รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลคติกร่วมกับการบรรจุสุญญากาศเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการผลิตไส้กรอกอีสาน

The combination of crude bacteriocin, lactic acid and vacuum package to improve safety of E-san sausage manufacture

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

นางอังคนา ทุมดี

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับการบรรจุสุญญากาศเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการผลิตไส้กรอกอีสาน

The combination of crude bacteriocin, lactic acid and vacuum package to improve safety of E-san sausage manufacture

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

นางอังคนา ทุมดี

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 12781682x

i

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
P1467
2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่
เลขทะเบียน 145147
วัน.เดือน.ปี 31 ส.ค. 2560

ชื่อโครงการ การใช้สารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกร่วมกับการบรรจุสุญญากาศเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในการผลิตไส้กรอกอีสาน

แหล่งเงินทุน งบประมาณเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการวิจัย: ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ผู้ร่วมวิจัย: นางอังคนา ทุมดี

หน่วยงาน: ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซินและ สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยของไส้กรอกอีสาน การศึกษานี้ประกอบด้วย 3 การทดลอง ได้แก่ (i) การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ (ii) ศึกษาประสิทธิภาพของกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (ทำในหลอดทดลอง) และ (iii) การใช้กรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในไส้กรอกอีสาน

การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซินและคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อ 15 ตัวอย่าง จำนวน 250 ไอโซเลท และพบเพียง 1 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ตั้งชื่อว่า ไอโซเลท KL-1 โดยแบคเทอริโอซินที่พบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ ได้แก่ *Lactobacillus sakei, Leuconostoc mesenteroides* และ *Enterococcus feacalis* ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินโดยศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่หมาะสมของเชื้อในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และจำแนกชนิดของเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) ที่อุณหภูมิ 30 °C ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 37 °C สามารถสร้างสารได้ 6, 400 AU/ml จำแนกเชื้อไอโซเลท KL-1 ได้เป็น *Lactobacillus plantarum* สารแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C และความเย็นที่ 4 °C นานสองวัน อย่างไรก็ตามการต้มที่ 100 °C และเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลาที่นานขึ้น พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อลดลง

การทดลองที่ 2 กรดแลกติกสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อให้เกิดการเน่าเสียและ ก่อโรค ในขณะที่สารแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่พบในอาหารหลายชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือศึกษาประสิทธิภาพของกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* Anatum, *Escherichia coli* และ*Staphylococcus aureus* โดยแบคเทอริโอซินที่นำมาศึกษามาจากเชื้อไอโซเลท KL-1 การทดลองครั้งนี้ประกอบไปด้วยสองส่วน ส่วนแรกคือศึกษาการยับยั้งเชื้อดังกล่าวข้างต้นโดยสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4% ส่วนที่สองคือศึกษาการยับยั้งเชื้อดังกล่าวข้างต้นโดยสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4% ร่วมกับสารแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 2 % จากนั้นตรวจนับจำนวนเชื้อทดสอบที่มีชีวิตรอดภายหลังที่สารสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่ากรดแลกติกที่ความเข้มข้น 3 และ 4% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum, *E. coli* และ*S. aureus* ที่ระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง โดยจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้กรดร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน 2 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากขึ้น ที่ระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง

การทดลองที่ 3 มีวัตถุประสงค์คือศึกษาการใช้สารละลายกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการเพิ่มความปลอดภัยในไส้กรอกอีสาน การทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่มได้แก่ ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติกความเข้มข้น 2, 4%,เติมแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 2, 4% และกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ศึกษากระบวนการหมักสองแบบ ได้แก่ การหมักในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C และการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองพบว่ากระบวนการหมักที่แตกต่างมีผลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์และคุณลักษณะต่างในไส้กรอกอีสาน ในกระบวนการหมักแบบแขวนที่อุณหภูมิห้องพบว่าจำนวนเชื้อ yeast/mold ในกลุ่มที่เติม กรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินมีจำนวนต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มอื่นจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ในกระบวนการหมักแบบบรรจุในถุงสุญญากาศกลับไม่พบเชื้อยีสต์รา (น้อยกว่า 10 cfu/g)ในการหมักวันที่ 3 ในการศึกษาค่า pH พบว่าไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซิน ส่วนค่าสีพบว่าพบว่าในกลุ่มที่เติมกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซิน มีค่าความสว่างมากว่า (L*) และค่าสีแดง (a*)น้อยกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปในทางเดียวกันในสภาวะการหมักทั้งสองแบบ จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสานพบว่ากลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินมีจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในการหมักแบบแขวนที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการหมักในถุงสุญญากาศตรวจไม่พบเชื้อ *S. aueus* และจากการทดสอบการชิมพบว่าผู้บริโภคมีความพึงพอใจไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซินมากที่สุด ดังนั้นดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานให้มีความปลอดภัยมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The study composed of 3 experiments as following, (i) screening of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fermented meat product, (ii) *In vitro* inhibitory activities of lactic acid solution and bacteriocin from lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* KL-1 against food pathogenic bacteria and (iii) Application of lactic acid solution, bacteriocin and their combination to improve the safety of E-san sausage.

The first experiment: the aim of this study was to screen and *in vitro* characterize the properties of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from fermented meat product. Two hundred and fifty LAB were isolated from fifteen samples of fermented meat produccts and screened for bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Antimicrobial activity of bacteriocin was carried out by spot on lawn method against both gram positive and gram negative bacteria. One isolate, assigned as KL-1, produced bacteriocin and showed inhibitory activity against *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus faecalis*. To characterize the bacteriocin-producing strain, optimum temperature, incubation period for maximum bacteriocin production and identification of bacteriocin-producing strain were determined. It was found that the optimum cultivation temperature of the strain to produce the maximum bacteriocin activity (12,800 AU/mL) was obtained at 30 °C. Meanwhile, bacteriocin production at 6,400 AU/mL was found when culturing the strain at 37 °C and 42 °C. The isolate KL-1 was identified as *Lactobacillus plantarum*. Antimicrobial activity of cell-free supernatant was completely inhibited by proteolytic enzyme of trypsin, alpha-chymotrypsin and proteinase K. Bacteriocin activity was stable at high temperature up to 100°C for 10 mins and at 4 °C storage for 2 days. However, the longer heating at 100°C and 4°C storage, its activity was reduced.

The second experiment: lactic acid can inhibit the natural microflora including spoilage bacteria and food borne pathogens, while bacteriocins produced by lactic acid bacteria are biologically active proteins demonstrating a bactericidal mode of action and also reduce growth of many food borne pathogen varieties. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory activity of lactic acid solution against *Salmonella* Anatum, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Cell free supernatant (CFS; pH 6.9) known as bacteriocin was produced by lactic acid bacteria isolate KL-1. The experiment consisted of 2 parts: one, measurement of the antimicrobial activities of 0, 1, 2, 3 and 4% lactic acid solutions; and two, measurement of the antimicrobial activities of combinations of 2% sterilized CFS with 0, 1, 2, 3 and 4% lactic acid solutions. Three species of bacteria mentioned above were inoculated into tryptic soy broth which added lactic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and bacteriocin treatments as above, then incubated at 37 °C. The numbers of bacteria survival were counted at 0, 6, 12, 18, 24 and 30 h. The results showed that at 3 and 4% lactic acid solution inhibited the growth of *S.* Anatum, *E. coli* and *S. aureus* after 24 and 30 h. Number of tested bacteria significantly decreased ($p<0.05$) when compared to the control group (without any solution). Number of tested bacteria increased ($p<0.05$) from initial number (about 6.3 log cfu/ml) to 30 h (about 8 log cfu/ml). In addition, the combination of 3 and 4% lactic acid solution and 2% bacteriocin was more effective to reduce the numbers of *S.* Anatum, *E. coli* and *S. aureus* at 24 and 30 h.

The third experiment: The aim of this study was to evaluate the application of bacteriocin, lactic acid solution and their mixture to improve product quality to meet the safety standard of the Thai E-san sausage. There were 6 treatments in the experiment as follows: 2 and 4 % of lactic acid, 2 and 4% of bacteriocin ,the combination of 2% of lactic acid solution and 2% of bacteriocin.and a control (no adding solution). The E-san sausages were applied with the solution as previously described. These sausage underwent two fermentation processes, in vacuum bags and kept at 30 ^{o}C and hanging under room temperature. The results indicated that different fermentation processes had effect on number of microorganisms and E-san sausage quality. The number of yeast and mold in E-san sausage added with the mixture of lactic acid and bacteriocin was lower than other groups ($p<0.05$). However, number of yeast/mold was not detected in samples under vacuum fermentation(less than 10 cfu/g). The E-san sausage of both fermentation methods which added lactic acid solution and bacteriocin showed lower pH value than the control group. The color of these E-san sausage displayed the higher lightness (L*) and lower redness (a*) than the control group. In addition, *S. aureus* on ground pork mixed with lactic acid solution and bacteriocin was significantly decrease ($P< 0.05$). Therefore, this research was beneficial for E-san sausage production to control both pathogenic and spoilage microorganism.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์ และดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี ที่กรุณาให้ความรู้ในเรื่องงานวิจัยและคอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์จาก คุณอังคณา ทุมดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2557 ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คมแข พิลาสมบัติ

อังคณา ทุมดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ข

Abstract ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ลักษณะทั่วไปของไส้กรอกอีสาน 4

2.2 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 5

2.3 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน 8

2.4 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน 9

2.5 คุณสมบัติของกรดแลกติก 9

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิการทดลอง 11

3.1 ขอบเขตงานวิจัย 11

3.2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ 13

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 14

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 14

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย 15

3.6 ขั้นตอนการศึกษาการเก็บข้อมูล 25

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ 28

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 29

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 74

บรรณานุกรม 75

ภาคผนวก 80

ประวัตินักวิจัย 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยงและอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย 13

ตารางที่ 4.1 กิจกรรมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากไอโซเลท KL-1 30

ตารางที่ 4.2 การจำแนกสายพันธ์ KL-1 โดยวิธีทางกายภาพ 31

ตารางที่ 4.3 การจำแนกสายพันธ์ KL-1 โดยวิธีทางชีวเคมี 32

ตารางที่ 4.4 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อไอโซเลท KL-1 34

ตารางที่ 4.5 ผลของเอนไซน์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 37

ตารางที่ 4.6 ผลของความร้อนและความเย็นต่อกิจกรรมขอสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T 38

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ S. Anatum 40

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 41

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* 42

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anstum 43

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 44

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ S. aureus 45

ตารางที่ 4.13 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความเป็นกรดด่างในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean $\pm$ S.D.) 49

ตารางที่ 4.14 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean $\pm$ S.D.) 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.15 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความเป็นกรดด่างในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)..... 50

ตารางที่ 4.16 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อ เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)..... 51

ตารางที่ 4.17 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าสีในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)..... 53

ตารางที่ 4.18 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าสีในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการ บรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)..... 54

ตารางที่ 4.19 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า Texture Profile Analysis (TPA) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิห้อง..... 56

ตารางที่ 4.20 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า Texture Profile Analysis (TPA) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยบรรจุถุงสุญญากาศ 57

ตารางที่ 4.21 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า water activity (Aw) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)..... 59

ตารางที่ 4.22 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า water activity (Aw) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)..... 60

ตารางที่ 4.23 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความชื้น (%) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก โดยการแขวน (Mean ± S.D.) 60

ตารางที่ 4.24 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความชื้น (%)ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D) 61

ตารางที่ 4.25 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D) 63

ตารางที่ 4.26 จำนวนบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D) 64

ตารางที่ 4.27 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อจำนวนยีสต์และราในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก โดยการแขวน (Mean ± S.D.) 65

ตารางที่ 4.28 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อจำนวนยีสต์และราในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D) 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.29 ค่าเฉลี่ยความชอบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean±S.D)..... 67

ตารางที่ 4.30 ค่าเฉลี่ยความชอบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D) 68

ตารางที่ 4.31 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S. aureus* ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean±S.D.) 72

ตารางที่ 4.32 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S.aureus* ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)..... 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 4.1 ระยะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อไอโซเลท KL-1 (a) 30 °C, (b) 37 °C และ (c) 42 °C 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีรสชาติเปรี้ยว ที่ทำมาจากเนื้อสุกร ไขมันสุกร ข้าวสุก ปรุงรสด้วยเครื่องปรุงรส เครื่องเทศและ สมุนไพร เช่น น้ำตาลทราย เกลือ กระเทียมบด พริกไทย ลูกผักชี ผสมให้เข้ากันดี นวดจนเหนียว บรรจุในไส้หมูหรือไส้ชนิดอื่นที่บริโภคได้ มัดเป็นท่อน ผึ่งไว้ในที่สะอาดจนเปรี้ยว และต้องทำให้สุกก่อนรับประทาน (มผช. 2546) เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ทำได้ง่าย และได้รับความนิยมในการบริโภคทั่วไปในประเทศไทย (Sriphochanart and Skolpap. 2001) การผลิตส่วนใหญ่ผลิตเองในครัวเรือนหรือผลิตโดยธุรกิจขนาดเล็ก นิยมขายในรูปที่ยังไม่สุก หรือปรุงสุก วิธีการเก็บรักษาไส้กรอกอีสานที่ยังไม่สุกคือ เก็บที่อุณหภูมิห้อง ทำให้อายุการเก็บรักษาสั้นเนื่องจากการเจริญของเชื้อรา อายุการเก็บรักษาส่วนใหญ่เพียง 2-3 วัน ทำให้เป็นข้อจำกัดในการขยายตลาด ถ้าหากสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้นจะเป็นประโยชน์กับผู้ประกอบการมากขึ้น (Phromraksa *et al.* 2005) จากการผลิตแบบครัวเรือน ทำให้ไม่มีการควบคุมสุขลักษณะในการผลิต และปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักให้เกิดเองตามธรรมชาติ ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน โดยไม่มีการควบคุม ทำให้ได้ไส้กรอกที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ (มัลลิกา ไชยวุฒิ และคณะ. 2554) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกที่ปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก แล้วสร้างกรด ทำให้เกิดความเปรี้ยวในเนื้อหมัก (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) อย่างไรก็ตามดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า อุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกอีสานส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก หรืออุตสาหกรรมขนาดครอบครัว ทำให้ไม่มีการควบคุมการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ อีกทั้งกระบวนการหมักไม่ได้ควบคุม อาจทำให้การเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งการปนเปื้อนมักมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่นำมาทำไส้กรอกอีสาน และการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในไส้สุกรที่นำมาใช้ (มัลลิกา ไชยวุฒิ. 2555) ได้มีการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสุกร ได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Yersinia* sp. (Duffy *et al.* 1999; Bolton *et al.* 2002) และในลำไส้สัตว์มักพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *E. coli*, *Yersinia* sp. และ *Listeria monicytogenes* (Warris. 2000) ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ในแหนมและไส้กรอกอีสาน (Chokesajjawatee *et al.* 2009; Visessanguan *et al.* 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่ทนต่อเกลือไนไตร์ สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนออกมาในอาหารในระหว่างการเจริญเติบโต (คมแข พิลาสมบัติ. 2550; González-Fandos *et al.* 1999) อย่างไรก็ตาม เชื้อก่อโรคดังกล่าวที่พบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน มักถูกยับยั้งหรือทำลายด้วยกรดแลกติก และสารยับยั้งต่างๆ ที่กลุ่มแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแลกติกผลิตขึ้นในระหว่างการหมัก (มัลลิกา ไชยวุฒิ. 2555) Chokesajjawatee *et al.* (2009) รายงานว่า จำนวนเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารเนื้อหมัก ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงจะมีโอกาสพบเชื้อก่อโรคมากกว่า และในผลิตภัณฑ์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.6 มักมีโอกาสพบการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคน้อยมาก โดยค่าความเป็นกรดด่าง 4.56 ยังคงตรวจพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในขณะเดียวกันข้อกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. (2546) กำหนดว่าไส้กรอกอีสานต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* Chokesajjawatee *et al.* (2009) กล่าวว่า การควบคุมเชื้อก่อโรคในอาหารหมักเนื้อจะต้องควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ในผลิตภัณฑ์ให้ลดลงต่ำกว่า 4.6 อย่างรวดเร็ว อีกประการหนึ่ง ถึงแม้ว่าไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์ปรุงสุกก่อนรับประทาน แต่ถ้าหากผลิตภัณฑ์ก่อนทำให้สุกมีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคที่สามารถสร้างสารพิษที่ทนร้อนได้ เช่น *Staphylococcus aureus* กระบวนการทำให้สุกไม่สามารถทำลายสารพิษได้ ทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายจากการบริโภคไส้กรอกอีสาน

