วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3 เล่ม 2 (37-45)

การใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 ในแหนมเนื้อโค

Use of Probiotic Starter Culture *(Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactobacillus salivarius* D 4) in Beef Nham

อรุณวรรณ อินทร์ช่วย[1] คมแข พิลาสมบัติ[1] จุฑารัตน์ เศรษฐกุล[1] รุจริน ลิ้มศุภวานิช[2] และ อดิศร เสวตวิวัฒน์[3]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของการใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ แหนมกลุ่มควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) แหนมที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า (*Pacovis* RCI - 47) แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ระยะเวลาการหมักแหนม 3 วัน จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 4 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) สุ่มตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2 และ 3 เพื่อตรวจหาเชื้อ Lactic acid bacteria (LAB) สุ่มตัวอย่างวันที่ 0 และ 3 เพื่อตรวจหาเชื้อ Yeast/Mold, Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. สำหรับปริมาณกรดทั้งหมด และค่า pH สุ่มตัวอย่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 และการศึกษาค่าสี L*, a* และ b* สุ่มตัวอย่างวันที่ 3 ของการหมัก และวันที่ 4 ของการเก็บรักษา (วันที่ 7) ผลการศึกษาทางด้านจุลินทรีย์ พบว่า จำนวน LAB ในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมักแหนม ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนต่ำสุด แต่ในวันที่ 3 พบว่า จำนวน LAB ไม่แตกต่างกันทุกกลุ่มการทดลอง ในขณะที่จำนวน Yeast/Mold ในทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่เมื่อหมักแหนม 3 วัน พบว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีจำนวน Yeast/Mold ลดลงเหลือน้อยที่สุด ($P<0.05$) ส่วนจำนวน Coliforms ในวันที่ 0 และ 3 ของการหมักแหนม พบว่าทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มการทดลองมีแนวโน้มเชื้อ Coliforms ลดลง อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในแหนมเนื้อโคตรวจไม่พบในทุกกลุ่มการทดลอง ผลทางด้านคุณภาพแหนม พบว่า กลุ่มควบคุมมีปริมาณกรดทั้งหมดต่ำสุดและมีค่า pH สูงสุด ($P<0.05$) การเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ทำให้ค่า pH ลดลงมากที่สุด ($P<0.05$) ส่วนค่า L* และ b* ที่ผิวสัมผัสด้านนอกของกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่น

คำสำคัญ: กล้าเชื้อ แหนมเนื้อโค แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียก่อโรค

Abstract

This research investigated the effect of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactobacillus salivarius* D 4 as a starter culture for beef Nham product. The experiment consisted of four studied groups : Control (non starter culture), Nham with commercial starter culture *(Pacovis* RCI – 47), Nham with *P. pentosaceus* TISTR 536 and Nham with *Lb. salivarius* D 4. Nham were fermented for 3 days and then stored at 4 °C for 4 days. The experimental design was a Completely Randomized Design (CRD). Lactic

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[2] คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
[3] คณะอุตสาหกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid bacteria (LAB) were examined on day 0, 1, 2 and 3 of fermentation. Yeast/Mold, Coliforms, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. were analyzed on day 0 and 3. Total acid and pH values were obtained daily during 3 days of fermentation and 4 days of storage (day 0 to 7). Nham were evaluated for outside L*, a*, b* color on day 3 of fermentation and after 4 days of storage (day 7). For microbiological quality, control had the lowest LAB on day 0, 1 and 2, but there was no difference among treatments on day 3. There was no difference in yeast/mold on day 0. But after 3 days of fermentation, *P. pentosaceus* TISTR 536 had the lowest yeast/mold ($P<0.05$). No difference in Coliforms was found among treatments ($P>0.05$), but Coliforms decreased after fermentation. In addition, the number of *Salmonella* spp., *S. aureus* and *E. coli* were not detected in all experimental groups. For quality analysis, results showed that the control treatment had the lowest total acidity and highest pH value ($P<0.05$). Treatment with *Lb. salivarius* D 4 had the lowest pH ($P<0.05$). The outside color L* and b* values of treatment with *Pacovis* RCI – 47 were the highest (lightest and most yellow)

