภัยจากเชื้อ *S.* Anatum รวมถึงศึกษาคุณภาพอื่นๆของไส้กรอกอีสาน ได้แก่ ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก เป็นต้น ในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน และนำเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ทดลองหมักในไส้กรอกอีสานจริงเปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานที่ไม่เติมกล้าเชื้อเพื่อทดสอบความชอบของผู้บริโภคต่อไส้กรอกอีสานที่ใช้เชื้อดังกล่าวเป็นกล้าเชื้อในการผลิตเทียบกับไส้กรอกอีสานที่หมักตามธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับในอนาคต รวมไปถึงยังเป็นอาหารทางเลือกใหม่ให้กับผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาแนวโน้มความชอบของผู้บริโภคต่อของไส้กรอกที่บรรจุในไส้คอลลาเจนและไส้หมูในการหมักแบบเปียกและแบบกึ่งแห้ง

1.2.2 เพื่อตรวจสอบยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินระหว่างการหมักไส้กรอกในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

1.2.3 เพื่อตรวจสอบยืนยันการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

1.2.4 เพื่อศึกษาคุณภาพของไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49 ในการหมัก

1.2.5 เพื่อทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Lb. plantarum* RS49 เทียบกับไส้กรอกอีสานที่หมักตามสูตรทั่วไป โดยพิจารณาใช้ไส้สำหรับบรรจุจากผลในวัตถุประสงค์ข้อ 1.2.1

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโรคอาหารเป็นพิษ *S.* Anatum รวมไปถึงสามารถลดระยะเวลาในการหมักไส้กรอกอีสานเพื่อให้จำหน่ายได้เร็วและปลอดภัย

1.3.2 สามารถนำคุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อของไทยให้ปลอดภัยโดยไม่ต้องพึ่งกล้าเชื้อจากต่างชาติ

1.3.3 พัฒนาอาหารหมักพื้นบ้านของไทยให้มีความหลากหลายและเป็นอาหารทางเลือกใหม่ของผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตไส้กรอกอีสาน (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

ไส้กรอกอีสาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักแบบเปรี้ยว (Fermented meat product) พื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ผลิตจากเนื้อหมูหรือเนื้อวัวติดมันที่มีคุณภาพปานกลาง โดยนำเนื้อบดละเอียดพอประมาณ ผสมกับเครื่องปรุงและอาจมีการเติมมันแข็งบดละเอียดเพื่อให้ไส้กรอกนุ่มขึ้น นวดผสมให้เข้ากันและนำเข้าเครื่องบรรจุไส้ สามารถบรรจุในไส้หมูหรือไส้ชนิดอื่นที่บริโภคได้ มัดด้วยเชือกเป็นปล้องขนาด 1-3 นิ้ว แขวนราวหมักในอุณหภูมิห้อง 2-3 วัน (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2546) ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักเปรี้ยวนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรสเปรี้ยวเนื่องจากเกิดการหมักของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อตามธรรมชาติต่อน้ำตาล ข้าว และโปรตีนในส่วนผสมเนื้อ ทำให้เกิดกรด และค่าพีเอช ลดลงเป็น 4.5-5.6 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบว่ามีบทบาทต่อการผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ ได้แก่

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus brevis

Lactobacillus leichannii

Leuconostoc mesenteroides

Pediococcus cerevisiae

ในระยะแรกของการหมักมักพบ *P. cerevisiae* ต่อมาพบ *Lactobacillus* spp. เจริญมากในช่วงหลัง ไส้กรอกอีสานมักทำให้สุกโดยการปิ้ง ย่าง ทอดหรือ อบ ก่อนนำมารับประทาน

2.1.1 คุณลักษณะที่ต้องการของไส้กรอกอีสาน (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2546)

2.1.1.1 ลักษณะทั่วไป ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องมีรูปทรงเดียวกัน และมีขนาดใกล้เคียงกัน มีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ มีผิวเรียบ ไม่ฉีกขาด

2.1.1.2 ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้

2.1.1.3 ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักและของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น

2.1.1.4 ลักษณะเนื้อต้องนุ่มและไม่ร่วน

2.1.1.5 ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 จุลินทรีย์ก่อโรคตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (2546)

2.1.2.1 ซัลโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

2.1.2.2 *Staphylococcus aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม

2.1.2.3 *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.1.2.4 ยีสต์และรา ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.2 ส่วนผสมที่ทำให้เกิดการหมักของไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสานมีส่วนผสมที่สำคัญหลายอย่างที่ทำให้ไส้กรอกอีสานมีลักษณะพิเศษในด้านกลิ่นรส และเนื้อสัมผัสดังนี้

2.2.1 เนื้อสัตว์

เมื่อสัตว์ตายการไหลเวียนของเลือดหยุดลงกล้ามเนื้อจึงต้องสลับเปลี่ยนจากการเผาผลาญอาหารเป็นแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic metabolism) และสาร ATP จะสลายไปไกลโคเจนในกล้ามเนื้อจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกพีเอชจะลดลง ยิ่งมีไกลโคเจนมากก็จะมีการผลิตกรดแลคติกมาก ซึ่งจะทำให้ความเป็นกรดลดลงอยู่ที่ระดับที่ยอมรับได้คือพีเอชระหว่าง 5.3 ถึง 5.7 หากสัตว์มีไกลโคเจนไม่เพียงพอกรดแลคติกที่ผลิตได้จะไม่มาก เนื้อจึงยังมีพีเอชสูงอยู่ที่ประมาณ 6.0-7.0 หรือสูงกว่า ทำ ให้มีสีคล้ำ เนื้อสัตว์ในลักษณะเช่นนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาผลิตไส้กรอกหมัก เนื่องจากอุ้มน้ำไว้มาก มีผลทำให้ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียได้ง่ายกว่าเนื้อที่มีพีเอชต่ำ (กรมปศุสัตว์, 2551)

2.2.2 ไขมัน (สุมณฑา วัฒนสินธุ, 2545)

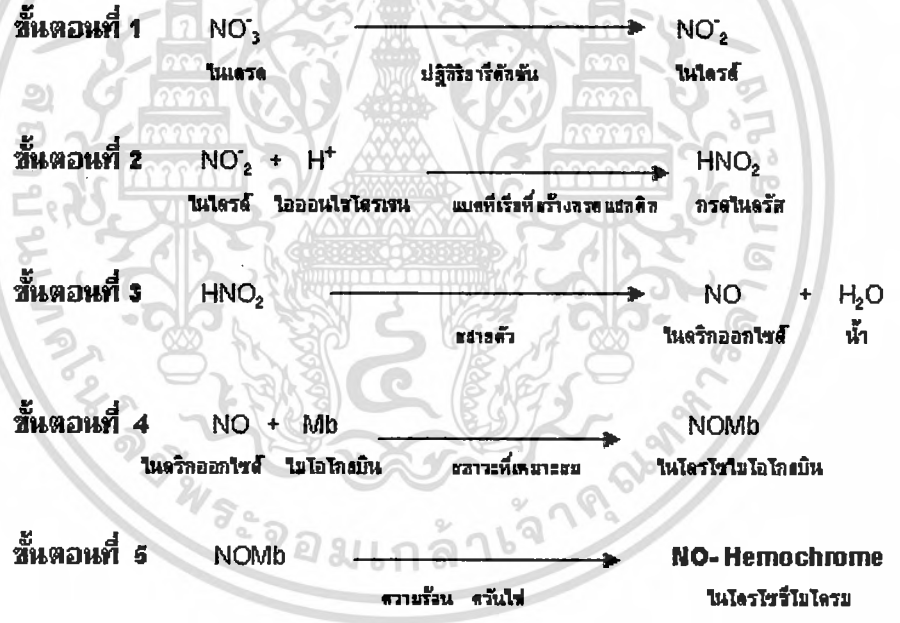
การผลิตไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้งที่ต้องการเก็บไว้นาน ต้องเติมไขมันแข็งที่มีจุดหลอมเหลวสูง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว ไขมันจากแผ่นหลังสุกรได้รับความนิยมมากที่สุด ทำให้ได้ไส้กรอกหมักที่มีคุณภาพดี ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวไม่ควรเกิน 12 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันทั้งหมด ปริมาณเปอร์ออกไซด์ในเนื้อเยื่อไขมันต้องควบคุมให้ต่ำสุด ทำได้โดยการแช่แข็งไขมันทันทีหลังจากฆ่า และหลีกเลี่ยงการใช้ไขมันที่เก็บรักษาโดยการแช่แข็งเป็นเวลานาน เนื่องจากสามารถเกิดการเหม็นหืนเกิดขึ้นจากการออกซิไดส์ของไขมัน เนื้อที่มีไขมันประเภทอิ่มตัวอยู่มาก เช่น เนื้อวัวและเนื้อแกะจะมีความต้านทานต่อการเหม็นหืนได้ดีกว่าเนื้อที่มีไขมันประเภทไม่อิ่มตัวอยู่มาก เช่น เนื้อหมู ดังนั้นการปกปิดผิวหรือบรรจุหีบห่อที่ป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจนก็ช่วยชะลอการเหม็นหืนได้ (นภัสรพี เหลืองสกุล, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ไนเตรท (Nitrate) และไนไตรท (Nitrite) (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

สารไนไตรทที่ใช้ส่วนมากใช้ในรูปของโซเดียมไนไตรท โซเดียมไนเตรท หรือโปตัสเซียมไนเตรท จุดประสงค์การใช้เพื่อให้ได้สีชมพูที่มีความคงตัว ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อมีรสชาติดีและมีผลป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ *Clostridium* spp. ไนไตรทยังทำหน้าที่เป็นสารกันการเหม็นหืนในไขมันของผลิตภัณฑ์ สำหรับการใช้เกลือไนเตรทนั้นมักจะใช้ร่วมกับเกลือไนไตรท โดยจะใช้ผลิตภัณฑ์ประเภทหมักแห้งที่ใช้เวลาการหมักนาน ๆ เช่น dry cured meat และไม่นิยมใช้แต่เกลือไนเตรทเพียงอย่างเดียว เพราะไนเตรทไม่มีผลโดยตรงในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หรือมีน้อยมากต่อเชื้อจุลินทรีย์ กลุ่ม micrococci ที่สามารถเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรทได้เสียก่อน จึงจะมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี (รุจริน ลิ้มศุภวานิช และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2552)

บทบาทของเกลือไนเตรทและไนไตรทต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื่องจากการแตกตัวให้สาร ไนตริก ออกไซด์ เพื่อทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบินดังปฏิกิริยา ตามขั้นตอนที่แสดงดังภาพที่ 2.1 ต่อไปนี้



ภาพที่ 2.1 การแตกตัวให้สาร ไนตริกออกไซด์ของไนเตรท

ที่มา : Kramich *et al.* (1973)

ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อมักใช้เกลือไนไตรทในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเนื่องจากความลำบากในการชั่งเกลือไนไตรทในปริมาณน้อย ๆ ให้มีความถูกต้อง จึงมีการผสมเกลือไนไตรทเข้ากับเกลือบริโภค (nitrite salt) ออกจำหน่าย จึงมีการผสมเกลือไนไตรทเข้ากับเกลือบริโภค (nitrite salt) ออกจำหน่ายเพื่อความสะดวกในการชั่งตวงและการใช้ ซึ่งส่วนผสมนี้มีชื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกทางการค้าต่างกันไป โดยทั่วไปจะมีส่วนผสมของเกลือไนไตรทประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง นี้ขึ้นกับข้อกำหนดของแต่ละประเทศ สำหรับในประเทศไทยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนระบุว่า ส่วนผสมของเกลือไนไตรทเรียกว่า ผงเพรก จะมีปริมาณเกลือบริโภค 94 ส่วน และเกลือไนไตรท 6 ส่วน โดยกำหนดให้ใช้ ผงเพรกได้ในปริมาณ 2 กรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม เช่น ในการผลิตแหนมเนื้อ เป็นต้น (รุจริน ลิ้มศุภวานิช และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2552) การใช้เกลือไนไตรทนั้นจะต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมาก เนื่องจากการใช้ในปริมาณมากเกินไปเพียงเล็กน้อยสามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (2547) กำหนดให้ใช้เกลือไนไตรทในปริมาณไม่เกิน 125 ppm (12 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม)โดยคำนวณเป็นปริมาณโซเดียมไนไตรทและการใช้เกลือไนเตรทในผลิตภัณฑ์เนื้ออยู่ที่ปริมาณไม่เกิน 500 ppm (500 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม) โดยคำนวณเป็นปริมาณโซเดียมไนเตรท หากใช้เกินกำหนดจะมีโอกาสเสี่ยงต่อปัญหาของการตกค้างในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าไนไตรทตกค้างนี้จะทำปฏิกิริยากับกลุ่ม เอมีน (amines) ในเนื้อสัตว์ และเปลี่ยนเป็นสารไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง (ศูนย์ข้อมูลด้านอาหาร, 2552)

2.2.4 ฟอสเฟต (Phosphate) (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

ฟอสเฟตเป็นสารประกอบที่ใช้เติมในน้ำหมักเนื้อเพื่อวัตถุประสงค์คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-binding capacity) ทำให้เนื้อไม่สูญเสียน้ำหนักมากเกินไปขณะร้อน เนื้อมีความนุ่มและชุ่มน้ำเพิ่มขึ้นและมีรสชาติดี บทบาทของสารฟอสเฟตที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อ คือ

2.2.4.1 การเพิ่มความนุ่ม

โดยเป็นตัวทำให้ค่าพีเอชของเนื้อเพิ่มขึ้นและช่วยให้โปรตีนของกล้ามเนื้อคลายตัว เนื่องจากสารเอคโตไมโอซินแยกออกจากกันเป็นแอคติน และไมโอซิน สารฟอสเฟตที่ใช้ในด้านนี้ คือ พวกไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate)

2.2.4.2 การเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ

โดยทำให้เส้นใยโปรตีนยืดตัวล้อมรอบโมเลกุลน้ำ พบว่าเกลือของกรดอ่อนให้คุณสมบัติได้ดีในข้อนี้คือ โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate)

2.2.4.3 เพิ่มรสชาติ

โดยการทำให้โมเลกุลของเนื้อสานกันเป็นตาข่าย สามารถกันกั้นไม่ให้เลือดและของเหลวในเนื้อไหลออกมา เนื้อจึงมีรสชาติดีขึ้น

2.2.4.4 ช่วยให้โมเลกุลเนื้อยึดเกาะกันดี

โดยการดึงโมเลกุลโปรตีนที่ละลายน้ำได้มารวมตัวกันทำให้เนื้อเหนียวและยืดหยุ่นดีขึ้น นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.5 ช่วยให้สีคงทน

โดยทำหน้าที่ควบคุมพีเอช ให้อยู่ในช่วง pH 6.0 - 6.6 จึงทำให้เนื้อมีสีแดงคงทนดีขึ้น ผงฟอสเฟตสำเร็จรูปที่ใช้เติมลงในอาหาร (Food grade phosphate) อาจมีฟอสเฟตตั้งแต่ 1 ชนิด เช่น ไตรโซเดียมโพลีฟอสเฟต (trisodium polyphosphate) จนถึงหลายชนิด เช่น โซเดียมโพลีฟอสเฟต (sodium polyphosphate) มีรายงานว่าฟอสเฟตมีกิจกรรมต้าน *Clostridium botulinum* โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับไนไตรท สารละลายฟอสเฟตทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองมีผลต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารละลายฟอสเฟตที่ทำให้ปราศเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกไวต่อการถูกยับยั้งโดยฟอสเฟตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2553)

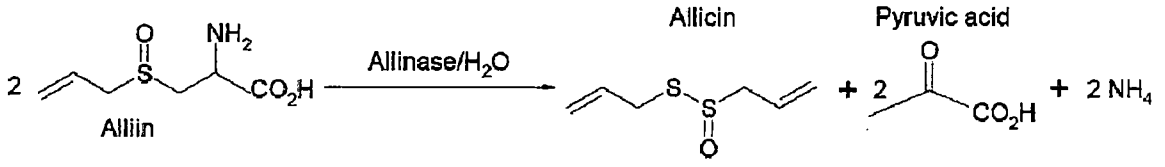
2.2.5 กระเทียม (Garlic)

กระเทียมเป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นอยู่ใต้ดิน เรียกว่า หัว หัวกระเทียมประกอบด้วยกลีบหลายกลีบรวมกัน มักมี 8-12 กลีบ โดยมีเปลือกหุ้มหลายชั้น สีขาวออกชมพู หรือสีขาวอมม่วง เนื้อกระเทียมจะมีสีขาว มีกลิ่นฉุนและรสเผ็ดร้อน นิยมใช้พันธุ์ *Allium sativum* ในการประกอบอาหารและทำยา (จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน, 2539) กลิ่นเฉพาะตัวของกระเทียมเกิดจากน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบของกำมะถัน (sulphur) อยู่มาก แต่ไม่มี oxygen น้ำมันระเหยง่ายนี้มีอยู่ไม่ต่ำกว่า 0.9 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยไดอัลลิล ไดซัลไฟด์ (diallyl disulphide) และอัลลิลโพรพิลไดซัลไฟด์ (allylpropyl disulphide) ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดอย่าง และมีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ด้วย (สมพร ภูติยานันท์, 2542)

2.2.5.1 สารสำคัญในกระเทียม

Cavallito และ Bailey (1944) ได้วิเคราะห์สารต้านแบคทีเรียจากกลีบกระเทียมบด ซึ่งเป็นสารประกอบพวกซัลไฟด์ ชื่อว่า อัลลิซิน (allicin) เป็นสารที่ไม่มีสีละลายน้ำได้และมีอยู่น้อยมาก ในสูตรโครงสร้างจะมีซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบ ทำให้อัลลิซินมีกลิ่นฉุนเป็นกลิ่นที่ได้จากการหั่นหรือสับกระเทียม (จเร จรัสจรูญพงศ์, 2550) ต่อมา Stall and Seebeck (1951) ได้วิเคราะห์โครงสร้างและปฏิกิริยาของสารประกอบซัลไฟด์ไว้ ตามภาพที่ 2.2 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 : Alliin + Allinase enzyme and water = Allcin + Pyruvate

ที่มา : Stall and Seebeck (1951)

อัลลิอิน (alliin) เป็นกรดอะมิโนพบในกระเทียมสดมีประมาณ 0.25-1.15 เปอร์เซ็นต์ อัลลิซินได้มาจากการสลายตัวของ อัลลิอินเมื่อเซลล์แตกออกจากการทุบหรือสับกระเทียม และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อัลลิเนส (alliinase) ซึ่งถูกแยกกันด้วยเนื้อเยื่อบางๆ (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2554) อัลลิซินเป็นสารที่ไม่คงตัว จะสลายตัวช้าหรือเร็วขึ้นกับสภาวะแวดล้อม

อัลลิซิน ซึ่งเป็นสารสำคัญในกระเทียมสามารถรวมตัวกับวิตามินบี 1 ได้เป็น allithiamine เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์แล้วจึงแตกตัวเป็นวิตามินบี 1 และอัลลิซินมีคุณสมบัติรวมกับโปรตีนได้ คุณสมบัตินี้เองที่ทำให้กระเทียมเป็นยาปฏิชีวนะได้ จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในวงกว้าง หลายตัวทั้งกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก เช่น *Staphylococus*, *Streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, Coryne *bacterium diptheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhi, *Shigella dysenteriae* รวมทั้งแบคทีเรียที่ไวต่อกรดอย่าง *Mycobacterium tuberculosis* ก็สามารถถูกยับยั้งโดยกระเทียม (Uchida *et al.*, 1975) เพราะอัลลิซินจะไปรวมกับโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียจึงสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นๆได้ (สมพร ภูติยานันท์, 2542) สารสกัดจากกระเทียมสาสามารถป้องกันการสร้างเอนเทอโรทอกซิน A, B และ C1 รวมทั้งเอนไซม์ thermonuclease ของ *Staphylococus* (Gonzalez-Fandos *et al.*, 1994)

2.2.5.2 กลไกการทำงานของอัลลิซิน

อัลลิซินสามารถยับยั้งการทำงานเอนไซม์ของแบคทีเรีย เช่น เอนไซม์สังเคราะห์ซิติลโคเอ ไคเนสที่ประกอบด้วยอะซิเตท และเอนไซม์สังเคราะห์ฟอสโฟอะซิติลโคเอ (Focke *et al.*, 1990) อัลลิซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *Sal.* Typhimurium ได้บางส่วนโดยเฉพาะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน แต่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นเป้าหมายแรกของอัลลิซินในการทำลายแบคทีเรีย

2.2.6 เครื่องปรุงอื่นๆ

การเติมเครื่องเทศช่วยเพิ่มกลิ่น สี และรสชาติแก่อาหารทำให้อาหารน่ารับประทานขึ้น เป็นการช่วยถนอมอาหารและช่วยกลบกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ออกไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องเทศที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน (ธเนศ อิสระมงคลพันธุ์และวิไลลักษณ์ อิสระมงคลพันธุ์, ม.ป.ป.) คือ

2.2.6.1 พริกไทยขาวป่น นิยมใส่ในผลิตภัณฑ์เนื้อทุกประเภท

2.2.6.2 ผงชูรส (Monosodium glutamate, MSG) ผงชูรสที่ใช้ควรมีเกลือโซเดียมบริสุทธิ์ของกรดกลูตามิคถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และผลิตมาจากวัตถุดิบของพืช เช่น ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวโพด และ sugar beet ผงชูรสไม่ให้กลิ่นแต่จะช่วยเพิ่มรสชาติตามธรรมชาติแก่ผลิตภัณฑ์หลายอย่างและสามารถปกปิดรสชาติบางอย่างที่ไม่เป็นที่ต้องการด้วย

2.2.6.3 น้ำตาลทราย (Sugar) ในการทำไส้กรอกอีสานน้ำ ตาลทรายมีสมบัติเป็นสารกันเสียทางอ้อมคือ ในการหมักจะเกิดกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลเป็นอาหารของแลคติกแบคทีเรีย ทำให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้น น้ำในผลิตภัณฑ์ลดลงและทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัว

2.3 การบรรจุ

ให้บรรจุไส้กรอกอีสานในไส้บรรจุที่สะอาด แห้ง ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้ ไส้ที่ใช้บรรจุมี 2 แบบ (อิ่มเอิบ พันสด, 2549) คือ

2.3.1 ไส้ธรรมชาติ

หมายถึง ไส้บรรจุที่ทำมาจากลำไส้หรือส่วนของสัตว์ที่มีรูปร่างแน่นอน มีความคงทนตลอดทุกขั้นตอนของการทำผลิตภัณฑ์นั้นๆ ได้แก่ ไส้หมู หลอดคอวัว หรือไส้แพะ ไส้ธรรมชาตินี้ มีคุณสมบัติดีคือ สามารถ รมควันให้มีกลิ่นหอม แต่ไม่มีคุณสมบัติในการป้องกันความชื้น ไส้บรรจุธรรมชาตินี้มีคุณสมบัติที่ปล่อยให้ความชื้นและควันไฟซึมเข้าภายในเนื้อไส้กรอกได้ง่ายมาก และนอกจากนั้นมันยังสามารถหดตัวได้ จึงทำให้ไส้รัดแนบเข้ากับเนื้อได้อย่างสนิทมาก จนอาจสูญเสียความชื้นได้ง่ายกว่าไส้สังเคราะห์ (อุมาพร ศิริพินทุ์, 2546)

2.3.2 ไส้สังเคราะห์

เป็นไส้ที่ทำจากวัตถุพวกซาราน และโพลีเอททีลีน เช่น ไส้บรรจุคอลลาเจน ข้อดีของไส้สังเคราะห์ คือมีคุณสมบัติสามารถเก็บความชื้นได้แต่ในการรมควัน ควันไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ มีความแข็งแรงสม่ำเสมอและหดรัดตัวได้อย่างเหมาะสม (อุมาพร ศิริพินทุ์, 2546)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนธรรมชาติที่พบมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในร่างกาย ถูกดูดซึมได้ง่ายและปลอดภัยต่อร่างกาย สามารถรับประทานได้จึงเหมาะสำหรับเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหาร แม้ว่าไส้คอลลาเจนจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปรรูป จึงมีการเข้าใจผิดว่าเป็น ไส้เทียม เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตไส้บรรจุได้มาจากส่วนเนื้อเยื่อ ส่วนโคเรียมพบได้ชั้นเยื่อเมือกย่อยหนังเนื้อโคที่ยังประกอบด้วยคอลลาเจน

2.4 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักเนื้อสัตว์ (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

การถนอมอาหารโดยอาศัยจุลินทรีย์เป็นตัวช่วยในการย่อยสลาย หรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบในระหว่างการหมัก ของสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และ สารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยการกระทำของจุลินทรีย์ และหรือจากการกระทำของเอนไซม์จากอาหารที่ใช้ในการหมักผลจากการหมัก ดังนี้ (สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์, 2537; อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

2.4.1 การเกิดรสชาติของกรด (acid taste)

เนื่องจากเกิดการหมักของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ตามธรรมชาติกับน้ำตาล ข้าวและโปรตีน ได้เป็นกรดหลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก ซึ่งจะทำให้อาหารมีรสเปรี้ยวและความเป็นกรดเพิ่มขึ้น

2.4.2 การเกิดสีแดงของเนื้อจากสารไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin)