ดังนั้นเพื่อเป็นการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการควบคุมเชื้อก่อโรคเริ่มต้นก่อนเกิดกระบวนการหมัก โดยการทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในส่วนผสมในวันแรกลดลง โดยการเติมกรดแลกติกและเติมสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งสารทั้งสองชนิดเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค มีคุณสมบัติเป็นกรด สามารถการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค แต่ไม่ทำลายแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งยังจะทำให้แบคทเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้และสร้างกรดออกมาระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสารแบคเทอริโอซินทำงานร่วมกับกรดแลกติก สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Salmonella* sp. ได้การใช้สารดังกล่าวข้างต้นจะทำงานร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ช่วยในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจพบในไส้กรอกอีสาน ทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยจากการรับประทานไส้กรอกอีสานมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน
2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้กรดแลกติกในไส้กรอกอีสานเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรค
3. ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมักต่อคุณภาพด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ศึกษาวิธีที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิ 30 °C และการหมักในถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 3 วัน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ และศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินเพื่อนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในการการศึกษาผลของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella* sp. และ *E. coli* ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของในการเติมกรดแลกติกในการการผลิตไส้กรอกอีสานต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยศึกษา ค่าความเป็นกรดด่าง สี (CIE L*a*b*) ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างกระบวนการหมัก ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบค่าแรงเฉือน (shear force) ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis ค่าความชื้น (Moisture content) ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จำนวนยีสต์และรา และวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส จากนั้นศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน และศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมักต่อคุณภาพด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของไส้กรอกอีสาน โดยวิธีที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิ 30 °C และการหมักในถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 4 วัน

1.4 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย

1 ปี (ต.ค. 2556 – ก.ย. 2557)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการใช้กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินผลิตไส้กรอกอีสานให้มีความปลอดภัยจากเชื้อก่อโรคมากขึ้น

2. สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ทำจากเนื้อหมู มันหมู ข้าวสุก ปรุงรสด้วยเครื่องปรุงรส เครื่องเทศและสมุนไพร เช่น น้ำตาลทราย เกลือ กระเทียมบด พริกไทย ลูกผักชี ผสมให้เข้ากันดี นวดจนเหนียว บรรจุในไส้หมูหรือไส้ชนิดอื่นที่บริโภคได้ มัดเป็นท่อน ผึ่งไว้ในที่สะอาดและแห้งจนเปรี้ยว และต้องทำให้สุกก่อนรับประทาน

คุณลักษณะที่ต้องการ

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

- ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องมีรูปทรงเดียวกัน และมีขนาดใกล้เคียงกัน มีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ มีผิวเรียบ ไม่ฉีกขาด

2.1.2 สี

- ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้

2.1.3 กลิ่นรส

- ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักและของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น

2.1.4 ลักษณะเนื้อ

- ต้องนุ่มและไม่ร่วน

2.1.5 สิ่งแปลกปลอม

- ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วน หรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

2.1.6 วัตถุเจือปนอาหาร

- ห้ามใช้สีทุกชนิด

- หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้

- โซเดียมไนไทรต์หรือโพแทสเซียมไนไทรต์ (คำนวณเป็นโซเดียมไนไทรต์) ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก (เกลือ : เกลือไนไตรท์ ในสัดส่วนร้อยละ 94 : 6) ต้องไม่เกิน 2 กรัมต่อเนื้อสัตว์ 1 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ฟอสเฟตในรูปของโมโน- ได- และโพลิของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียม อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกัน (คำนวณเป็น P_2O_5 จากฟอสฟอรัสทั้งหมด) ต้องไม่เกิน 3000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

- โปรตีนต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 12 โดยน้ำหนักไขมันต้องไม่เกินร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก

- จุลินทรีย์ ซาลโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม เอสเชอริเชีย โคไล โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ยีสต์และรา ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อ ตัวอย่าง 1 กรัม

2.1.7 การบรรจุ

- ให้บรรจุไส้กรอกอีสานในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546)

2.2 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ผลกระทบของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์คือ ทำให้ผู้บริโภคเกิดการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคเชื้อก่อโรคหรือสารพิษที่พบในอาหาร นอกจากนี้ยังทำให้อาหารเหล่านั้นเกิดการเน่าเสีย ส่งผลต่อเศรษฐกิจ (คมแข พิลาสมบัติ. 2550) ดังนี้

2.2.1 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่เหมาะต่อการเจริญของอาหารและมักพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังกระบวนการฆ่าสัตว์ ซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อนเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนในระหว่างการเก็บรักษาในห้องเย็น เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเน่าเสีย เนื้อสัตว์ที่เน่าเสียหมายถึงเนื้อสัตว์ที่มีกลิ่น สีและรสชาติที่ผิดปกติ เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างสารประกอบบางชนิดขึ้นมาระหว่างเจริญบนเนื้อสัตว์ (Russo *et al.* 2006) ซึ่งเป็นเกณฑ์ในการกำหนดคุณภาพของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผู้บริโภคมีการคาดหวังในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี มีคุณค่าทางโภชนาการทางอาหาร รวมทั้งมีความปลอดภัยในการบริโภค ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียในเนื้อสัตว์นั้นจะมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์เริ่มต้นที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Nychas *et al.* 2008) จุลินทรีย์เหล่านี้อาจมีการปนเปื้อนจากส่วนภายนอกและระบบทางเดินอาหารของสัตว์ นอกจากนี้อาจปนเปื้อนมาจากภาชนะบรรจุ อากาศ และผู้ปฏิบัติงานอีกด้วย ถ้าปล่อยให้เนื้ออยู่ในอุณหภูมิห้องเชื้อจากแหล่งที่มาเหล่านี้อาจเจริญและทำให้เนื้อเน่าเสียได้ การรักษาเนื้อสัตว์ให้ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ทำได้โดยการเลี่ยงจากจุลินทรีย์ให้มากที่สุด แต่ถ้าเนื้อสัตว์มีการปนเปื้อนมาแล้วการกำจัดออกไปทำได้ค่อนข้างยาก (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539) ซึ่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์โดยทั่วไปทำให้เกิดผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในระหว่างกระบวนการหมักที่จะทำให้มีอายุการเก็บรักษาได้ไม่นาน (Ouattara *et al.* 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ผู้บริโภคเกิดเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคเนื้อสัตว์เหล่านั้น โดยโรคที่สำคัญและมักเกิดกับผู้ที่บริโภคเนื้อสัตว์คือโรคอาหารเป็นพิษ (Pearson and Dutson. 1986; Rao *et al.* 1998) เชื้อที่สำคัญที่ทำให้เกิดอาการดังกล่าวได้แก่ *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni/coli* และ *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* และ *Bacillus cereus* (Pearson and Dutson. 1986; Warriss. 2000; Borch and Arinder. 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นับว่ามีอันตรายต่อมนุษย์ที่มักปนเปื้อนบนเนื้อสัตว์ได้แก่ *E. coli* O157:H7 (Nissen *et al.* 2001), *Bacillus cereus* และ *Aeromonas hydrophila* (Huffman. 2002) โดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* O157:H7 เป็นสาเหตุทำให้ผู้บริโภคมีอาการป่วยที่รุนแรงและตายได้ในที่สุด ถ้าหากบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อในขณะที่ยังปรุงไม่สุก บางครั้งพบว่าเชื้อสามารถสร้างสารพิษได้มากกว่าหนึ่งชนิด เช่น verotoxin หรือ shiga-like toxin และปริมาณเชื้อที่บริโภคเข้าไปต่ำกว่า 10 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Carney *et al.* 2006) นอกจากนี้กระทรวงเกษตรประเทศสหรัฐอเมริกา (USDA) ยังได้เสนอให้โรงฆ่าสัตว์มีการใช้สารฆ่าเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ หรือใช้เทคโนโลยีในการลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์การผลิตสัตว์และกระบวนการฆ่าสัตว์ (Nissen *et al.* 2001)

มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์แหนมหมู โดยอดิศร เสวต วิวัฒน์ (2533) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมู 56 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งสิ้น 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมาก ได้แก่ *S.* Derby และ *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด ต่อมา อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ในแหนมและไส้กรอกอีสาน (Chokesajjawatee *et al.* 2009; Visessanguan *et al.* 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่ทนต่อเกลือไนไตร์ สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนออกมาในอาหารในระหว่างการเจริญเติบโต (คมแข พิลาสมบัติ. 2550; González-Fandos *et al.* 1999)

2.2.3 ข้อกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. (2546) กำหนดว่าไส้กรอกอีสานต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus*

2.2.3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aaureus สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะที่ไร้ออกซิเจนบางสายพันธุ์สามารถทนเกลือได้สูง (ร้อยละ 10-20) สามารถทนต่อไนไตรท์ได้ค่อนข้างดี ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึงร้อยละ 50-60 และสามารถย่อยโปรตีนได้แต่ไม่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น โดยทั่วๆ ไปสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และ water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity ที่กว้าง (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539) จึงนับว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่ถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข โดยก่อให้เกิดอาการอาเจียนและท้องเสียเมื่อได้รับสารพิษเข้าไปในร่างกาย เป็นโรคที่พบบ่อยในอาหารของหลายประเทศ ซึ่งในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ถือว่าเป็นสาเหตุในการแพร่ระบาดของเชื้อ (Oliveira *et al.* 2010) ซึ่งผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยทั่วไปมีกรดอินทรีย์อ่อนๆ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่ผลิตได้มาจากอาหารหมักต่างชนิดกัน นอกเหนือจากนั้นมีการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ลงไปในอาหารหมัก ซึ่งกรดแลกติกที่ผลิตได้จากกล้าเชื้อบริสุทธิ์นั้นสามารถเป็นสารป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีการปนเปื้อนมาได้ (Gonçalves *et al.* 2005)

2.2.3.2 *Escherichia coli*

E. coli พบได้ในสัตว์กีบ เช่น วัว แพะ แกะ ซึ่งเป็นแหล่งกักเก็บเชื้อตามธรรมชาติ ไม่ทนต่อความร้อน แต่สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิแช่แข็ง เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์อย่างรุนแรงโดยเฉพาะในอาหารที่มีการบริโภคอาหารดิบๆ หรือไม่ผ่านการปรุงสุก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแห้งที่มีการบริโภคแบบดั้งเดิมโดยไม่มีการปรุงสุก หลังจากที่ผลิตโดยการหมักก้อนเนื้อตามด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิและความชื้นต่ำประมาณ 30 วัน นอกจากนี้แบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* O157:H7, *Lis. monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์อาจมีการปนเปื้อนมาจากส่วนผสม วัตถุดิบ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในกระบวนการผลิตหรือมีการปนเปื้อนภายหลังจากการผลิต ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีการตรวจพบในเนื้อสัตว์และสามารถอยู่รอดได้ในกระบวนการผลิตไส้กรอก (Colak *et al.* 2007) อันตรายต่อสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนั้นทางหน่วยบริการตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety and Inspection Service : FSIS) และการดำเนินงานภายใต้กระทรวงเกษตรแห่งสหรัฐ (United States Department of Agriculture: USDA) จะบังคับให้ผู้ผลิตจะต้องผ่านการตรวจสอบกระบวนการผลิตเพื่อมั่นใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียก่อโรค (Hwang *et al.* 2009)

Muthukumarasamy and Holley (2007) รายงานว่า *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อันตรายต่อร่างกายเป็นอย่างมาก สามารถทนกรดได้ และสามารถในการอยู่รอดในไส้กรอกหมักแห้งได้ มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* O157:H7 จากการบริโภคไส้กรอกหมักแห้งและได้มีการเรียกคืนผลิตภัณฑ์ ต่อมาได้มีการแนะนำหลักเกณฑ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะต้องมีการป้องกันเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในกระบวนการผลิต โดยการใช้ความร้อน 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที สามารถลดระดับของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ให้มีความปลอดภัยมากขึ้น และ Lahti *et al.* (2001) รายงานว่า *E. Coli* O157:H7 และ *Lis. monocytogenes* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ค่า water activity ต่ำ เกลือโซเดียมคลอไรด์ และความเข้มข้นของไนไตรท์ระดับความเข้มข้นสูงในการหมักเนื้อ ปริมาณของการติดเชื้อ *E. coli* ถึงแม้ว่ามีน้อยกว่า 50 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ในอาหารก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง ช่วงความเป็นกรดด่างในการเจริญเท่ากับ 4.0-9.0 และไม่ทนต่อแรงดันออสโมติกไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือแกงที่มีความเข้มข้นร้อยละ 9 และเกลือไนไตรท์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella* spp. ได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างลดลง นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร เนื่องจากเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ติดต่อผ่านการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเท่านั้น ส่วนใหญ่จะพบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่างๆ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว เป็นต้น และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยการปนเปื้อนมาจากอากาศ เครื่องมือและอุปกรณ์ในระหว่างการผลิต ความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์และสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโต (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545)

สำหรับรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์แหนมหมู โดยอดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมู 56 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งสิ้น 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมาก ได้แก่ *S.*Derby และ *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด ต่อมา อดิศร เสวตวิวัฒน์ และอรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์)

2.3 คุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

Muyanja *et al.* (2002) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โมเลกุลของแบคเทอริโอซินประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะไฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน De Vuyst and Vandamme (1994) รายงานว่า แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียโดยสังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้าง แบคเทอริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน จะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรมการดัดแปลง หลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม (Post-translation modification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 1999) ซึ่งในกลุ่มของ antibiotic แบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่อง (Bruno and Montville. 1993) แบคเทอริโอซิน เช่น ไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม antibiotic ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายคือการเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงานและไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover. 1993) ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่มของ non antibiotic จะเป็นกลุ่มที่ต้องการตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (Ennahar *et al.* 1999) นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซิน class II ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน (Abee. 1995) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.* 2000)