Keywords: starter culture, beef Nham, lactic acid bacteria, pathogenic bacteria

บทนำ

Visessanguan *et al.* (2004) รายงานว่า แหนมคือ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ทำมาจากเนื้อสัตว์ ซึ่งแหนมควรมี pH อยู่ระหว่าง 4.4 - 4.8 ปริมาณกรดทั้งหมด 0.77 - 1.6% และมีปริมาณน้ำอิสระ (a_w) อยู่ระหว่าง 0.80 - 0.95 กระบวนการหมักเกิดจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ทำให้แหนมที่ผลิตได้นั้นมีคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ การทดลองครั้งนี้จึงได้นำแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. salivarius* D 4 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อในแหนมเนื้อโค ทั้งนี้ Pilasombut *et al.* (2009) ทำการคัดแยกเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 จากลำไส้เป็ด ซึ่งมีคุณสมบัติผลิตแบคเทอริโอซินชนิด abp 118 β ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Lactobacillus sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 942, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693 และ *Enterococcus faecalis* TISTR 888 เชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ยังมีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติกโดยเชื้อสามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt) 0.9% ทนค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 ความเข้มข้น NaCl 5% นอกจากนี้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ในระบบทางเดินอาหารจำลองที่ค่า pH เท่ากับ 2.5 และเชื้อสามารถทนต่อไนไตรท์ในปริมาณ 100 ppm และ Swetwiwathana *et al.* (2005) ทำการคัดแยกเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จากแหนมเนื้อหมู ซึ่งมีคุณสมบัติผลิตแบคเทอริโอซินชนิด pediocin PA - 1 ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis, Kocuria varians Lactobacillus plantarum, Lb. sakei*, *Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria innocua* และ *L. monocytogenes* เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติก โดยเชื้อมีความสามารถทนค่า pH เท่ากับ 2 สามารถทนเกลือน้ำดี (bile salt) ในระดับความเข้มข้น 1.0% และจากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อในเบื้องต้น โดย Swetwiwathana *et al.* (2004) พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อไนไตรท์ในปริมาณ 125 ppm นอกจากนี้ Swetwiwathana *et al.* (2005) รายงานว่า เชื้อมีชีวิตรอดได้ในระบบทางเดินอาหารจำลองที่ค่า pH เท่ากับ 2 ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคเมื่อเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. saliva-rius* D 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การเตรียมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 (Pacovis, Germany) ทำโดยชั่งกล้าเชื้อปริมาณ 1 กรัม ละลายด้วยน้ำอุ่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วจึงนำใส่ลงในแหนม สำหรับเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 เตรียมเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำเชื้อจาก stock culture ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่ม 16 – 18 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงนำใส่ลงในแหนมในปริมาณ 10^6 cfu/g โดยใส่เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อแหนม 1 กิโลกรัม

2. ตัวอย่างแหนม

แหนมเนื้อโคน้ำหนักรวม 6 กิโลกรัม มีส่วนผสมคือ เนื้อโคบด 3.8 กิโลกรัม เอ็นโคสุก 1.2 กิโลกรัม ข้าวสุก 400 กรัม กระเทียมสด 400 กรัม ผงเพรก 110 กรัม ฟอสเฟต 20 กรัม น้ำตาลทราย 20 กรัม โมโนโซเดียมกลูตาเมท 10 กรัม นวดเป็นเวลา 10 นาที แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง คือ สูตรควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก สูตรที่ผสมกล้าเชื้อทางการค้า สูตรที่ผสมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยเติมกล้าเชื้อปริมาณ 10^6 cfu/g นวดให้ทั่วแหนมเป็นเวลา 4 นาที นำแหนมที่ผสมแล้วเข้าเครื่องอัดแหนมอัดลงไส้พลาสติกแห่งละ 100 กรัม มัดปลายทั้งสองด้านด้วยเครื่องมัดไส้กรอก นำตัวอย่างแหนมทั้ง 4 สูตรเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65% เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นระยะเวลา 4 วัน

3. การศึกษาคุณภาพของแหนมเนื้อโค

3.1 ด้านจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติก (MRS, Merck, Germany, AOAC, 2006) เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ของการหมัก สำหรับการวิเคราะห์ Coliforms, *E. coli* (Chromocult, Merck, Germany, AOAC, 2006), Yeast/Mold (Malt agar, Merck, Germany, AOAC, 2005), *S. aureus* (Baird-parker, Merck, Germany, BAM, 2001), *Salmonella* spp. (Salmosyst broth base, Salmosyst selective supplement tablet, Xylose-Lysine-Deoxycholate agar, Salmonella-Shigella agar, Merck, Germany, AOAC,1995) ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และ 3 ของกระบวนการหมัก