เนื้อสัตว์เกิดสีได้เนื่องจากไนเตรทและไนไตรทที่สามารถทำปฏิกิริยาให้เกิดสีเป็นสารสีแดงที่เรียกว่า ไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) แต่หากถูกความร้อนจนอุณหภูมิสูงถึง 54–60 °ซ ไนโตรโซไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นสารสีชมพูที่คงทนที่เรียกว่า ไนโตรโซฮีโมโครม (nitrosohemochrome) ซึ่งเป็นสีของผลิตภัณฑ์เนื้อทั่วไป ดังแสดงภาพที่ 2.1

2.4.3 การย่อยสลายไขมัน (lipolysis)

ไขมันในเนื้อสัตว์ที่ใช้บริโภคมี 3 ประเภทคือ (Drake, 2006)

1. ไขมันที่อยู่ใต้ผิวหนังหรือไขมันภายนอกที่ครอบคลุมด้านนอกของซาก
2. ไขมันที่แทรกระหว่างกล้ามเนื้อ
3. ไขมันหรือกล้ามเนื้อหินอ่อนที่พบภายในกล้ามเนื้อ

ริ้วลายที่มองเห็นของไขมันที่แทรกในกล้ามเนื้อแสดงถึงความอร่อยและความชุ่มฉ่ำของเนื้อเกิดจาก

1. การเปลี่ยนแปลงกรดไขมัน ระหว่างการปรุงอาหารและผลิตสารประกอบที่มีรสชาติ
2. ไขมันทำหน้าที่เป็นโกดังสำหรับสารประกอบอะโรมาติกที่จะถูกปล่อยออกมาในระหว่างการปรุง รสชาติของเนื้อมาจากสารประกอบอะโรมาติกเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 เกิดกลิ่น รส จากสารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น

โดยมีรสชาติที่เกิดได้จากแบคทีเรียแลคติกที่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคสกรดแลคติกเป็นหลัก และรสชาติจากกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน และกลิ่นหอมสารประกอบอะโรมาติกจากการย่อยสลายไขมัน กรดอะซิติกปริมาณเล็กน้อยก็ช่วยเสริมเรื่องกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แต่ถ้าหากมีปริมาณที่เข้มข้นมากเกินไปก็สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเหม็นได้ (Leroy *et al.*, 2005)

2.5 การใช้กล้าเชื้อในอาหารหมัก

การใช้กล้าเชื้อ คือ การนำจุลินทรีย์ที่หมักแล้วให้ผลเป็นที่ต้องการในการหมักครั้งก่อน มาเติมในวัตถุดิบ เพื่อผลิตอาหารหมักขึ้นมาใหม่ โดยให้ผลเช่นเดิม เรียกว่า back slopping กระบวนการหมักในปัจจุบัน เป็นวิธีที่ทำให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายมากขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้หมักอาหารประเภทต่างๆ จะถูกแยกและจำแนกชนิด และนำมาศึกษาปฏิกิริยาการหมักทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอ อีกทั้งยังทดสอบคุณภาพความปลอดภัย รวมถึงหลักการยอมรับของผู้บริโภคหลังการใช้กล้าเชื้อในการหมัก จนแน่ใจว่าเหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมัก (Lücke, 1986 ; Swetwiwathana, 2005) เรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่าสตาร์ทเตอร์ (starter culture หรือ starter) ซึ่งในปัจจุบันกระบวนการหมักโดยใช้สตาร์ทเตอร์ มักกระทำในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ที่มีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการหมัก ทำให้ได้ผลิตผลที่ต้องการในปริมาณที่สูงและมีคุณภาพสม่ำเสมอ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

2.6 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria : LAB) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) หรือ ท่อน (rod) มีการเรียงตัวแบบคู่ สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Axcelsson , 1993) มีบทบาทสำคัญในการแปรรูปอาหารหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า เป็นต้น ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียพวกนี้คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนมากจะเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerope) ไม่มีออกซิเจน (anaerope) และมีออกซิเจนเล็กน้อย (microanaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 °ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 °ซ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 5.58-6.20 โดยทั่วไปเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตรการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือด่าง (Salminen and Wright, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การจำแนกแบคทีเรียแลคติก

สามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ

2.6.2.1 กลุ่มที่เน้นสร้างแลคเตท (homofermentative) เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท อาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วจะสร้างกรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

2.6.2.2 กลุ่มที่สร้างแลคเตทร่วมกับสารอื่น (heterofermentative) เป็นแบคทีเรียที่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติกออกมา 50 เปอร์เซ็นต์ อีก 25 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดอื่น เช่น กรดอะซิตริก (acitric acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) เป็นต้น และอีก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เชื้อกลุ่มที่สร้างแลคติกมีหลายสกุลคือ Aerococcus, Alloiococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus และ Weisella (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และ อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548)

2.6.2 กระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation) (Salminen and Wright, 1993)

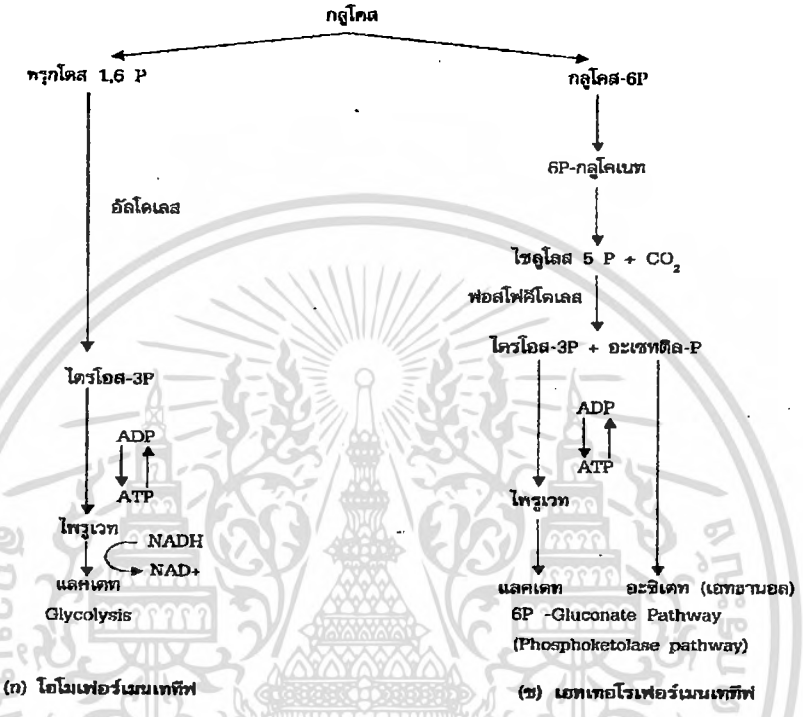
กระบวนการหมักกรดแลคติกเกิดในไซโตพลาสซึม มีการสร้างพลังงานแบบ substrate level phosphorylation แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของผลผลิตที่เกิดขึ้นตามภาพที่ 2.3

- Homofermentative กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัสและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็น กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุล จากการหมักน้ำตาล 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสเฟตให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นตอนสุดท้ายการรีดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาหลังจากที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชั่น กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

- Heterofermentative กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชั่นและ ดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) ร่วมด้วย น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟต (glyceroldehyde phosphate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะตอม และอะซิติลฟอสเฟต (acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟตีโตเลส (phosphoketolase enzyme) กลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟต จะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซีสในการหมักแบบ homofermentative แต่เนื่องจากการหมักแบบ heterofermentative มีกลีเซอรอลดีไฮด์เพียง 1 โมเลกุล จึงเกิด ATP 1 โมเลกุล



ภาพที่ 2.3 วิถีทางเคมีการหมักของแบคทีเรียแลคติก
ที่มา: สุมณฑา วัฒนสินธุ (2545)

2.7 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก

ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักแบคทีเรีย สามารถเก็บไว้ได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ (Doyle *et al.*, 1997)

2.7.1 กรดอินทรีย์ ต่างๆ (Organic acid)

กรดอินทรีย์หลายชนิดถูกนำมาใช้เติมในอาหารแต่ไม่ได้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด ซึ่งกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้แก่ Acetic lactic propionic sorbic และ benzoic acid ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับค่าพีเอชดังนั้นในการเลือกกรดอินทรีย์มาถนอมอาหารต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาที่ค่าพีเอช และ pKaของกรดชนิดนั้นๆ ซึ่งโดยปกติกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีค่าพีเอช ต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 5.0 การศึกษาผลของกรดชนิดต่าง ๆ ที่แบคทีเรียแลค ติกผลิตขึ้นมายับยั้งแบคทีเรียอื่น ๆ มีดังนี้

2.7.1.1 กรดแลคติก (Lactic acid)

กรดแลคติก ($CH_3CHOHCOOH$, pKa = 3.79 น้ำหนักโมเลกุล 90.08) เป็นกรดอ่อน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum, Clotridium perfringens, Clostridium sporogenes, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* และ *Yersinia enterocolitica* มีผู้เสนอว่าการสะสมอิออนลบเป็นสาเหตุทำให้กรดที่เกิดขึ้นจากการหมักเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำ โดยโมเลกุลของกรดที่ละลายได้ในไขมันสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระในรูปของโปรตอนตัวพาที่มีพลังงาน (energy – linked carrier) กรดแลคติกเดิมอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว จะแตกตัวปล่อยโปรตอนผ่านเข้าสู่เซลล์ทำให้ไซโตพลาสซึมมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น เซลล์ของจุลินทรีย์จะพยายามรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่โดยการกำจัดโปรตอนออกจากเซลล์ เมื่อพลังงานถูกใช้ไปเพื่อรักษาพีเอชในเซลล์ให้คงที่มีปริมาณมาก จึงทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ช้าลง

จากรายงาน Ziauddin *et al.* (1993) พบว่า กรดแลคติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยความเข้มข้นกรดแลคติกความเข้มข้น 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ เช่น *Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus* และ *Streptococcus* นอกจากนี้การทดลองของ สุรีย์ นานาสมบัติ (2547) พบว่า *Sal.* Typhimurium *Sal.* Agona และ *Sal.* Rissen สามารถอยู่รอดได้ในอาหารเหลว TSB ที่มีการปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติก ที่ 5.0 และ 5.5 แต่ที่ค่าพีเอช 4.5 เซลล์ลงลดอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีความเป็นกรดมาเกินไป มีผลทำให้ภายในสภาพเซลล์มีความไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เซลล์จึงไม่สามารถอยู่รอดได้

2.7.1.2 กรดแอซิตริก และ กรดโพรพิโอนิก (Acetic and propionic acid) (wood, 1992)

แบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแอซิตริก และ กรดโพรพิโอนิกได้ในปริมาณน้อย กรดแอซิติกและกรดโพรพิโอนิก มีค่า pKa สูงกว่า กรดแลกติก จึงมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลกติก กลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดแอซิติกและกรดโพรพิโอนิกจะเหมือนกับกรดแลกติก คือ รบกวนการทำงานของ cell membrane โดยจะทำให้ electrochemical potential เป็นกลาง นอกจากนี้ กรดแอซิติก ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลง และยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในระหว่างการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก ที่ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดสจึงไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

ในอาหารหมักจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อย เนื่องจากเป็นการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.7.3 ไดอะซิติล (diacetyl)

แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตไดอะซิติลได้โดยใช้ซิเตรทเป็นสารตั้งต้น และเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ไพรูเวท ไดอะซิติลเป็นสารที่ทำให้เนยแข็งมีกลิ่นหอม มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อถึง 40 สายพันธุ์ ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียแลคติก 10 สายพันธุ์ ยีสต์ 4 สายพันธุ์ แบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกอีก 12 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแกรมลบอีก 14 สายพันธุ์ Jay (1982) รายงานว่าไดอะซิติลสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์แกรมลบได้ด้วยความเข้มข้นที่ 258-344 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *E. coli* จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.7.4 อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

เป็นผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปจะมีปริมาณเล็กน้อยซึ่งมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารเป็นสำคัญ โดยทั่วไปอะซิทัลดีไฮด์จะจับคู่กับซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งมีสมบัติในการเพิ่มการต้านแบคทีเรีย เช่น *E. coli, Staph. aureus* และ *Sal.* Typhimurium เป็นต้น แต่มีอะซิทัลดีไฮด์เกิดในการหมักได้ในปริมาณน้อย จึงมีบทบาทไม่มากในการยับยั้งแบคทีเรีย (Liu and Pilone, 1998)

2.7.5 เอทานอล (ethanol)

เกิดจากการหมักแบบ heterofermentative ในสภาวะการที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดเอทานอล เป็นสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆในการเติบโต แม้ว่าเอทานอลจะเกิดขึ้นในปริมาณน้อยก็ตาม Gyurova และ Zhivkov (2009) รายงานว่า เอทานอลความเข้มข้นต่ำสามารถทำให้ขั้วของเซลล์เมมเบรนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

E. coli K12 เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาดและทำลายไขมันที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้ประจุและของเหลวไหลออกมาภายนอกเซลล์

2.7.6 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) (De Vuyst and Vandamme, 1994)

เป็นผลตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยการหมักแบบ heterofermentative lactobacilii ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมัก โดยจะมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก ส่วนในการยับยั้งจุลินทรีย์จะออกฤทธิ์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยเข้าแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนเป็นผลให้ค่าพีเอชลดลง ทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์

2.7.7 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2553)

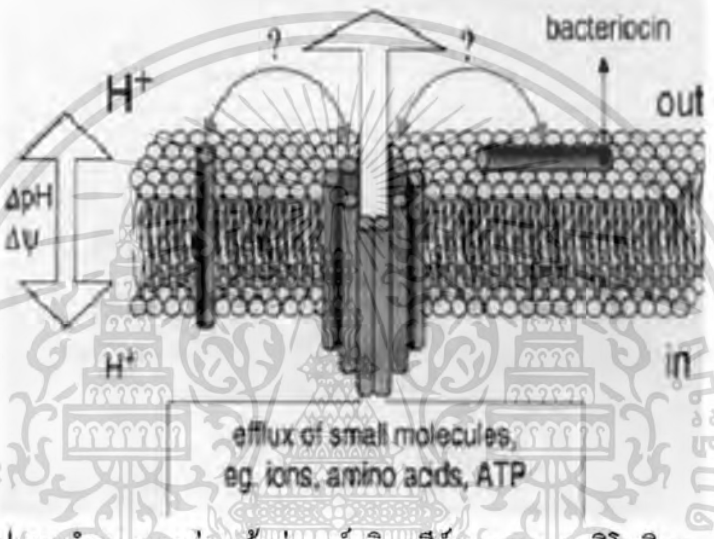
แบคเทอริโอซินเป็นสารที่แบคทีเรียหลายสายพันธุ์สร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแลคติก มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน ประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) โดยมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบสำคัญ ดังนั้นแบคเทอริโอซินมักถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์ เช่น ทริปซิน อัลฟา-ไคโมทริปซิน โปรติเอส เป็นต้น จึงไม่มีผลตกค้างหลังการบริโภค และการที่แบคเทอริโอซินถูกย่อยได้โดยเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลส เอนไซม์ไลเพส และเอนซ์ฟอสโฟไลเพส แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอซินยังมีส่วนประกอบของโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต ไขมันหรือฟอสฟอรัสอยู่ด้วย แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความคงตัวแตกต่างกัน สารนี้จะมีความไวต่อการถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชและส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้ดีกว่าด่าง

ในการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจะจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่มี เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์เชื่อมต่อกันเป็นร่างแห ทำให้แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดเล็กที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ง่าย ในชั้นนี้ประกอบด้วยสารพวกฟอสโฟไลปิด ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ กรดไขมันและหมู่ฟอสเฟต โดยหมู่ฟอสเฟตจะส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีประจุลบ ในขณะที่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มีประจุบวก เมื่อเกิดการจับกันของประจุบวกและประจุลบโดย electrostatic attractions ทำให้ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด จึงทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการไหลรั่วขององค์ประกอบเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (อรัญญา สังขศรี, 2541)

กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะแตกต่างกันไปแล้วแต่สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lb. fermentum, Lb. acidophilus, Lb.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
129579

plantarum, Ped. acidilactici และ *Ped. pentosaceus* แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดรวมถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Lis. monocytogenes* ทำให้แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการเป็นสารถนอมอาหารได้ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550) แบคเทอริโอซินบางชนิดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการฆ่าจุลินทรีย์ (bacteriocidal) เช่น แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* N014 (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2006) plantaricin KW 30 ที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* KW 30 (Kelly *et al*., 1996) และ acidocin J 1229 ซึ่งผลิตโดย *Lb. acidophilus* JCM 1229 (Tahara and Kanatani, 1996)



ภาพที่ 2.4 รูปแบบจำลองการผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน
ที่มา : Mc-aullife *et al*. (2001)

ปัจจุบันแบคเทอริโอซินกำลังได้รับความสนใจเนื่องจากผู้บริโภคได้หันมาให้ความสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น ต้องการผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์อีกทั้งต้องการผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากสารปรุงแต่ง (additive-free) เพื่อเป็นการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ผู้ผลิตจึงต้องพยายามหาทางเลือกใหม่ๆในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารจึงถือเป็นทางเลือกใหม่ ที่ให้ข้อดีทั้งแง่การควบคุมคุณภาพอาหารและป้องกันการระบาดของอาหารเป็นพิษ แบคเทอริโอซินมีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียทำให้สามารถใช้ได้อย่างเหมาะสมในอาหารที่เสื่อมเสียได้ง่าย เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นม

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาประเทศไทย มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรียแลคติกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักพื้นเมืองของไทย เช่น แหนม Swetwiwathana *et al*. (2008) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินและคัดแยกได้จากอาหารหมักประเภทเนื้อประเภทต่างๆของไทยมาเป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อ โดยมุ่งเน้นถึงโอกาสที่จะเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อให้ผู้บริโภคได้ประโยชน์จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อในกลุ่มนี้หลังจากบริโภคอาหารหมักแบบไม่ผ่านความร้อน ซึ่งเป็นการทดลองเบื้องต้นในหลอดทดลอง (MRS broth) โดยอาศัยหลักพื้นฐานว่า เชื้อกลุ่มโปรไบโอติกต้องทนสภาวะความเป็นกรดที่พีเอชต่างๆได้ดีในกระเพาะอาหาร และสามารถทนเกลือน้ำดีที่พีเอช 8

2.8 แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus*

เซลล์รูปท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิลไล (coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมเมื่ออายุมากขึ้น และจะอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ทนกรด (aciduric) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 5.5-6.2 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพเป็นกลาง หรือเป็นด่าง เป็นกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนน้อย (microaerophilic) มักพบในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ เบียร์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง และบริเวณเนื้อเยื่อในท่อทางเดินอาหาร และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิลาวัณ เจริญจิระตระกูล, 2536) แม้ว่าแบคทีเรียสกุลนี้จะมีประโยชน์ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก การสร้างกรดแลคติกกลับไม่เป็นผลดีในอาหารชนิดอื่น เนื่องจากจะทำให้อาหารชนิดนั้นเสื่อมเสีย lactobacilli บางชนิดสร้างเมือกทำให้ไส้กรอกเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว ทำให้เนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศเกิดเปรี้ยวขึ้น ทำให้อาหารที่เก็บถนอมไว้ด้วยน้ำส้มสายชูเน่าเสีย เช่น ซอสมะเขือเทศและมายองเนส (Banwart. 1989)

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการหมักและมีความหลากหลายของเมทาบอลิซึ่มมากกว่าแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น ดังนั้น Lactobacilli จึงต้องการอาหารจำเพาะในการเจริญเติบโตและหลายชนิดต้องการสภาวะที่มีสารอาหารสมบูรณ์ Lactobacilli ไม่ใช่แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนและไขมันได้ดี ดังนั้นจึงต้องการกรดอะมิโน เปปไทด์ และกรดไขมันสำหรับการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว บางสายพันธุ์ต้องการวิตามินหลายชนิด นิวคลีโอไทด์และสารอาหารชนิดอื่นๆ รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตที่สามารถหมักได้ (Hutkins, 2006)

2.9 *Lactobacillus plantarum*

เป็นเซลล์รูปท่อน ขนาด 0.9-1.2 x 3-8 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวกันเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (calciumpentotinate) ไนอะซิน (niacin) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผักดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ช่องปาก และอุจจาระคน *Lb. plantarum* เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและทนกรดได้ดี ในการทำกระหล่ำปลีดอง เชื้อนี้สามารถเจริญขึ้นและเพิ่มจำนวนมากขึ้นภายในเวลา 6 – 8 วัน หลังจากที่การหมักผ่านไป 16 – 18 พบว่า *Lb. plantarum* จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังคงมีจำนวนเพิ่มขึ้น และทำให้การหมักดำเนินต่อไปจนกระทั่งน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติก (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

2. 10 *Salmonella* spp.

ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ที่พบได้ทั่วไปทั้งในสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลักษณะของเชื้อมีรูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ที่อยู่รอบเซลล์ ขนาดประมาณ 0.7-1.5 ไมโครเมตร ยาว 2.0-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ค่า Aw ต่ำสุดสำหรับการเจริญประมาณ 0.93-0.95 ลักษณะโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อมีขอบเรียบ ผิวมัน ไม่มีสี เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เจริญได้ดีในอุณหภูมิประมาณ 37-45 °ซ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 37 °ซ ไม่ทนทานต่อความร้อนจะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 °ซ นาน 15-20 นาที หรือ 62 °ซ นาน 4 นาที หรือ 100 °ซ นาน 1 นาที ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °ซ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549) ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อความเป็นกรด จึงไม่สามารถอยู่รอดได้ในอาหารหมักเนื้อเพราะถูกยับยั้งได้โดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก นอกจากนี้ยังไวต่อสารที่ใช้ในการหมักด้วย ซัลโมเนลลาจึงไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อนโรคสำคัญในอาหารหมักเนื้อ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ใช้กล้าเชื้อในการหมัก (Anonymous, 2005) สามารถสร้างชีวพิษภายในตัว (endotoxin) ซึ่งก่อให้เกิดพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ผู้ที่ได้รับเชื้อเข้าไปในปริมาณมากจึงจะทำให้เกิดโรค เชื้อซัลโมเนลลาปริมาณที่ประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ สามารถทำให้เกิดโรค Salmonellosis ได้ แต่ในบางกรณี แม้ว่าจะมีปริมาณต่ำกว่า 10^8-10^9 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้เช่นกัน โดยจะเกิดอาการภายใน 8-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการเป็นไข้ ปวดบิดในท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง และเป็นนานถึง 1-8 วัน แล้วแต่กรณี ในรายที่รุนแรงอาจติดเชื้อเข้าไปในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมอง ถึงแก่ชีวิตได้ เมื่อรักษาหายแล้ว ผู้ป่วยจะเป็นพาหะนำโรคเป็นเวลานาน และสามารถแพร่โรคสู่คนอื่นได้ (Doyle and Cliver, 1990)

2.11 หลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส Polymerase chain reaction (PCR) (วีระพงศ์ ฉลิตานนท์และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2549)

เทคนิคการทำพีซีอาร์ โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ยีนที่ต้องการ และเพิ่มขยายยีนดังกล่าว ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า ใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบและมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) เข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

2.11.1 Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 °ซ โดยทั่วไปการ denature ที่ 94-95 °ซ เป็นเวลา 20 วินาที ก็เพียงพอสำหรับการแยกสายแม่พิมพ์อย่างสมบูรณ์

2.11.2 Annealing

เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 °ซ เพื่อให้ Primerสามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำพีซีอาร์ อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในช่วงนี้ขึ้นกับ GC content ความยาว และความเข้มข้นของ primer โดยทั่วไป สามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการหาค่า Tm ของไพรเมอร์ โดยการใช้ software หรือ สูตรคำนวณง่าย ๆ ดังนี้

$$Tm = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

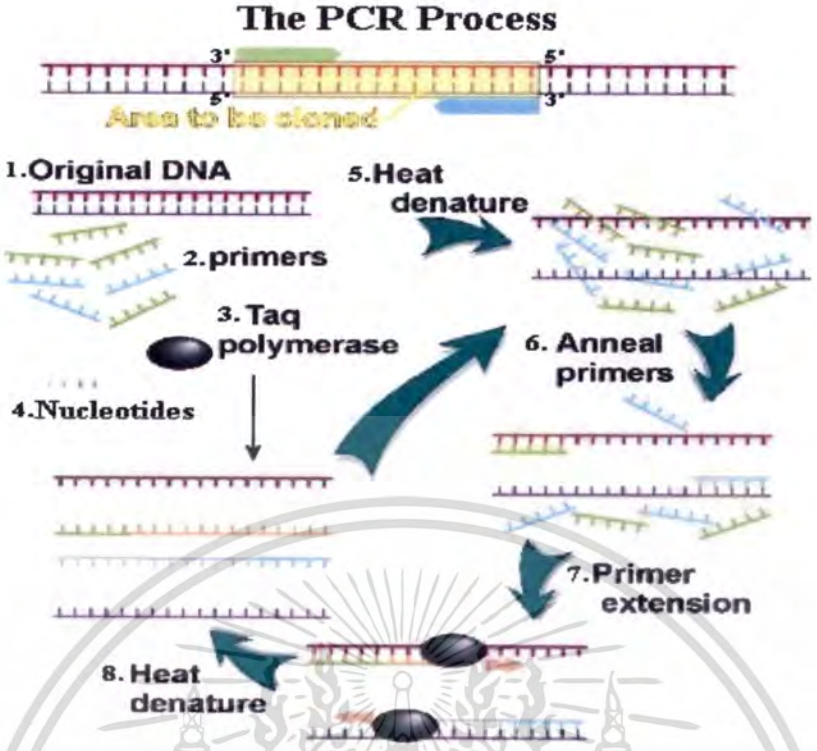
ซึ่งจะได้ค่า Tm อย่างคร่าว ๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกัน (ประมาณ 2 °ซ) หลาย ๆ อุณหภูมิ โดยใช้ค่า Tm-5oC เป็นอุณหภูมิหลักการใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นอย่างมากมาย ในขณะที่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิดเลย

2.11.3 Primer extension

เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75°ซ ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาวและความเข้มข้นของสายแม่พิมพ์ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย โดยทั่วไปเวลา extension 45 วินาที จะเพียงพอสำหรับ Taq DNA polymerase ในการเพิ่มขยาย PCR product ขนาด 1 kb ที่ 72 °ซ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยนตามลักษณะแม่พิมพ์ที่แตกต่างกันออกไป

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ที่มา: http://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm

2.12 องค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องใน ปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (PCR) (วีระพงศ์ อุลิตานนท์และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2549)

ประสิทธิผล (Efficacy) ของการทำพีซีอาร์สามารถวัดได้จาก 3 ปัจจัย คือความจำเพาะ (specificity), ประสิทธิภาพ (efficiency) หรือผลิตผลที่ได้ (yield) และความถูกต้อง (fidelity) การทำพีซีอาร์ที่มีความจำเพาะสูงมากจะทำให้ได้ PCR product เกิดขึ้นจากส่วนของแม่พิมพ์ที่จำเพาะเท่านั้น ในขณะที่การทำพีซีอาร์ ที่มีประสิทธิภาพสูง จะทำให้ได้ PCR product ในประมาณที่สูงกว่าโดยใช้จำนวนรอบการทำน้อยกว่า ส่วนการทำพีซีอาร์ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ก็จะทำให้ได้ PCR product ที่มีความถูกต้องในลำดับเบสสูง หรือผิดพลาดน้อยมาก จนสามารถละเลยได้

2.12.1 บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา

เป็นบัฟเฟอร์ซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ *Tag* polymerase โดยมีความเข้มข้น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) การเลือกใช้บัฟเฟอร์ให้เหมาะสมกับงานพีซีอาร์ขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ รวมถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นขององค์ประกอบในปฏิกิริยา โดยเฉพาะความเข้มข้นของแมกนีเซียม (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว, 2549)

2.12.2 dNTP

ประกอบไปด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อมาแบบสำเร็จรูปหรือ ซื้อมาแต่ละชนิด แล้วจึงนำมารวมให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 2 ไมโครโมลาร์

2.12.3 ไพรเมอร์

จัดเป็นองค์ประกอบสำคัญของความสำเร็จในการทำพีซีอาร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็น โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กันควรมีองค์ประกอบของเบส G และ C เท่ากัน สำหรับความเข้มข้นของ primers ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.6 μM ถ้าใช้ไพรเมอร์ในปริมาณที่น้อยเกินไป จะทำให้ไพรเมอร์ถูกใช้หมดก่อนปฏิกิริยาสิ้นสุดลง เป็นผลให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลง

2.12.4 ดีเอ็นเอเป้าหมาย

ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟินเป็นต้น ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5- 5000 นาโนกรัม โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

2.12.5 แมกนีเซียมคลอไรด์

แมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก แมกนีเซียมไอออนจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ผลผลิตดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ไพรเมอร์และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไวด์โตรฟอสเฟตที่อยู่ในปฏิกิริยา ถ้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนน้อยเกินไปจะไม่เกิดปฏิกิริยา หรือเกิดได้ไม่ดีทำให้ผลผลิตต่ำ แต่ถ้ามีแมกนีเซียมมากเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง ความเข้มข้นที่นิยมใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.6 Thermostable DNA polymerases

เนื่องจากในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ที่ใช้จึงต้องเลือกชนิดที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) ชนิดที่นิยมใช้คือ *Taq* polymerase เนื่องจากมีราคาถูกกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น และมีการตัดโพลีเพพไทด์ของเอนไซม์นี้ออกไปบางส่วน จึงเป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมในการทำ PCR ด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ เอนไซม์มี activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 72-75 °ซ และมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง (95 °ซ) เป็นเวลานาน

2.13 แอฟแอลพี (AFLP, Amplified fragment length polymorphism)

อาร์เอฟ แอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์หรือต่างชนิดกันย่อมมีลำดับเบสของสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไม่มากก็น้อย ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์(mutation) ตามธรรมชาติอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมหรืออาจเกิดจากข้อผิดพลาดของเซลล์เองส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความแตกต่าง หรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่า เกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) สามารถตรวจสอบได้โดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน (complementary) ระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้น ทำให้ตรวจพบความแตกต่างของสายพันธุ์พืชได้ (Tankslay et al., 1989, McCouch and Tankslay, 1991, Kochert, G.,1994, USDA, 1994, Paterson, 1996)

2.14 พีซีอาร์อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic, RAPD) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

อาร์เอพีดีเป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่งโดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นวิธีที่ทำง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งผลที่ได้ต่างจากเดิมเนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ จึงต้องระมัดระวังควบคุมการทดลองให้คงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการควบคุมคุณภาพของอาหารหมักประเภทเนื้อ

Swetwiwathana *et al.* (1999) ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lb. curvatus, Lb. sakei* และ *Pediococcus* spp. ร่วมกับ ไนเตรท ไนไตรท และกระเทียม ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Sal.* Anatum ในแหนม พบว่าเมื่อใช้ โซเดียมไนเตรท 125 ppm, กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ starter culture จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *Sal.* Anatum ได้ แต่ใช้ร่วมกับ *Lb. sakei* จะให้ผลในการยับยั้งดีที่สุด

อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ได้ศึกษาถึงการลดจำนวน *Sal.* Anatum ที่เติมลงในส่วนผสมแหนม (ปริมาณ 100 เซลล์ ต่อ กรัม) ก่อนทำการหมัก พบว่า หลังจากหมักแหนมครบ 5 วัน ปริมาณ *Sal.* Anatum ลดลงถึง 92.2% และปริมาณเชื้อที่ยังเหลือรอดอยู่นั้น จะเป็นเซลล์บาดเจ็บถึง 62.06%

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล (2539) ศึกษาผลของเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ *Sal.* Anatum และ *Sal.* Typhimurium เมื่อทำการทดลองเติม *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 หรือ 10^6 cfu/ml. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth เพื่อสังเกตผลต่อ *Sal.* Anatum พบว่า *Lb. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อซัลโมเนลลา ได้เช่นเดียวกับ *Sal.* Typhimurium การทำลายเชื้อเกิดในช่วงที่พีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ml ยับยั้งการเจริญของ *Sal.* Anatum ปริมาณเริ่มต้น 10^2 และ 10^3 cfu/ml. ในเวลาเดียวกันคือ ชั่วโมงที่ 15 ขณะเดียวที่พีเอช มีค่า 5.69- 5.79 และทำลายเชื้อ *Sal.* Anatum ปริมาณเริ่มต้น 10^2 และ 10^3 cfu/ml. เกิดในเวลาที่ 28 และ 32 ชั่วโมงขณะที่พีเอชลดลงมาที่ 4.22 และ 4.03 ตามลำดับ เมื่อใช้ *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/ml. เกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน 9 และ 18 ชั่วโมง เมื่อพีเอช ลดลงที่ 5.60 – 5.95 และ 3.97-3.99 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ *Sal.* Anatum กับ *Sal.* Typhimurium พบว่า *Sal.* Anatum ทนกรดที่ *Lb. plantarum* สร้างขึ้นที่ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ml. ได้มากกว่า *Sal.* Typhimurium (อรนุช อุตรภิชาติ, 2530; อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533)

โสภา สีชอล์ค (2541) ศึกษาการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น 2 ชนิด คือ *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/mL และ *P. cerevisiae* ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/mL เพื่อลดปริมาณ *Sal.* Typhimurium และ *Sal.* Anatum ในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *Lb. plantarum* หรือ *P. cerevisiae* และเชื้อเชื้อผสม *Lb. plantarum* และ *P. cerevisiae* มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Sal.* Typhimurium และ *Sal.* Anatum ได้เท่าเทียมกัน โดยใช้ระยะเวลา 28 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่มีปริมาณเริ่มต้น 10^2 cfu/mL และใช้ระยะเวลา 32 ชั่วโมงในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/mL

Swetwiwathana (2000) รายงาน ผลของกระเทียมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแหนมและการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ว่าจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบมากในแหนมคือ *S.* Anatum และ *Staph. aureus* สามารถถูกยับยั้งได้โดยกระเทียมแต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดกระเทียมเข้มข้นช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติกและการผลิตกรดแลคติกด้วย

Luxananil *et al.* (2009) ได้ศึกษาการเติม *Lb. plantarum* BCC 9546 (LpBCC9546) เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม และนำมาผสมกับพลาสมิด pRV85 เพื่อยืนยันการอยู่รอดและก่อให้เกิดการหมักในแหนมของ LpBCC9546 ผลผลิตได้ออกมาเป็นสายพันธุ์ LpG11 ที่สามารถต้านทานอีริโทซินและแสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียว LpG11 ถูกใช้เป็นกล้าเชื้อและดูแนวโน้มการเจริญของเชื้อในอาหารแข็งจำเพาะ พบว่าเชื้อเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงสุดที่ 10^7-10^8 cfu/g ภายใน 24 ชั่วโมง หลังจาก 50 ชั่วโมงลดลงถึง 10^5 cfu/g ใน 168 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ LpBCC9546 ที่ไม่ได้เติมพลาสมิดพบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน รวมทั้งสมบัติด้านความเป็นกรด เนื้อสัมผัสและสี ของแหนม LpG11 จึงเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์การเจริญได้ดีกว่า LpBCC9546

Radulovic *et al.* (2011) ศึกษาการเติมกล้าเชื้อโพรไบโอติกลงในไส้กรอกหมัก โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด คือ ชุดควบคุมเป็นไส้กรอกหมักแบบธรรมชาติ ชุดที่ 2คือ ไส้กรอกหมักเติมกล้าเชื้อ *Lb. helveticus* RO52 และชุดที่ 3 คือไส้กรอกหมักเติมกล้าเชื้อ *Bifidobacterium longum* RO175 ทำการหมักเป็นเวลา 40 วัน ทำการวิเคราะห์การเจริญของกล้าเชื้อ ค่าพีเอช และการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมัก พบว่า ในช่วงแรกทั้ง *Lb. helveticus* RO52 และ *B. longum* RO175 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^6 cfu/g จากนั้นก็เพิ่มขึ้นจนถึง 10^8 cfu/g คงที่จนจบการทดลอง ส่วนค่าพีเอชและการทดสอบทางประสาทสัมผัสให้ผลไปในทางเดียวกันกับตัวอย่างควบคุม แต่สามารถอยู่รอดในการหมักได้นานกว่าถึง 40 วัน กล้าเชื้อโพรไบโอติกดังกล่าวจึงเหมาะที่จะนำมาเป็นกล้าเชื้อในการหมักต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานเนื้อโค (วิรัตน์ สมุน และ ณัฐยาพร สมุน, 2552)

3.1.1 เนื้อโคพื้นเมือง และมันวัวแข็ง (ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.1.2 ข้าวสุก (ข้าวสารหอมมะลิตราฉัตร สีม่วง)

3.1.3 กระเทียม (Tops supermarket)

3.1.4 โมโนโซเดียมกลูตาเมท (ตราอายิโนะโมะโต๊ะ)

3.1.5 น้ำตาลทราย (ตรามิตรผล)

3.1.6 เกลือฟอสเฟต (ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.1.7 โซเดียมไนไตรท (ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.2 ไส้ที่ใช้บรรจุส่วนผสมไส้กรอกอีสานเนื้อโค

3.2.1 ไส้หมูสด (ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

3.2.2 ไส้คอลลาเจน ขนาด 38 มม. (Nippi Collagen Industries, Ltd., Japan)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 เชื้อ *Lactobacillus plantarum* RS49 ที่ผลิต pediocin-like bacteriocin จากหน่วยรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

3.3.2 เชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (JCM 1157^T)

3.3.3 เชื้อ *Salmonella* Anatum จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.3.4 เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการทดสอบเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี ได้แก่

3.3.4.1 *P. pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4.2 *Lb. plantarum* RS54

3.3.4.3 *Lb. plantarum* 3.8

3.3.4.4 *W. cibaria SI21*

3.3.4.5 *P. pentosaceus* M13

3.3.4.6 *Lc. lactis* 12N

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการผลิตไส้กรอก

3.4.1.1 ตู้บ่ม Type KA 50 air - conditioned maturing cabinet (Sudtronic M. Schaaf Co., Germany)

3.4.1.2 เครื่องผสม (Kitchen aids รุ่น K5SS, U.S.A.)

3.4.1.3 เครื่องบรรจุไส้ (Sammic U.S.A.)

3.4.1.4 เครื่องบดเนื้อ (JBL, Thailand)

3.4.1.5 เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Sartorius; BP 3100s, Germany)

3.4.1.6 เครื่องย่างไฟฟ้า (Electrolux รุ่น EBG200, Sweden)

3.4.2 อุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี

3.4.2.1 ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.4.2.2 บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.2.3 บิวเรต

3.4.2.5 ปีเปตขนาด 10 มิลลิลิตร

3.4.2.6 ปีเปตขนาด 1 มิลลิลิตร

3.4.2.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Diethelm & Co.,Ltd , Singapore)

3.4.2.8 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (Weilheim , Germany)

3.4.2.9 เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Novasina รุ่น MS1-Aw, Switzerland)

3.4.2.10 เครื่องวิเคราะห์ค่าความชื้น (Mettler Toledo รุ่น HB43-S, U.S.A)

3.4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ทางชีววิทยา

3.4.3.1 จานเพาะเชื้อ

3.4.3.2 ถุงพลาสติกปลอดเชื้อ

3.4.3.3 เข็มและลูปเขี่ยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.4 แท่งแก้วคนสาร

3.4.3.5 แท่งแก้วรูปตัวแอล

3.4.3.6 แผ่นสไลด์

3.4.3.7 ไมโครปิเปต (P20 , P200 และ P1000) และทิป

3.4.3.8 หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร พร้อมฝาปลอดเชื้อ

3.4.3.9 หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิตร

3.4.3.10 หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร

3.4.3.11 กระติกน้ำแข็ง

3.4.3.12 เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge) (Pico, Germany)

3.4.3.13 เครื่องตีปั่น (Stomacher) (Oskon Co.,Ltd., Thailand)

3.4.3.14 เครื่องผสม (Votex mixer) (Scientific Industries, U.S.A.)

3.4.3.15 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert , Germany)

3.4.3.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert , Germany)

3.4.3.17 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟโตไลซิส (Agarose gel electrophoresis) (Cosmo Bio Co.,Ltd., Japan)

3.4.3.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Bosstech , U.S.A.)

3.4.3.19 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ENDURO Gel XL, Labnet, U.S.A.)

3.4.3.20 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc XR, Bio Rad laboratories, U.S.A.)

3.4.3.21 เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (My Cycler thermal cycler, Bio Rad laboratories, U.S.A)

3.4.3.22 ตู้แช่เข็ง -20 องศาเซลเซียส

3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมี

3.4.4.1 ฟีนอฟทาลีน (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.4.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N (Merck, U.S.A)

3.4.5 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อในการตรวจวิเคราะห์ทางด้านชีววิทยา

3.4.5.1 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, U.SA)

3.4.5.2 โซเดียมไนไตรท์ (Merck, U.S.A)

3.4.5.3 โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.5.4 โซเดียมแอสคอเบท (Fluka, Switzerland)

3.4.5.5 กลีเซอรอล (Carlo Erba Reagent, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.6 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading Ltd., Thailand)

3.4.5.7 Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, USA)

3.4.5.8 coagulase plasma, Rabbit with EDTA (BD BBL™, U.S.A)

3.4.5.9 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

3.4.5.10 กรดแลคติก (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.5.11 กรดแอสคอบิก (Fluka, Switzerland)

3.4.5.12 แคลเซียมคาร์บอเนต (Merck, USA)

3.4.5.13 Potassium tellurite (Merck, USA)

3.4.5.14 Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, USA)

3.4.5.15 Xylose- Lysine Deoxycholate (XLD) (Scharlau, Spain)

3.4.5.16 Triple Sugar Iron (TSI) (Difco, USA)

3.4.5.17 Lysine Indole Motility (LIM) (Difco, USA)

3.4.5.18 Trypticase soy agar (TSA) (Merck, USA)

3.4.5.19 Trypticase soy broth (TSB) (Merck, USA)

3.4.5.20 Meat extracts (Difco, USA)

3.4.5.21 Tryptone (Hardy Diagnostics, USA)

3.4.5.22 Glucose (SP Scientific, Thailand)

3.4.5.23 Baird-Parker agar (BP) (Difco, USA)

3.4.5.24 DE Man, Rogosa and Sharpe Broth (MRS broth) (Merck, USA)

3.4.5.25 DE Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) (Merck, USA)

3.4.5.26 Nutrient agar (NA) (Merck, USA)

3.4.5.27 Peptone (Hardy Diagnostics, USA)

3.4.5.28 Salmosyst selective supplement tablet (SBST) (Merck, USA)

3.4.5.29 Kovac (Merck, USA)

3.4.5.30 Calcium carbonate (Scharlau, USA)

3.4.5.31 Agar powder (SP Scientific, Thailand)

3.4.5.32 Peptone from soymeal (Soytone) (Merck, Germany)

3.4.5.33 Antiserum O group B, C, D, E (S&A Reagent Lab, Thailand)

3.4.5.34 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading Ltd., Part., Thailand)

3.4.5.35 Billion green (Merck, USA)

3.4.5.36 Escherichia coli broth (EC) (Merck, USA)

3.4.5.37 Lauryl sulphate tryptose (LST) (Difco, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.38 แกรมไอโอดีน

3.4.5.39 คริสตัลไวโอเล็ต

3.4.5.40 ซาฟานีนโอ

3.4.5.41 Agarose (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.5.42 1X TAE buffer

3.4.5.43 Ethidium bromide (Vivantis Biochemical, USA) 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.4.5.44 6X Loading dye buffer (Fermentas, USA)

3.4.5.45 DNA Ladder Plus (SM 0431, Fermentas, USA)

3.4.5.46 10X PCR buffer (Fermentas, USA)

3.4.5.47 Magnesium chloride (MgCl2) (Fermentas, USA)

3.4.5.48 Deoxynucleotides (dNTPs) (Fermentas, USA)

3.4.5.49 Primer OPA sequence (5′- AGTCAGCCAC-3′)

3.4.5.50 Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA)

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.6.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

3.6.1.1 แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *S.* Anatum ทำการถ่ายเชื้อด้วย Streak plate technique ลงบนหลอดเอียงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้เป็น stock culture ถ่ายเชื้อเดือนละครั้งระหว่างการทดลอง

3.6.1.2 แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการวิจัย *Lb. plantarum* RS49 และ เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* (JCM 1157^T) ทำการถ่ายเชื้อแบบ deep tube ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + $CaCO_3$ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเดือนละครั้งระหว่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

3.6.2.1 นำ Stock culture เชื้อ *S.* Anatum ที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5±2 °ซ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจหาความเข้มข้นของเชื้อ

3.6.2.2 ทำการถ่ายเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 จาก stock culture ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาตรวจหาความเข้มข้นของเชื้อ

3.6.3 การเตรียม Isan Sausage Model Broth (ISMB)

เตรียมแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB) โดยดัดแปลงจากสูตรแบบจำลองการหมักแหนม (Nham Model Broth, NMB) ของ Swetwiwathana *et al.* (1999) ดังภาคผนวกที่ ก 7.21 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวดทนร้อนฝาเกลียว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3.6.4 ศึกษาการควบคุมสภาวะการหมักต่อสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา เคมีบางประการและความชอบของผู้บริโภคต่อคุณภาพของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคที่ใช้ไส้คอลลาเจนและไส้หมูสด

ใช้เนื้อโคพื้นเมืองและมันโคแข็งมาบดหยาบและผสมกับส่วนผสมต่างๆ ตามสูตรการทำไส้กรอกอีสานตามตารางที่ 3.1 แบ่งส่วนผสมบรรจุในไส้หมูและไส้คอลลาเจน ทำการหมักแบบสดโดยใส่ถุงพลาสติกปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และหมักแบบกึ่งแห้งโดยการแขวนไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ และความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ (Sudtronic M. Schaaf Co., Germany) ทำการหมักไส้กรอกที่ผลิตเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-7 °ซ) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษา) วางแผนการทดลอง 2x2 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบบล็อคสุ่มสมบูรณ์ (2x2 factorial in RCBD) ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ใช้ subsample ในการวิเคราะห์ 2 ตัวอย่าง ศึกษา 2 ปัจจัย โดยกำหนดให้

ปัจจัย A คือ ไส้บรรจุ 2 ชนิด ได้แก่ ไส้หมูและไส้คอลลาเจน

ปัจจัย B คือ สภาวะการหมัก 2 สภาวะ ได้แก่ แบบสดและแบบกึ่งแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย AxB วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS

ตารางที่ 3.1 สูตรการผลิตไส้กรอกอีสานเนื้อโค 10 กิโลกรัม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อเสือร้องไห้	6800
มันวัวแข็ง	1700
ข้าวสวย	1500
เกลือไนไตรท	130
ฟอสเฟต	30
น้ำตาลทราย	50
ผงชูรส	25
พริกไทย	40
กระเทียมปอกสับ	500

ที่มา : ดัดแปลงจาก วิรัตน์ สุมน และ ณัฐยาพร สุมน (2552)

3.6.4.1 การวิเคราะห์สมบัติด้านเคมีของไส้กรอกอีสาน

นำตัวอย่างส่วนผสมไส้กรอกก่อนการหมัก (วันที่ 0) และไส้กรอกที่บรรจุในไส้หมูและไส้คอลลาเจนซึ่งหมักทั้งแบบสดและแบบกึ่งแห้งครบ 2 วัน และตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4-7°ซ ในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 ไปศึกษาสมบัติทางเคมีต่างๆ ได้แก่

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ทำการตรวจวัดค่าโดยใช้วิธีการตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง Water Activity (Novasina รุ่น MS1-Aw, Switzerland)

2. การวิเคราะห์ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์ (moisture content) ทำการตรวจวัดค่าโดยใช้วิธีการตามคู่มือการใช้งานของเครื่องวิเคราะห์ค่าความชื้น (Mettler Toledo รุ่น HB43-S, U.S.A.)

3. วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) (วิธีการตามภาคผนวก ข1)

4. วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกโดยการไทเทรตหาปริมาณกรดแลกติกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N (ดัดแปลงจาก AOAC , 1984 โดย นภา โล่ห์ทอง, 2529) (วิธีการตามภาคผนวก ข1)

3.6.4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียแลกติก

นำตัวอย่างส่วนผสมไส้กรอกก่อนการหมัก (วันที่ 0) และไส้กรอกที่บรรจุในไส้หมูและไส้คอลลาเจนซึ่งหมักทั้งแบบสดและแบบกึ่งแห้งครบ 2 วัน และตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอุณหภูมิ 4-7 °ซ ในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสาน โดยวิธี Pour plate technique ด้วย MRS agar+ $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Swetwiwathana *et al.*, 2007)

3.6.4.3 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อความชอบของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูและไส้คอลลาเจน

นำตัวอย่างไส้กรอกทั้งไส้หมูและไส้คอลลาเจนที่หมักแบบสดและแบบกึ่งแห้งครบ 2 วันมาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยย่างไส้กรอกบนเครื่องย่างปิ้งไฟฟ้า (Electrolux รุ่น EGB200) เป็นเวลาด้านละ 10 นาที ใช้ผู้ชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 20 คน ทดสอบความชอบของไส้กรอกหมักทั้งหมดทางด้าน สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยการให้คะแนนความชอบแบบ 9 point hedonic scale จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติตามแผนการทดลองแบบ RCBD โดยบลอกคือผู้ชิม 20 คน ได้ทรีทเมนต์ 4 กลุ่มคือ ไส้หมูหมักแบบสด ไส้หมูหมักแบบกึ่งแห้ง ไส้คอลลาเจนหมักแบบสด และไส้คอลลาเจนหมักแบบกึ่งแห้ง และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS

พิจารณาผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อดังกล่าวเพื่อคัดเลือกไส้ที่ใช้บรรจุไส้กรอกอีสานต่อการยอมรับของผู้บริโภคในไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเทียบกับไส้กรอกอีสานที่ทำการหมักตามธรรมชาติในขั้นตอนต่อไป

3.6.5 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantarum* RS49

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน โดยใช้วิธี spot – on lawn ตามวิธีของ Mayr – Harting *et al.* (1972) (ภาคผนวก ค8) โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157^T เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ ดูโซนใสในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ค่าความเข้มข้นสุดท้าย เทียบเป็นหน่วย Arbitary Unite ต่อปริมาณของตัวอย่างเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 (AU/ml)

3.6.6 การศึกษาการใช้กรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum (SA) ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อสกัดแบคเทอริโอซินที่ปลอดเชื้อตามภาคผนวกที่ ค8 เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่ปรับค่าพีเอชให้มีค่า ที่ 5.5, 5.0, 4.5 และ 4.0 โดยให้มีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินประมาณ 400 Au/ml เทียบกับรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีค่าพีเอชระดับต่างๆแต่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เพื่อศึกษาผลของกรดแลคติกและผลรวมของกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซิน ที่มีต่อ *S.* Anatum (SA)ในระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 cfu/ml โดยแบ่งรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานเป็น 8 แบบ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่ 1 ISMB pH 4.0 + SA 10^4 cfu/ml + แบคเทอริโอซิน

รูปแบบที่ 2 ISMB pH 4.0 + SA 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 3 ISMB pH 4.5 + SA 10^4 cfu/ml + แบคเทอริโอซิน

รูปแบบที่ 4 ISMB pH 4.5 + SA 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 5 ISMB pH 5.0 + SA 10^4 cfu/ml + แบคเทอริโอซิน

รูปแบบที่ 6 ISMB pH 5.0 + SA 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 7 ISMB pH 5.5 + SA 10^4 cfu/ml + แบคเทอริโอซิน

รูปแบบที่ 8 ISMB pH 5.5 + SA 10^4 cfu/ml

จากนั้นบ่ม ISMB ทั้งหมดในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการตรวจนับเชื้อ *S.* Anatum ที่เหลือรอดใน ISMB รูปแบบต่างๆทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นที่ใส่เชื้อ (0 ชั่วโมง) จนครบ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธี spread plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ *S.* Anatum เหลือรอด และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บ (วิธีการตามภาคผนวก ค10)

3.6.7 ศึกษาผลของไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้ง *S.* Anatum (SA) ในแบบจำลองไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)

นำเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 มาทำการเพาะเลี้ยงและปรับให้มีเชื้อเริ่มต้นที่ 10^6 cfu/ml นำมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) โดยแบ่งรูปแบบการจำลองการหมักไส้กรอกอีสานเป็น 8 แบบ โดยเทียบกับรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ไม่เติมไนไตรท กระเทียมปลอดเชื้อและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อศึกษาผลรวมของไนไตรทและกระเทียมปลอดเชื้อและการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ความเข้มข้นเชื้อ 10^6 cfu/ml ที่มีต่อ *S.* Anatum ในระดับความเข้มข้นเชื้อ 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 1 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml (control)

รูปแบบที่ 2 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + 100 ppm $NaNO_2$

รูปแบบที่ 3 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + 5 เปอร์เซ็นต์ sterilized garlic

รูปแบบที่ 4 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + 100 ppm $NaNO_2$ + 5 เปอร์เซ็นต์ sterilized garlic

รูปแบบที่ 5 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบที่ 6 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml + 100 ppm $NaNO_2$

รูปแบบที่ 7 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + *Lb. plantarum* RS49 $1.0x10^6$ cfu/ml + 5 เปอร์เซ็นต์ sterilized garlic

รูปแบบที่ 8 คือ ISMB + SA 10^4 cfu/ml + *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml + 5 เปอร์เซ็นต์ sterilized garlic + 100 ppm $NaNO_2$

จากนั้นบ่ม ISMB ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการตรวจนับเชื้อ *S.* Anatum ที่เหลือรอดใน ISMB รูปแบบต่างๆทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นที่ใส่ *S.* Anatum (0 ชั่วโมง) จนบ่มครบ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธี spread plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD ทำการบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ *S.* Anatum เหลือรอดและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บ (วิธีการตามภาคผนวก ค10)

ตรวจนับเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ใน ISMB รูปแบบต่างๆทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นที่ใส่ *Lb. plantarum* RS49 (0 ชั่วโมง) จนบ่มครบ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธี spread plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นกรดแลคติก

3.6.8 การศึกษาคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

โดยเตรียมส่วนผสมสูตรตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 3.1 นวดส่วนผสมจนเข้ากัน แบ่งส่วนผสมออกเป็น 2 ส่วน เพื่อควบคุมการหมักตามธรรมชาติ และใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/g เป็นกล้าเชื้อในการหมัก ทำการหมักเป็นเวลา 2 วัน โดยเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานในวันที่ 0 1 และ 2 เพื่อไปวิเคราะห์สมบัติต่างๆของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

3.6.8.1 ศึกษาปริมาณการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

นำไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตร มาศึกษาหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกบน MRS Agar + $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี spread plate technique บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวกที่ ค1) และทำการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.8.2 วิเคราะห์สมบัติทางเคมี

เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติค ค่าพีเอชและปริมาณน้ำอิสระ ของไส้กรอกอีสานในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.4.1

3.6.8.3 การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ห้ามพบในส่วนผสมไส้กรอกอีสาน ตาม มผช. (144/2546)

1. เชื้อซัลโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม โดยวิธี Standard conventional medthod (AOAC, 2005) (ภาคผนวก ค2)
2. เชื้อ coagulase positive *Staphylococcus aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม การทดสอบปฏิบัติตาม AOAC (2000) (ภาคผนวก ค3 และ ค4)
3. เชื้อ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN ต้องพบน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ตาม AOAC (2005) (ภาคผนวก ค5)
4. ยีสต์และรา การทดสอบปฏิบัติตาม BAM (2001) ต้องพบน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อ 1 กรัม AOAC (2005) (ภาคผนวก ค7)

3.6.9 ตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติก *Lb. plantarum* RS49 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานโดยเทคนิค PCR-RAPD

3.6.9.4 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอีสาน

หลังจากทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 จากข้อ 3.6.8.1 ทำการสุ่มโคโลนีที่มีโซนใสนำมาเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture โดยใส่กลีเซอรอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร รวมกับสารละลายเชื้อแบคทีเรียแลกติกปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำ stock culture ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก มาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวโดยวิธี streak plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar + $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ มาทำโคโลนี PCR เพื่อยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในขั้นตอนการทำ PCR – RAPD ในหัวข้อต่อไป

3.6.9.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) โดยเทคนิค PCR - RAPD

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่ทราบสายพันธุ์และแยกได้ในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 จากข้อ 3.6.9.1 มาสังเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์ OPA-3 (5′-AGTCAGCCAC-3′) (Oneca *et al.*, 2003) ที่จำเพาะกับแบคทีเรียแลกติกเข้าจับแบบสุ่ม ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	10x	1
$MgCl_2$	25 mM	0.8
dNTP	10 mM	0.4
Primer OPA – 3	10 µM	0.4
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.2
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ		7.2
Colony template		
รวม		10

เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยนำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบน ใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

รอบที่ 1	94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที
รอบที่ 2-45	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 นาที
	36 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
รอบที่ 3	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที

แล้วพักปฏิกิริยาที่ 15 °ซ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ เสร็จสิ้นลงขั้นตอนต่อไปคือ ทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (ภาคผนวก ข2)

3.6.9.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.6.9.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading dye 2 ไมโครลิตร มาตรวจสอบบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer โดยใช้ 100 bp DNA Ladder plus เป็น marker เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 โวลต์ นาน 70 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสงแสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ NTSYS pc. ver. 2.1 เพื่อจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) ซึ่งเป็นการนำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลมาสร้างเป็นตาราง matric โดยใช้ระบบตัวเลขคือ ถ้ามีการปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 ซึ่งต้องบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอแล้วแสดงผลเป็น เดนโดรแกรม (dendrogram) (Rohlf, 2002)

3.6.10 การประเมินคุณภาพไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

นำส่วนผสมไส้กรอกอีสานที่ควบคุมการหมักตามธรรมชาติและไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml บรรจุในไส้หมูหรือไส้คอลลาเจนในสภาวะที่คัดเลือกโดยพิจารณาในด้านการยอมรับของผู้บริโภคจากผลการทดลองข้อ 3.6.4 หมักเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการปิ้งบนเตาไฟฟ้า ปิ้งกลับด้านไส้กรอกอีสานทุกๆ 5 นาที ปิ้งนานประมาณ 20 -30 นาที จากนั้นทำการทดสอบความแตกต่างโดยรวมของผลิตภัณฑ์แบบ triangle test ใช้ผู้ชิมทั่วไปที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 24 คน เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ปรับปรุงคุณภาพแล้วกับมาตรฐานหรือตัวอย่างควบคุม พิจารณาตัวอย่างทั้งหมด 3 ตัวอย่างเป็นตัวอย่าง Unknown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการควบคุมสภาวะการหมักต่อสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา เคมีบางประการและความชอบของผู้บริโภคต่อคุณภาพของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคที่ใช้ไส้คอลลาเจนและไส้หมูสด

จากการผลิตไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคพื้นเมืองที่บรรจุในไส้หมูสดและไส้คอลลาเจน โดยทำการหมักที่สภาวะแตกต่างกันคือ สภาวะการหมักแบบสด และสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง เมื่อทำการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก และสมบัติทางเคมี ในผลิตภัณฑ์ก่อนการหมักและหลังหมักครบ 2 วัน (ตารางที่ 4.1) ปัจจัย A คือปัจจัยเรื่องไส้ ได้แก่ ไส้หมูและไส้คอลลาเจนไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกและสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ปริมาณน้ำอิสระ และค่าความชื้น ($p>0.05$) ส่วนปัจจัย B คือวิธีการหมักแบบสดและแบบกึ่งแห้งไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกและสมบัติทางเคมี คือ ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ($p>0.05$) แต่มีอิทธิพลต่อ ปริมาณน้ำอิสระ และค่าความชื้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัย ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยทางสถิติของไส้ที่ใช้บรรจุต่อสมบัติด้านต่างๆ

Study list	ไส้ (A)		การหมัก (B)		p value		
	ไส้หมู	คอลลาเจน	สด	กึ่งแห้ง	A	B	A×B
LAB (log cfu/g)	8.56	7.56	8.10	8.29	.994	.176	.418
pH	4.84	4.88	4.90	4.90	.424	.891	.092
Lactic acid (%)	0.44	0.54	0.50	0.45	.603	.386	.297
Aw	0.966	0.961	0.967	0.959	.873	.003*	.073
Moisture Content (%)	49.20	51.21	53.15	47.26	.320	.019*	.524

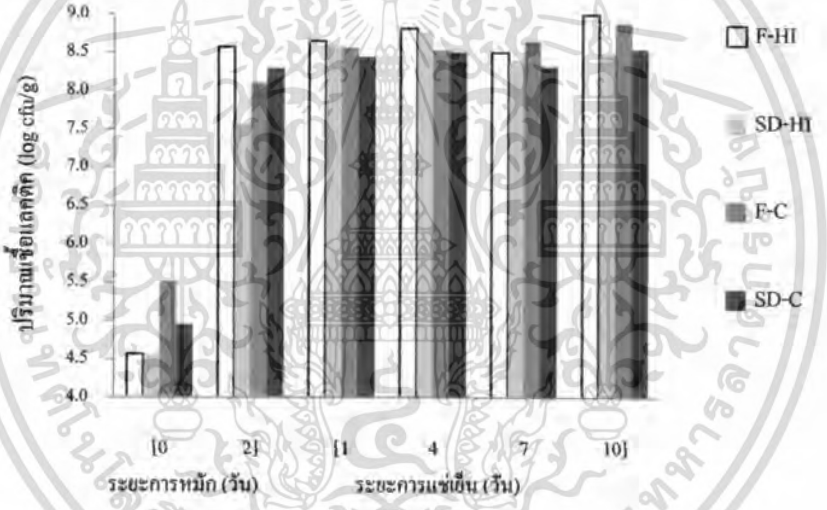
* แสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

4.1.1 ผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสาน

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกเมื่อผ่านระยะเวลาในการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกของไส้กรอกอีสาน ทั้งสี่ตัวอย่างมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 4-5 log cfu/g ปริมาณเชื้อมีการเพิ่มขึ้นอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็วถึง 7-8 log cfu/g หลังการหมัก 2 วัน (ภาพที่ 4.1) และเชื้อจะมีปริมาณคงที่ในช่วงการเก็บที่อุณหภูมิ 4-7 °ซ เป็นเวลา 10 วันที่ 8 log cfu/g โดยไส้กรอกอีสานในสภาวะการหมักแบบสดมีการเพิ่มจำนวนหลังจากระยะการหมัก 2 วัน มากกว่าแบบกึ่งแห้งโดยเฉพาะไส้หมูในสภาวะการหมักแบบสดมีการเพิ่มปริมาณของเชื้อมากที่สุด และจากภาพจะเห็นได้ว่ามีการเพิ่มปริมาณขึ้นอีกเล็กน้อยหลังจากมีการแช่เย็น เมื่อจบระยะเวลาในการศึกษาไส้หมูในสภาวะการหมักแบบสดยังคงมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อมากที่สุดประมาณ 9 log cfu/g รองลงมาคือไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบสด ไส้หมูสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง และไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Samelis *et al.* (1994) ที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในซาลามี่หมัก ว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในระยะเวลาที่ทำการทดลอง



ภาพที่ 4.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูสด (HI) และไส้คอลลาเจน (C) หมักในสภาวะแบบสด (F) และแบบกึ่งแห้ง (SD) ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษาในตู้เย็น

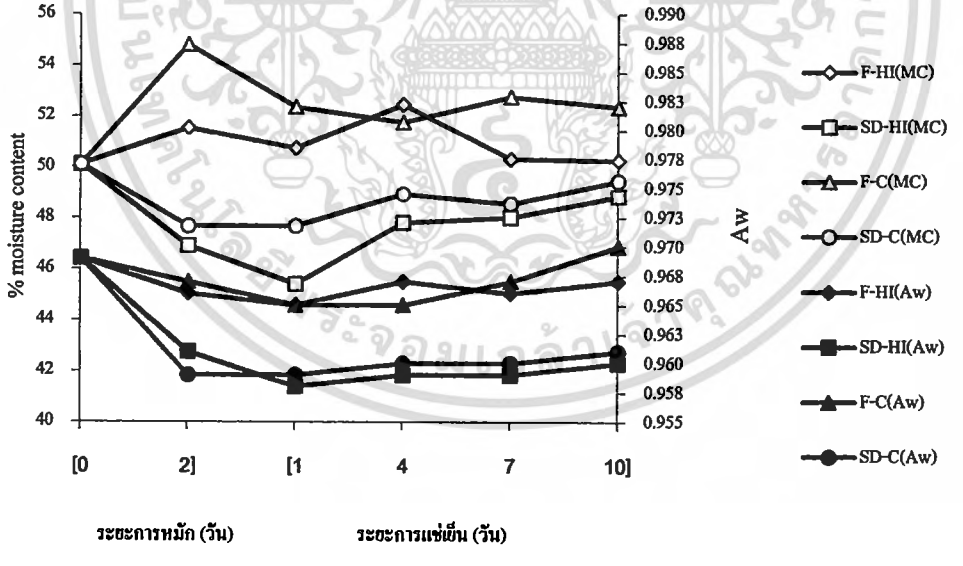
4.1.2 ผลการวิเคราะห์ความชื้นของผลิตภัณฑ์ และปริมาณน้ำอิสระ

ความชื้นเริ่มต้นของไส้กรอกอีสานทั้งสี่ตัวอย่างอยู่ที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.2) เมื่อผ่านระยะเวลาในการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน ไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบสด มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นประมาณ 51-55 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งที่มีความชื้นลดลงอยู่ที่ประมาณ 47-48 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยรุจริน ลิ้มศุภวานิช และจุฑารัตน์เศรษฐกุล (2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวว่าความชื้นที่พอเหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อลดรูปชนิดหยาบแบบกึ่งแห้งอยู่ที่ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์ค่าความชื้นของไส้กรอกอีสานแบบกึ่งแห้งเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในระหว่างการเก็บในตู้เย็นตลอด 10 วัน เนื่องจากไส้หมูซึ่งเป็นไส้ธรรมชาติสามารถหดตัวได้ดี ไส้จึงรัดแนบกับส่วนผสมได้สนิททำให้เกิดการสูญเสียความชื้นได้ง่ายกว่าไส้คอลลาเจน และไส้หมูยังยอมให้ความชื้นและควันไฟซึมผ่านได้ดีกว่าด้วย (อิ่มเอิบ พันสด, 2549)

ปริมาณน้ำอิสระของไส้กรอกอีสานทั้งสี่แบบ (ภาพที่ 4.2) เมื่อเริ่มการทดลองตัวอย่างทั้งสี่มีปริมาณน้ำอิสระอยู่ที่ประมาณ 0.968-0.969 เมื่อผ่านระยะเวลาในการหมัก ตัวอย่างทั้งสี่มี ปริมาณน้ำอิสระลดลง โดยไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบสด มีปริมาณน้ำอิสระลดลงเล็กน้อยเหลือประมาณ 0.966 - 0.967 ซึ่งลดลงน้อยกว่าไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง ($p \leq 0.05$) ที่มีปริมาณน้ำอิสระลดลงอยู่ระหว่าง 0.959 และ 0.961 โดยตัวอย่างที่หมักในสภาวะการหมักแบบสดซึ่งบรรจุในถุงปิดสนิทมีการถ่ายเทความชื้นจากข้างในออกสู่ภายนอกได้น้อย จึงเกิดหยดน้ำที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ เป็นสาเหตุทำให้ความชื้นถูกกักอยู่ภายใน (Wedliny Domowe national convention, 2008) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับค่าความชื้น ในภาพที่ 4.2 พบว่าเมื่อค่าความชื้นเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำอิสระจะเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเก็บตัวอย่างทั้งสี่ในตู้เย็นเป็นเวลา 10 วัน มีผลทำให้ ปริมาณน้ำอิสระเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย (วารสารจาร์พา, 2545)

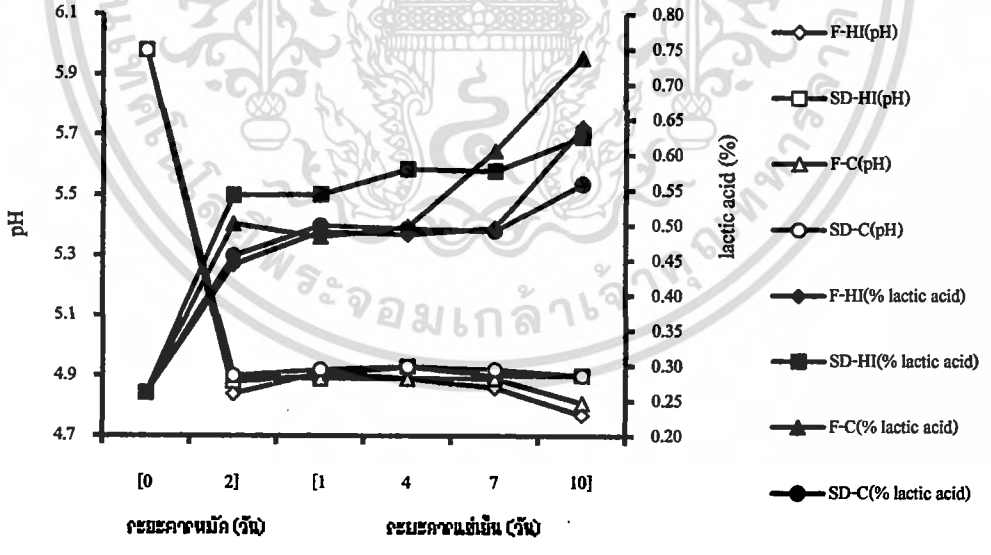


ภาพที่ 4.2 ค่าความชื้น (MC) และปริมาณน้ำอิสระ (Aw) ของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูสด (HI) และไส้คอลลาเจน (C) หมักในสภาวะแบบสด (F) และแบบกึ่งแห้ง (SD) ในระหว่างการหมักและเก็บรักษาในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

ปริมาณกรดแลคติกเริ่มต้นของไส้กรอกอีสานทั้งสี่ตัวอย่างอยู่ที่ประมาณ 0.26 เปอร์เซ็นต์ และมีการเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อผ่านระยะเวลาในการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน โดยไส้หมูที่มีสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งมีการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกมากที่สุดประมาณ 0.54 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างทั้งสี่มีการลดลงของค่าพีเอชไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ใกล้เคียงกันประมาณ 0.44-0.54 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของค่าพีเอช (ภาพที่ 4.3) เมื่อเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงไปด้วยโดยตัวอย่างทั้งสี่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 5.9-6.0 เมื่อผ่านระยะเวลาในการหมัก ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว อยู่ที่ประมาณ 4.8-4.9 โดยไส้หมูที่มีสภาวะการหมักแบบสดมีการลดลงของค่าพีเอชมากที่สุด และมีการลดลงมากที่สุดจนจบการทดลอง รองลงมาคือไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบสด ไส้หมูในสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งและไส้คอลลาเจนในสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง ตามลำดับ ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของทั้งสี่ตัวอย่างในช่วงเวลาการหมัก 2 วัน ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งในด้านของไส้บรรจุและสภาวะการหมัก ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างในตู้เย็นเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของทั้ง 4 ตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่เช่นเดียวกับค่าพีเอชตั้งแต่การแช่เย็นวันที่ 1 จนถึงวันที่ 7 จากนั้นในวันที่ 10 จะพบว่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.3 ค่าพีเอช (pH) และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูสด (HI) และไส้คอลลาเจน (C) หมักในสภาวะแบบสด (F) และแบบกึ่งแห้ง (SD) ในระหว่างการหมักและเก็บรักษาในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกเล็กน้อยโดยเฉพาะในไส้คอลลาเจนแบบสดที่มีการเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกตั้งแต่การเก็บในตู้เย็นวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับผลการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (ข้อ 4.1.1) และรายงานของดวงพร คันธโชติ (2535) เกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกตามระยะเวลาในการหมักเป็นผลมาจากการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น และผลของการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกก็สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น

4.1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

หลังจากผ่านระยะการหมักแบบสดและแบบกึ่งแห้งของไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้หมูและไส้คอลลาเจนครบ 2 วันที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ นำมาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ชิม 20 คน ให้คะแนนความชอบแบบ 9 Point Hedonic Scale จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าความชอบของผู้บริโภคในไส้กรอกหมักทั้งสี่ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ผู้บริโภคมีแนวโน้มให้คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวม ในตัวอย่างไส้หมูที่มีสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งมากที่สุด โดยคะแนนอยู่ในช่วง 6.56-6.98 อยู่ในระดับความชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง แต่คุณลักษณะด้านกลิ่นผู้บริโภคมีแนวโน้มให้คะแนนความชอบต่อไส้กรอกหมักไส้คอลลาเจนที่มีสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้งมากที่สุด

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานเนื้อโคพื้นเมืองที่บรรจุในไส้หมูสดและไส้คอลลาเจนทำการหมักที่สภาวะต่างกัน

ไส้บรรจุ	สภาวะการบ่ม^{ns}	ลักษณะปรากฏ^{ns}	สี^{ns}	กลิ่น รส^{ns}	เนื้อสัมผัส^{ns}	รสชาติ^{ns}	ความชอบโดยรวม^{ns}
ไส้หมูสด	สด	6.00	6.40	6.21	6.00	6.41	6.35
	กึ่งแห้ง	6.56	6.67	6.23	6.68	6.91	6.98
ไส้คอลลาเจน	สด	6.06	6.16	6.26	6.08	6.06	6.31
	กึ่งแห้ง	6.23	6.50	6.36	6.03	6.13	6.33

ns = non-significance

หมายเหตุ เกณฑ์การให้คะแนนความชอบแบบ 9 Point Hedonic Scale

1= ไม่ชอบมากที่สุด 2= ไม่ชอบมาก 3= ไม่ชอบปานกลาง 4= ไม่ชอบเล็กน้อย
5= เฉยๆ 6= ชอบเล็กน้อย 7= ชอบปานกลาง 8= ชอบมาก 9= ชอบมากที่สุด

เมื่อพิจารณาปัจจัยต่างๆที่ทำการศึกษา ไส้คอลลาเจนจึงมีแนวโน้มในการนำมาทดแทนการใช้ไส้หมูในการผลิตไส้กรอกอีสานเนื้อได้ เนื่องจากสมบัติทางด้านเคมีและจุลชีววิทยาที่ไม่แตกต่างกันในการหมักแบบสดหรือแบบกึ่งแห้ง อีกทั้งการยอมรับจากผู้บริโภคในไส้กรอกอีสานจากที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุในไส้คอลลาเจนใกล้เคียงกับไส้หมู อีกทั้งไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้คอลลาเจนยังช่วยปรับปรุงเรื่องของกลิ่น รส ให้ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือกไส้กรอกอีสานที่บรรจุในไส้คอลลาเจนหมักในสภาวะแบบสดเพื่อทำการศึกษาการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อควบคุมการหมักให้ได้ผลตามที่ต้องการและช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้เร็วขึ้น เช่น เชื้อซัลโมเนลลาซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษแก่ผู้บริโภค และเป็นการเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์อีกทางหนึ่งด้วย

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantarum* RS49

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน ที่เตรียมได้หลังจากเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49 มาเพาะเลี้ยงใน MRS broth และบ่มเพาะเชื้อที่ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อและกรองเอาส่วนใสที่มีสารสกัดแบคเทอริโอซินปลอดเชื้อ นำสารสกัดแบคเทอริโอซินที่ได้มาทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมด้วยการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* (JCM 1157^{T})โดยแบ่งตามระดับการเจือจางของแบคเทอริโอซิน: น้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:0 - 1:64 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดโซนใสในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* เพื่อหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่เหมาะสม ผลการทดลองดังภาพที่ 4.4

ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* RS49 ที่มีผลต่อ *Lb. sakei* (JCM 1157^{T})

จากภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* RS49 พบว่าการเกิดโซนใสในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* ที่เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ เริ่มจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินมากที่สุดที่ 1:0 จากนั้นการเพิ่มระดับการเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้จนถึงระดับการเจือจางของแบคเทอริโอซิน: น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ 1: 4 ที่ระดับความเจือจางที่ 1: 8 ถึง 1:64 ไม่พบการยับยั้งเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทดสอบ ซึ่งการเกิดโซนใสจากการที่แบคเทอริโอซินไปยับยั้งการขนส่งน้ำตาลแมนโนส (mannose) ของเซลล์ และยับยั้งโดยก่อให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และรบกวนการสร้างผนังเซลล์ทำให้รบกวนการขับเคลื่อนโปรตอนภายในเซลล์ (proton motive force) (ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 2555) เมื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจากค่าความเจือจางสูงสุดที่เกิดโซนใสตามวิธีในภาคผนวก ค. คำนวณได้ 400 AU/ml จากข้อมูลดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการทดลองในข้อ 4.3 ต่อไป

4.3 ผลของกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum (SA) ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)

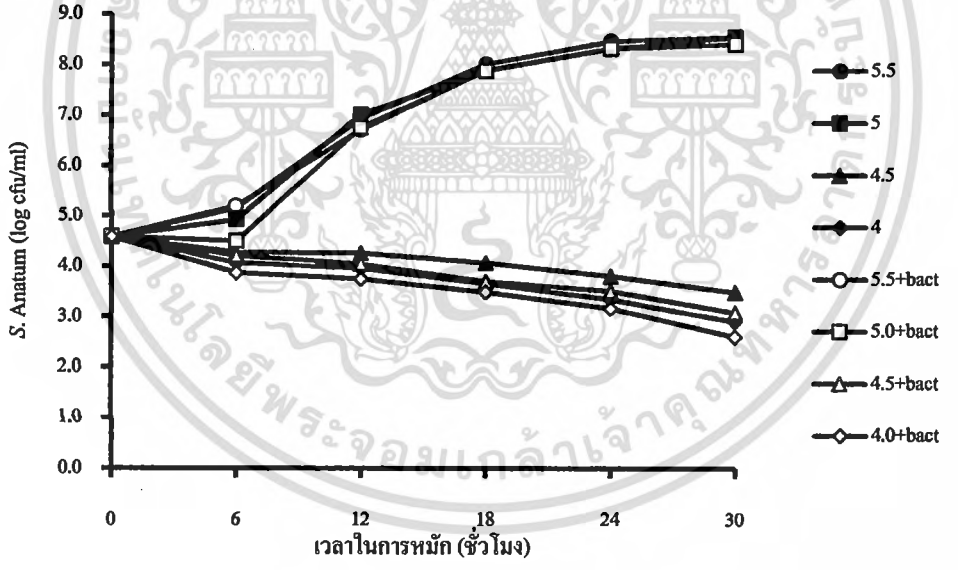
การทดลองการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณเริ่มต้น 4 log cfu/มิลลิลิตร ด้วยกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โดยปรับค่าพีเอชของรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดสอบการทนต่อสภาวะการหมักไส้กรอกอีสานของเชื้อซัลโมเนลลาโดยปรับสภาวะที่ค่าพีเอช 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินประมาณ 400 AU/ml ที่ได้จากผลการทดสอบในข้อ 4.2 และกลุ่มที่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ และนำตัวอย่างมาทำการตรวจนับเชื้อ *S.* Anatum ด้วยวิธี spread plate ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 30 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD จากนั้นบ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.1 ผลการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Anatum (SA) ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.5 รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีค่าพีเอช 4.0 และ 4.5 มีแนวโน้มในการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 จนถึงชั่วโมงที่ 30 เมื่อพิจารณารูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติก 4.0 และ 4.5 ที่เติมและไม่เติมแบคเทอริโอซิน พบว่าแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ดีกว่ารูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกอย่างเดียว เนื่องจากแบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550) จึงเป็นการรบกวนสมดุลทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออนจากนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซิน แต่ฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของซัลโมเนลลาได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงยังสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจพบได้ในชั่วโมงที่ 30 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Swetwiwathana *et al.* (2007) ที่ได้ทดลองการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ด้วยกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่มีค่ากิจกรรม 6400 AU/ml ผลิตโดย *P. pentosaceus* TISTR536 ในแบบจำลองการหมักแหนมที่ค่าพีเอชต่างๆ พบว่าที่ค่าพีเอช 4.5 ร่วมกับแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 24 ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ แต่ในกรณีของการปรับค่าพีเอช เพียงอย่างเดียวไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในชั่วโมงที่ 30 เนื่องจากการศึกษานี้ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ใช้ในการทดลองมีค่ากิจกรรมที่ 400 AU/ml จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ช้ากว่า นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีค่าพีเอช 5.0 และ 5.5 ทั้งในกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซินและไม่เติมแบคเทอริโอซินไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ จึงมีปริมาณเชื้อ *S.* Anatum เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 18 ของการศึกษา โดยในกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซินมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *S.* Anatum ช้ากว่ากลุ่มที่ไม่เติมแบคเทอริโอซินเล็กน้อย ดังนั้นสรุปได้ว่าการปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติก มีผลต่อการเจริญและการยับยั้ง *S.* Anatum และการใช้ร่วมกับแบคเทอริโอซินจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่าการไม่ใช้แบคเทอริโอซิน



ภาพที่ 4.5 ผลของค่าพีเอชและแบคเทอริโอซินต่อเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 หมายถึง ค่าพีเอช ของรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

bact หมายถึง รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน จะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum มากกว่าการเติมสารละลายกรดแลคติกอย่างเดียว โดยพิจารณาจากรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับค่าพีเอช 4.0 และ 4.5 พบว่า เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีการใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีค่าพีเอช 4.0 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บจะเพิ่มจาก 0 59.95 61.82 72.69 95.21 และ 95.75 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0 6 12 18 24 และ 30 ตามลำดับ ส่วนในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมสารละลายกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ค่าพีเอช 4.5 มีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บเพิ่มจาก 0 10.59 และ 50.45 ในชั่วโมงที่ 0 6 และ 12 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่ปรับ ค่าพีเอชที่ 4.0 และ4.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน (400 AU/ml)

ค่าพีเอชใน ISMB	ชั่วโมงในการบ่ม	*S.* Anatum ใน ISMB ที่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน			*S.* Anatum ใน ISMB เติมแบคเทอริโอซิน		
		TSA (cfu/ml)	XLD (cfu/ml)	เปอร์เซ็นบาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu/ml)	เปอร์เซ็นบาดเจ็บ
4.5	0	38833	38833	0.00	38833	38833	0.00
	6	19050	18800	1.31	16367	14633	10.59
	12	15183	12867	15.25	11267	5583	50.45
	18	11200	5767	48.51	5050	3857	23.62
	24	6500	1950	70.00	3270	1497	54.22
	30	3117	1510	51.56	1223	925	24.37
4.0	0	38833	38833	0.00	38833	38833	0.00
	6	11933	10983	7.96	7533	3017	59.95
	12	9323	5783	37.97	5717	2183	61.82
	18	4657	1803	61.28	3120	852	72.69
	24	2267	160	92.94	1483	71	95.21
	30	807	73	90.95	400	17	95.75

หมายเหตุ Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึง ค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บลดลงอยู่ที่ 23.62 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 18 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 24 สำหรับรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีการเติมสารละลายกรดแลคติกเพื่อปรับพีเอชที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 เพียงอย่างเดียวจะมีการเพิ่มขึ้นและลดลงของเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บลักษณะเดียวกับรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมสารละลายกรดแลคติกเพื่อปรับค่าพีเอช 4.5 ร่วมกับแบคเทอริโอซิน สอดคล้องกับการทดลองของ เรณู ทวิชชาติวิทยากุล (2539) เมื่อเติม *S.* Anatum ปริมาณ 10^3 cfu/ml ลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี *Lb. plantarum* ปริมาณ 10^6 cfu/ml พบว่า *S.* Anatum สามารถถูกทำลายโดยกรดที่ *Lb. plantarum* สร้างขึ้นที่พีเอชประมาณ 3.89-3.93 จากผลของการเหลือรอดของเชื้อ *S.* Anatum ในข้อ 4.3.1 แสดงให้เห็นว่าการเติมแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเซลล์ เนื่องจากฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ จึงต้องใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น กรดแลคติกที่มีความเข้มข้นสูง จะช่วยทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบให้ถูกทำลายเร็วขึ้น (Swetwiwathana *et al.*, 2007) โดยแบคเทอริโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคทีริโอซินส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของพีเอช เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนจากกรดอินทรีย์ภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ กระตุ้นให้เซลล์ใช้พลังงาน ATP ในการปรับสมดุล เมื่อพลังงาน ATP หมดเซลล์ก็ตาย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550) ส่วนรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมสารละลายกรดแลคติกเพื่อปรับค่าพีเอช 5.0 และ 5.5 ทั้งร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินไม่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บเชื้อ *S.* Anatum

4.4 ผลไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในการยับยั้ง *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)

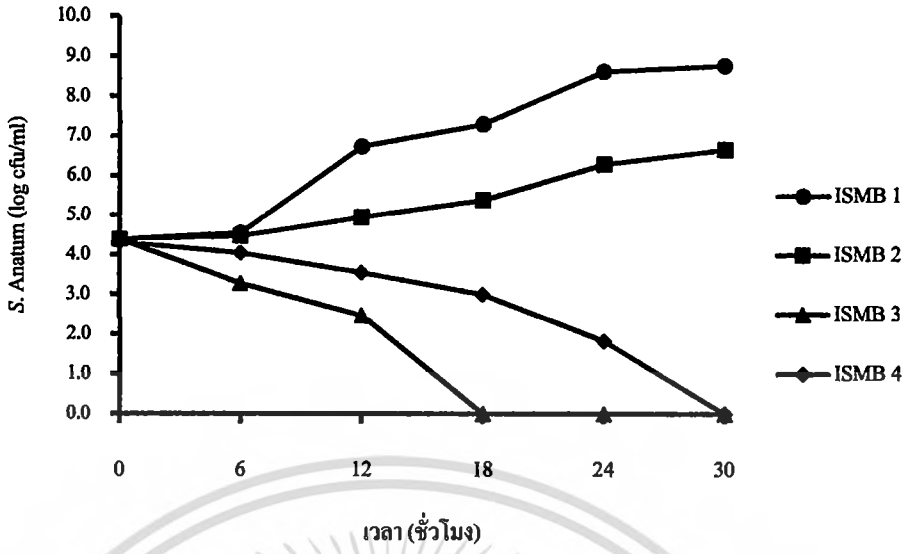
ในการผลิตไส้กรอกอีสานมักเติมไนไตรทโดยมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้สีชมพูที่มีความคงตัว ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อมีรสชาติดีและมีผลป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของไส้กรอกอีสานกำหนดให้ โซเดียมไนไตรทต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2546) และกระเทียมเพื่อเพิ่มกลิ่นรสให้กับไส้กรอกอีสาน โดยกระเทียมมีสารอัลลิซินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในวงกว้าง หลายตัวทั้งกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก (Uchida *et al.*, 1975) นอกจากนี้ Swetwiwathana *et al.* (2007) รายงานว่ากระเทียมและไนไตรทสามารถชะลอการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ของไนไตรทและกระเทียมร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.1 ผลของไนไตรทในการยับยั้ง *S.* Anatum (SA) ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

จากการทดลองในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เพื่อศึกษาผลของไนไตรท 100 พีพีเอ็ม ร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณ 10^6 cfu/ml ต่อการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณ 10^4 cfu/ml เปรียบเทียบกับ ISMB ที่มีการเติม ไนไตรทและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพียงอย่างเดียว จากภาพที่ 4.6 พบว่าไนไตรทมีส่วนช่วยในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum เมื่อเติมส่วนผสมทั้ง 2 อย่างร่วมกันจะมีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.*Anatum ได้ดีที่สุด โดยทำให้จำนวนเชื้อ *S.* Anatum ค่อยๆ ลดลงและหมดไปได้ภายใน 18 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมเพียงกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 อย่างเดียวสามารถทำลายเชื้อ *S.* Anatum ได้หมดในชั่วโมงที่ 30 แต่ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมไนไตรทเพียงอย่างเดียว เชื้อ *S.* Anatum สามารถเพิ่มขึ้นจนถึง 10^6 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งไนไตรทและกล้าเชื้อ พบว่าเชื้อ *S.* Anatum สามารถเจริญได้ดีกว่าจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ถึง 10^8 cfu/ml แสดงให้เห็นว่า ไนไตรทความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum แต่ไม่สามารถลดการเจริญของเชื้อได้ โดย Swetwiwathana *et al.* (1999) รายงานว่าการเติมโซเดียมไน ไตรทความเข้มข้น 125 พีพีเอ็ม ในรูปแบบจำลองแหนม (Nham model broth, NMB) มีผลชะลอการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นเชื้อ *S.* Anatum ค่อยๆเพิ่มปริมาณขึ้นจนเท่ากับ NMB ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมโซเดียมไนไตรทในชั่วโมงที่ 48 แต่ในการทดลองนี้มีการเติมไนไตรทลงในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ดังนั้นเชื้อ *S.* Anatum จึงสามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าการทดลองข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ผลของไนไตรทและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ ISMB 1 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานและเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml

ISMB 2 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm และเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml

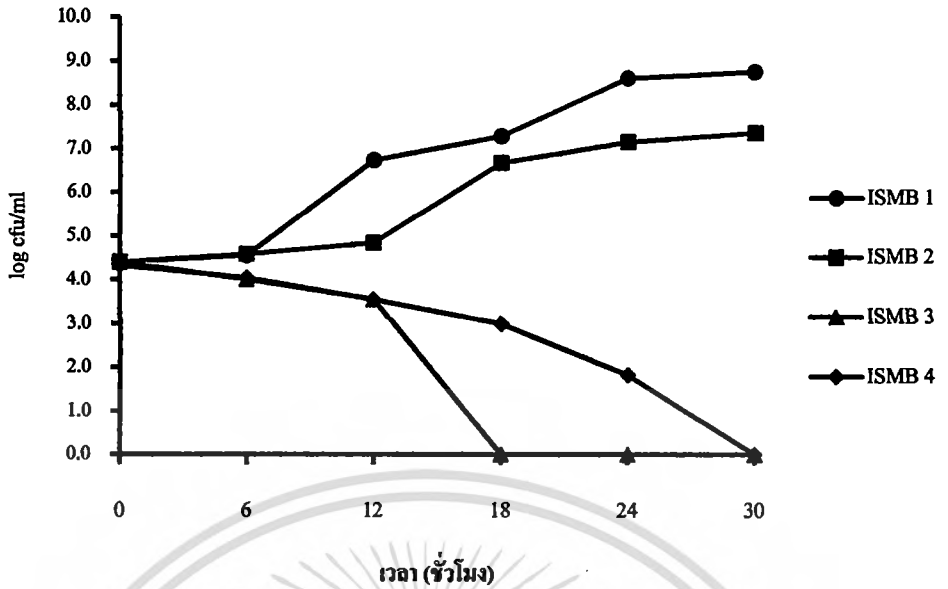
ISMB 3 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

ISMB 4 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

4.4.2 ผลของกระเทียมในการยับยั้ง *S.* Anatum ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

กระเทียมเป็นเครื่องเทศที่ใช้เติมลงในไส้กรอกอีสานเพื่อปรุงแต่งกลิ่นรส และยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงศึกษาการควบคุมเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โดยใช้กระเทียมสับปลอดเชื้อ และกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 จากการทดลองในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เพื่อศึกษาผลของกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์และ *Lb. plantarum* RS49 กล้าเชื้อ ต่อการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณ 10^4 cfu/ml เปรียบเทียบกับรูปแบบจำลองที่มีการเติมกระเทียมปลอดเชื้อหรือกล้า *Lb. plantarum* RS49 เชื้อเพียงอย่างเดียว พบว่า การเติมกระเทียมปลอดเชื้อร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ดีที่สุด (ภาพที่ 4.7) ส่งผลให้จำนวนเชื้อลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 18 นอกจากนี้พบว่ารูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมกระเทียมปลอดเชื้อเพียงอย่างเดียวมีการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมทั้งกระเทียมปลอดเชื้อและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ผลของกระเทียมและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ ISMB 1 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานและเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml

ISMB 2 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน กระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml

ISMB 3 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน กระเทียมสับปลอด เชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

ISMB 4 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เชื้อ *S.* Anatum 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

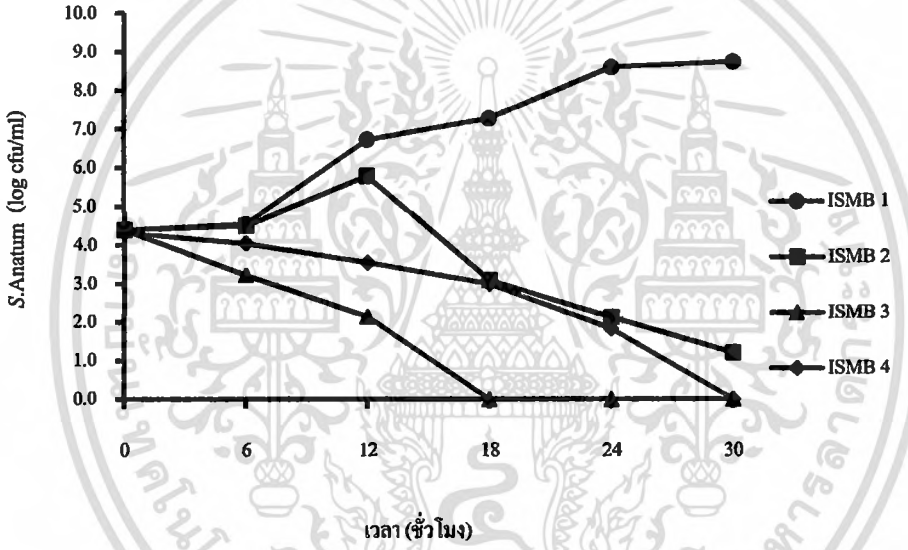
พบว่าเชื้อ *S.* Anatum สามารถเจริญได้ดีกว่าจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ถึง 10^8 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Swetwiwathana *et al.* (2004) การเติมกระเทียมสดในรูปแบบจำลองแหนมสามาถช่วยชะลอการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ เมื่อเติมกระเทียมสดร่วมกับกล้าเชื้อ *P. Pentosaceus* TISTR 536 ในรูปแบบจำลองแหนมพบว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อ *S.* Anatum ได้อย่างรวดเร็ว Ankri และ Mirelman (1999) อ้างว่า สารอัลลิซินบริสุทธิ์ความเข้มข้น 0.2 -0.5 mM ไม่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *S.* Typhimurium ได้อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถยับยั้งอาร์เอ็นเอ ได้และยังมีความจำเพาะในการยับยั้งกระบวนการสร้าง acetyl-CoA

4.4.3 ผลของการใช้ไนไตรทและกระเทียมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

จากการทดลองเติมไนไตรทความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ร่วมกับกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน ต่อเชื้อ *S.* Anatum ปริมาณ 10^4 cfu/ml เปรียบเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบจำลองที่เติมไนไตรท กระเทียมร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 พบว่าการเติมกล้าเชื้อทำให้ยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.8) โดยมีผลทาให้จานวนเชื้อ *S.* Anatum ค่อยๆ ลดลง และหมดไปได้ภายใน 18 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลของSwetwiwathana *et al.* (2004) รายงานว่าการใช้กระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท 125 พีพีเอ็ม และเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทำลายเชื้อ *S.* Anatum ให้หมดไปได้ภายใน 30 ชั่วโมง จากผลในข้อที่ 4.4.1 และ 4.4.2 แสดงให้เห็นว่ารูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมไนไตรทหรือกระเทียมเพียงอย่างเดียว มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ในช่วงแรกของการหมัก (0-12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นเชื้อสามารถเจริญต่อได้ เมื่อทำการเติมไนไตรทร่วมกับกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *S.* Anatum ยังสามารถเจริญได้ในช่วงแรกของการหมัก (0-12 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4.8 ผลของไนไตรทร่วมกับกระเทียมและกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ต่อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ ISMB 1 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานและเชื้อ S. Anatum 10^4 cfu/ml

ISMB 2 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm กระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *S. Anatum* 10^4 cfu/ml

ISMB 3 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm กระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *S. Anatum* 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

ISMB 4 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เชื้อ *S. Anatum* 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายแตกต่างกัน

4.4.6 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน (ISMB)

จากตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในทุกรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 พบว่ารูปแบบจำลองที่ 3 ที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 มีเปอร์เซ็นต์ของการบาดเจ็บมากที่สุด สอดคล้องกับตารางที่ 4.4 การผลิตแบคเทอริโอซินของรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมกระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm และเชื้อ *Lb.* plantarum RS49 10^6 cfu/ml สำหรับรูปแบบจำลองที่เติมกล้าเชื้อพบว่า รูปแบบจำลองที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บมากที่สุดซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลอง ภาพที่ 4.6 การเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 18 โดยไน ไตรทมีผลในการชะลอการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ทำให้กรดสามารถทำลายเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่เติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นและไนไตรท ร่วมและไม่ร่วมกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

ISMB	ชั่วโมงในการหมัก	*S.* Anatum ใน ISMB ที่ไม่เติมกล้าเชื้อ			*S.* Anatum ใน ISMB เติม กล้าเชื้อ		
		TSA (cfu/ml)	XLD (cfu/ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu/ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
2	0	24833.33	24833.33	0	21033.33	21033.33	0
	6	37933.33	12233.33	67.75	10133.33	6575.00	35.12
	12	68733.33	29700.00	56.79	3550.00	1350.00	61.97
	18	465666.67	151666.67	67.43	0.00	0.00	100
	24	14030000.00	953333.33	93.21	0.00	0.00	100
	30	22610000.00	22166666.67	1.96	0.00	0.00	100
3	0	24833.33	24833.33	0	21033.33	21033.33	0
	6	29833.33	6766.67	77.32	1900.00	175.00	90.79
	12	88833.33	7816.67	91.20	293.33	10.00	96.59
	18	238690.00	36466.67	84.72	0.00	0.00	100
	24	1909333.00	1317166.67	31.01	0.00	0.00	100
	30	4431333.33	1816666.67	59.00	0.00	0.00	100
4	0	24833.33	24833.33	0	21033.33	21033.33	0
	6	31850.00	5133.33	83.88	1683.33	1300.00	22.77
	12	61666.67	1000.00	98.38	138.33	117.50	15.06
	18	1233.33	0.00	100.00	0.00	0.00	100
	24	133.33	0.00	100.00	0.00	0.00	100
	30	16.00	0.00	100.00	0.00	0.00	100

หมายเหตุ ISMB 2 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน กระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

ISMB 3 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โซเดียมไนไตรทปลอดเชื้อ 100 ppm และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

ISMB 4 คือ รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน กระเทียมสับปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท ปลอดเชื้อ 100 ppm และเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

จากการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ (สูตรที่ 1) และไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml (สูตรที่ 2) บรรจุในไส้หมูหรือไส้คอลลาเจนในสภาวะแบบกึ่งแห้ง เพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ห้ามพบในส่วนผสมไส้กรอกอีสานตาม มผช. ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณน้ำอิสระ ของไส้กรอกอีสานในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก ดังนี้

4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก

จากการนำไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตรการหมัก มาตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกบน MRS agar + $CaCo_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี spread plate technique บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ ในสภาพไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกตามระยะเวลาการหมัก จากภาพที่ 4.11 พบว่า ไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตร มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียแลคติกอย่างสม่ำเสมอ จากวันที่เริ่มต้นการหมักวันที่ 0 ไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นที่ 6.31 log cfu/g และไส้กรอกอีสานสูตรที่ 2 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นที่ 6.91 log cfu/g เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมักวันที่ 2 พบว่า ไส้กรอกอีสานมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นถึง 8.18 และ 8.73 cfu/g ตามลำดับ