2.5 คุณสมบัติของกรดแลกติก

Pipek *et al.* (2004) รายงานว่าการใช้กรดแลกติกในการลดจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้ในระดับความเข้มข้น 1-2 % ซึ่งอาจใช้ในขั้นตอนที่แตกต่างกันได้ในแต่ละโรงฆ่าและได้แนะนำให้ใช้บนซากสัตว์ภายหลังฆ่าให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผิวซากไม่ให้เจริญและแทรกตัวลงไปในเนื้อเยื่อสัตว์ Van Netten *et al.* (1995) กล่าวว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1-2 % ที่อุณหภูมิของสารละลายกรดแลกติก 70°C เป็นเวลา 15 วินาที มีผลในการลดจำนวนจุลินทรีย์บนซากโค และยังกล่าวเสริมว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2% ที่อุณหภูมิของสารละลายกรดแลกติก 37°C เป็นเวลา 120 วินาที สามารถขจัดเชื้อ *Salmonella* บนซากไก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไม่มีผลต่อคุณภาพของซากไก่ ซึ่งในการศึกษา *In vitro* พบว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.6 อุณหภูมิของสารละลาย 37°C สามารถลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* ได้ถึง 5 log cfu/ml

กรดแลกติกมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในสภาวะนี้จะทำให้ช่วงเจริญเติบโต (lag phase) ใช้ระยะเวลานานขึ้น จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช้าลง (Woolthuis and Smulders. 1985) การยับยั้งจุลินทรีย์โดยกรดนั้นเกิดจากส่วนที่เป็น lipophilic ของกรด ซึ่งอยู่ในรูปโมเลกุลที่ไม่แตกตัวซึมผ่านเข้าไปใน plasma membrane ของจุลินทรีย์ ซึ่งปกติมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างเป็นกลาง (pH 7) เมื่อกรดเข้าไปภายในจะทำให้เกิดสภาวะแตกตัวของโปรตอน (proton) และคอนจูเกตเตต เบส (conjugated base) มีผลในการทำลายออกซิเดทีฟ ฟอสฟอรีเลชั่น ฟอร์ม (oxidative phosphorelation form) ของระบบการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) รวมถึงการยับยั้งระบบการขนถ่ายสารโมเลกุล (substrate molecule) เข้าสู่เซลล์ เป็นผลให้เกิดการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Adam and Hall. 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ขอบเขตงานวิจัย

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
<u>การทดลองที่ 1</u> การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ	1.1 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน 1.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 1.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน
<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* (ในหลอดทดลอง)	2.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* 2.2 นำข้อมูลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติก และสารยับยั้งจุลินทรีย์ (crude bacteriocin) จากการทดลองที่ 2.1 ใช้ร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*
<u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ	3.1 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลก ติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ 3.1.1 คุณสมบัติทางด้านกายภาพ 3.1.1.1 ค่าความเป็นกรดด่าง 3.1.1.2 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) 3.1.1.3 สี (CIE L*a*b*) ด้วยเครื่อง Hunterlab Mini Scan EZ 3.1.1.4 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	รูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัดแบบ Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) 3.1.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี 3.1.2.1 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water activity measurement) ด้วยเครื่อง เครื่องตรวจวัดค่า A_w (Novasina, Switzerland) 3.1.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content) ด้วยเครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA) 3.1.3 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ 3.1.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 3.1.3.2 จำนวนยีสต์และรา 3.1.4 วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส (chewiness and hardness) กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale 3.2 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน โดยศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน เมื่อแขวนไว้ที่อุณหภูมิห้องและเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยงและอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ	อาหาร	อุณหภูมิ (°C)
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	MRS	37
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TISTR 1344	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR 942	MRS	30
Enterococcus faecalis JCM 5803^T	MRS	37
Enterococcus faecalis TISTR 888	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	MRS	30
Bacillus coagulans JCM 2257^T	TSB-YE	37
Bacillus coagulans TISTR 1447	TSB-YE	37
Listeria innocua ATCC 33090^T	TSB-YE	37
Brochotrix campeatris NBRC 11547^T	TSB-YE	26
Staphylococcus aureus TISTR 118	TSB-YE	37
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	TSB-YE	26
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	NB	30

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism , Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

MRS = de Man, Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)

TSB-YE = Tryptic soy broth (Merck, Germany) + 0.6%Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)

NB = Nutrient broth (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องบดเนื้อรูบดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร
2) ตู้อบลมร้อน (Binder, USA)
3) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
4) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Germany)
5) ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model merk II, USA)
6) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Germany)
7) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Germany)
8) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama model HVE 50, Japan)
9) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
10) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
11) เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France)
12) ไมโครเวฟ (Toshiba)
13) เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น
14) ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
15) เครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA)
16) เครื่องวิเคราะห์ค่า Water activity (Novasina, Switzerland)
17) เครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler, Instron Model 1011)
18) เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunterlab Mini Scan EZ, USA)
19) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax, Germany)
20) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Ramon, Germany)
21) ถุงสุญญากาศชนิด K-Nylon/LLDPE

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Agar (Criterion, USA)
2) Baird-Parker agar (Merck, Germany)
3) Malt extract (Merck, Germany)
4) MRS broth (Merck, Germany)
5) Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)
6) Nutrient broth (Merck, Germany)
7) Yeast extract granulated (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) Potassium tellurite-hydrate (Merck, Germany)

9) Peptone from meat (Merck, Germany)

10) Calcium carbonate (Scharlau Chemie S.A., Spain)

11) Sodium Chloride (Ajax Finechem, Australia)

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

นำตัวอย่างอาหารหมักเนื้อชนิดต่างๆ ได้แก่แหนมจำนวน 5 ตัวอย่าง ไส้กรอกอีสาน จำนวน 5 ตัวอย่าง และอาหารเนื้อหมักของประเทศเวียตนามเรียกว่า เนมชัว (nem chua) จำนวน 5 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างดังกล่าว โดยการนำเอาตัวอย่างอาหารหมักแต่ละตัวอย่างน้ำหนัก 25 เจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเจือจาง 1: 10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 และ 1:1000000 จากนั้นนำไป spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก Itoi *et al.* 2008) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar (ดัดแปลงจาก Pilasombut. 2006) จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture โดยใส่กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร รวมกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับในการทำการศึกษาครั้งต่อไป

ทำการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn ที่ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบ (จากตารางที่ 3.1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกจากอาหารเนื้อหมัก เลี้ยงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6.5-7 จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall, U.S.A) แล้วดูดส่วนใสมาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่เตรียมไว้รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละความเจือจางลงไป ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใส ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.* 1995)

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.2.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.2.1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ (ดัดแปลงจาก Kandler *et al.* 1986)

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำมาทดสอบดังนี้

1) การตรวจการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ พอทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันทีจากนั้นหยดสารละลาย saflanin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ทดสอบคะตะเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ส่วนโคโลนีที่ไม่เกิดฟองจะให้ผลลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3) การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

4) ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 10, 30, 37, 42, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) ทดสอบความทนเกลือ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

6) ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดและด่าง

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1.2 การศึกษาทางชีวเคมี

ศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อ เขี่ยโคโลนีจำนวน 3-5 โคโลนีลงในหลอดอาหารของ API 50 CH medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบ โดยเรียงชุดทดสอบลงบนถาด ดูด API 50 CH medium ที่มีเชื้ออยู่ ใส่สารลงไปในชุดทดสอบทุกช่อง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและอย่าให้ปลายทิปสัมผัสกับขอบช่อง เมื่อดูดอาหารใส่ในช่องทุกช่องแล้ว ให้เททับด้วยน้ำมันพาราฟิน จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม api*web*™ stand alone V 1.2.1 (BioMerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ซึ่งเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นสีดำ แสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าอาหารเป็นสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าเป็นผลลบ หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมายคำถาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145147

1.2.1.3 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Carolissen-Mackay *et al.* (1997) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS หลอดใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเก็บซ้ำประมาณ 2-3 รอบ โดยสังเกตปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้ เติมสารละลาย A (TE buffer, 6.7% sucrose) 500 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform (1 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม isopopanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2) การตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

2.1) วิธีการเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจลน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ให้ครบ 200 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟจนกว่าอะกาโรสเจลจะละลาย จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัว ถอดซี่หวีออก จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2) การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วางแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแท่นรองในเครื่อง อิเล็กโตรโฟรีซิส เทสารผสม 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจล จากนั้นผสม gel loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับ ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมที่อยู่ด้านบนของอะกาโรสเจล และใช้ 1 Kb ladder ซึ่งเป็น marker เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นทำการรันเจลโดยใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ นาน 90 นาที ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ทำการวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้เครื่องถ่ายรูปเจล

3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG -3') และ REVB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Kanokratana *et al.* 2004) ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.5	1x
25 mM $MgCl_2$	2.0	2 mM
10 mM dNTP	1	400 µM
10 µM Primer BSF8/20	1	0.4 µM
10 µM Primer REVB	1	0.4 µM
5U/µl Taq DNA polymerase	0.25	0.05 µM
100 ng/µl DNA template	1	
น้ำกลั่น	16.25	
รวม	25	

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียม ดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบจะมีอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศา

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยา พีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิต พีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

4) การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในเจล (น้ำหนักห้ามเกิน 0.4 กรัม) ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ จากนั้นใส่บัฟเฟอร์ QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด เมื่อเห็นว่าสารละลายเป็นสีเหลือง ใส่ isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นให้เทใส่ลงในคอลัมน์ ระวังอย่าให้ล้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนล่างทิ้ง นำคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ พักคอลัมน์ให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 20 นาที ทำการ elute ดีเอ็นเอ โดยเติมบัฟเฟอร์ EB ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

5) การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 4) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิต พีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer [40 mM Tris-Hcl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mATP (pH 7.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)] พลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6) การเตรียมเชื้อ *E.coli* DH5α ให้เป็น competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 2001) จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์แล้วเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

7) การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock

ดัดแปลงตามวิธีของ Sambrook *et al.* (2001) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นดูดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ในข้อที่ 6) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารละลายไป spread บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (x-gal) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

8) การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, x-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T มีบริเวณยีน *lacZ* ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase โดยจะทำการย่อย x-gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA ที่บริเวณยีน *lacZ* จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้และได้ตะกอนสีขาวแทน

9) การสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep Spin Miniprep Kit

นำโคโลนีที่มีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มีการเขย่า (incubate shaker) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง รอให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วทำการ vortex จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมาเบาๆ 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบาๆ 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนเหลวด้านล่างหลอดทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง ทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที รอให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ ทำการ elute ดีเอ็นเอโดยการเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10-15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบ พลาสมิดที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

10) การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA

ทำการตรวจสอบชิ้น 16S rDNA ซึ่งถูกแทรกสู่พลาสมิดเวคเตอร์ด้วยการวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (vivantis) และ *BamHI* (vivantis) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกันโดยในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร พลาสมิดเวคเตอร์ที่แทรกด้วย 16S rDNA ที่ได้จากข้อ 9) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และปรับด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

11) วิเคราะห์หาลำดับเบส

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN

1.2.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

ทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ดัดแปลงจาก Pilasombut (2006) นำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินนของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml) ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

1.3.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทเอาเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ α-chymotrypsin, trypsin และ proteinase K แล้วปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 ทุกตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดให้กรองโดยใช้แผ่นกรองปลอดเชื้อ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่

1.3.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ

ทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง ดัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) โดยนำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่า pH เท่ากับ 6 โดยส่วนหนึ่งนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที และอีกส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ทดสอบความคงทนของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ ดัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินทุกวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella sp., E. coli* และ *S. aureus* แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติก ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

การทดลองที่ 2.2 นำข้อมูลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติกจากการทดลองที่ 2.1 ใช้ร่วมกับสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคของสารทดสอบ ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* ที่ระยะเวลาที่สารสัมผัสแบคทีเรีย ได้แก่ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารที่ระยะเวลาต่างๆ รายงานผลในค่า log cfu/ml

การทดลองที่ 3 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสูญญากาศ แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลก ติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสูญญากาศ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้

3.1.1 คุณสมบัติทางด้านกายภาพ

3.1.1.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

3.1.1.2 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

3.1.1.3 สี (CIE L*a*b*) ด้วยเครื่อง Hunterlab Mini Scan EZ

3.1.1.4 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัดแบบ Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA)

3.1.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี

3.1.2.1 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water activity measurement) ด้วยเครื่อง เครื่องตรวจวัดค่า A_w (Novasina, Switzerland)

3.1.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content) ด้วยเครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

3.1.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

3.1.3.2 จำนวนยีสต์และรา

3.1.4 วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏเนื้อสัมผัส (chewiness and hardness) กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน

ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน เมื่อแขวนไว้ที่อุณหภูมิห้องและเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C

3.6 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.6.1 การวิเคราะห์ด้านกายภาพ

3.6.1.1 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้หัวโพรบทิ่มลงบนตัวอย่างโดยตรง จากนั้นบันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.6.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด ดัดแปลงจาก Friedrich *et al.* (2001) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาแต่ส่วนใส หยดด้วยฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด นำไปไตเตรทด้วย 0.1 NaOH จนเป็นสีชมพูอ่อน โดยทดลองกลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณกรดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1000 \times \text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.3 การวัดค่าสี (CIE L*a*b*)

สุ่มตัวอย่างกลุ่มทดลองละ 3 ชิ้น มาวัดค่าสีด้วยระบบ CIE (L*a*b*) ชิ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี HunterLab Mini Scan EZ 4000L (Hunter Lab Inc., Reston, USA) เมื่อ L* คือ ค่าความสว่าง a* คือ ค่าสีแดง และ b* คือ ค่าสีเหลือง

3.6.1.5 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัด Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้น ขนาด 2 x 4 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

3.6.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี

3.6.2.1 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water activity measurement)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปริมาณ 3 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.6.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 3 กรัม วัดด้วยเครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA) จำนวน 3 ซ้ำ

3.6.3 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

3.6.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยวิธีการที่อ้างอิงจาก AOAC (2006) โดยนำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ (0.5%) ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้น spread ที่ผิวหน้าอาหารแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria เฉพาะจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.2 จำนวนยีสต์และรา

ตรวจวิเคราะห์หายีสต์ และรา โดยวิธีการที่อ้างอิงจาก AOAC (2005) โดยนำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Malt agar ที่เติมกรดแลกติก 80% ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำรอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 ° C เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนยีสต์ และรา รายงานผลจำนวนยีสต์ และรา เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.3 จำนวนเชื้อ *S. aureus*

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* โดยวิธีการที่อ้างอิงจาก BAM (2001) นำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird Parker ที่เติม Potassium tellurite 1% และไข่แดง ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้น spread ที่ผิวหน้าอาหารแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อ *S. aureus* รายงานผลจำนวนเชื้อ *S. aureus* เฉพาะจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของ *S. aureus* โดย Subculture เชื้อลงใน Brain heart infusion broth (BHI broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 0.30 มิลลิลิตร เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเชื้อในหลอดที่มี BHI broth และหลอดอาหาร TSA slant (สำหรับการทดสอบซ้ำ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ดูด Coagulase plasma ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อที่มี BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องมาจากเอนไซม์ Coagulase (Coagulase positive) ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น ซึ่งอาจจะมีลักษณะต่าง ๆ กัน สำหรับเชื้อที่ให้ Coagulase ไม่เท่ากัน

3.6.4 วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

โดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสตาม โดยทดสอบ 7 ลักษณะ ได้แก่ สี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว และลักษณะโดยรวม ประเมินโดยวิธี Consumer test โดยใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นกลุ่มนักศึกษา อาจารย์ และผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 30 คนขึ้นไป โดยมีช่วงการให้คะแนนความพึงพอใจ 7 ระดับ (7 – Point Hedonic Scale) ตั้งแต่ 1 – 7 ดังต่อไปนี้