3.2 ด้านคุณภาพ โดยวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (Mettler Toledo model SG-2, China) และปริมาณกรดทั้งหมด (ดัดแปลงจากนภา, 2529) เก็บตัวอย่างทุกวัน และการวิเคราะห์ค่าสี L* (lightness) a* (redness) และ b* (yellowness) ที่ผิวสัมผัสด้านนอกของแหนมด้วย Minolta Chromameter (CR-300, Japan) โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 3 ของการหมัก (วันที่ 3) และ ภายหลังนำมาเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิแช่เย็นเป็นเวลา 4 วัน (วันที 7) ตรวจโดยวิธีการของ AMSA (1991)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาทางด้านจุลินทรีย์ เมื่อใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค พบว่า จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในวันแรกของการหมัก (0 day) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกไม่แตกต่างกัน แต่ทุกกลุ่มมีจำนวนแบคทีเรียกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลคติกมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงสุด ($P<0.05$) มีจำนวนเท่ากับ 5.74 log cfu/g จนกระทั่งวันที่ 2 ของการหมัก พบว่า จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไม่แตกต่างกัน แต่ทุกกลุ่มมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงสุด ($P<0.05$) โดยมีจำนวนเท่ากับ 8.49 log cfu/g โดยในกลุ่มควบคุมยังคงมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุด โดยมีจำนวนเท่ากับ 7.93 log cfu/g ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ในระหว่างกระบวนการหมัก (Table 1) เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรก โดยพบว่าในวันที่ 3 ของการหมักจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทุกกลุ่มมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นมากกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้อัตราการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งในกลุ่มควบคุมแบคทีเรียกรดแลคติกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ทำแหนม ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีอัตราการเจริญเติบโตที่น้อยกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ นอกจากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D 4 พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะ pH ต่ำ ดังรายงานของ Swetwiwathana *et al.* (2005) และ Pilasombut *et al.* (2009) สำหรับจำนวนเชื้อ Yeast/Mold ในวันที่ 0 ของการหมักทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อ Yeast/Mold ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่พบว่า ในวันที่ 3 ของการหมักแหนม กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีจำนวนเชื้อ Yeast/Mold ต่ำสุด ($P<0.05$) โดยมีจำนวนเท่ากับ 3.08 log cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 และ *Lb. salivarius* D 4 ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 3.86, 3.86 และ 3.62 log cfu/g ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งการลดลงของเชื้อ Yeast/Mold ในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 อาจเนื่องมาจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีในช่วงแรกๆ ของการหมัก จึงทำให้สร้างกรดในปริมาณที่มากและเร็วกว่าแหนมกลุ่มอื่นๆ ซึ่งกรดจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Yeast/Mold ให้ลดลง และจากรายงานของบุษกร (2547) กล่าวว่าในระยะแรกของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบ ได้แก่ เชื้อกลุ่ม homofermentative cocci ยกตัวอย่างเช่น *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เป็นจำนวนมากเติบโตไปพร้อมๆ กับเชื้อกลุ่ม heterofermentative lactobacilli มีการใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลกติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้ pH ลดลงจากเดิมในระยะ 3 วันแรกของการหมัก และ Swetwiwathana *et al.* (2005) รายงานว่า กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สร้างแบคเทอริโอซิน ชนิด Pediocin PA-1 อาจเป็นไปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Yeast/Mold ในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคให้เหลือน้อยที่สุด จากรายงานของ Visessanguan *et al.* (2006) รายงานว่าการใช้กล้าเชื้อ *Lb. curvatus* ทำให้จำนวนเชื้อ Yeast/Mold ลดลงเหลือน้อยกว่า 3.0 log cfu/g ภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมง ในผลิตภัณฑ์แหนมหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่จำนวนเชื้ออยู่ในระดับที่สูงกว่า 4.0 log cfu/g สำหรับจำนวนเชื้อ Coliforms พบว่า ในวันที่ 0 และ 3 ทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) แต่พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักมีจำนวนเชื้อ Coliforms น้อยกว่าวันที่ 0 ของการหมักในทุกกลุ่มการทดลอง เนื่องมาจากวันที่ 3 ของการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนมากกว่าวันที่ 0 ทำให้ผลิตกรดแลคติกออกมายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Coliforms อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในแหนมทุกกลุ่มการทดลอง การศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Effect of starter cultures on the number of lactic acid bacteria (log cfu/g) in beef Nham (mean±SD) at each fermentation time