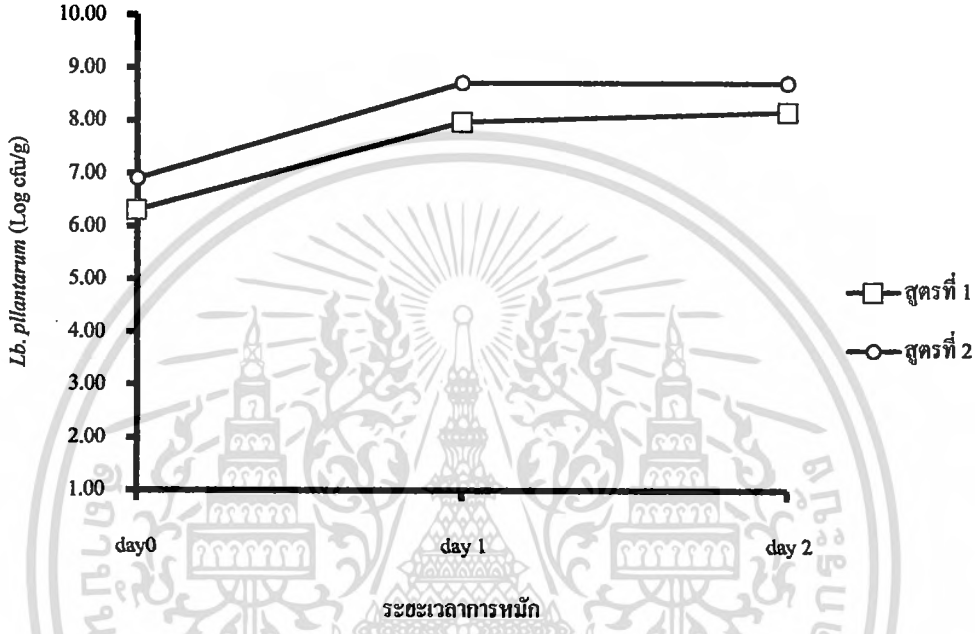
4.5.2 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกและพีเอชในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกและพีเอชในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน พบว่าไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตร มีการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก (ภาพที่ 4.12) จึงเป็นผลทำให้มีการลดลงของพีเอชจากค่าพีเอชเริ่มต้นของการหมัก 6.03 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักมีค่าพีเอชที่ 4.29-4.52 เนื่องจากการสร้างกรดจากแบคทีเรียแลกติกที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานรวมไปถึงการสร้างกรดจากกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงไป โดยเมื่อสิ้นสุดการหมัก ไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก 0.87 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก 0.95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลการศึกษาค่า Aw ในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

ปริมาณน้ำอิสระของไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตร (ตารางที่ 4.6) เมื่อเริ่มการทดลองตัวอย่างทั้งสองมีค่า Aw อยู่ที่ประมาณ 0.9631-0.9687 เมื่อผ่านระยะเวลาในการหมัก ไส้กรอกอีสานทั้งสองมี ค่า Aw ลดลง เมื่อสิ้นสุดระยะในการหมักไส้กรอกอีสานมีค่า Aw 0.9467-0.9526

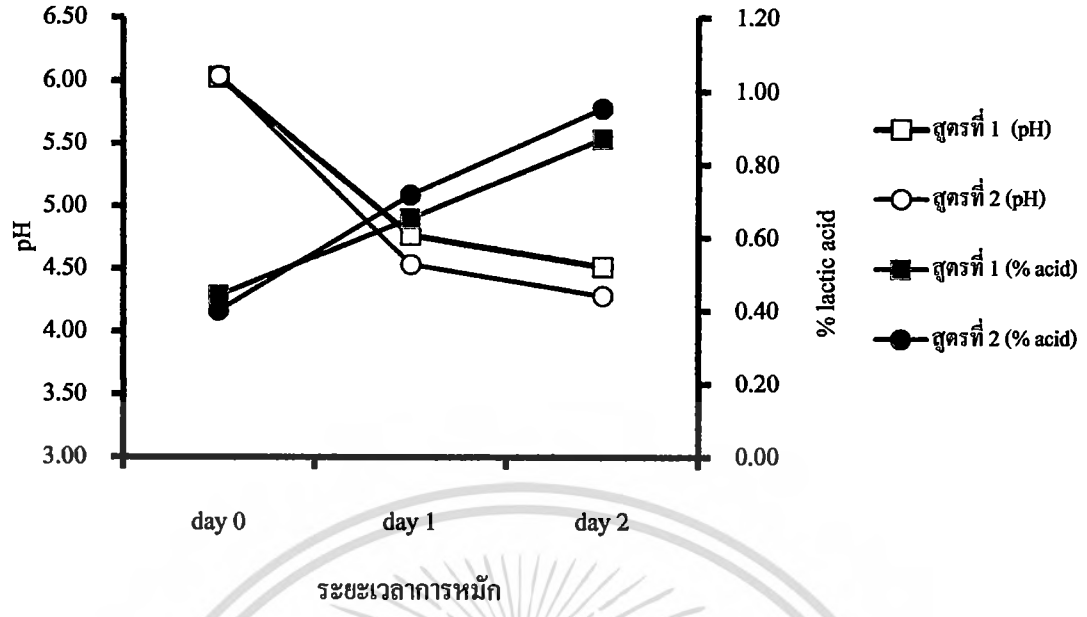


ภาพที่ 4.11 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ : สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ

สูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกในกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

หมายเหตุ : สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ
สูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ค่า Aw ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสาน	ระยะเวลาการหมัก		
	Day0	Day 1	Day2
สูตรที่ 1	0.9687	0.9625	0.9467
สูตรที่ 2	0.9631	0.9586	0.9526

หมายเหตุ : สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ
สูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml

4.5.4 ผลการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ห้ามพบในส่วนผสมไส้กรอกอีสาน

หลังจากทำการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตร ที่หมักในวันที่ 0 1 และ 2 มาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนดตาม มผช. (144/2546) จากตารางที่ 4.7 พบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่หมักโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ และไส้กรอกอีสานที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 25 กรัม ผลการทดลองเป็นไปในทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

จุลินทรีย์	มาตรฐาน มผช.	สูตรที่ 1			สูตรที่ 2		
		วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2
Salmonella / 25 g	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Staph. aureus / 0.1 g	ไม่พบ	พบ	พบ	พบ	พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
MPN *E. coli* / g	< 3	9.4	6	<3	<3	<3	<3
yeast/ g	< 10	3.48	3.45	2	2.62	2.13	2
Molds/ g	< 10	2.07	1.87	0	1.74	1	0

หมายเหตุ : สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ
สูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml

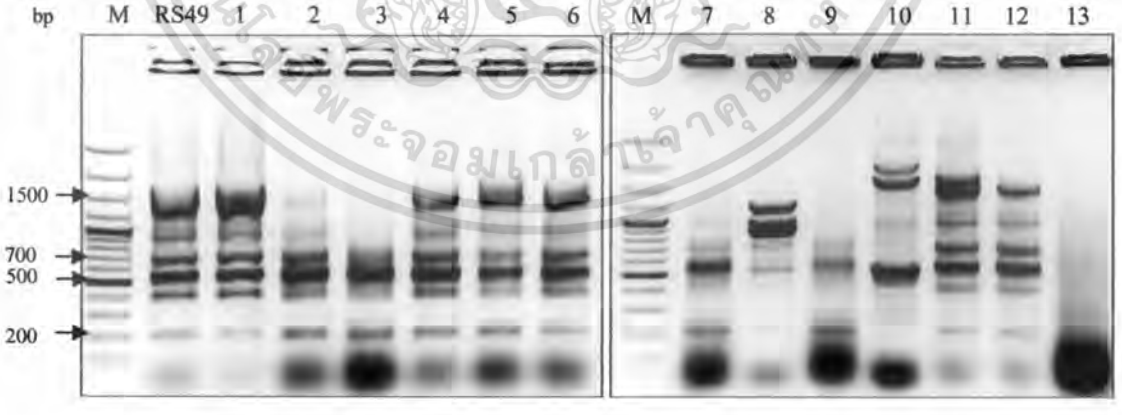
เดียวกันกับข้อที่ 4.3.1 ผลร่วมของกรดแลคติกกับแบคเทอริโอซินต่อการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Anatum ในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่พบว่า รูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ เมื่อเทียบกับการทดลองนี้ไส้กรอกอีสานทั้ง 2 สูตรมีค่าพีเอช 4.29-4.52 เมื่อสิ้นสุดการหมัก การวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Staph. aureus* พบมีการปนเปื้อนในไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1 ตลอดระยะเวลาในการหมัก สำหรับไส้กรอกอีสานสูตรที่ 2 ที่มีการเติมเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมัก พบการปนเปื้อนเมื่อเริ่มต้นการหมัก และตรวจไม่พบในการหมักวันที่ 1 และ 2 เชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบในการหมักและปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gonzalez-Fandos และคณะ (1999) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่ทนเกลือและทนไนไตรทได้ดี รวมทั้งสามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อย จึงสามารถตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ผ่านการหมักแล้ว 2 วัน ส่วนเชื้อ *E. coli* เกณฑ์ มผช. (144 – 2546) ระบุว่าต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1 มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* เกินมาตรฐานที่กำหนดเล็กน้อย ส่วนไส้กรอกอีสานสูตรที่ 2 พบการปนเปื้อนต่ำกว่าที่มาตรฐานกำหนด (<3) สอดคล้องการทดลองของ อรัญญา สังขศรี (2541) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* ที่แยกได้จากอาหารหมักของไทย สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดี เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในการหมักสามารถผลิตไดอะซิติลและอะซิทัลดีไฮด์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียลบได้ (Jay, 1982; Liu และ Pilone, 1998) ส่วนเชื้ออื่นๆ ซึ่งได้แก่จำนวนยีสต์ พบว่าลดลงจากวันแรกทั้ง 2 สูตรการทดลอง และเชื้อราพบว่ามีค่าต่ำกว่าที่มาตรฐานกำหนด ในการผลิตไส้กรอกอีสานควรเลือกวัตถุดิบจากแหล่งที่ได้มาตรฐานและต้องมีการจัดการการผลิตที่ดีในด้านของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุขลักษณะการปฏิบัติงาน ไส้กรอกอีสานต้องผ่านการให้ความร้อนให้เพียงพอก่อนการบริโภค เช่น ด้วยการปิ้งหรือการย่าง จะช่วยสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้

4.6 ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติก *Lb. plantarum* RS49 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานโดยเทคนิคพีซีอาร์ - อาร์เอพีดี

จากการนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPA-3 (5′-AGTCAGCCAC-3′) เพื่อใช้จำแนกกลุ่มแบคทีเรียแลคติกเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลคติกที่สุ่มแยกได้ในไส้กรอกอีสานที่กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในกระบวนการหมักวันที่ 0 และวันที่ 2 จำนวน 53 และ 56 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer โดยใช้ 100 bp DNA Ladder plus เป็น marker เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 70 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล พบกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสานมีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 บริสุทธิ์ ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเกิดขึ้น 4 แถบ มีขนาดประมาณ 200, 500, 700, และ 1,500 bp ตามลำดับ ผลการศึกษาดังภาพที่ 4.13 และ 4.14 และกลุ่มแบคทีเรียแลคติกอื่นๆที่มีลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49



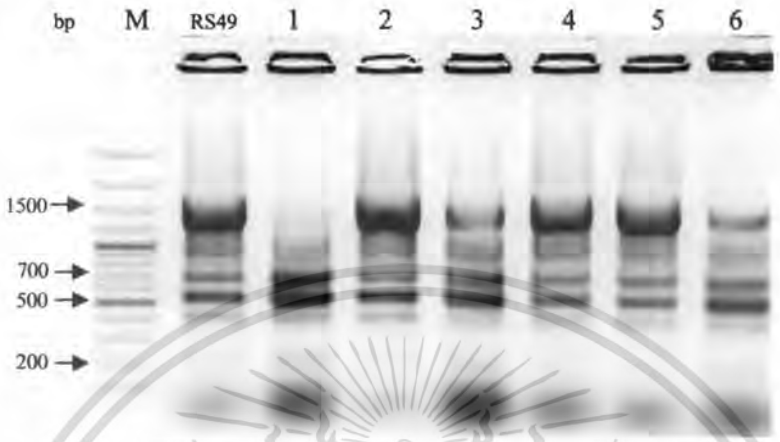
ภาพที่ 4.13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ OPA-3 กับแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในกระบวนการหมักวันที่ 0 เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 บริสุทธิ์

ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder plus

ช่อง RS49 คือ แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่อง 1-13 คือ แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอโซเลทแบคทีเรียแลคติกที่ 1-6 และ 24-30 ในไส้กรอกอีสานจากกระบวนการหมักวันที่ 0



ภาพที่ 4.14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ OPA-3 กับแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในกระบวนการหมักวันที่ 2 เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 บริสุทธิ์

ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder plus

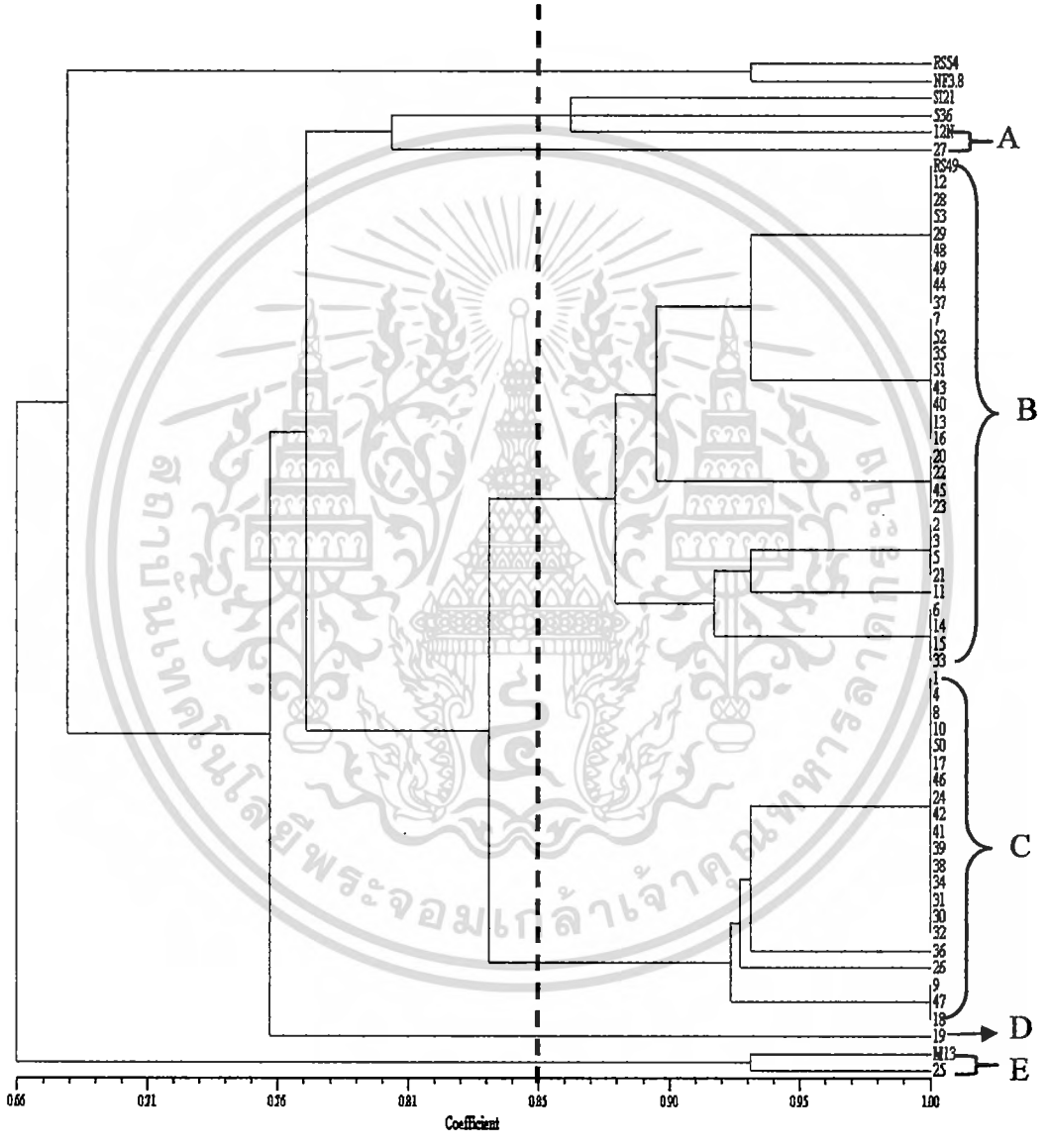
ช่อง RS49 คือ แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

ช่อง 1-6 คือ แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอโซเลทแบคทีเรียแลคติกที่ 12-17 ในไส้กรอกอีสานจากกระบวนการหมักวันที่ 2

เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานด้วยวิธี UPGMA กับโปรแกรม NTSYS pc. ver. 2.1 ซึ่งเป็นการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลมาสร้างเป็นตาราง matric โดยใช้ระบบตัวเลขคือ ถ้ามีการปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 ซึ่งต้องบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอแล้วแสดงผลเป็น เดนโดรแกรม (dendrogram) ตามภาคผนวก ง. สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในวันที่ 0 จำนวน 53 ไอโซเลท ได้ 5 กลุ่มที่ค่าความเหมือนกัน 85 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.15) โดยกลุ่ม (cluster) A เป็นกลุ่มที่มีค่าความเหมือนกับเชื้อ *Lb. lactis* จำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท 27) กลุ่ม B เป็นกลุ่มของเชื้อ *Lb. plantarum* พบมากที่สุด จำนวน 29 ไอโซเลท กลุ่ม C จำนวน 21 ไอโซเลท และ กลุ่ม D จำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท 19) ไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มใดเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ และกลุ่ม E เป็นกลุ่มของเชื้อ *P. pentosaceus* จำนวน 1 ไอโซเลท (ไอโซเลท 25) ส่วนกลุ่มแบคทีเรีย

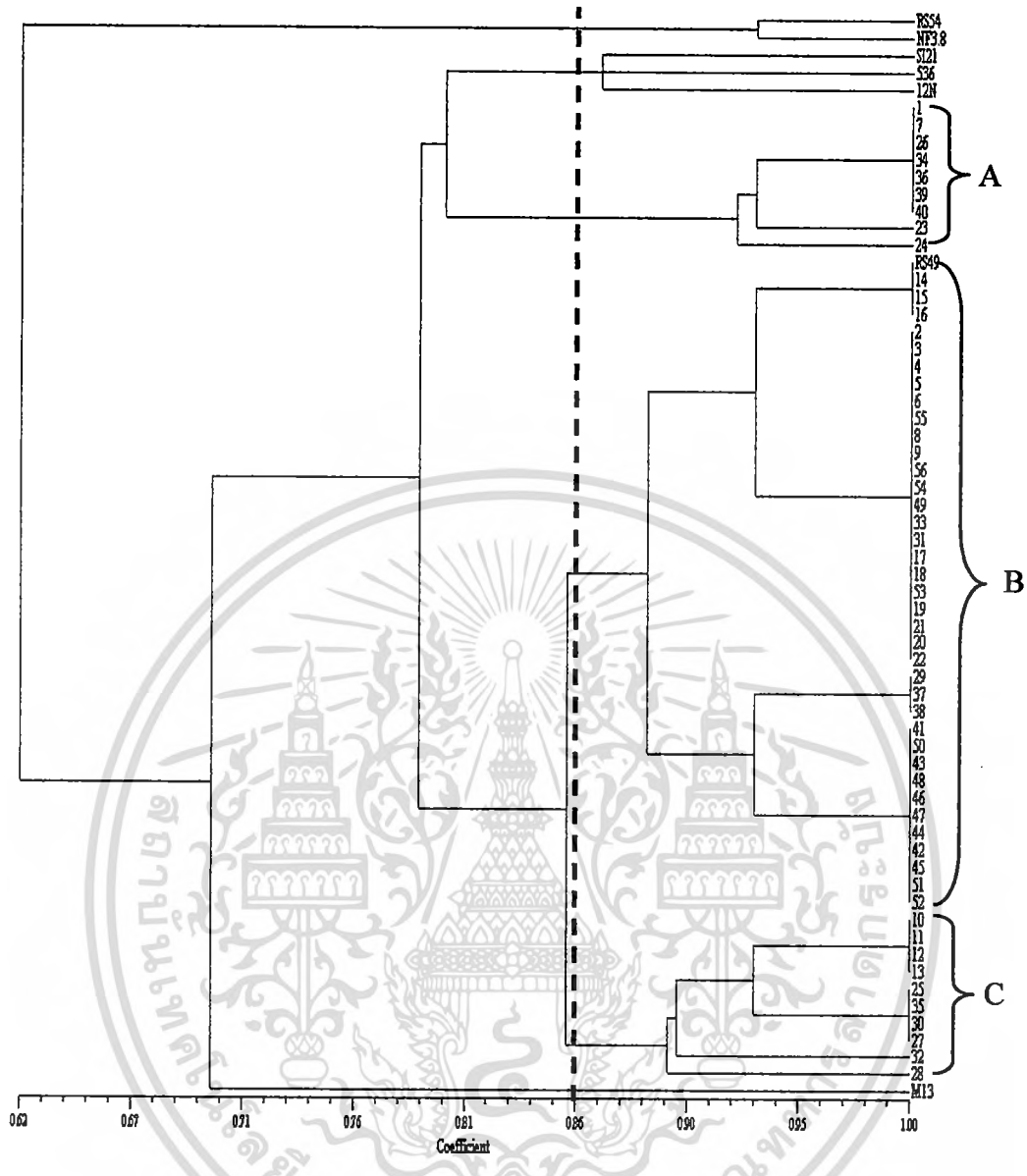
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคติกในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในวันที่ 2 จำนวน 56 ไอโซเลท (ภาพที่ 4.14) สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติกได้ 3 กลุ่มที่ค่าความเหมือนกัน 85 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.16) โดยกลุ่ม B พบมากที่สุดจำนวน 37 ไอโซเลท เป็นกลุ่มที่มีความเหมือนกันกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* รองลงมาคือ กลุ่ม A และ กลุ่ม C จำนวน 9 และ 10 ไอโซเลท ไม่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์กลุ่มใด



ภาพที่ 4.15 เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทำพีซีอาร์ – อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานวันที่ 0 โดย ---- คือเส้นที่ลากผ่านตัดค่าสัมประสิทธิ์ที่ 0.85 หรือการตัดค่าสัมประสิทธิ์ของความเหมือนกันที่ 85 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของการทำพีซีอาร์ – อาร์เอพีดี ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานวันที่ 2 โดย ---- คือเส้นที่ลากผ่านตัดค่าสัมประสิทธิ์ที่ 0.85 หรือการตัดค่าสัมประสิทธิ์ของความเหมือนกันที่ 85 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาครั้งนี้ ตรวจพบเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี ซึ่งในวันที่ 0 ของกระบวนการหมักพบกล้าเชื้อน้อยเนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่ากล้าเชื้อที่เติมเข้าไปยังไม่เจริญเต็มที่จึงมีจำนวนไม่มากพอ เมื่อผ่านกระบวนการหมักในวันที่ 2 พบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 มีความสามารถในการเจริญและเพิ่มจำนวนในไส้กรอกอีสานได้ โดย Hugas (1998) และ Drosinos *et al.* (2005) รายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าเชื้อที่ถูกคัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์ใด เชื้อเหล่านั้นมีความสามารถในการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมในผลิตภัณฑ์เหล่านั้นได้ดี

ปัจจุบันนิยมนำเทคนิคพีซีอาร์ – อาร์เอพีดีมาใช้ในการจัดกลุ่มและศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย เนื่องจากเทคนิคนี้ง่ายในการตรวจสอบ ทำได้รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยมาก (สุรินทร์ ปียะโชคคณากุล. 2545) Andrighetto *et al.* (2001) ทดลองจัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากไส้กรอกหมัก (Veneto region, Italy) จำนวน 53 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ – อาร์เอพีดี พบว่าแบคทีเรียแลคติกมีความใกล้เคียงกับ *Lb. sakei* และ *Lb. curvatus* เทคนิคพีซีอาร์ – อาร์เอพีดีเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วในการศึกษาการจัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติก Lactobacilli ในไส้กรอกหมักและสามารถช่วยในการเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ สุกัญญา วาวงค์ และคณะ (2554) ตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมลงในแหนมเนื้อโค ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างแหนมที่ใส่กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จำนวน 60 ไอโซเลท จากนั้นวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์-อาร์เอพีดี (PCR-RAPD) ผลการศึกษาพบลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่แยกได้จากกระบวนการหมักแหนมวันที่ 2 และ 3 มีความคล้ายคลึงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 คือ มีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสามขนาด โดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700, 750 และ 1200 bp ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถมีชีวิตรอดในแหนม จนถึงวันที่สามของการหมัก

จากผลการทดลองการอยู่รอดของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ในการหมักไส้กรอกอีสานด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี สอดคล้องกับผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ข้อ 4.5.1 ซึ่งแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นในวันที่ 2 ของการหมัก และมีการเพิ่มขึ้นผลิตกรดแลคติกเป็นผลให้ค่าพีเอชลดลง ทำให้สภาวะในการหมักไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนโรคอื่นๆ เป็นผลมาจากประสิทธิภาพในการหมักของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ที่เติมลงไปในไส้กรอกอีสาน อีกทั้งยังมีแนวโน้มในการนำกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานได้จริงในอนาคต เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Anatum ที่จะเจริญระหว่างกระบวนการหมัก จากนั้นจึงทำการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อไส้กรอกอีสานที่ใช้กล้าเชื้อในการหมักเทียบกับไส้กรอกอีสานตามสูตรการค้าที่วางขายต่อไป

4.7 ผลการประเมินคุณภาพไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

จากการผลิตไส้กรอกอีสานที่ควบคุมการหมักตามธรรมชาติและไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml บรรจุไส้คอลลาเจนในสภาวะแบบกึ่งแห้งที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกโดยพิจารณาในด้านการยอมรับของผู้บริโภคจากผลการทดลองข้อ 4.1.4 หมักเป็นเวลา 2 วัน เพื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อกับผลิตภัณฑ์ที่วางขายผลิตตามสูตรตารางที่ 3.1 ควบคุมการหมักตามธรรมชาติ เนื่องจากสูตรที่วางขายเป็นสูตรที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคอยู่แล้ว ดังนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อจึงอาจที่อาจจะกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไส้กรอกอีสานได้ จึงทำการทดสอบความแตกต่างคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างแบบ triangle test ใช้ผู้ชิมทั่วไปที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 24 คน โดยเสนอตัวอย่าง 3 ตัวอย่างที่มีเลขรหัส 3 หลักพร้อมกันโดยมี 2 ตัวอย่างที่เหมือนกัน 1 ตัวอย่างที่แตกต่าง ให้ผู้ทดสอบเลือกตัวอย่างที่แตกต่างกันและตอบคำถามลงในแบบทดสอบทางประสัมผัส (ภาคผนวก ฉ) โอกาสที่จะเลือกถูกคือ 1 ใน 3 ส่วนโอกาสที่จะเลือกผิดคือ 2 ใน 3 ประเมินโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ จากตารางที่ 4.8 เมื่อพิจารณาจากค่าความน่าจะเป็น Asymp. Sig. พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับไส้กรอกอีสานที่ควบคุมการหมักตามธรรมชาติและไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.8 ผลการเลือกตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่มีความแตกต่าง

	Observed N	Expected N
ถูก	16	8.2
ผิด	8	15.8
Total	24	
Asymp. Sig.	0.01	

หมายเหตุ: ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการผลิตไส้กรอกอีสาน การควบคุมสภาวะในการหมักเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการส่งเสริมการหมักของแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยอุณหภูมิ 30 °ซ และความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักแบบกึ่งแห้งซึ่งเป็นสภาวะการหมักที่นิยมใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานทั่วไป มีผลทางจุลินทรีย์และเคมีบางประการเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รวมทั้งคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วย

จากการศึกษาการใช้เฮอเดิลเทคโนโลยีในการหมักจากรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสาน พบว่า การลดค่าพีเอชเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ และเมื่อเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum มากขึ้น เมื่อศึกษาปัจจัยด้านส่วนผสมของไส้กรอกอีสานในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานโดยการเติมไนไตรท 100 ppm และกระเทียมร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน คือ *Lb. pantarum* RS49 เพื่อดูการการเพิ่มขึ้นของกรดแลคติกในระหว่างการหมัก มีผลให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่ม และค่าพีเอช ลดลงตลอดจนการเพิ่มขึ้นของค่าความเข้มข้นแบคเทอริโอซิน จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว เมื่อทดลองการเติมกล้าเชื้อลงในส่วนผสมไส้กรอกอีสานและทำการหมัก จากนั้นตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามมาตรฐาน มผช. 144/2546 พบว่ามีปริมาณเชื้ออยู่ภายใต้มาตรฐาน มผช. จึงตรวจยืนยันการอยู่รอดของกล้าเชื้อ *Lb. pantarum* RS49 โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟดี แล้วพบว่ามีไอโซเลทเพิ่มขึ้นจากวันที่เริ่มต้นการหมักอย่างชัดเจน จึงเชื่อได้ว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเป็นผลมาจากการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. pantarum* RS49

5.2 ข้อเสนอแนะ

ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเฮอเดิลเทคโนโลยีจากกระบวนการหมักคือ ค่าพีเอชและ Aw ต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์ จึงต้องมีการควบคุมส่วนผสมและกระบวนการหมักให้ถูกต้อง แต่การทำให้มีความปลอดภัยมากขึ้นโดยการเติมกล้าเชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินและเป็นกล้าเชื้อแยกจากไส้กรอกอีสานเนื่องจากจะสามารถทนสภาวะการหมักได้ดี และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อก่อโรค อีกทั้งยังช่วยยืดเวลาการผลิตกรดในระหว่างการหมัก ทำให้อายุการเก็บผลิตภัณฑ์ยาวนานขึ้นรวมถึงควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ความสม่ำเสมอและเป็นที่ยอมรับ

สำหรับผู้บริโภคควรเลือกบริโภคไส้กรอกอีสานที่ผ่านมาการหมักอย่างน้อย 2 วัน และควรทำให้สุกก่อนรับประทานเพื่อทำลายเชื้อก่อโรคที่ยังเหลือรอดจากกระบวนการหมักให้หมดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมปศุศัตว์. 2551. การผลิตเนื้อโค. คุณภาพ. เอกสารเผยแพร่ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคเนื้อ กองบำรุงพันธุ์สัตว์. เข้าถึงได้จาก: www.dld.go.th/research- AHD/ Document/.../qbeefs_2.pdf. (25 มีนาคม 2551)

จเร จรัสจรูญพงศ์. 2550. ลึกแต่ไม่ลับ...กับกระเทียม. บทความวิทยาศาสตร์เพื่อประชาชน. บทความเผยแพร่ทางวิทยุกระจายเสียง สำนักบริการวิชาการมหาวิทยาลัยบูรพา. เข้าถึงได้จาก: http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/forum.asp?FORUM_ID=7 (27 กันยายน 2554).

จดหมายข่าวราชบัณฑิตยสถาน. 2539. กระเทียม *Allium sativum* L. คลังความรู้. เข้าถึงได้จาก: http://www.royin.go.th/th/knowledge. (21 มกราคม 2555).

ณัฐธิดา แปวกระโทก. 2554. ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน *Weissella cibaria* SI 21 และ *Lactobacillus plantarum* RS49 ต่อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2555. แบคเทอริโอซินสารจากธรรมชาติ สำหรับการถนอมอาหารเพื่อสุขภาพ. Bio & Nano. June-July 2012 (39). หน้า 223.

ดวงพร คันธโชติ. 2535. การเปรียบเทียบการผลิตไส้กรอกอีสานด้วยวิธีธรรมชาติและเติมสารเร่งการหมัก. โครงการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ธเนศ อิสระมงคลพันธุ์ และ วิไลลักษณ์ อิสระมงคลพันธุ์. ม.ป.ป. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. เอกสารประกอบการสอน. สาขาอาหารและโภชนาการ คณะคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมลคลกรุงเทพ. กรุงเทพฯ

ธีรพร กงบังเกิด. 2546. จุลชีววิทยาอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและ สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

นภัสรพี เหลืองสกุล. 2546. เอกสารประกอบการสอนวิชากระบวนการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

บันฑูรย์ ตระการวีระเดช. 2550. ตอนที่ 3 การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ภายหลังการฆ่าชำแหละ.เชื้อ *Salmonella* กับการผลิตเนื้อสุกร. เข้าถึงได้จาก: http:// merial.Com/pdf/LA/LA_ Salmonella_with_Pork_ProduCtion_3_01-07-08.pdf. (6 ตุลาคม 2553).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

พรศิริ พรหมกิ่งแก้ว และ อนิรุธ เนื่องเม็ก. 2548. การศึกษาการปนเปื้อนของ *Salmonella* และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดในภาคเหนือ. วารสารข่าวสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือ (ตอนบน). 13(3).

เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ. 2554. กระเทียม. ข้อควรคำนึงในการบริโภคกระเทียม. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaihealth.or.th/healthcontent/article. (3 กุมภาพันธ์ 2554).

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. การประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation). ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ไส้กรอกอีสาน. มผช. 144/2546. กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 144/2546. ไส้กรอกอีสาน.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. การแปรรูปและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. สหมิตรออฟเซต, กรุงเทพฯ.

รุจริน ลิ้มศุภวานิช และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552. ผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทต่างๆ. หน้า 70. ใน คุณภาพเนื้อโคไทย. สำนักพิมพ์อัมรินทร์ปริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพฯ.

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimirium และ *Salmonella* Anatum. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร เทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วารสารจาร์พา. 2545. Water Activity กับการควบคุมอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร. เข้าถึงได้จาก : www.phtnet.org/article/view-article.asp?aID=12. (19 ตุลาคม 2553).

วิรัตน์ สุมน และ ณัฐยาพร สุมน. 2552. ผลิตภัณฑ์พื้นบ้านจากเนื้อโคไทย. หน้า 89. ใน คุณภาพเนื้อโคไทย. สำนักพิมพ์อัมรินทร์ปริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพฯ.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2549. พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain reaction. สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. เข้าถึงได้จาก : http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf. (16 สิงหาคม 2555).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมพร ภูติยานันท์. 2542. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. โครงการพัฒนาตำรา สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

สุกัญญา วาวงศ์, คมแข พิลาสมบัติ, นวลพรรณ งามยี่สุ่น, และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. การตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเนื้อโดยวิธีพีซีอาร์อาร์เอพีดี. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29:3 เล่มที่ 2 (65-72)

สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์. 2537. อาหารหมักพื้นเมือง. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กรุงเทพฯ.

สุมณฑา วัฒนศิลป์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร Food Microbiology. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมาลี บุญมา, อรุณ บ่างตระกูลนนท์, นพรัตน์ หมานริม และ ชุมพจน์ อมาตยกุล. 2539. การตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยวิธี SCM และวิธี MSRV. อาหาร 26 : 88 – 97.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2547. ผลการปรับตัวต่อกรดของเชื้อ *Salmonella* ต่อความอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม. รายงานการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2553. การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยใช้สารถนอมอาหาร. จุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

โสภา สีชอล์ค .2541. ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต และโซเดียมไนไตรต์ ต่อการลดลงของ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลคติกในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1): 88-101.

ศูนย์ข้อมูลด้านอาหาร. 2552. พิษจากโซเดียมไนไตรท และโซเดียมไนเตรทในอาหาร. ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารปนเปื้อนในอาหาร. สำนักงานคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เข้าถึงได้จาก : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_food/ fm_main.asp. (7 มกราคม 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, ปรีชา จึงสมานุกูล และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2538. ซาลโมเนลลาในอาหารพร้อมบริโภค. วารสารเทคนิคการแพทย์ 23 (2): 153 – 160.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2549. ผลของกรดแลคติกและสาร Pediocin PA – 1 จาก *Pediococcus. Pentosaceus* TISTR536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก. โครงการงานวิจัยรายได้ประจำปีงบประมาณ 2549, คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก (bacteriocins of lactic acid bacteria). วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2:23.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลกติก. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, สงขลา.

อิ่มเอิบ พันสด. 2549. บทที่ 10 การแปรรูปเนื้อสัตว์ เรื่องการบรรจุไส้ . บทเรียนเครือข่ายอินเตอร์เน็ต เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. เข้าถึงได้จาก : http://www.nsru.ac.th/e- learning/ meattech/ lesson/less11_3.html. (13 สิงหาคม 2555)

อุมาพร ศิริพินทุ์. 2546. ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ระบบบริหารการเรียนการสอนผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เข้าถึงได้จาก : http://coursewares.mju.ac.th:81/elearning46/ft470/ct/ ct_0701.html. (13 สิงหาคม 2555)

อรัญญา สังขศรี. 2541. การยับยั้งแบคทีเรียในทางเดินอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Achim, S. 2009. Case for collagen. Meat Technology. Hochschule Ostwestfalen-Lippe University of Applied Sciences. Available: http://www.devro.com/uploads/tx_sbdownloader/Case_for_collagen.pdf. (accessed 13 August 2012)

Andrighetto1, C., L. Zampese and A. Lombardi. 2001. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermentedsausages of Veneto region (Italy) C. Letters in Applied Microbiology. 33: 26-30.

Ankri, S.and D. Mirelman .1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection, 2, 1999, 125—129.

Anonymous. 2005. Shelf-Stable Dried Meats, Microbiology, FSRE Shelf-Stable. Available: http://www.fsis.usda.gov/pdf/fsre_ss_5microbiologydried.pdf. (accessed 21 January 2012).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AOAC. 1984. Official methods of analysis 14 th ed. Association of official analytical chemists. Arlington, Virginia, USA. 1-140 p.

AOAC. 2000. Official methods of analysis 17th ed. Association of official analytical chemists. Maryland USA. 1-173 p.

AOAC. 2006. Official methods of analysis 17th ed. Association of official analytical chemists. Maryland USA. 5-6 p.

Axcelsson, L.T. 1993. lactic acid bacteria : classification and physiology. *In* Lactic Acid Bacteria. (ed. Salminen, S and Wright, A.V.) Marcel Dekker, New York.

BAM. 2002. Bacteriological Analytical Manual online, chapter 4 on Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. U.S. Food and Drug Administration. September 2002. [online] available: http://www.fda.gov/food/scienceresearch/Laboratorymethods/ bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm064948.htm#conventional.

Banwart, G. 1989. Basic Food Microbiology. Van Nostrand Reihold, New York.

Cavallito, C. and J.H. Bailey. 1944. Allicin. the antibacterial principle of *Allium sativum*. isolation. physical properties and antibacterial action. J. Am. Chem. Soc. 66: 1944-1952.

Chen, H. and D. G. Hoover. 2003. Bacteriocin and their food applications. Comprehensive review in food science and food safety. 2: 82-100.

Collin, C. H. 1995. Collins and Lyne's microbiological methods. Oxford, Butterworth-Heinemann, UK.

Daka, D. 2011. Antibacterial effect of garlic (*Allium Sativum*) on *Staphylococcus aureus*: an in *vitro* study. African Journal of Biotechnology. 10(4).

De Vuyst, L. and E. J. Vandamme .1994. Nisin, a antibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. Lactis: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London, England.

Doyle, M. P. and D. O. Cliver. 1990. Foodborne Diseases. Academic Press. U.S.A.

Doyle, M.P., T. Zhao, J. Meng, and S. Zhao. 1997. Escherichia coli O157:H7. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM press estore. pp. 171–191.

Drake, D. J. 2006. Beef flavor fundamentals. a food service guide to beef. Available: http://www.beeffoodservice.com/CMDocs/BFS/BeefU/BeefUFactSheets/05_ BeefFlavor Fundamentals.pdf (22/2/13).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Drosinos, E. H., M.Mataragas , N. Xiraphi, G. Moschonas, F. Gaitis and J. Metaxoplulos. 2005. Characterization of the microbial flora from traditional Greek fermented sausage. Meat Science. 69: 307-317.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. Journal of Biology science, Biological engineer. 87:705–716.

Focke, M., A. Feld and K. Lichtenthaler. 1990. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase, FEBS Letters. 261: 106–108.

Gonzalez-Fandos, E., M.L. Garcia-Lopez, M.L. Sierra and A. Otero. 1994. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) andthermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic, journal of applied bacteriology. 77: 549–552.

Gross, E and J.L. Morell. 1971. The structure of nisin. Journal of the American Chemical Society. Soc. 93:4634-4635.

Gyurova, A. Y. and A. M. Zhivkov. 2009. Influence of low concentration ethanol on membrane permeability of *E.coli*. XI anniversary scientific conference biotechnol. & biotechnol. 120 years of academic education in biology, 45 years faculty of biology. 23: 480-483.

http://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm. [available] (16/1/1013).

Hugas, M. 1998. bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Scient. 49 : 139-150.

Hutkins, R.W. 2006. microbiology and technology of fermented foods. blackwell publishing, U.S.A.

Jay, J. M. 1982. Antimicrobial Properties of Diacetyl. applied and environmental microbiology, . American Society for Microbiology . 44: 525-532. Available: http://aem.asm.org. (21/2/2013).

Kelly, W. J., R. V. Asmundson, and C. M. Huang. 1996. Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Bacteriology. 81: 657-662.

Kochert, G. 1994. RFLP technology. In DNA-based markers in plants. Phillips, R.L. and Vasil, I.K. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. pp.8-38.

Kramich, W.E., A.M. Peason, and F.W. Tuaber. 1973. Process meat. AVI Publish. New Zealand.

Leroy, F., J. Verluyten and L. De Vuyst .2005. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology 106: 270 – 285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Liu, S. and G. J. Pilone. 1998. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. Institute of Molecular BioSciences, College of Sciences, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Lücke, F. K. 1986. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. Fleischwirtschaft. 66 : 1505 – 1509.

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

Mayr-Harting, A., A. J. Hedges. and R.C.W. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocins. method in microbiology. 7A : 315-442.

Mc-aullife, O., R.P. Ross., and C. Hill, 2001. Lantibiotics: structure, biosynthetic and mode of actions. FEMS microbiological review. 25: 285 – 308.

McCouch, S., and S.D. Tankslay. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. In. Rice biotechnology. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK. Pp. 109- 133.

Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M. and Torre, P. 2003. PCR and RAPD identification of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. FEMS Microbiological. Letter. 227 : 271-277.

Paterson, A.H. 1996. Genome Mapping in Plants. Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A. 330 p.

Radulovic Z., D. zivkovic , N. Mirkovic, M. Petrušic, S. Stajic, M. Perunovic, D. Paunovic. 2011. Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). Procedia Food Science 1: 1516 – 1522.

Rattanachaikunsopon, P. and P. Phumkhachorn. 2006. Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from Nham, a traditional Thai fermented pork. Journal of Food Protection. 69: 1937-1943.

Rohlf, F.J. 2002. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket. New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rose, B.E., W.E. Hill, R. Umholtz, G.M. Ransom, and W.O. James. 2002. Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry product collected at federally inspected establishments in the United State of America, 1998 through 2000. Journal of Food Protection. 65:937-947.

Salminen, S and A.V. Wright. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc. York.

Samelis, J., F. Maurogenakis and J. Metaxopoulos. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. International Journal of Food Microbiology 23: 179–196.

Stall, A. and E. Seebeck. 1951. Chemical investigations of alliin, and the specific principle of garlic, Adv. Enzymol. 11:377-400.

Swetwiwathana, A. 2005. Microbiological quality enhancement of thai fermented meat product (Nham) using Nham-associated pediocin producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536). Philosophy Degree Thesis, Kyushu University, Japan Swetwiwathana, A., A. Fischer, N. Lotong and U. Leutz. 1999. Controlling the growth of *Salmonella* Anatum in Nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic. Fleischwirtschaft International.

Swetwiwathana, A., N. Lotong and K. Sonomoto. 2000. Isolation and selection of thermotolerant bacteriocin – producing lactic acid bacteria from Nham (Thai Fermented Meat). Proceeding of 2nd seminar of Thai and Japanese coordinator meeting. Yamaguchi University. Japan.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2004. Effect of garlic and nitrite on pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth of *Salmonella* Anatum in simulated Nham fermentation. KMITL International Conference on Integration of Science & Technology. 2: 363-366.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2007. Maturation of Nham–a Thai fermented meat product : effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella* anatum during Nham fermentation. Fleischwirtschaft International. 3: 46 – 49.

Swetwiwathana, A., K. Pilasombut and J. Sethakul. 2008. Screening of Bacteriocin – producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat for probiotics prospect of biotechnology. Science Direct Vol. 136 (supplement 1) October 2008: 737 – 738.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tahara, T. and K. Kanatani. 1996. Isolation, partial characteization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acid*ophilus JCM 1229. Journal of Applied Bacteriology. 81: 669- 677.

Tankslay, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology. 7:257-264.

Tilokavichai, J., A. Jindaprasert, K. Pilasombut, J. Sethakul and A. Swetwiwathana. 2011. Effect of glutathione on bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from traditional Thai fermented meat. 57th International congress of meat science and technology. Ghent-Belgium.

Toriani, S., C. Orsi and M. Vescovo. 1997. Potential of *Lactobacillus casei*, culture permeate, and lactic to control microorganisms in ready-to-use vegetable. Journal of Food Protection. 60 : 1564-1567.

Uchida, Y., T. Takahashi and Sato N. 1975. The characteristics of the antibacterial activity of garlic, Japan Journal of Antibiotics 28: 638-642.

Vatanyoopaisarn, S., K. Prapatsornwathana, T. Kuhakongkeat and C. Phalaikornkul. 2011. Potential use of lactic acid bacteria with bacteriocin-like activity against *Staphylococcus aureus* as dual starter cultures in Thai fermented sausage "Sai Krok Prew". International Research Food Journal. 18: 680-687.

Wedliny Domowe national convention. 2008. Traditionally Made Fermented Sausages. (April 6, 2008). Available: http://www.wedlinydomowe.com/sausage-types/fermented- sausage/ Traditional. (1/11/2010).

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

Ziauddin, K. S., H. S. Roa and B. L. Amla. 1993. In *vitro* study on the effect of lactic acid and sodium choride on spoilage and pathogenic bacteria of meat. J. Food Sci. Technol. 33: 255- 258.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก1. การเตรียมสารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ

1.1 50X TAE stock solution 1000 ml

Tris	242	g
Glacial acetic acid	57.1	g
0.5 M EDTA , pH 8.0	100	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	L

และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

1.2 DNA Loading dye

0.25% bromophenol blue

30% glycerol ละลายใน TE (pH 8.0)

1.3 Stock solution ของ EDTA 0.5 M pH 8.0

ละลายไดโซเดียมเอทิเลียนไดเอมีนเททราแอซิเตท (disodiummethlenediaminetetra acetate.2 H_2O) หรือ EDTA 18.612 g ในน้ำกลั่น 80 ml คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer และค่อย ๆ เติมสารละลายด่างความเข้มข้น 1.0 N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 (เกลือไดโซเดียมของ EDTA จะไม่กลายเป็นสารละลายจนกระทั่งมีการปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 8.0 โดยการเติม 1.0 N NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที

ก2. การเตรียมกระเทียมปลอดเชื้อ

เลือกกระเทียมที่มีมีจุดและไม่มีเชื้อรา ชั่งน้ำหนักกระเทียมตามจำนวนที่ต้องการ แล้วนำเข้าตู้เขี่ยเชื้อ และทำการปลอดกระเทียมโดยที่ไม่ให้ผิวกระเทียมได้รับความเสียหาย ด้วยมีดปลอดเชื้อและปากคีบ หลังจากนั้นนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จึงนำมาหั่นและสับให้ได้ขนาดแล้วเติมลงในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก3. การเตรียมไนไตรท์ปลอดเชื้อ 100 ppm

1. ชั่งโซเดียมไนไตรท์ 0.01 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml
2. กรองผ่าน filter membrane 0.2 μm 1 ml ลงในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ปริมาตร 100 ml

ก4. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มัล

เตรียมได้จากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 g เติมน้ำในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml เก็บใส่ขวดแก้วสีชา

ก5. Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

ตวง Alcohol 95 เปอร์เซ็น ปริมาตร 736.84 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml

ก 6. Butterfield's phosphate buffered

6.1 การเตรียมสารละลายสต๊อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 g ในน้ำกลั่น 500 ml ปรับ pH 7.2 ด้วยสารละลาย 1.0 NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำเข้าเครื่องฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

6.2 การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต๊อก 1.25 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นตวงใส่ขวดปรับปริมาตร 450 ml (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 g) หรือตวงใส่ขวดปริมาตร 225 ml (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 g) แล้วนำเข้าเครื่องฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

ก7. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

7.1 MRS Agar +0.5% $CaCO_3$

Tween 80	1.0	ml	di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	g
sodium acetate	5.0	g	di-ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Manganese sulfate	0.05	g	Magnesium sulfate	0.2	g
Calcium carbonate	5.0	g	Tryptone	10.0	g
Glucose	20.0	g	Agar	15.0	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yeast extract	4.0	g	Meat extract	8.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.2 MRS broth (MERCK, Germany ชั่ง 52.2 g/1000 ml.)