1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด
2 หมายถึง ไม่ชอบมาก
3 หมายถึง ไม่ชอบ
4 หมายถึง เฉยๆ
5 หมายถึง ชอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6 หมายถึง ชอบมาก

7 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ยกเว้นการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มไม่สมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5 : SPSS Inc.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

จากการแยกเชื้อจากแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ ไส้กรอกอีสาน จำนวน 5 ตัวอย่าง แหนมจำนวน 5 ตัวอย่าง และแหนมจากประเทศเวียตนามเรียกว่า เนมชัว (Nem Chua) จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 250 ไอโซเลท พบว่า มี 1 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบหลายชนิด ตั้งชื่อว่า ไอโซเลท KL-1 โดยสามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้อาหารและเนื้อสัตว์เน่าเสียได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC14917^{T} (6400 AU/ml) , (12800 AU/ml), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^{T} (12800 AU/ml), , *Lactobacillus sakei* TISTR 890 (12800 AU/ml), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^{T} (1600 AU/ml) , *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR942 (400 AU/ml) , *Enterococcus faecalis* JCM5803^{T}(6400 AU/ml) และ *Enterococcus faecalis* TISTR888 (6400 AU/ml) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกและกรดอะซิติก (Franz *et al.* 1998) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงมีการปรับค่าความเป็นกรดและด่างของสารละลายใสปราศจากเซลล์ให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนนำมาทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) Tagg *et al.* (1976) รายงานว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีน ซึ่งมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา Ennahar *et al.* (1999) รายงานว่าการทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกัน ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 กิจกรรมสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากไอโซเลท KL-1

Indicator microorganism	Bacteriocin activity (AU/mL)
Lactobacillus plantarum ATCC14917^T	6400
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM1157^T	12800
Lactobacillus sakei TISTR 890	12800
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TISTR1344	0
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM6124^T	1600
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR942	400
Enterococcus faecalis JCM5803^T	6400
Enterococcus faecalis TISTR888	6400
Streptococcus sp. TISTR1030	0
Bacillus coagulans JCM2257^T	0
Bacillus coagulans TISTR1447	0
Listeria innocua ATCC33090^T	0
Brochotrix campeatris NBRC11547^T	0
Staphylococcus aureus TISTR118	0
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	0
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	0
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	0

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville;

JCM, Japan Collection of Micro-organisms, Wako, Japan;

NBRC, NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan; TISTR, *Thailand Institute of Scientific and Technological Research*

1.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินไอโซเลท KL-1

1.2.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.2.1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ

เมื่อนำไอโซเลท KL-1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไอโซเลท KL-1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นท่อนสั้น เชื้อไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 10- 42 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 9.6 เมื่อเปรียบเทียบกับ Bergey's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Manual (Kandler *et al.* 1986) พบว่า ไอโซเลท KL-1 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* spp. ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การจำแนกสายพันธ์ KL-1 โดยวิธีทางกายภาพ

Test		Results
Gram		+
Catalase		Negative
Morphology		Short rod
Growth temperature	10 °C	-
	30 °C	+
	37 °C	+
	42 °C	+
NaCl concentration	1 %	+
	2 %	+
	3 %	+
	4 %	+
	5 %	+
pH	4.5	+
	9.6	+

Remark : + growth, - not growth

1.2.1.2 การศึกษาทางชีวเคมี

จัดจำแนกชนิดของไอโซเลท KL-1 โดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล ใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux) พบว่าไอโซเลท KL-1 หมักน้ำตาลได้หลายชนิดได้แก่ glycerol, L-arabinose, D- ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-manose, D-manital, N-acetylglucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin ferric citrate, Salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-lactose, D-melibiose, D-saccharose (sucrose), D-trehalose, D-melezitose, D-raffinose, D-gentibiose and potassium gluconate เมื่ออ่านผลที่เกิดจากการหมักน้ำตาล 49 ชนิดและนำผลที่ได้ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสามารถจำแนกได้เป็น *Lactobacillus plantarum* ที่ระดับความเหมือน (% Identity) 95.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3 อย่างไรก็ตามต้องมีการยืนยันผลการจำแนกไอโซเลท KL-1 ด้วยวิธี 16S rDNA เนื่องจากว่า การจำแนกโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux) ยังเป็นข้อมูลที่ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกเชื้อ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาโดยวิธี 16S rDNA เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า เพราะสามารถทราบถึงระดับ interfamily และ interdivision ได้ (Pot *et al.* 1994)

ตารางที่ 4.3 การจำแนกสายพันธ์ KL-1 โดยวิธีทางชีวเคมี

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1. Control	-	-
2. Glycerol	+	+
3. Erythritol	-	-
4. D-arabinose	-	-
5. L-arabinose	+	+
6. D-ribose	+	+
7. D-xylose	-	-
8. L-xylose	-	-
9. D-adonitol	-	-
10. Methyl-βD-xylopyranoside	-	-
11. D-galactose	+	+
12. D-glucose	+	+
13.D-fructose	+	+
14. D-mannose	+	+
15. L-sorbose	-	-
16. L-rhamnose	-	?
17. Dulcitol	?	+
18. Inositol	-	-
19. D-mannitol	+	+
20. D-sorbitol	-	-
21. Methyl-αD-mannopyranoside	-	-
22. Methyl-αD-glucopyranoside	-	-
23. N-acetylglucosamine	+	+
24. Amygdalin	+	+

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
25. Arbutin	+	+
26. Esculin ferric citrate	+	+
27. Salicin	+	+
28. D-cellobiose	+	+
29. D-maltose	+	+
30. D-lactose(bovine origin)	+	+
31. D-melibiose	+	+
32. D-saccharose(sucrose)	+	+
33. D-trehalose	+	+
34. Inulin	-	-
35. D-melezitose	+	+
36. D-raffinose	+	+
37. Amidon (starch)	-	-
38. Glycogen	-	-
39. Xylitol	-	-
40. Gentiobiose	+	+
41. D-turanose	-	?
42. D-lyxose	-	-
43. D-tagatose	-	-
44. D-fucose	-	-
45. L-fucose	-	-
46. D-arabitol	-	-
47. L-arabitol	-	-
48. Potassium gluconate	+	+
49. Potassium 2-ketogluconate	-	-
50. Potassium 5-ketogluconate	-	-

Remark + fermented

- No fermented

? Non identified

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.1.3 การยืนยันผลการจำแนกไอโซเลท KL-1 โดยวิธี 16S rDNA

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการเปรียบเทียบความเหมือน เนื่องจากในแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตทั่วไปจะมีไรโบโซม เป็นองค์ประกอบ โดยไรโบโซมของแบคทีเรียหรือโพรคาริโอต จะมีขนาด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยใหญ่ 50S และหน่วยเล็ก 30S โดยในหน่วยใหญ่ 50S จะประกอบด้วย 23S rRNA ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 2,900 นิวคลีโอไทด์ และมี 5S rRNA ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ส่วนในหน่วยเล็ก 30S จะมี 16S rRNA ซึ่งจะมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) โดย rRNA จะทำหน้าที่ผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอ และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ เนื่องจากว่าเป็นลำดับเบสอนุรักษ์ ดังนั้นจึงนำ 16S rRNA มาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (Madigan and Martino. 2006)

จากนั้นนำผลที่ได้จากการโคลนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBI ในอินเตอร์เน็ต (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท KL-1 มีลำดับเบสความเหมือนกับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JDMI (sbjct) ถึง 99% (Accession No. CP001617.1) แสดงดังภาพที่ 4.1 ดังนั้นจึงกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Lactobacillus plantarum* KL-1 ผลสรุปการจำแนกชนิดเชื้อไอโซเลท KL-1 แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อไอโซเลท KL-1

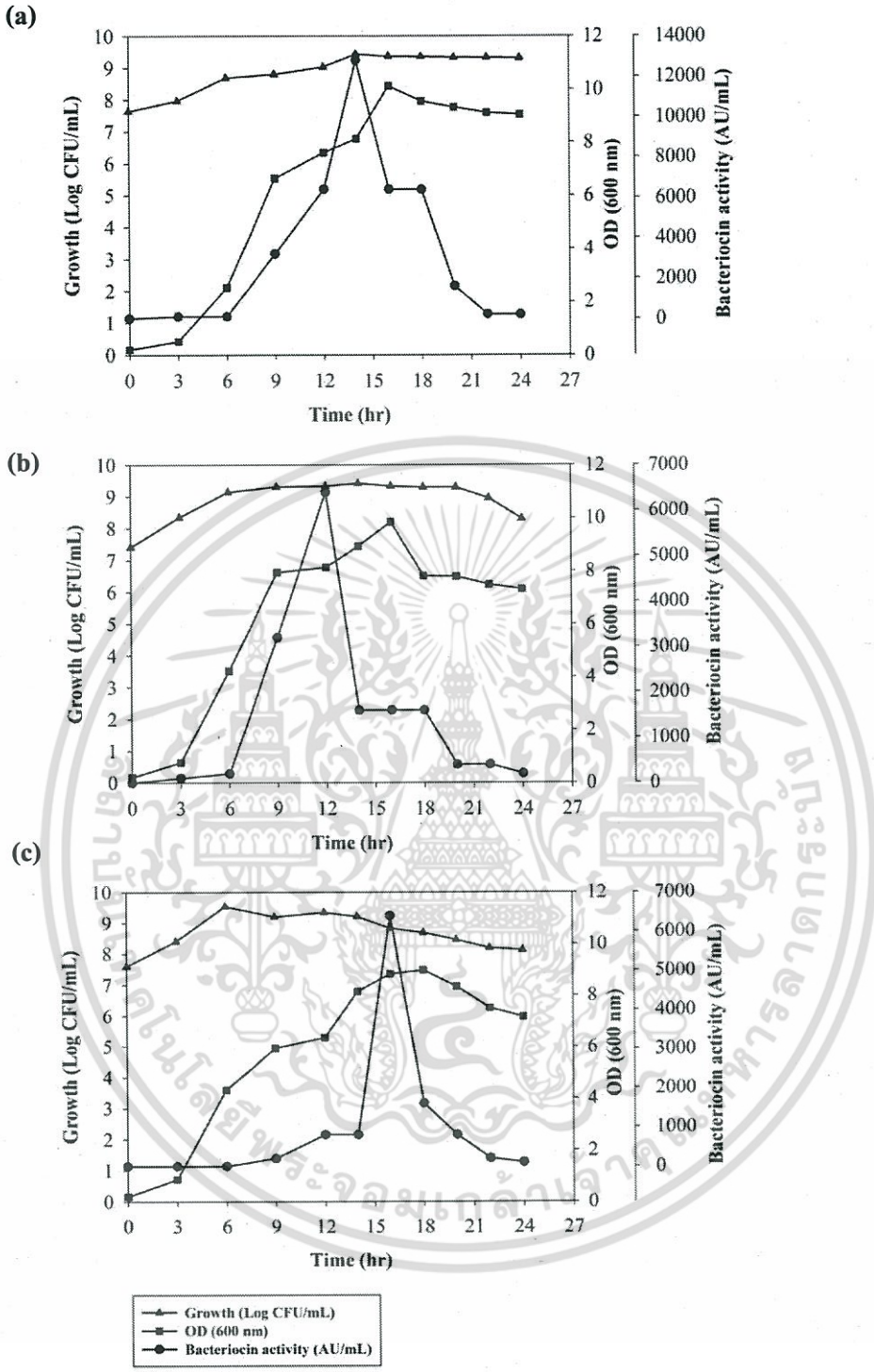
	Characteristic
Morphology	Short rod
Biochem identification	เมื่ออ่านผลที่เกิดจากการหมักน้ำตาล 49 ชนิดและนำผลที่ได้ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป95.1%
16s rDNA	*Lb.plantarum* 99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.1.4 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยไอโซเลท KL-1

เมื่อนำไอโซเลท KL-1 มาทดสอบการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส และหาระยะเวลาที่ไอโซเลท Sb2 สร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด ผลปรากฏว่า จำนวนเซลล์ที่วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง (OD ที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับจำนวนเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไอโซเลท KL-1 สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญ 14 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท KL-1 มีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6400 AU/ml แสดงดังภาพที่ 4.1 (a, b และ c) ซึ่งพบว่าระยะการเจริญที่ไอโซเลท KL-1 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้สูงสุดคือ เข้าสู่ระยะ Stationary phase อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลท KL-1 ที่อุณหภูมิ37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะ Stationary phase ได้เร็วกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheigh et al. (2002) ซึ่งรายงานว่าการสร้างสารแบคเทอริโอซินมีความสัมพันธ์กับระยะการเจริญของเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยอาจพบได้ในระยะกลางของช่วง exponential phase จนกระทั่งถึงช่วงปลายของระยะ exponential phase และระยะต้นของช่วง Stationary phase นอกจากนี้ Suma *et al.* (1998) รายงานว่าเชื้อ *L. plantarum* NCIM2084 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้สูงสุดเมื่อเชื้อเจริญในช่วงระยะปลาย exponential phase จนถึงระยะต้นของช่วง Stationary phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ระยะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อไอโซเลท KL-1 (a) 30 °C, (b) 37 °C และ (c) 42 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารแบคเทอริโอซิน

1.3.1 การทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากคุณสมบัติเบื้องต้นแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ดังนั้นจึงมักถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เมื่อทำการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโดย ไอโซเลท KL-1 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb.* sakei subsp. *sakei* JCM 1157^{T} โดยใช้เอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin และ proteinase K พบว่า *สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก*ไอโซเลท KL-1 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin และ proteinase K โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 0, 0 และ100 AU/ml ตามลำดับตามลำดับ โดยกิจกรรมการยับยั้งเชื้อของสารแบคเทอริโอซินที่ศึกษามีค่าเริ่มต้น 12800 AU/ml ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับร้อยละ 100, 100 และ 99.2 การศึกษานี้เป็นการยืนยันผลว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจากไอโซเลท KL-1 นั้นคือ สารแบคเทอริโอซิน เนื่องจากสารแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ดังนั้นจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Klaenhammer, 1988; Vaughan *et al.*, 2001) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลของเอนไซน์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}

Proteolytic enzyme	**Bacteriocin activity (AU/mL)**
Control pH 7	12800
Control pH 3 (without adjusted pH)	12800
Trypsin	0
α-chymotrypsin	0
Proteinase K	0
Pepsin	100

1.3.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูงและต่ำ

เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อไอโซเลท KL-1 ทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่า เมื่อให้ความร้อนที่เวลา 10 นาที ค่ากิจกรรมการยับยั้งยังคงที่ (12,800 AU/ml) และเมื่อให้ความร้อนผ่านไป 30 นาที ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงร้อยละ 50 (6,400 AU/ml) ส่วนการทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ผลปรากฏว่า สารแบคเทอริโอซินสามารถทนต่อความร้อนได้ แต่พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือเพียง 400 AU/ml เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ผลปรากฏว่า โดยในวันที่ 2 ค่ากิจกรรมการยับยั้งยังมีค่าคงที่ (12,800 AU/ml) และเมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 3 ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (6,400 AU/ml) และเมื่อทำการทดลองจนถึงวันที่ 5 ผล