Treatment	Fermentation time (day)			
	0	1	2	3
Control	4.78±0.45[b]	7.56±0.33	7.93±0.27[b]	8.53±0.33
Pacovis RCI – 47	5.74±0.48[a]	8.01±0.46	8.49±0.18[a]	8.49±0.33
P 536	5.36±0.07[a]	8.02±0.06	8.30±0.21[a]	8.43±0.58
D 4	5.59±0.30[a]	7.75±0.46	8.27±0.41[a]	8.58±0.48

[a-b] Means in the same column with different superscipts differ significantly (P<0.05)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

Table 2 Effect of starter cultures time on the number of Yeast/Mold (log cfu/g) in beef Nham (mean±SD) at each fermentation time

Treatment	Fermentation time (day)	
	0	3
Control	5.49±0.31	3.86±0.45[a]
Pacovis RCI – 47	6.14±0.32	3.86±0.12[a]
P 536	5.97±0.47	3.08±0.58[b]
D 4	6.16±0.58	3.62±0.11[a]

[a-b] Means in the same column with different superscipts differ significantly (P<0.05)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

Table 3 Effect of starter cultures on the number of Coliforms (log cfu/g) in beef Nham (mean±SD) at each fermentation time

Treatment	Fermentation time (day)	
	0	3
Control	4.94±0.06	4.71±0.14
Pacovis RCI – 47	4.85±0.26	4.17±0.71
P 536	5.12±0.51	4.34±0.64
D 4	5.21±0.55	4.54±0.94

Means in the same column without different superscipts are not significantly different (P>0.05)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของแหนมเนื้อโค พบว่าปริมาณกรดทั้งหมดในกลุ่มควบคุมมีแนวโน้มต่ำที่สุดในระหว่างกระบวนการหมักและการเก็บรักษา โดยเฉพาะ ในวันแรกของการหมัก พบว่ากลุ่มควบคุมมีการเพิ่มของปริมาณกรดทั้งหมดต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามในระหว่างการหมัก 3 วัน ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในปริมาณกรดทั้งหมดของทุกกลุ่มการทดลอง (P>0.05) นอกจากนี้ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.01 ทั้งนี้เมื่อนำแหนมมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องแต่น้อยกว่าในช่วง 3 วันแรกของกระบวนการหมัก และในวันที่ 5 พบว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทุกกลุ่มมีปริมาณกรดทั้งหมดมากกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมในระหว่าง

Table 4 Effect of starter cultures on the total acid in beef Nham (mean ± SD) during 3 days of fermentation at 30 °C and 4 days of storage at 4 °C

Treatment	fermentation and storage time (day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	0.51±0.11	0.66±0.11	0.89±0.25	0.89±0.20	0.94±0.06^{ab}	0.92±0.09^{b}	0.95±0.23	1.01±0.06
Pacovis RCI-47	0.62±0.09	0.71±0.12	0.83±0.14	0.81±0.21	0.93±0.12^{b}	1.07±0.07^{a}	1.08±0.13	1.04±0.10
P536	0.59±0.07	0.76±0.17	0.84±0.16	1.01±0.09	1.00±0.07^{a}	1.03±0.07^{a}	0.90±0.12	1.10±0.18
D4	0.61±0.11	0.78±0.16	0.84±0.20	0.99±0.07	0.86±0.08^{b}	0.99±0.07^{a}	1.03±0.12	1.01±0.08

$^{a-b}$ Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

Table 5 Effect of starter cultures on pH values of beef Nham (mean ± SD) during 3 days of fermentation at 30 °C and 4 days of storage at 4 °C