Tween 80	1.0	ml	di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	g
sodium acetate	5.0	g	di-ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Magganese sulfate	0.05	g	Magnesium sulfate	0.2	g
Calcium carbonate	5.0	g	Tryptone	10.0	g
Glucose	20.0	g	Agar	15.0	g
Yeast extract	4.0	g	Meat extract	8.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.3 MRS soft agar

Tween 80	1.0	ml	di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	g
sodium acetate	5.0	g	di-ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Magganese sulfate	0.05	g	Magnesium sulfate	0.2	g
Calcium carbonate	5.0	g	Tryptone	10.0	g
Glucose	20.0	g	Agar	10.0	g
Yeast extract	4.0	g	Meat extract	8.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที อุ่นไว้ใน water bath 50°ซ เมื่อต้องการทำการทดสอบ

7.4 Trypticase (Tryptic) Soy Broth

Trypticase peptone	17 g	Phytone peptone	3 g
NaCl	5 g	K_2HPO_4	2.5 g
Glucose	2.5 g	D.W.	1 L

Final pH 7.3±0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารปริมาตร 225 ml ลงในฟลาส์กหรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.5 Baird Parker agar

1. Base medium

Tryptone	10 g	Beef extract	1 g
Yeast extract	1 g	Sodium pyruvate	10 g
Glycine	12 g	Lithium chloride.6H2O	5 g
Agar	15 g	D.W.	900 ml

Final pH 7.0 ± 0.2

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เทสารละลายที่ได้ลงในฟลาส์ก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ฟลาส์กละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย 1% Potassium tellurite

Potassium tellurite	1	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย Potassium tellurite ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 °ซ

3. Egg yolk emulsion, 50%

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาว โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดง และน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมในปริมาตรที่เท่ากันปิดฝาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °ซ

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร Baird-Parker base medium มา 95 ml (อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส) เติม Egg yolk tellurite emulsion ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันระวังฟองอากาศ แล้วเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.6 Lauryl sulphate tryptose (LSTB) Broth

L-Tryptophan	1 g	NaCl	1 g
K_2HPO_4	3.13 g	KH_2PO_4	0.27 g
Sodium lauryl sulfate	0.1 g	NaCl	5 g

Final pH 6.8±0.2

แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 ml พร้อมทั้งใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) ปิดจุกหลอด แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.7 Brilliant Green Lactose Bile (BGLB) Broth

Peptone	10 g	Lactose	10 g
Oxgall	20 g	Brilliant green	0.0133 g
D.W.	1 L	Final pH 7.2±0.1	

แยกละลาย peptone และ lactose ใน D.W. 500 ml Oxgall ละลายใน D.W. 200 ml ซึ่งละลายใน D.W. 200 ml ซึ่งน้ำละลาย Oxgall นี้ควรจะมีค่า pH ประมาณ 7.0-7.5 ผสมสารละลายทั้งสองรวมกัน และปรับปริมาตรให้เป็น 975 ml ปรับค่า pH ของสารละลายเป็น 7.4 จากนั้นเติมสารละลาย aqueous brilliant green เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ละลายใน D.W. ปริมาตร 13.3 ml ปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1 L แบ่งใส่หลอดทดสอบหลอดละ 10 ml พร้อมทั้งใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) ปิดจุกหลอด แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.8 Escherichia coli (EC) Broth

Trypticase or tryptose	20 g	Bile salts No.3	1.5 g
Lactose	5 g	K_2HPO_4	1.5 g
KH_2PO_4	1.5 g	NaCl	5 g
D.W.	1L	Final pH 6.9±0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใน D.W. ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 ml ปริมาตรหลอดละ 8 มิลลิลิตร พร้อมทั้งใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) ปิดจุกหลอด แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.9 Eosin Methylene Blue (EMB) agar

Eosin methylene blue	36 g	D.W.	1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือด ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 °ซ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (ไม่ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อนานเกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.10 Triple Sugar Iron (TSI) agar

Beef extract	3 g	Yeast extract	3 g
Peptone	15 g	Proteose peptone	5 g
Glucose	1 g	Lactose	10 g
Sucrose	10 g	$FeSO_4$	0.2 g
NaCl	5 g	$Na_2S_2O_3$	0.3 g
Phenol red	0.024 g	Agar	12 g
D.W.	1 L	Final pH 7.4±0.2	

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดใน D.W. ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 ml ปรับปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวหลอด ปิดจุก นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งโดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาวประมาณ 4-5 cm และมี butt ยาวประมาณ 2-3 cm

7.11 Indole Medium (Tryptone broth)

L-Tryptophan	1 g	NaCl	1 g
K_2PO_4	3.13 g	KH_2PO_4	0.27 g
D.W.	200 ml	Final pH 7.2±0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ดูดสารละลายที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.12 Methyl Red and Voges-Proskauer (MR-VP) Broth

Buffered peptone	7 g	Glucose	5 g
K_2HPO_4	5 g	D.W.	1 L
Final pH 6.9±0.2			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใน D.W. 800 ml โดยการให้ความร้อนอ่อนๆ ปล่อยให้เย็น เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 6.9±0.2 นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.13 Simmon Citrate Agar

Sodium citrate.$2H_2O$	2 g	NaCl	5 g
K_2HPO_4	1 g	$NH_4H_2PO_4$	1 g
$MgSO_4$	0.2 g	Bromthymol blue	0.08 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar	15 g	D.W.	1 L

Final pH 6.9±0.2

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดใน D.W ถ่ายในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวหลอด ปิดจุก นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็ง โดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาวประมาณ 4-5 cm และมี butt ยาวประมาณ 2-3 cm

7.14 Salmosyst Selective Supplement

Potassium tetrathionate	0.2 g	Ox bile	0.08 g
Brillent green			

1. Preliminary enrichment

นำตัวอย่าง 25 g ใส่ในอาหาร TSB ที่เตรียมไว้ 225 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นระยะเลา 18-24 ชั่วโมง

2. Selective enrichment

ดูดสารละลาย Preliminary enrichment มา 10 ml เติม Salmosyst Selective Supplement tablet 1 เม็ด เขย่านาน 30 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นระยะเลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจในขั้นตอน Selective plating ต่อไป

7.15 Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract	3 g	Ferric ammonium citrate	0.8 g
L-Lysine	5 g	Sodium thiosulfate	6.8 g
Xylose	3.65 g	NaCl	5 g
Lactose	7.5 g	Agar	15 g
Sucrose	7.5 g	Phenol red	0.08 g
Sodium desoxycholate	2.5 g	D.W.	1 L

Final pH 7.4±0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือด ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 °ซ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (ไม่ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อนานเกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

7.16 Deoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose (DHL) Agar

Peptone from casein	10 g	Peptone from meat	10 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Meat extract	3 g	Meat extract	3 g
Lactose	10 g	Sucrose	10 g
L-Cysteiniumchlorid	0.2 g	Sodium citrate	1 g
Sodium desoxycholate	0.5 g	Sodium thiosulfate	2 g
Ammonium iron (III) citrate	1 g	Neutral red	0.03 g
Agar	15 g	D.W.	1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือด ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 °ซ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ (ไม่ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อนานเกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

7.17 Lysine- Indole-Motility (LIM) Medium

Polypeptone	10 g	Yeast extract	3 g
L-Lysine	10 g	Dextrose	1 g
L-Tryptophan	0.5 g	Bromcresol purple	0.02 g
Agar	3 g	D.W.	1 L

Final pH 6.7

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเดือด ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 ml ปรับปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวหลอด ปิดจุก นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.18 Trypticase Soy Agar (TSA)

Casein peptone	1.5 g	Soymeal peptone	5 g
NaCl	5 g	Agar	15 g
D.W.	1 L		

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเดือด ลงในฟลาส์กหรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

7.19 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3 g	Peptone	5 g
Agar	15 g	D.W.	1 L

ต้มละลายส่วนผสม ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาด 13x100 ml ปรับปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของความยาวหลอด ปิดจุก นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.20 Potato Dextrose Agar

Potato infusion	200 g	Dextrose	20 g
Agar	20 g	D.W.	1 L

Final pH 5.6 ± 0.2

การเตรียม Potato infusion ต้มมันฝรั่งที่หั่นโดยไม่ได้ปอกเปลือก 200 g ในน้ำกลั่น 1 L เป็นเวลา 30 นาที กรองกงเอาเนื้อมันฝรั่งออก เก็บน้ำต้มมันฝรั่ง (Potato infusion) ไว้ใช้ ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดใน Potato infusion เทใส่ขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อที่ใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

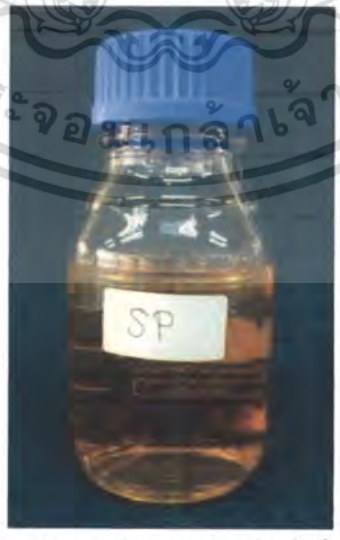
7.21 การเตรียมแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ดัดแปลงจาก Nham model broth, NMB)

Beef extract	10 g	Tryptone	10 g
Sodium ascobate	0.5g	Sodium tri-polyphosphate	3.0 g
Glucose	10 g	Sodium chloride	25 g
Sodium nitrite	0.1g	D.W.	1 L

Final pH 6 ± 0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยการต้มให้เดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

ที่มา : Swetwiwathana *et al.* (1999)



ภาพที่ ก.1 ตัวอย่างแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

ข1. วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

5.1 วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984)

ชั่งตัวอย่างแหนม 3 g บดให้ละเอียดเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO_2 50 ml กรองด้วยกระดาษกรองผ่านเครื่อง Suction Flask นำน้ำใสที่ได้เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH จนกระทั่งถึงจุด end point เกิดสีชมพูคำนวณหาเปอร์เซ็นกรด แลคติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1{,}000 \times \text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

5.2 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984)

นำตัวอย่างแหนม 20 g มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 ml คนให้เข้ากันวัดด้วยเครื่องวัด pH

5.3 การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (A_w) (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง Water Activity (Novasina รุ่น MS1-Aw, Switzerland)

ทำการตรวจวัดค่าโดยนำตัวอย่างไส้กรอกอีสาน มาบดให้ละเอียด บรรจุลงในตลับสำหรับวัดค่า แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Water Activity Novasina รุ่น MS1 ที่อุณหภูมิ 25 °ซ

5.4 การวิเคราะห์ค่าความชื้น (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่องวิเคราะห์ค่าความชื้น (Mettler Toledo รุ่น HB43-S, United State of America)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานวางบนถาดอะลูมิเนียมสำหรับวัดค่า แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mettler Toledo รุ่น HB43-S

ข2. การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวรายและหวีให้เรียบร้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลายอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็น ใน 0.5X TAE buffer
3. หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ความร้อนโดยไมโครเวฟ จนอะกาโรสละลายหมด
4. ตั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 °ซ หยดสารละลายเอธิดียมโบรไมด์เล็กน้อยเขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสให้พอดีเท 1XTAE buffer ให้ท่วมเจล
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 6x ปริมาตร 2 ไมโครลิตร รวมเป็น 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงไปที่ช่องในแผ่นเจลแต่ละช่อง
7. ดูดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงช่องในแผ่นเจลเพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ
8. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดเครื่อง ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 70 นาที
9. จากนั้นนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแน่นอน (marker) ทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษา แล้วถ่ายรูปและบันทึกด้วยเครื่อง Gel documentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์ทางชีวภาพ

ค1. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

1. เตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เทน้ำยาเจือจางจากการเตรียมใน (ภาคผนวก ก 6.4) 225 ml ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher
3. ทำการเจือจางตัวอย่าง 7 ระดับการเจืองจางตามความเหมาะสมด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 9 ml
4. ดูดตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางหยดลงบน MRS agar+0.5% calcium carbonate (เตรียมได้จากภาคผนวก ก7.1) ความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ จานละ 0.1 ml
5. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับการเจือจาง
6. บ่มเพาะเชื้อทั้งหมดใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. ตรวจนับโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) จากความเจือจางที่เหมาะสม

ค2. วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาที่อาจปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานมาตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา ที่อาจพบการปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005) ตามแผนผังแสดงวิธีการ ดังนี้

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 25 g ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณ 225 ml

↓

ตีปั่นให้ส่วนผสมเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายสารละลายเชื้อ 10 ml ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อและเติม Salmosyst tablet จำนวน 1 เม็ด เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

เขี่ยเชื้อจากหลอดตัวอย่างเชื้อ จำนวน 1 ลูป ขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ DHL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุ่มโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* จากอาหารแข็ง XLD และ DHL อย่างละ 3 โคโลนี

↓

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Triple sugar iron (TSI) slant agar และ Lysine indole motility (LIM) medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

หยดสารสารละลายโคแวค (KOVAC's indole reagent) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM และตรวจสอบผลเชื้อซัลโมเนลลา ตามตาราง ค-1

ตารางที่ ค-1 ตารางเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

TSI				LIM		
slant	butt	H_2S	gas	lysine	indole	motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

ตรวจสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI

K = alkaline ปลายหลอด (slant) ของ TSI จะมีสีแดงหรือสีชมพูบานเย็น

A = acid ก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S + = ในหลอด TSI จะเกิดตะกอนสีดำของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะต้องให้ผล +

H_2S - = ไม่เกิดตะกอนสีดำในหลอด TSI เนื่องจากไม่เกิดการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

gas + = มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและก๊าซเพียงเล็กน้อย

gas - = ไม่พบฟองอากาศในหลอด TSI (มีบางเซโรวาร์ให้ผล -)

ตรวจสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM

lysine + = หลอดอาหารจะมีสีม่วงทั้งหลอด เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลามีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อ lysine มีความเป็นด่างมากขึ้นมีผลทำให้ bromcresol purple ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ในอาหารดังกล่าวและมีสีม่วงซึ่งมี pH เป็นกลาง เปลี่ยนเป็นมีสีม่วงมากขึ้น ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์ตัวนี้

lysine - = หลอดอาหารจะมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อที่ทำการทดสอบไม่มีเอนไซม์ lysine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

decarboxylase แต่มีเอนไซม์ lysine deaminase ซึ่งจะไปย่อย lysine ทำให้ pH ของอาหารต่ำลง มีผลทำให้ bromcresol purple เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

indole += จะมีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากหยดน้ำยาโคแวค

indole - = ไม่เกิดสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังหยดน้ำยาโคแวค ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาจะไม่มีเอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับน้ำยาโคแวค

motile += หลอดอาหาร LIM จะขุ่นทั้งหลอด เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะมีแฟรกเจลลา ใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อทำการ stab เชื้อลงในอาหาร LIM แล้วบ่มเพาะเชื้อ โดยเชื้อซัลโมเนลลาที่เจริญจะเคลื่อนที่ออกจากรอย stab ไปทุกทิศทุกทาง

ค3. วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Staph. aureus* (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

1. เตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 25 g ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เทน้ำยาเจือจาง (เตรียมได้จากภาคผนวก ก6.4) 225 ml ตีปั่นให้เข้ากัน
3. ทำการเจือจางตัวอย่าง 6 ระดับการเจือจางตามความเหมาะสมด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 9 ml
4. ดูดตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางหยดลงบนอาหารแข็ง BP ที่มีการเติมไข่แดงที่ปราศจากเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ จานละ 0.1 ml
5. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับการเจือจาง
6. เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
7. ตรวจนับโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Staph. aureus* ตามลักษณะที่เจริญในอาหารแต่ละชนิดซึ่ง *Staph. aureus* จะมีเอนไซม์ lecithinase ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ lecithin ในไข่แดงทำให้เกิดตะกอนของเกลือฟอสเฟต เห็นเป็นตะกอนขุ่น (opaque zone / creamy zone) รอบโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร
8. นำลักษณะโคโนลีที่สงสัยว่าจะเป็น *Staph. aureus* ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ต่อไป

ค4. วิธีวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *Staphylococcus aureus*

1. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ หลอดละ 0.3 ml
2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Stap. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อใน BHI broth บ่มเชื้อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. หยด Rabbit plasma ปริมาตร 0.3 ml ลงในหลอดเพาะเชื้อ BHI broth บ่มเพาะเชื้อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง
4. อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *Stap. aureus* สร้างขึ้น

ค5. การหาค่าปริมาณ MPN *Escherichia coli*

1. เตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 25 g ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เทน้ำยาเจือจาง (เตรียมได้จากภาคผนวก ก6.4) 225 ml ตีปั่นให้เข้ากัน
3. ทำการเจือจางตัวอย่างในระดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 9 ml
4. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ลงใน Lauryl sulphate tryptose (LST) broth ระดับความเจือจางละ 3 หลอด ๆ ละ 1 ml บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตดูการเกิดก๊าซในหลอด Durham tube
5. ถ่ายเชื้อจาก LST broth ทั้งหมดที่มีก๊าซ หลอดละ 0.1 ml ลงใน *Escherichia coli* (EC) broth และ 2 % Brillant green lactose bile broth (BG) หลอดต่อหลอด
6. บ่มเพาะเชื้อ EC broth ที่อุณหภูมิ 44.5-45.5 °ซ และบ่ม BG ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการณ์เกิดก๊าซในหลอด Durham tube
7. ในอาหาร EC broth ถ่ายเพาะเชื้อหลอดที่มีก๊าซใน EC broth 1 ลูบบนอาหารแข็ง Eosin methylene blue (EMB) agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. อาหาร BG สังเกตการเกิดก๊าซในหลอด Durham tube แล้วนำค่า MPN เพื่อดูปริมาณ fecal coliform
9. สังเกตลักษณะโคโลนีในอาหาร EMB โดยเลือกแห้ง สีดำ หรือมี metallic sheen ทำการทดสอบโคโลนีที่สงสัยโดยทำ IMViC test

ค6. การวิเคราะห์ IMViC test (BAM, 2002)

6.1 Indole production: เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็ง EMB ลงใน tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยด น้ำยา Kovac ปริมาณ 0.2-0.3 ml สังเกตปฏิกิริยา เมื่อเกิดวงแหวนสีแดง รายงานว่าให้ผลเชิงบวก

6.2 Voges-Proskauer (VP)-reactive compounds: เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็ง EMB ลงใน MR-VP broth บ่มที่ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายสารละลาย 1 ml ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ หยด α-naphthol solution และ 40% KOH เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนเป็นสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3 Methyl red-reactive compounds: สารละลายที่เหลือจากปฏิกิริยา VP ให้ทำการหยดAfter methyl red 5 หยด สังเกตการณ์เปลี่ยนสี ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงจะให้ผลในเชิงบวก เป็นสีเหลืองให้ผลในเชิงลบ

6.4 Simmons Citrate: เขี่ยเชื้อจากอาหารแข็ง EMB ลงใน Simmons Citrate slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี

ค7. การวิเคราะห์ยีสต์และราในไส้กรอกอีสาน

1. เตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 25 g ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เทน้ำยาเจือจาง (เตรียมได้จากภาคผนวก ก6.4) 225 ml ตีปั่นให้เข้ากัน
3. ทำการเจือจางตัวอย่างในระดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 9 ml
4. ดูดตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางหยดลงบนอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมตามภาคผนวก ก 7.20 ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ จานละ 0.1 ml
5. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับการเจือจาง
6. เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 3-5 วัน
7. ตรวจนับโคโลนีที่สงสัยยีสต์ หรือเชื้อรา

ค8. วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินโดยวิธี Spot on-lawn (Mayr – Harting *et al.*, 1972)

1. นำตัวอย่างแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* RS49 มาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. นำหลอดเลี้ยงเชื้อในข้อที่ 1 มาเหวี่ยงเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 5,500 rpm นาน 15 นาที กรองด้วยชุดกรองเมมเบรนขนาด 0.2 µm ลงในหลอดปราศจากเชื้อ
3. นำของเหลวที่ผ่านการกรองลงในหลอด eppendorf ที่ปราศจากเชื้อแล้วทำการเจือจางสารละลายที่ผ่านการกรองแบบ 2 fold dilution
4. นำเชื้ออินดิเคเตอร์ *L. sakei* subsp. sakei (JCM 1157T) เพาะเลี้ยงลงใน MRS solf agar (เตรียมได้จากภาคผนวก ก7.3) ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร Nutrient agar (เตรียมได้จากภาคผนวก ก7.19) ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว
5. แบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็นช่อง ๆ แต่ละช่องต่อหนึ่งอัตราส่วน ดูดส่วนใสในแต่ละระดับความเจือจางมาจากหลอด eppendorf 10 µL หลดลงบนผิวหน้าอาหารนำไปบ่มในcandle jar ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ตรวจดูการเกิดโซนใสและคำนวณความเข้มข้นของสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกผลิตได้เป็นค่า Arbitary Unit (AU)/ml

ค9. คำนวณหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสังเกตได้จากค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (zone of inhibition) ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จากส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

$$\text{ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)} = \frac{\text{ค่าการเจือจางสูงสุดที่แสดงบริเวณใส} \times 1000}{\text{ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (ไมโครลิตร)}}$$

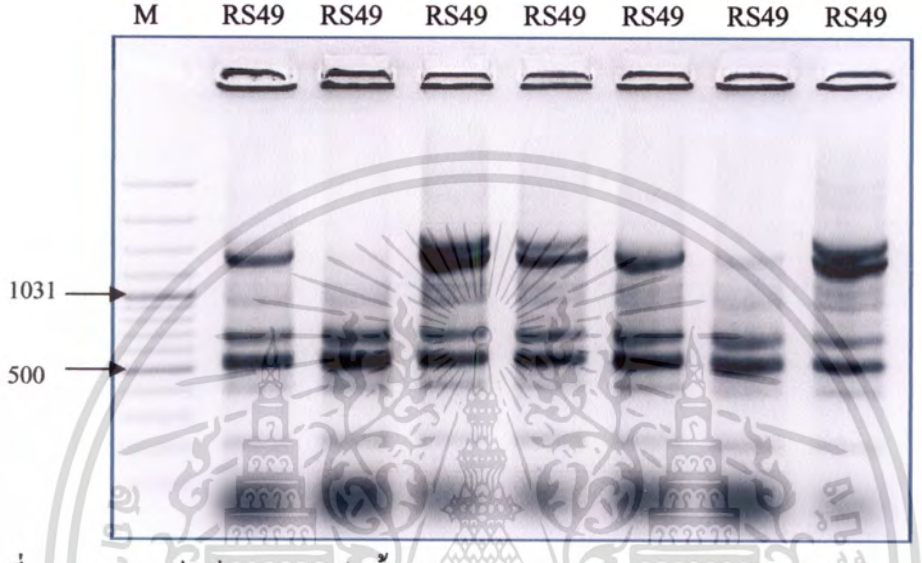
ค10. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร TSA} - \text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร XLD}}{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร TSA}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก



ภาพที่ ง. 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder plus

ภาพที่ ง. 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M คือ แถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder plus

536 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

RS54 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* RS54

NF 3.8 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* 3.8

RS49 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* RS49

SI21 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *W. cibaria SI21*

M13 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* M13

12N คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lc. lactis* 12N

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ง- 1 ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 0 ของการหมัก

ขนาด DNA มาตรฐาน 100 bp	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 1 คือ มีแถบของดีเอ็นเอปรากฏ 0 คือ ไม่มีแถบของดีเอ็นเอปรากฏ

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 0 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
มาตรฐาน 100 bp	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
500	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 0 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
มาตรฐาน 100 bp	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 0 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี							
มาตรฐาน 100 bp	46	47	48	49	50	51	52	53
100	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	1	0	0	1	0	0	0
500	1	0	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	1	1	0	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	1	1	0	0	0	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 2 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
มาตรฐาน 100 bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ 1 คือ มีแถบของดีเอ็นเอปรากฏ 0 คือ ไม่มีแถบของดีเอ็นเอปรากฏ

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 2 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
มาตรฐาน 100 bp	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0		0

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 2 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี														
มาตรฐาน 100 bp	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานวันที่ 2 ของการหมัก

ขนาด DNA	ตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดี										
มาตรฐาน 100 b	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ภาคผนวก ฉ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ

9 – Point Hedonic Scale Test

ชื่อผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกเปรี้ยว ชุดที่.....

ชื่อผู้ทดสอบ..... วันที่.....

คำแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนตามความชอบตัวอย่าง ในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงความรู้สึกท่านมากที่สุด โดยกำหนด

9 = ชอบมากที่สุด
8 = ชอบมาก
7 = ชอบปานกลาง
6 = ชอบเล็กน้อย
5 = เฉยๆ
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
3 = ไม่ชอบปานกลาง
2 = ไม่ชอบมาก
1 = ไม่ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง			
1. ลักษณะปรากฏ				
2. สี				
3. กลิ่น				
4. เนื้อสัมผัส				
5. รสชาติ				
6. ความชอบโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

"ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือค่ะ"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

TRIANGLE TEST

DIFFERENCE ANALYSIS

วันที่..... ผู้ทดสอบชิม.....

ผลิตภัณฑ์..... ชุดที่.....

---

1. กรุณาชิมตัวอย่างนี้ตามลำดับที่เสนอจากซ้ายไปขวา และเขียนเครื่องหมาย √ ตัวอย่างที่แตกต่าง 1 ตัวอย่าง กรุณาบ้วนปากระหว่างตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตรวจสอบตัวอย่างที่แตกต่าง
.....	☐
.....	☐
.....	☐

2. แสดงระดับของความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่เหมือนกัน 2 ตัวอย่าง กับ ตัวอย่างที่แตกต่างกัน

   เล็กน้อย (Slight) .....

   ปานกลาง (Moderate) .....

   มาก (Much) .....

   มากที่สุด (Extreme) .....

3. การยอมรับ (Acceptability) ระหว่างตัวอย่างที่เหมือนกัน 2 ตัวอย่าง กับ ตัวอย่างที่แตกต่างกัน

   ตัวอย่างที่แตกต่าง .....

   ตัวอย่างที่เหมือนกัน .....

4. ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอบคุณค่ะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อผู้เขียน นางสาวมัลลิกา ไชยวุฒิ

ที่อยู่ 183 หมู่ 4 ต.เวียง อ. เทิง จ. เชียงราย

โทร. 081-779-7499

วันเดือนปีเกิด 26 มกราคม พ.ศ. 2528

การศึกษา

- สำเร็จการศึกษาคหกรรมศาสตรบัณฑิต (คห.บ.) สาขาอาหารและโภชนาการ-ธุรกิจอาหาร จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ ปีการศึกษา 2551
- ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) ณ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาสุขาภิบาลอาหาร ในช่วงปีการศึกษา พ.ศ. 2551

ประวัติการทำงาน ปี พ.ศ. 2551 ตำแหน่งโภชนากร ประจำโรงพยาบาล บีเอ็นเอช บริษัท โซเดกซ์โซ่

ผลงานวิจัย

มัลลิกา ไชยวุฒิ กิตติชัย บรรจง จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. การศึกษาความชอบของผู้บริโภคต่อคุณภาพของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่ใช้ไส้คอลลาเจนและไส้หมูสด. การประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. 2:135-146.

มัลลิกา ไชยวุฒิ กิตติชัย บรรจง จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. ผลของการหมักต่อคุณภาพและการยอมรับของไส้กรอกอีสานจากเนื้อโคพื้นเมืองไทยที่หมักในไส้หมูสดและไส้คอลลาเจน.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29(3-2) : 18-27.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้