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏว่า ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือเพียง 3,200 AU/ml และลดลงเหลือ 1600 AU/ml เมื่อเก็บแช่เย็นนาน 7 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 การทดสอบดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆ ในอนาคต ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารอาจผ่านกระบวนการความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อหรือเพื่อทำให้อาหารสุกที่อุณหภูมิแตกต่างกันไป นอกจากนี้การทดสอบระยะเวลาของสารแบคเทอริโอซินเมื่อเก็บแช่เย็นที่ระยะเวลาต่างๆ เนื่องจากในอุตสาหกรรมอาหารนั้นมักมีการเก็บรักษาอาหารที่ความเย็น ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งหากมีการนำสารแบคเทอริโอซินจากไอโซเลท KL-1 ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต

ตารางที่ 4.6 ผลของความร้อนและความเย็นต่อกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

Conditions	**Bacteriocin activity (AU/mL)**
Heat stability	
Control (100°C 5 min)	12800
100 °C 10 min	12800
100 °C 30 min	6400
100° °C 60 min	6400
121 °C 15 min	400
Chill stability (4 °C)	
Day 0	12800
1	12800
2	12800
3	6400
4	6400
5	3200
6	3200
7	1600
8	1600
9	1600
10	1600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

2.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

2.1.1 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซิน โดยสารแบคเทอริโอซินได้จากการนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเชื้อ *Lb. plantarum* ที่เจริญ 18-20 ชั่วโมง (crude bacteriocin) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 6-5-7 ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายใดๆ (0 %) คือกลุ่มควบคุมพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 2 log cfu/ml (จาก 6.13 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 เพิ่มเป็น 8.32 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30) กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1, 2 และ 3 % พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อช้ากว่ากลุ่มแรก ($p< 0.05$) กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4% สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อโดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อเมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง แต่กลับพบการลดลงของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 30 ชั่วโมง ($p<0.05$) (จาก 6.33 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือเป็น 5.58 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30) ส่วนการใช้สารแบคเทอริโอซิน (pH 6.9) พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *S.* Anatum แต่เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารแบบเดี่ยว ซึ่งการใช้สารละลายกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 1% และ 2%ร่วมกับ สารแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 2% มีแนวโน้มในการชะลอการเพิ่มจำนวนของเชื้อในชั่วโมงที่ 30 แต่ไม่แตกต่างกันในทางสถติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 3% และ 4% ร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Anatum ในชั่วโมงที่ 24 และ 30 ($p<0.05$) โดยพบจำนวนเชื้อจาก 6.35 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือเป็น 4.75 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4% ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ S. Anatum

Treatment	จำนวนเชื้อ *Salmonella* Anatum (log cfu/ml)						
	pH	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr
0 % lactic acid	7	6.13 ^{a,v}	7.42 ^{b,w}	7.45 ^{d,w}	8.32 ^{c,x}	8.43 ^{c,x}	8.32 ^{c,x}
1% lactic acid	6	6.16 ^{a,v}	7.33 ^{b,w}	7.38 ^{c,w}	7.68 ^{bc,w}	7.68 ^{b,w}	7.66 ^{b,w}
2% lactic acid	5.5	6.26 ^{ab,v}	7.32 ^{b,w}	7.38 ^{c,w}	7.36 ^{b,w}	7.33 ^{b,w}	7.30 ^{b,w}
3% lactic acid	5	6.28 ^{ac,v}	7.34 ^{b,z}	7.31 ^{b,z}	7.31 ^{b,z}	7.09 ^{b,w}	7.02 ^{b,w}
4% lactic acid	4.5	6.33 ^{c,w}	6.27 ^{a,vw}	6.20 ^{a,vw}	6.20 ^{a,vw}	5.70 ^{d,vw}	5.58 ^{a,v}
bacteriocin 2%	6.9	6.31 ^{a,v}	8.10 ^{c,w}	8.39 ^{c,w}	8.27 ^{c,w}	8.13 ^{c,w}	8.02 ^{d,w}
1% LA + 2% bacteriocin	5.7	6.32 ^{a,v}	7.40 ^{b,z}	7.24 ^{b,y}	7.16 ^{b,xy}	7.13 ^{b,x}	7.03 ^{c,w}
2% LA + 2% bacteriocin	5.3	6.36 ^{a,v}	7.38 ^{b,z}	7.27 ^{b,y}	7.13 ^{b,x}	7.08 ^{b,wx}	7.01 ^{c,w}
3% LA + 2% bacteriocin	4.8	6.33 ^{a,w}	7.29 ^{b,x}	7.19 ^{b,x}	7.12 ^{b,x}	7.06 ^{b,x}	5.56 ^{b,v}
4% LA + 2% bacteriocin	4.4	6.35 ^{a,z}	6.17 ^{a,y}	5.97 ^{a,x}	5.05 ^{a,w}	4.96 ^{a,w}	4.75 ^{a,v}

หมายเหตุ : a-d = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

v-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.1.2 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายใดๆ (0 %) คือกลุ่มควบคุมพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 2 log cfu/ml (จาก 6.25 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 เพิ่มเป็น 8.04 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30) ในทำนองเดียวกัน กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1% ไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *E. coli* ได้ กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อช้ากว่ากลุ่มแรก ($p< 0.05$) กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 3 และ 4% สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อโดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อเมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง แต่กลับพบการลดลงของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 30 ชั่วโมง ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (จาก 6.34 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือเป็น 5.62 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกเข้มข้น 4%) ส่วนการใช้สารแบคเทอริโอซิน (pH 6.9) พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *E. coli* แต่เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารแบบเดี่ยว ซึ่งการใช้สารละลายกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 1% และ 2%ร่วมกับ สารแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 2% มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวโน้มในการชะลอการเพิ่มจำนวนของเชื้อในชั่วโมงที่ 30 อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4% ร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ในชั่วโมงที่ 24 และ 30 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบจำนวนเชื้อจาก 6.30 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือเป็น 4.71 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4% ร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

Treatment	จำนวนเชื้อ *Escherichia coli* (log cfu/ml)						
	pH	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr
0 % lactic acid	7	6.25 ^{a,v}	7.62 ^{b,w}	8.17 ^{d,x}	8.17 ^{d,x}	8.12 ^{c,x}	8.04 ^{d,x}
1% lactic acid	6	6.31 ^{ab,v}	7.75 ^{b,w}	8.17 ^{d,x}	8.17 ^{d,x}	8.14 ^{c,wx}	8.02 ^{d,wx}
2% lactic acid	5.5	6.41 ^{c,v}	7.42 ^{b,z}	7.38 ^{c,z}	7.28 ^{c,y}	7.13 ^{b,x}	7.01 ^{c,w}
3% lactic acid	5	6.31 ^{ab,w}	7.33 ^{b,z}	7.23 ^{b,y}	7.12 ^{b,z}	7.06 ^{b,x}	5.89 ^{b,v}
4% lactic acid	4.5	6.34 ^{bc,z}	6.31 ^{a,z}	6.12 ^{a,y}	5.91 ^{a,x}	5.76 ^{a,w}	5.62 ^{a,v}
bacteriocin 2%	6.9	6.26 ^{a,u}	7.56 ^{b,v}	8.16 ^{d,w}	8.18 ^{c,x}	8.13 ^{d,w}	8.08 ^{d,w}
1% LA + 2% bacteriocin	5.7	6.27 ^{a,u}	8.29 ^{c,y}	8.26 ^{dx,y}	8.13 ^{c,xy}	8.06 ^{b,vw}	7.95 ^{d,v}
2% LA + 2% bacteriocin	5.3	6.33 ^{a,u}	7.42 ^{b,y}	7.32 ^{c,x}	7.18 ^{b,x}	7.08 ^{c,v}	7.02 ^{c,v}
3% LA + 2% bacteriocin	4.8	6.30 ^{a,w}	7.26 ^{b,y}	7.17 ^{b,xy}	7.06 ^{b,y}	5.86 ^{b,v}	5.72 ^{b,v}
4% LA + 2% bacteriocin	4.4	6.30 ^{a,z}	6.18 ^{a,y}	6.02 ^{a,x}	5.85 ^{a,w}	4.71 ^{a,v}	4.59 ^{a,u}

หมายเหตุ : a-d = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

u-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.1.3 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายใดๆ (0 %) คือกลุ่มควบคุมพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 2 log cfu/ml (จาก 6.33 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 เพิ่มเป็น 8.02 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30) ในทำนองเดียวกัน กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1% ไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้ กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อช้ากว่ากลุ่มแรก กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 3 และ 4% สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อโดยไม่พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อเมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง แต่กลับพบการลดลงของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 30 ชั่วโมง ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (จาก 6.28 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือเป็น 4.61 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกเข้มข้น 4%) ส่วนการใช้สารแบคเทอริโอซิน (pH 6.9) พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *S. aureus* แต่เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อใกล้เคียงกับสารละลายกรดแลกติก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

Treatment	จำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* (log cfu/ml)						
	pH	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr
0 % lactic acid	7	6.33 ^{a,u}	7.62 ^{b,v}	8.22 ^{d,w}	8.18 ^{d,w}	8.11 ^{d,w}	8.02 ^{d,vw}
1% lactic acid	6	6.32 ^{a,u}	8.27 ^{c,x}	8.20 ^{d,x}	8.11 ^{d,w}	8.07 ^{d,vw}	8.02 ^{d,v}
2% lactic acid	5.5	6.32 ^{a,u}	7.26 ^{b,v}	7.19 ^{c,v}	7.15 ^{c,v}	7.10 ^{c,v}	7.17 ^{c,v}
3% lactic acid	5	6.30 ^{a,z}	6.24 ^{a,y}	6.16 ^{b,x}	6.08 ^{b,w}	6.01 ^{b,v}	5.90 ^{b,v}
4% lactic acid	4.5	6.28 ^{a,y}	6.22 ^{a,y}	6.08 ^{a,x}	5.95 ^{a,w}	4.81 ^{a,v}	4.61 ^{a,v}
bacteriocin 2%	6.9	6.29 ^{a,u}	7.66 ^{b,v}	8.23 ^{c,w}	8.16 ^{c,x}	8.13 ^{d,w}	8.07 ^{d,vw}
1% LA + 2% bacteriocin	5.7	6.32 ^{ab,u}	8.29 ^{c,z}	8.23 ^{c,y}	8.12 ^{d,x}	8.05 ^{d,w}	8.01 ^{d,v}
2% LA + 2% bacteriocin	5.3	6.29 ^{a,u}	7.25 ^{b,y}	7.20 ^{b,x}	7.16 ^{c,x}	7.11 ^{c,w}	7.03 ^{c,v}
3% LA + 2% bacteriocin	4.8	6.38 ^{b,w}	7.26 ^{b,y}	7.16 ^{b,x}	5.96 ^{b,v}	5.88 ^{b,v}	4.71 ^{b,u}
4% LA + 2% bacteriocin	4.4	6.32 ^{ab,y}	6.23 ^{a,y}	6.05 ^{a,x}	5.92 ^{a,w}	4.72 ^{a,v}	4.56 ^{a,u}

หมายเหตุ : a-d = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

u-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.2 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

จากตารางที่ 4.10 จากการศึกษาสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 และ 4 % และสารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือ Crude bactericon ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ซึ่งสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้มาจากส่วนใสของเชื้อ *Lb. plaantarum* โดยไม่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีความเป็นกรด ผลการทดลองพบว่า สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4% สามารถยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. Anatum เมื่อระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยระยะเวลาที่ 0, 12 และ24 ชั่วโมง จำนวนเชื้อมีค่า 6.27, 6.15 และ 5.97 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 0 และ 2% พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ($P< 0.05$) เช่นเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า crude bacteriocin ความเข้มข้น 2% สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้เช่นกัน โดยระยะเวลาที่ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง จำนวนเชื้อมีค่า 6.26, 5.95 และ 5.33 log cfu/ml ตามลำดับ เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับ crude bacteriocin พบว่าจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anstum

Treatment	จำนวนเชื้อ *Salmonella* Anatum (log cfu/ml)			
	pH	0 hr	12 hr	24 hr
0 % lactic acid	7	$6.26^{b,y}$	$7.96^{c,z}$	$8.36^{c,z}$
2% lactic acid	6	$6.30^{b,y}$	$7.24^{b,y}$	$8.01^{c,z}$
4% lactic acid	5.5	$6.27^{b,y}$	$6.15^{b,y}$	$5.97^{b,y}$
Crude bacteriocin 2%	5.4	$6.26^{b,y}$	$5.95^{b,y}$	$5.33^{b,y}$
2% LA + 2% crude bacteriocin	4.3	$6.23^{b,y}$	$5.13^{b,y}$	$4.04^{a,x}$
4% LA + 2% crude bacteriocin	4	$6.21^{b,y}$	$4.90^{a,x}$	$3.76^{a,x}$

หมายเหตุ : a-c = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
x-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากตารางที่ 4.11 ผลการทดลองพบว่าสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2% ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อ *E. coli* ในกลุ่มที่ใช้กรดแลกติกความเข้มข้นที่ 0 (กลุ่มควบคุม) และ 2 % เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 4%, crude bacteriocin ความเข้มข้น 2% และการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับ crude bacteriocin สามารถยับยั้งและลดเชื้อ *E. coli* ($p<0.05$) โดยที่ระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ใช้ crude bacteriocin มีจำนวนเชื้อ 6.20, 6.28 และ 5.11 log cfu/ml ตามลำกับ กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติก (2%) ร่วมกับ crude bacteriocin (2%) มีจำนวนเชื้อ 6.24, 5.15 และ 4.05 log cfu/ml ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติก (4%) ร่วมกับ crude bacteriocin (4%) มีจำนวนเชื้อ 6.19, 5.03 และ 3.69 log cfu/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*

Treatment	จำนวนเชื้อ *Escherichia coli* (log cfu/ml)			
	pH	0 hr	12 hr	24 hr
0 % lactic acid	7	6.17 ^{a,x}	8.23 ^{c,z}	8.38 ^{c,z}
2% lactic acid	6	6.12 ^{a,x}	7.15 ^{b,y}	8.12 ^{c,z}
4% lactic acid	5.5	6.21 ^{a,x}	6.16 ^{a,x}	4.81 ^{b,x}
Crude bacteriocin 2%	5.4	6.20 ^{a,x}	6.28 ^{a,x}	5.11 ^{b,y}
2% LA + 2% crude bacteriocin	4.3	6.24 ^{a,x}	5.15 ^{b,y}	4.05 ^{b,x}
4% LA + 2% crude bacteriocin	4	6.19 ^{a,x}	5.03 ^{b,y}	3.69 ^{b,x}

หมายเหตุ : a-c = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

x-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาการใช้สารละลายกรดแลกติกและ crude bacteriocin ต่อจำนวนเชื้อ *S. aureus* แสดงในตารางที่ 4.12 ผลการทดลองให้ผลในทำนองเดียวกันกับการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum และ *E. coli* ซึ่งสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0 และ 2 % ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แต่ที่ความเข้มข้น 4% สามารถทำลายเชื้อเมื่อระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($p<0.05$) โดยที่ระยะเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อ 6.22, 6.13 และ 4.79 log cfu/ml นอกจากนี้ยังพบว่า crude bacteriocin สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และเมื่อใช้กรดแลกติกร่วมกับ crude bacteriocin พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อมากขึ้น โดยที่ระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อเป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ใช้ crude bacteriocin มีจำนวนเชื้อ 6.23, 6.93 และ 5.09 log cfu/ml ตามลำกับ กลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติก (2%) ร่วมกับ crude bacteriocin (2%) มีจำนวนเชื้อ 6.27, 5.17 และ 4.13 log cfu/ml ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติก (4%) ร่วมกับ crude bacteriocin (4%) มีจำนวนเชื้อ 6.21, 4.07 และ 3.63 log cfu/ml ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Crude bactericocin) จากเชื้อ *Lb. plantarum* กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