Treatment	fermentation and storage time (day)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	6.26±0.08	5.64±0.56	5.17±0.18	4.99±0.14^{a}	5.01±0.19	4.96±0.17	5.00±0.17	5.06±0.13^{a}
Pacovis RCI-47	6.21±0.09	5.20±0.06	5.07±0.10	4.98±0.06^{a}	4.89±0.15	4.85±0.14	4.86±0.21	4.87±0.16^{b}
P536	6.26±0.10	5.43±0.29	5.18±0.19	5.09±0.09^{a}	5.02±0.14	5.00±0.10	5.00±0.10	4.97±0.03^{a}
D4	6.25±0.09	5.57±0.49	5.00±0.04	4.86±0.03^{b}	4.97±0.06	4.94±0.10	4.92±0.05	4.97±0.03^{a}

$^{a-b}$ Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

Control = Nham without starter culture, *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

กระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดมากที่สุด จนถึงวันที่ 7 (Table 4) สำหรับค่า pH พบว่ากลุ่มควบคุมมีแนวโน้มของค่า pH สูงกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ในระหว่างกระบวนการหมักและระหว่างการเก็บรักษา จนกระทั่งในวันที่ 7 พบว่าค่า pH ของกลุ่มควบคุมยังคงสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 5.06 (Table 5) สอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก โดยมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม เป็นผลให้ค่า pH ลดลง เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น และมีการผลิตกรดในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลอดภัยต่อผู้บริโภคเมื่อรับประทานแหนมที่มี pH ต่ำ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Visessanguan *et al*. (2004) ที่รายงานว่า ค่า pH ของแหนมลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีค่าลดลงเหลือ 4.8 ภายใน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้อาจเป็นไปได้ว่า กล้าเชื้อที่เติมลงไปนั้น ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนมากพอที่จะสร้างกรด และทำให้ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.8 ได้ภายในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งแหนมที่ได้จากการทดลองมีค่า pH สูงกว่า 4.8 สำหรับค่าสีที่ผิวสัมผัสด้านนอก พบว่า ในวันที่ 3 และวันที่ 7 ค่า L* และ ค่า b* ที่ผิวสัมผัสด้านนอก ของกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 มีค่าสูงสุด ทำให้แหนมที่เติมกล้าเชื้อดังกล่าวมีลักษณะสีที่ซีดกว่ากลุ่มอื่น แล้วนอกจากนี้ กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 และกลุ่มควบคุม มีค่าสีแดงสูงกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงทำให้แหนมมีลักษณะสีแดงสวยกว่าทั้ง 2 กลุ่ม (Table 6) และ (Table 8) สอดคล้องกับค่า a* ที่มีค่าต่ำที่สุด (Table 7) เป็นผลอาจเนื่องจากค่า pH ในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 มีค่าต่ำสุด ในวันที่ 7 ซึ่งการลดลงของค่า pH ทำให้ค่าความสว่างของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น และค่าสีแดงลดลง จึงส่งผลให้ค่า L* และค่า b* เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Visessanguan *et al*. (2004) รายงานว่า การลดลงของค่า pH มีผลทำให้ค่าความสว่างของแหนมหมูเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากกรดแลคติกทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพ และการออกซิเดชันของโปรตีน

Table 6 Effect of starter cultures on outside color value (L*, lightness) of beef Nham (mean±SD) on day 3 of fermentation at 30 °C and after 4 days of storage at 4 °C (day 7)

Treatment	fermentation and storage time (day)	
	3	7
Control	48.68±1.66[b]	47.38±1.43[c]
Pacovis RCI – 47	50.60±1.54[a]	50.49±1.20[a]
P 536	47.41±1.39[c]	46.68±1.53[c]
D 4	50.02±1.36[a]	48.73±1.25[b]

[a-c] Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

Table 7 Effect of starter cultures on outside color value (a*, redness) of beef Nham (mean±SD) on day 3 of fermentation at 30 °C and after 4 days of storage time at 4 °C (day 7)

Treatment	fermentation and storage time (day)	
	3	7
Control	16.17±2.68	15.84±1.94
Pacovis RCI – 47	15.62±1.06	15.61±1.02
P 536	16.18±1.06	16.60±1.02
D 4	16.70±1.63	15.75±2.02

Means in the same column without different superscipts are not significantly different ($P>0.05$)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 8 Effect of starter cultures on outside color value (b*, yellowness) of beef Nham (mean±SD) on day 3 of fermentation at 30 °C and after 4 days of storage time at 4 °C (day 7)

Treatment	fermentation and storage time (day)	
	3	7
Control	3.32±0.84[b]	3.71±0.86[b]
Pacovis RCI – 47	3.97±0.55[a]	4.40±0.68[a]
P 536	3.25±0.56[b]	3.91±0.55[b]
D 4	3.29±0.42[b]	3.87±0.53[b]

[a-b] Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.05)

Control = Nham without starter culture; *Pacovis* RCI - 47 = Nham inoculated with commercial starter culture (*Pacovis* RCI – 47)

P 536 = Nham inoculated with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536; D 4 = Nham inoculated with *Lactobacillus salivarius* D 4

สรุปผลการทดลอง

การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลดีต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก โดยพบว่าในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่ากลุ่มควบคุม ส่งผลให้มีผลดีต่อผลิตภัณฑ์แหนมหมัก คือ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคและทำอาหารเน่าเสีย จึงทำให้แหนมกลุ่มดังกล่าวมีความปลอดภัย และอายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น พบว่าการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถลดจำนวน Yeast/Mold เหลือน้อยสุด ซึ่งการลดลงของเชื้อส่งผลดีต่อผู้บริโภคในเรื่องของความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนมหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มมากขึ้น แหนมทุกกลุ่มการทดลองที่เติมกล้าเชื้อมีจำนวนเชื้อ Coliforms ลดลง อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในแหนมทุกกลุ่มการทดลอง ทางด้านคุณภาพของแหนม พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า pH ต่ำ และมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุม และแหนมกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 มีค่า pH ต่ำสุดและปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด ทำให้แหนมกลุ่มดังกล่าวมีความปลอดภัยเนื่องมาจาก ที่ค่า pH ที่ต่ำเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย แต่กลับพบว่าการลดลงของค่า pH มีผลเสียต่อค่าสีที่ผิวสัมผัสด้านในและด้านนอกของแหนม พบว่า การเติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47 ให้ค่าความสว่างมากที่สุด และค่าสีแดงลดลงมากกว่าทุกกลุ่มการทดลอง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสว่างเพิ่มขึ้น และสีแดงลดน้อยลง ผลิตภัณฑ์มีความน่ารับประทานลดลงเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีที่ซีดกว่าทุกกลุ่มซึ่งเป็นลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคไม่ต้องการ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D 4 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์โดยความร่วมมือของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ร่วมกับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้ให้เงินสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

AMSA. 1991. Guideline for meat color evaluation. American Meat Science Association. Illinois. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AOAC. 1995. Chapter 17 AOAC Official Method 17.9.01. p. 55. In Cunniff, P. Official methods of analysis of AOAC International. Virginia: AOAC International.

AOAC. 2005. Chapter 17 AOAC Official Method 940.36B. p. 2. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC International. U.S.A.

AOAC. 2006. Chapter 17 AOAC Official Method 966.23c-24. p.5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC International. Maryland: AOAC International.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 12 on *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. January2001. [online] Available : http:// www.fda.gov /Food /Science Research /LaboratoryMethods/ Bacteriological AnalyticalManualBAM. 19/08/2554

Pilasombut, K., A. Swetwiwathana, R. sitthigripong and J. Sethakul. 2009. Screening of bacteriocin-like inhibitory substance from lactic acid bacteria for fermented meat starter culture. Paper presented at 55th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Copenhagen, Denmark, August 2009. 4 p.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2004. Effect of Garlic nitrite on Pediocin PA-1 prodution of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the Growth of *Salmonell* Anatum in Simulate Nham Fermentation. Paper presented at KMITL International Conference On Integration of Science and Technology for Sustainable Development, Bangkok, Thailand, August 2004. 4 p.

Swetwiwathana, A., N. Srisuk, L. Sangsuk, N. Lotong, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2005. Screening of bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria isolated from fermented meat in acidic broth and the fresence of bile salts for probiotic prospect. Paper presented at 55th International Congress of Meat Science and Technologyv (USDA), Baltimore, Maryland, USA, August 2005. 7 p.

Visessanguan, W., S. Benjakul, S. Riebroy and P. Thepkasikul. 2004. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. Meat Sci. 66 : 579 – 588.

Visessanguan, W., S. Benjakul, T. Smitinont, C. Kittikun, P. Thephasikul and A. Panya. 2006. Changes in microbiological, biochemical and physical – chemical properties of Nham inoculate with different inoculums levels of *Lactobacillus curvatus*. Int. J. Food Microbiol. 39 : 814-826.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้