Treatment	จำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* (log cfu/ml)			
	pH	0 hr	12 hr	24 hr
0 % lactic acid	7	6.28 ^{a,x}	8.22 ^{c,z}	8.36 ^{c,z}
2% lactic acid	6	6.27 ^{a,x}	7.21 ^{a,y}	8.17 ^{c,z}
4% lactic acid	5.5	6.22 ^{a,y}	6.13 ^{a,y}	4.79 ^{b,x}
Crude bacteriocin 2%	5.4	6.23 ^{a,x}	6.93 ^{a,y}	5.09 ^{b,y}
2% LA + 2% crude bacteriocin	4.3	6.27 ^{a,x}	5.17 ^{b,y}	4.13 ^{b,x}
4% LA + 2% crude bacteriocin	4	6.21 ^{a,z}	4.07 ^{b,x}	3.63 ^{b,y}

หมายเหตุ : a-c = ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

x-z = ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

กรดแลคติคมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยกรดทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์บาดเจ็บและบางส่วนตายไป (Rosengren *et al.* 2013) ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงนั้นในช่วง Lag phase มีระยะเวลานานขึ้น ทำให้อัตราความเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ช้าลง (Woolthuis and Smulders. 1985) ผลของการยับยั้งจุลินทรีย์โดยกรดนั้นเกิดจากส่วนที่เป็น Lipophilic ของกรดที่ใช้ซึ่งอยู่ในรูปของโมเลกุลที่ไม่แตกตัวและซึมผ่านเข้าไปใน Plasma membrane ของแบคทีเรียที่มีค่าความเป็นกรดด่างค่อยข้างเป็นกลาง (pH 7) ซึ่งสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างของไซโทพลาสซึม ดังนั้นกรดอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเข้าไปก็จะเกิดสภาวะแตกตัวในรูปของ Protons และ conjugated base ซึ่งทำให้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จุลินทรีย์มีความเป็นกรด และมีผลในการทำลายระบบการขนส่งสาร (electron transport system)รวมถึงการยับยั้งระบบขนถ่ายสารต่างๆ (substrate molecule)เข้าสู่เซลล์ ทำให้มีผลต่อการทำลาย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Adam and Hall. 1988; Rosengren *et al.* 2013) การใช้กรดแลกติกในการลดจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ได้รับการยอมรับให้ใช้ได้ในระดับความเข้มข้น 1-2% ซึ่งอาจใช้ในขั้นตอนที่แตกต่างกันได้ในแต่ละโรงฆ่าและได้แนะนำให้ใช้บนซากสัตว์ภายหลังฆ่าให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนผิวซากไม่ให้เจริญและแทรกตัวลงไปในเนื้อเยื่อสัตว์ (Pipek *et al.*. 2004) นอกจากนี้ Wang *et al.* (2015) รายงานว่า สารกรดแลกติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Enteritidis, *E. coli* และ *L. monocytogenes* เนื่องจากกรดทำให้โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียเกิดการรั่วไหลและแตกตัว

ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพการล้างซากโดยการฉีดพ่นสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2% (v/v) บนซากไก่ก่อนกระบวนการเอาเครื่องในออก พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศ Aerobic plate count) ได้ถึง 1.6 log cfu/100 cm^2 และสามารถลดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobatteriaceae ได้ถึง 1 log cfu/100 cm^2 นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้มากถึงร้อยละ 35 (Bosilevae *et al.* 2006 อ้างโดยพรชัย เหลืองวารี. 2554) การลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์โดยการฉีดพ่นบนซากสัตว์ เช่นซากโค เป็นวิธีการที่ปฏิบัติทั่วไปในประเทศแถบอเมริกาเหนือ และในสหภาพยุโรปเองก็อนุญาตให้ใช้กรดแลกติกในโรงฆ่าสัตว์เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวมาแล้ว ซึ่งกรดแลกติกนอกจากจะมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *E. coli* แล้วยังสามารถทำลายเชื้อ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีคุณสมบัติทนต่อกรดมากกว่า *E. coli* สายพันธ์อื่นๆ อีกประการหนึ่งที่สำคัญคือ *E. coli* O157:H7 ที่มักพบบนเนื้อโคและเนื้อโคบดและเป็นเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญต่อผู้บริโภค (Youssef *et al.* 2013) ได้มีการศึกษาถึงผลของการใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % ฉีดล้างบนชิ้นเนื้อโค ต่อการลดลงของเชื้อ *E. coli* O157:H7 เปรียบเทียบกับเนื้อโคที่ไม่ผ่านการล้างด้วยกรด พบว่ากรดแลกติกที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157:H7 บนเนื้อโคลงได้ 1 log cfu/cm^2 (Carpenter *et al.* 2011)

จากการศึกษาผลของกรดแลกติกต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยมีการศึกษาการยับยั้งเชื้อดังกล่าวบนชิ้นเนื้อโคด้วยสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % ฉีดล้างบนชิ้นเนื้อโค ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 48 ชั่วโมง พบการลดลงของเชื้อ *L. monocytogenes* มากถึง 1.7 log cfu/cm^2 (El-Khateib *et al.* 1993) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาอื่นรายงานการใช้สารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2 % ฉีดล้างบนเนื้อไก่งวง และทำการตรวจเชื้อทันทีภายหลังการล้างด้วยกรด ผลการทดลองพบการลดลงของเชื้อเพียง 0.58 log cfu/cm^2 (Carperter *et al.* 2011)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าสารแบคเทอริโอซินไม่สารมารถยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus* ถึงแม้ว่าแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก (Lee *et al.* 1999) ลักษณะที่สำคัญของแบคเทอริโอซินคือมีการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียง ผลของการออกฤทธิ์ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งตาย (Tagg *et al.* 1976) หรือ อาจมีผลเพียงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย และในขณะเดียวกันแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจะมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากสารที่สร้างขึ้น (Hasting and Stiles. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ

3.1 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน

การศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินและกรดแลกติกเพื่อเพิ่มคุณภาพและความปลอดภัยของไส้กรอกอีสาน โดยการทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม (Con)

กลุ่มที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% (L2%)

กลุ่มที่ 3 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4% (L4%)

กลุ่มที่ 4 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2% (B2%)

กลุ่มที่ 5 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4% (B4%)

กลุ่มที่ 6 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% (L2%+B2%)

ระยะเวลาการหมัก 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน จากนั้นวิเคราะห์ คุณภาพทางกายภาพของไส้กรอกอีสาน ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง, เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด, ค่าสี, ค่า Texture Profile Analysis (TPA) คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่า water activity (A_w), เปอร์เซ็นต์ความชื้น คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria), ยีสต์และรา และ วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.1.1 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ

3.1.1.1 ผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติก ต่อค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณกรดในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสูญญากาศ

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 4.13) พบว่า การเติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกมีผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกระยะเวลาการหมัก ในวันแรกของการหมักไส้กรอกอีสานเติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินทุกกลุ่มมีค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่าชุดควบคุม (5.96) และลดลงตลอดระยะเวลาหมัก 4 วัน (pH 4.81) กลุ่มที่

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% กลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 2% และกลุ่มมีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ลงในไส้กรอกอีสาน พบ การลดลงของค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) อยู่ระหว่าง 5.45-4.57, 5.41-4.55 และ 5.19-4.65 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 4% กลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 4% ลงในไส้กรอกอีสาน พบการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างไม่แตกต่างกัน คืออยู่ระหว่าง 5.14-4.48 และ 5.13-4.49 แต่เมื่อครบวันที่ 4 ทุกกลุ่มมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่ากลุ่มทดลอง อยู่ระหว่าง 4.48-4.65 สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเปริมาณกรดทั้งหมด (ตารางที่ 4.14) พบว่า โดยกลุ่มควบคุมในวันที่ 0 มีค่าปริมาณกรด สูงสุด 0.69% จากนั้นทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก

ส่วนการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.15) พบว่า ให้ผลในทำนองเดียวกันกับค่าความเป็นกรดด่างในไส้กรอกอีสานที่หมักโดยการแขวน โดยการเติมสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติกมีผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกระยะเวลาการหมัก โดยในวันแรกของการหมักไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินทุกกลุ่มมีค่าความเป็นกรดด่าง น้อยกว่าชุดควบคุม (5.91) และลดลงตลอดระยะเวลาหมัก 4 วัน (pH 4.57) ในวันที่ 1 กลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% และกลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 2% ลงในไส้กรอกอีสาน พบ การลดลงของค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกัน (ไม่แตกต่าง) 5.32 และ 5.30 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 4% กลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 4% และ กลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ลงในไส้กรอกอีสาน พบการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) คือ 4.91, 4.90 และ 4.74 เมื่อสิ้นสุดการหมัก พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของกลุ่มควบคุมยังคงมีค่าสูงสุด (4.57) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด (ตารางที่ 4.16) ทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก

การลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานคือกรดแลกติก ที่มีเกิดจากจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียแลกติกที่ย่อยวัตถุดิบหลัก ได้แก่ ข้าว ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนเป็นไพรูเวตและกรดแลกติก โดยเอนไซม์ Lactate Dehydrogenase (De Vuyst and Vandamme. 1994) นอกจากนี้กระเทียมยังช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ติดมากับวัตถุดิบให้สร้างกรดมากขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง (ณัฐธิดา แปวกระโทก. 2554) สอดคล้องกับการทดลองของ กฤษณา ประภัสสรวัฒนา และคณะ (2552) พบว่าการหมักไส้กรอกเปรี้ยวมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 0, 1 และ 2 มีค่า 5.95, 4.93 และ 4.67 โดยการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรดด่างและการลดลงของเปอร์เซนต์กรด เนื่องจากเกิดการสร้างกรดจากแบคทีเรียแลคติก *Leuconostoc* และ *Streptococcus* ที่ปะปนมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติ (Steinkraus. 1992) ทำให้มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำลงประมาณ 4-4.5 ส่วน Lactobacillus และ Pediococcus บางสายพันธุ์ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงได้ถึง 3.5 ก่อนจะยับยั้งตัวเอง (Steinkraus .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1992) วัชรียา วงษ์หาญ และคณะ (2558) วัดค่าความเป็นกรดด่างของไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม พบว่ามีค่าลดลงจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 1 อย่างชัดเจน และลดลงอีกเล็กน้อยจากวันที่ 2 จนถึงวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 6.5, 5, 4.7, 4.6 และ 4.5 ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจาก 0.18, 0.4, 0.45, 0.5 และ 0.65 ตามลำดับ

จะเห็นว่าการเติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินซึ่งมีความเป็นกรดทำให้ไส้กรอกอีสานในวันที่ 0 มีค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่ากลุ่มควบคุม สัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุม ตลอดระยะเวลาการหมักทั้งไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ และไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2%, 4% แบคเทอริโอซิน 2%, 4% และกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

ตารางที่ 4.13 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความเป็นกรดด่างในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรดด่าง					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$5.96 \pm 0.03^{a,A}$	$5.45 \pm 0.01^{b,A}$	$5.14 \pm 0.02^{c,A}$	$5.41 \pm 0.00^{b,A}$	$5.13 \pm 0.03^{c,A}$	$5.19 \pm 0.15^{c,A}$
1	$5.75 \pm 0.13^{a,AB}$	$5.41 \pm 0.02^{b,B}$	$5.01 \pm 0.01^{c,B}$	$5.38 \pm 0.03^{b,A}$	$5.05 \pm 0.01^{c,B}$	$4.59 \pm 0.01^{d,B}$
2	$5.40 \pm 0.38^{a,BC}$	$5.00 \pm 0.01^{b,C}$	$4.91 \pm 0.01^{bc,C}$	$5.04 \pm 0.05^{b,B}$	$4.96 \pm 0.03^{b,C}$	$4.63 \pm 0.05^{c,B}$
3	$5.14 \pm 0.28^{a,CD}$	$4.64 \pm 0.02^{b,D}$	$4.53 \pm 0.05^{b,D}$	$4.64 \pm 0.03^{b,C}$	$4.54 \pm 0.01^{b,D}$	$4.70 \pm 0.04^{b,B}$
4	$4.81 \pm 0.20^{a,D}$	$4.57 \pm 0.02^{bc,E}$	$4.48 \pm 0.03^{c,E}$	$4.55 \pm 0.04^{bc,D}$	$4.49 \pm 0.01^{c,E}$	$4.65 \pm 0.04^{b,B}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณกรดทั้งหมดในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณกรดทั้งหมด					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$0.69 \pm 0.07^{a,C}$	$0.15 \pm 0.03^{c,D}$	$0.33 \pm 0.04^{bc,C}$	$0.19 \pm 0.01^{bc,E}$	$0.36 \pm 0.02^{b,C}$	$0.23 \pm 0.01^{bc,A}$
1	$1.02 \pm 0.07^{a,B}$	$0.26 \pm 0.02^{b,C}$	$0.42 \pm 0.01^{b,B}$	$0.25 \pm 0.01^{b,D}$	$0.43 \pm 0.03^{b,B}$	$0.29 \pm 0.02^{b,A}$
2	$0.99 \pm 0.08^{a,B}$	$0.44 \pm 0.02^{b,B}$	$0.43 \pm 0.01^{b,B}$	$0.43 \pm 0.02^{b,C}$	$0.45 \pm 0.03^{b,B}$	$0.36 \pm 0.01^{b,A}$
3	$1.22 \pm 0.05^{a,A}$	$0.57 \pm 0.02^{b,A}$	$0.62 \pm 0.02^{b,A}$	$0.55 \pm 0.02^{b,B}$	$0.61 \pm 0.02^{b,A}$	$0.50 \pm 0.02^{b,A}$
4	$1.31 \pm 0.12^{a,A}$	$0.59 \pm 0.01^{b,A}$	$0.64 \pm 0.02^{b,A}$	$0.58 \pm 0.02^{b,A}$	$0.63 \pm 0.03^{b,A}$	$0.56 \pm 0.05^{b,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

ตารางที่ 4.15 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความเป็นกรดด่างในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรดด่าง					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$5.91 \pm 0.01^{a,A}$	$5.43 \pm 0.02^{b,A}$	$5.12 \pm 0.02^{b,A}$	$5.43 \pm 0.02^{b,A}$	$5.12 \pm 0.02^{bc,A}$	$4.96 \pm 0.41^{c,A}$
1	$5.56 \pm 0.02^{a,B}$	$5.32 \pm 0.02^{b,B}$	$4.91 \pm 0.05^{c,B}$	$5.30 \pm 0.02^{b,B}$	$4.90 \pm 0.10^{c,B}$	$4.74 \pm 0.2^{c,A}$
2	$4.94 \pm 0.04^{a,C}$	$4.82 \pm 0.03^{ab,C}$	$4.77 \pm 0.05^{bc,C}$	$4.80 \pm 0.05^{bc,C}$	$4.70 \pm 0.11^{bc,C}$	$4.67 \pm 0.13^{c,A}$
3	$4.62 \pm 0.02^{a,D}$	$4.48 \pm 0.04^{bc,D}$	$4.42 \pm 0.02^{c,D}$	$4.46 \pm 0.05^{c,D}$	$4.41 \pm 0.02^{c,D}$	$4.55 \pm 0.10^{ab,A}$
4	$4.57 \pm 0.02^{a,E}$	$4.40 \pm 0.05^{b,E}$	$4.34 \pm 0.04^{b,D}$	$4.39 \pm 0.05^{b,E}$	$4.34 \pm 0.02^{b,D}$	$4.53 \pm 0.13^{b,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณกรดทั้งหมดในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณกรดทั้งหมด					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	B2%+L2%
0	$0.12 \pm 0.01^{d,E}$	$0.21 \pm 0.01^{c,E}$	$0.35 \pm 0.03^{b,D}$	$0.21 \pm 0.01^{c,E}$	$0.36 \pm 0.02^{b,C}$	$0.45 \pm 0.10^{a,B}$
1	$0.16 \pm 0.01^{d,D}$	$0.31 \pm 0.01^{c,D}$	$0.45 \pm 0.01^{b,C}$	$0.31 \pm 0.01^{c,D}$	$0.47 \pm 0.02^{b,B}$	$0.48 \pm 0.07^{a,B}$
2	$0.43 \pm 0.03^{c,C}$	$0.51 \pm 0.01^{b,C}$	$0.48 \pm 0.02^{bc,C}$	$0.52 \pm 0.02^{a,C}$	$0.49 \pm 0.02^{bc,B}$	$0.48 \pm 0.08^{b,AB}$
3	$0.48 \pm 0.01^{c,B}$	$0.63 \pm 0.02^{b,B}$	$0.68 \pm 0.02^{b,B}$	$0.62 \pm 0.01^{b,B}$	$0.70 \pm 0.00^{a,A}$	$0.51 \pm 0.13^{b,AB}$
4	$0.51 \pm 0.01^{c,A}$	$0.67 \pm 0.01^{b,A}$	$0.71 \pm 0.01^{a,A}$	$0.68 \pm 0.01^{b,A}$	$0.71 \pm 0.01^{a,A}$	$0.55 \pm 0.07^{c,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.1.1.2 ผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อค่าสีตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ

ผลการศึกษาค่าสีที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.17) พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ของกลุ่มควบคุมลดลงจากวันเริ่มต้น (45.74 เป็น 32.41) ส่วนกลุ่มอื่นมีค่าความสว่างมากกว่าตลอดระยะการหมักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกวันโดยกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 4% มีค่าความสว่างสูงที่สุด (L* = 60.42) ในวันที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 4% และกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับ แบคเทอริโอซิน 2% มีค่าความสว่างค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน ค่าสีแดง (a*) พบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีค่าเพิ่มขึ้นทุกวัน ส่วน กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2, 44% และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 2, 4% ค่าสีแดงลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ค่าสีเหลือง (b*) พบว่าทุกกลุ่มมีค่าสีเหลืองลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยวันที่ 4 กลุ่มควบคุมมีค่าสีเหลืองสูงที่สุดเท่ากับ 13.88

ส่วนการศึกษาค่าสีที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.18) พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ของทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มต้น แต่กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ค่าความสว่างค่อนข้างคงที่ตลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาการหมัก สำหรับค่าสีแดง (a*) พบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% มีค่าสีแดงลดลง ส่วนกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 4% กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 2, 4 % กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ค่าสีแดงค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ค่าสีเหลือง (b*) พบว่าทุกกลุ่มมีค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยวันที่ 4 กลุ่มควบคุมมีค่าสีเหลืองต่ำที่สุดเท่ากับ 6.54 สอดคล้องกับการทดลองของชนัญญา กงทะสร (2547) ศึกษาผลของสารละลายกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซินต่อค่าความสว่าง(L*) ของสันนอกเนื้อสุกรโดยจุ่มชิ้นเนื้อในสารละลายกรดแลกติก 1% และสารละลายกรดแลกติก 1% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 640 และ 1280 AU/ml แล้วนำเนื้อสันนอกไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ค่าความสว่างของสีเนื้อจะเพิ่มสูงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินสูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากการใช้กรดแลกติกและ แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์เป็นกรด ค่า pH ของเนื้อที่ต่ำกว่ามีผลทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลง ที่ผิวเนื้อมีน้ำซึมออกมามาก เป็นผลทำให้ค่าความสว่างของสีเนื้อสูงขึ้น (Bayles et al. 1996) Phromraksa et al. (2005) พบว่า ค่าความสว่างของไส้กรอกอีสานมีค่าลดลง ส่วนค่าสีแดงและ ค่าสีเหลืองค่อนข้างคงที่

การเติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกมีผลทำให้ค่าความสว่าง (L*) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทุกระยะเวลาการหมัก และยังพบการลดลงของค่าสีเหลืองในกลุ่มที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทุกระยะเวลาการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าสีในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)

ค่าสี	ระยะเวลา (วัน)	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	B2%+L2%
ความสว่าง(L*)	0	$45.74 \pm 0.16^{e,A}$	$46.49 \pm 0.31^{d,E}$	$47.11 \pm 0.01^{e,E}$	$48.61 \pm 0.14^{b,A}$	$45.11 \pm 0.11^{f,A}$	$56.51 \pm 0.73^{a,A}$
	1	$41.57 \pm 0.03^{d,B}$	$48.15 \pm 0.13^{bc,D}$	$50.28 \pm 0.42^{b,D}$	$47.78 \pm 0.13^{bc,AB}$	$44.95 \pm 0.17^{cd,A}$	$56.37 \pm 4.63^{a,A}$
	2	$41.48 \pm 0.11^{d,B}$	$51.93 \pm 0.05^{b,C}$	$52.60 \pm 0.60^{b,C}$	$46.93 \pm 0.05^{c,BC}$	$49.60 \pm 4.61^{bc,A}$	$57.80 \pm 1.44^{a,A}$
	3	$40.60 \pm 0.08^{c,C}$	$56.84 \pm 0.05^{a,B}$	$58.10 \pm 0.01^{a,B}$	$46.84 \pm 0.05^{b,BC}$	$49.50 \pm 4.18^{b,A}$	$54.48 \pm 1.25^{a,A}$
	4	$32.41 \pm 0.15^{d,D}$	$59.76 \pm 0.11^{a,A}$	$60.42 \pm 0.58^{a,A}$	$46.10 \pm 1.59^{c,C}$	$50.03 \pm 5.21^{c,A}$	$55.36 \pm 0.97^{b,A}$
ค่าสีแดง (a*)	0	$4.55 \pm 0.04^{b,E}$	$5.41 \pm 0.06^{a,A}$	$4.50 \pm 0.07^{b,A}$	$5.49 \pm 0.15^{a,A}$	$5.59 \pm 0.21^{a,A}$	$3.34 \pm 0.66^{c,B}$
	1	$5.43 \pm 0.02^{a,D}$	$5.55 \pm 0.36^{a,A}$	$4.28 \pm 0.02^{b,AB}$	$4.30 \pm 0.33^{b,B}$	$4.46 \pm 0.34^{b,B}$	$5.57 \pm 0.77^{a,AB}$
	2	$6.66 \pm 0.03^{a,C}$	$4.38 \pm 0.16^{b,B}$	$2.75 \pm 1.21^{c,AB}$	$3.96 \pm 0.12^{bc,BC}$	$4.33 \pm 0.19^{b,BC}$	$5.00 \pm 1.55^{b,AB}$
	3	$8.20 \pm 0.04^{a,B}$	$4.09 \pm 0.09^{c,B}$	$2.58 \pm 0.12^{a,AB}$	$3.71 \pm 0.16^{c,C}$	$3.96 \pm 0.06^{c,C}$	$5.70 \pm 1.44^{b,AB}$
	4	$9.73 \pm 0.05^{a,A}$	$3.60 \pm 0.08^{c,C}$	$2.48 \pm 1.39^{c,B}$	$3.27 \pm 0.18^{c,D}$	$3.48 \pm 0.08^{c,D}$	$7.02 \pm 1.99^{b,A}$
ค่าสีเหลือง (b*)	0	$16.05 \pm 0.06^{a,A}$	$12.11 \pm 0.01^{c,A}$	$14.14 \pm 0.05^{b,A}$	$12.11 \pm 0.01^{e,A}$	$13.42 \pm 0.11^{c,A}$	$13.20 \pm 0.18^{d,A}$
	1	$15.37 \pm 0.10^{a,A}$	$9.47 \pm 0.06^{e,B}$	$12.38 \pm 0.23^{b,B}$	$9.06 \pm 0.16^{f,B}$	$11.32 \pm 0.06^{c,B}$	$10.68 \pm 0.14^{b,B}$
	2	$16.03 \pm 0.05^{a,A}$	$9.10 \pm 0.02^{e,C}$	$10.31 \pm 0.14^{b,C}$	$8.73 \pm 0.20^{a,C}$	$9.21 \pm 0.18^{e,C}$	$8.56 \pm 0.37^{d,C}$
	3	$16.63 \pm 0.36^{a,A}$	$8.68 \pm 0.16^{bc,CD}$	$9.26 \pm 0.15^{b,D}$	$8.08 \pm 0.06^{bc,D}$	$8.35 \pm 0.21^{bc,D}$	$7.58 \pm 0.14^{c,D}$
	4	$13.88 \pm 0.02^{a,B}$	$8.13 \pm 0.08^{e,E}$	$8.70 \pm 0.16^{b,E}$	$7.69 \pm 0.14^{e,E}$	$7.95 \pm 0.52^{e,D}$	$6.60 \pm 0.31^{d,E}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าสีในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการ บรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

ค่าสี	ระยะเวลา (วัน)	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	B2%+L2%
ความสว่าง(L*)	0	$48.50 \pm 0.12^{b,D}$	$47.38 \pm 0.13^{b,E}$	$48.54 \pm 0.04^{b,E}$	$46.38 \pm 0.13^{b,E}$	$47.54 \pm 0.04^{b,E}$	$54.02 \pm 4.74^{a,B}$
	1	$48.51 \pm 0.27^{d,D}$	$51.35 \pm 0.09^{c,D}$	$54.48 \pm 0.02^{b,D}$	$49.35 \pm 0.09^{d,D}$	$51.48 \pm 0.02^{c,D}$	$56.34 \pm 1.72^{a,AB}$
	2	$57.23 \pm 0.04^{ab,C}$	$53.67 \pm 0.01^{cd,C}$	$55.95 \pm 0.06^{b,C}$	$52.34 \pm 0.59^{d,C}$	$53.95 \pm 0.06^{c,C}$	$58.00 \pm 1.79^{a,AB}$
	3	$58.06 \pm 0.03^{b,B}$	$58.70 \pm 0.54^{ab,B}$	$59.43 \pm 0.31^{a,B}$	$57.63 \pm 0.59^{b,B}$	$58.76 \pm 0.38^{ab,B}$	$57.59 \pm 1.47^{b,AB}$
	4	$58.63 \pm 0.24^{c,A}$	$61.19 \pm 0.03^{ab,A}$	$62.22 \pm 0.02^{a,A}$	$60.19 \pm 0.03^{bc,A}$	$61.24 \pm 0.03^{ab,A}$	$59.85 \pm 2.05^{bc,A}$
ค่าสีแดง (a*)	0	$5.89 \pm 0.04^{bc,A}$	$6.09 \pm 0.04^{bc,A}$	$5.86 \pm 0.05^{c,A}$	$6.41 \pm 0.02^{a,A}$	$6.12 \pm 0.08^{b,A}$	$5.57 \pm 0.29^{d,A}$
	1	$5.70 \pm 0.19^{a,B}$	$4.09 \pm 0.01^{bc,B}$	$3.20 \pm 0.03^{c,BC}$	$3.69 \pm 0.39^{c,B}$	$3.61 \pm 0.02^{c,B}$	$5.10 \pm 1.67^{ab,A}$
	2	$4.30 \pm 0.02^{ab,C}$	$3.88 \pm 0.06^{bc,C}$	$3.39 \pm 0.27^{c,B}$	$3.70 \pm 0.05^{bc,B}$	$3.59 \pm 0.03^{bc,B}$	$4.76 \pm 1.05^{a,A}$
	3	$3.40 \pm 0.01^{b,D}$	$3.92 \pm 0.02^{ab,C}$	$3.05 \pm 0.05^{b,C}$	$3.59 \pm 0.03^{ab,B}$	$3.38 \pm 0.05^{b,C}$	$4.62 \pm 1.39^{a,A}$
	4	$3.25 \pm 0.08^{b,D}$	$3.29 \pm 0.05^{b,D}$	$3.42 \pm 0.03^{b,B}$	$3.19 \pm 0.02^{b,C}$	$3.33 \pm 0.02^{b,C}$	$5.16 \pm 1.54^{a,A}$
ค่าสีเหลือง (b*)	0	$11.91 \pm 0.28^{b,A}$	$12.17 \pm 0.06^{ab,A}$	$12.41 \pm 0.02^{a,A}$	$12.37 \pm 0.07^{a,A}$	$12.33 \pm 0.15^{a,A}$	$8.38 \pm 0.38^{c,B}$
	1	$11.41 \pm 0.17^{a,B}$	$9.78 \pm 0.03^{c,B}$	$10.37 \pm 0.06^{b,C}$	$9.56 \pm 0.02^{cd,C}$	$9.52 \pm 0.11^{cd,C}$	$9.42 \pm 0.31^{d,AB}$
	2	$7.79 \pm 0.10^{d,C}$	$9.25 \pm 0.08^{c,C}$	$11.29 \pm 0.88^{a,B}$	$9.25 \pm 0.08^{c,D}$	$10.31 \pm 0.11^{b,B}$	$9.00 \pm 0.62^{c,AB}$
	3	$6.64 \pm 0.14^{d,D}$	$9.07 \pm 0.03^{b,D}$	$9.65 \pm 0.05^{a,C}$	$9.75 \pm 0.03^{a,B}$	$8.49 \pm 0.11^{c,D}$	$8.38 \pm 0.38^{c,B}$
	4	$6.54 \pm 0.22^{e,D}$	$8.75 \pm 0.11^{b,E}$	$9.82 \pm 0.02^{a,C}$	$9.84 \pm 0.04^{a,B}$	$8.26 \pm 0.15^{b,E}$	$9.99 \pm 0.88^{a,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.1.1.3 ผลของสารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติก ต่อค่าTexture Profile Analysis (TPA) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ

ผลการศึกษาค่า TPA ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.19) พบว่า ค่าความแข็ง (Hardness) และค่าความเหนียวเป็นกาวหรือยาง (Gumminess) ของไส้กรอกอีสานทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่ม โดยกลุ่มควบคุมมีค่าความแข็งและค่าความเหนียวสูงที่สุด เท่ากับ 20.08 และ 6.99 เมื่อครบวันที่ 4 ส่วนค่าความยืดหยุ่น (Springiness) ค่าความสามารถในการเกาะตัวกัน (Cohesiveness) และค่าการเคี้ยว (Chewiness) ของไส้กรอกอีสานทุกกลุ่มมีค่าลดลงตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่ม โดยค่าความยืดหยุ่นเมื่อสิ้นสุดระยะการหมักจะไม่มีค่าแตกต่าง ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่ม ค่าความสามารถในการเกาะตัวกัน พบว่ากลุ่มควบคุมมีความสามารถในการเกาะตัวกันดีกว่าทุกกลุ่ม เท่ากับ 0.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาค่า TPA ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.20) พบว่า ค่าความแข็ง (Hardness) และค่าความเหนียวเป็นกาวหรือยาง (Gumminess) ของไส้กรอกอีสานทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่ม โดยกลุ่มควบคุมมีค่าความแข็ง สูงที่สุด เท่ากับ 20.38 กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% มีค่าความเหนียวสูงสุดเท่ากับ 7.28 เมื่อครบวันที่ 4 ส่วนค่าความยืดหยุ่น (Springiness) ค่าความสามารถในการเกาะตัวกัน (Cohesiveness) และค่าการเคี้ยว (Chewiness) ของไส้กรอกอีสานทุกกลุ่มมีค่าลดลงตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า Texture Profile Analysis (TPA) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิห้อง

TPA	เวลา(วัน)	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
Hardness (N)	0	$2.04 \pm 0.07^{b,E}$	$1.51 \pm 0.48^{bc,E}$	2.91 ± 0.08^{aE}	$1.39 \pm 0.22^{c,E}$	$1.52 \pm 0.16^{bc,E}$	$1.46 \pm 0.07^{c,D}$
	1	$2.82 \pm 0.07^{b,D}$	$2.07 \pm 0.13^{d,D}$	$3.52 \pm 0.09^{a,D}$	$2.43 \pm 0.16^{c,D}$	$3.06 \pm 0.36^{d,D}$	$2.28 \pm 0.34^{d,D}$
	2	$7.09 \pm 0.02^{c,C}$	$8.32 \pm 0.03^{bc,C}$	$11.48 \pm 0.03^{bc,C}$	$6.78 \pm 0.74^{c,C}$	$7.91 \pm 1.09^{bc,C}$	$9.97 \pm 2.87^{b,C}$
	3	$12.79 \pm 0.03^{ab,B}$	$12.09 \pm 0.06^{b,B}$	$13.40 \pm 0.03^{a,B}$	$12.70 \pm 0.45^{ab,B}$	$14.34 \pm 0.26^{b,B}$	$12.65 \pm 1.10^{ab,B}$
	4	$20.08 \pm 0.06^{b,A}$	$18.44 \pm 0.13^{c,A}$	$19.20 \pm 0.03^{b,A}$	$19.77 \pm 0.49^{b,A}$	$19.34 \pm 0.27^{c,A}$	$18.90 \pm 0.79^{c,A}$
Springiness	0	$0.65 \pm 0.04^{c,A}$	$0.75 \pm 0.01^{a,A}$	$0.72 \pm 0.01^{ab,A}$	$0.76 \pm 0.02^{a,A}$	$0.62 \pm 0.08^{c,A}$	$0.70 \pm 0.03^{bc,A}$
(ratio)	1	$0.52 \pm 0.03^{c,B}$	$0.66 \pm 0.01^{a,B}$	$0.61 \pm 0.01^{b,B}$	$0.64 \pm 0.04^{ab,B}$	$0.53 \pm 0.01^{c,B}$	$0.60 \pm 0.03^{b,A}$
	2	0.38 ± 0.02^{bC}	$0.43 \pm 0.03^{ab,C}$	$0.46 \pm 0.02^{a,C}$	$0.43 \pm 0.02^{ab,C}$	$0.41 \pm 0.05^{ab,C}$	0.39 ± 0.01^{bAB}
	3	$0.31 \pm 0.01^{b,D}$	$0.37 \pm 0.02^{a,D}$	$0.35 \pm 0.01^{ab,D}$	$0.37 \pm 0.02^{a,D}$	$0.35 \pm 0.03^{ab,C}$D	$0.38 \pm 0.04^{a,A}$
	4	$0.27 \pm 0.03^{a,E}$	$0.34 \pm 0.02^{a,D}$	$0.31 \pm 0.02^{a,E}$	$0.28 \pm 0.04^{a,E}$	$0.27 \pm 0.04^{a,D}$	$0.41 \pm 0.18^{a,B}$
Cohesiveness	0	$0.45 \pm 0.04^{b,A}$	$0.46 \pm 0.02^{b,A}$	$0.51 \pm 0.01^{ab,A}$	$0.45 \pm 0.04^{b,A}$	$0.56 \pm 0.08^{a,A}$	$0.55 \pm 0.04^{a,A}$
(ratio)	1	$0.42 \pm 0.04^{b,AB}$	$0.42 \pm 0.02^{b,A}$	$0.47 \pm 0.02^{ab,B}$	$0.42 \pm 0.02^{b,AB}$	$0.46 \pm 0.01^{ab,A}$	$0.51 \pm 0.05^{a,A}$
	2	$0.39 \pm 0.03^{a,AB}$	$0.40 \pm 0.01^{ab,b}$	$0.43 \pm 0.02^{ab,C}$	$0.38 \pm 0.03^{b,BC}$	$0.51 \pm 0.12^{a,A}$	$0.41 \pm 0.07^{ab,B}$
	3	$0.37 \pm 0.02^{a,BC}$	$0.32 \pm 0.03^{ab,C}$	$0.29 \pm 0.03^{b,D}$	$0.33 \pm 0.03^{ab,CD}$	$0.32 \pm 0.04^{b,B}$	$0.32 \pm 0.03^{b,C}$
	4	$0.33 \pm 0.02^{a,C}$	$0.31 \pm 0.01^{ab,C}$	$0.27 \pm 0.02^{c,D}$	$0.30 \pm 0.01^{ab,D}$	$0.27 \pm 0.02^{c,B}$	$0.30 \pm 0.02^{bc,C}$
Chewiness (N)	0	$0.84 \pm 0.14^{a,B}$	$0.70 \pm 0.04^{ab,D}$	$0.55 \pm 0.18^{b,C}$	$0.72 \pm 0.04^{ab,C}$	$0.70 \pm 0.12^{ab,B}$	$0.53 \pm 0.03^{b,E}$
	1	$0.76 \pm 0.12^{b,B}$	$0.82 \pm 0.02^{ab,D}$	$0.58 \pm 0.01^{c,C}$	$0.87 \pm 0.03^{a,C}$	$0.59 \pm 0.03^{c,B}$	$0.57 \pm 0.02^{c,D}$
	2	$1.72 \pm 0.22^{a,A}$	$1.23 \pm 0.12^{bc,C}$	$1.44 \pm 0.13^{b,A}$	$1.11 \pm 0.18^{c,C}$	$1.36 \pm 0.06^{bc,AB}$	$1.45 \pm 0.01^{b,B}$
	3	$1.57 \pm 0.12^{a,A}$	$1.52 \pm 0.16^{a,B}$	$1.20 \pm 0.11^{a,B}$	$1.66 \pm 0.30^{a,B}$	$1.94 \pm 1.23^{a,A}$	$1.23 \pm 0.03^{a,C}$
	4	$1.87 \pm 0.27^{bc,A}$	$2.12 \pm 0.19^{ab,A}$	$1.54 \pm 0.15^{c,A}$	$2.35 \pm 0.33^{a,A}$	$1.93 \pm 0.34^{abc,A}$	$1.52 \pm 0.02^{c,A}$
Gumminess (N)	0	$1.30 \pm 0.14^{a,D}$	$0.94 \pm 0.05^{b,D}$	$0.77 \pm 0.24^{b,C}$	$0.94 \pm 0.09^{b,E}$	$0.95 \pm 0.01^{b,E}$	$0.87 \pm 0.20^{b,B}$
	1	$1.48 \pm 0.18^{a,D}$	$1.25 \pm 0.04^{a,D}$	$0.96 \pm 0.03^{a,C}$	$1.40 \pm 0.21^{a,D}$	$1.45 \pm 0.16^{a,D}$	$2.04 \pm 1.87^{a,B}$
	2	$4.48 \pm 0.34^{a,C}$	$2.83 \pm 0.07^{c,C}$	$3.57 \pm 0.18^{b,B}$	$2.57 \pm 0.18^{c,C}$	$3.48 \pm 0.08^{b,C}$	$3.77 \pm 0.37^{b,A}$
	3	$5.00 \pm 0.22^{a,B}$	$4.13 \pm 0.33^{b,B}$	$3.46 \pm 0.30^{c,B}$	$4.18 \pm 0.31^{b,B}$	$4.27 \pm 0.08^{b,B}$	$4.09 \pm 0.58^{b,A}$
	4	$6.99 \pm 0.36^{a,A}$	$6.29 \pm 0.22^{b,A}$	$4.92 \pm 0.42^{c,A}$	$6.30 \pm 0.12^{b,A}$	$5.21 \pm 0.13^{c,A}$	$5.07 \pm 0.20^{c,A}$

ตารางที่ 4.20 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า Texture Profile Analysis (TPAในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยบรรจุถุงสูญญากาศ

TPA	เวลา (วัน)	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	B2%+L2%
Hardness (N)	0	$3.11 \pm 0.03^{ab,D}$	$1.89 \pm 0.10^{b,D}$	$1.08 \pm 0.04^{b,D}$	$2.83 \pm 0.03^{ab,E}$	$1.02 \pm 0.02^{b,E}$	$4.98 \pm 3.43^{a,C}$
	1	$3.17 \pm 0.04^{ab,D}$	$2.16 \pm 0.19^{b,D}$	$1.16 \pm 0.03^{b,D}$	$2.53 \pm 0.05^{b,D}$	$1.42 \pm 0.03^{b,D}$	$5.05 \pm 3.15^{a,C}$
	2	$11.15 \pm 0.08^{a,C}$	$5.71 \pm 0.17^{e,C}$	$6.72 \pm 0.05^{d,C}$	$6.70 \pm 0.10^{d,C}$	$7.68 \pm 0.08^{c,C}$	$8.00 \pm 0.29^{b,C}$
	3	$12.64 \pm 0.22^{ab,B}$	$11.54 \pm 0.35^{b,B}$	$10.32 \pm 0.28^{c,B}$	$12.28 \pm 0.11^{ab,B}$	$11.70 \pm 0.18^{b,B}$	$13.43 \pm 1.51^{a,B}$
	4	$20.38 \pm 0.27^{a,A}$	$11.51 \pm 0.26^{c,A}$	$14.51 \pm 0.18^{d,A}$	$19.86 \pm 0.04^{a,A}$	$17.56 \pm 0.09^{b,A}$	$18.13 \pm 0.89^{b,A}$
Springiness (ratio)	0	$0.72 \pm 0.02^{ab,A}$	$0.70 \pm 0.02^{abc,A}$	$0.62 \pm 0.02^{c,A}$	$0.77 \pm 0.02^{a,A}$	$0.78 \pm 0.03^{a,A}$	$0.66 \pm 0.11^{bc,A}$
	1	$0.55 \pm 0.03^{b,B}$	$0.44 \pm 0.04^{c,B}$	$0.40 \pm 0.01^{c,C}$	$0.62 \pm 0.03^{a,B}$	$0.65 \pm 0.05^{a,B}$	$0.65 \pm 0.06^{a,A}$
	2	$0.42 \pm 0.04^{bc,C}$	$0.37 \pm 0.03^{c,C}$	$0.52 \pm 0.03^{a,B}$	$0.45 \pm 0.04^{abc,C}$	$0.48 \pm 0.03^{ab,C}$	$0.43 \pm 0.07^{bc,B}$
	3	$0.29 \pm 0.05^{d,D}$	$0.27 \pm 0.03^{d,D}$	$0.52 \pm 0.04^{a,B}$	$0.32 \pm 0.03cd^{a,D}$	$0.37 \pm 0.02^{bc,D}$	$0.41 \pm 0.04^{b,B}$
	4	$0.21 \pm 0.04^{b,E}$	$0.20 \pm 0.01^{b,E}$	$0.33 \pm 0.03^{ab,D}$	$0.23 \pm 0.04^{b,E}$	$0.27 \pm 0.04^{b,E}$	$0.44 \pm 0.15^{a,B}$
Cohesiveness (ratio)	0	$0.54 \pm 0.02^{a,A}$	$0.52 \pm 0.01^{a,A}$	$0.46 \pm 0.01^{a,A}$	$0.48 \pm 0.06^{a,A}$	$0.53 \pm 0.01^{a,A}$	$0.61 \pm 0.12^{a,A}$
	1	$0.44 \pm 0.04^{b,B}$	$0.47 \pm 0.03^{b,B}$	$0.47 \pm 0.02^{b,A}$	$0.43 \pm 0.02^{b,B}$	$0.43 \pm 0.03^{b,A}$	$0.56 \pm 0.06^{a,A}$
	2	$0.44 \pm 0.02^{a,B}$	$0.38 \pm 0.03^{ab,C}$	$0.41 \pm 0.02^{ab,B}$	$0.35 \pm 0.03^{b,C}$	$0.39 \pm 0.05^{ab,A}$	$0.39 \pm 0.06^{ab,B}$
	3	$0.31 \pm 0.05^{ab,C}$	$0.32 \pm 0.03^{ab,D}$	$0.34 \pm 0.05^{ab,C}$	$0.30 \pm 0.02^{ab,CD}$	$0.29 \pm 0.03^{b,A}$	$0.37 \pm 0.02^{a,B}$
	4	$0.32 \pm 0.01^{b,C}$	$0.29 \pm 0.03^{bc,D}$	$0.37 \pm 0.02^{a,C}$	$0.26 \pm 0.03^{cd,D}$	$0.24 \pm 0.03^{d,A}$	$0.33 \pm 0.02^{ab,B}$
Chewiness (N)	0	$1.21 \pm 0.02^{b,BC}$	$1.03 \pm 0.04^{b,BC}$	$0.38 \pm 0.01^{c,B}$	$1.24 \pm 0.35^{b,B}$	$0.66 \pm 0.18^{c,C}$	$1.62 \pm 0.14^{a,A}$
	1	$0.76 \pm 0.06^{bc,C}$	$0.74 \pm 0.03^{bc,C}$	$0.46 \pm 0.02^{c,B}$	$0.40 \pm 0.07^{c,C}$	$1.18 \pm 0.16^{a,B}$	$0.89 \pm 0.38^{ab,B}$
	2	$1.98 \pm 0.19^{a,A}$	$1.22 \pm 0.19^{c,B}$	$1.68 \pm 0.19^{ab,A}$	$1.43 \pm 0.01^{bc,AB}$	$1.69 \pm 0.19^{ab,A}$	$1.87 \pm 0.30^{a,A}$
	3	$1.22 \pm 0.48^{a,BC}$	$1.33 \pm 0.32^{a,AB}$	$1.60 \pm 0.20^{a,A}$	$1.45 \pm 0.18^{a,AB}$	$1.60 \pm 0.20^{a,A}$	$1.52 \pm 0.08^{a,A}$
	4	$1.40 \pm 0.34^{a,B}$	$1.67 \pm 0.28^{a,A}$	$1.46 \pm 0.30^{a,A}$	$1.86 \pm 0.08^{a,A}$	$1.46 \pm 0.30^{a,AB}$	$1.14 \pm 0.57^{a,A}$
Gumminess (N)	0	$1.67 \pm 0.06^{b,C}$	$1.30 \pm 0.04^{c,D}$	$0.48 \pm 0.03^{a,D}$	$1.53 \pm 0.46^{bc,D}$	$0.53 \pm 0.06^{d,E}$	$4.58 \pm 0.13^{a,A}$
	1	$1.39 \pm 0.14^{a,C}$	$1.20 \pm 0.05^{a,D}$	$0.71 \pm 0.02^{a,D}$	$1.32 \pm 0.05^{a,D}$	$0.84 \pm 0.03^{d,D}$	$4.18 \pm 0.14^{a,A}$
	2	$4.73 \pm 0.14^{a,B}$	$2.72 \pm 0.18^{c,C}$	$3.53 \pm 0.20^{b,C}$	$2.36 \pm 0.31^{cd,C}$	$2.32 \pm 0.15^{d,C}$	$2.08 \pm 0.24^{d,B}$
	3	$4.06 \pm 1.00^{ab,B}$	$4.14 \pm 0.62^{ab,B}$	$4.37 \pm 0.37^{a,B}$	$4.16 \pm 0.31^{ab,B}$	$3.20 \pm 0.23^{b,B}$	$1.43 \pm 0.06^{c,C}$
	4	$6.53 \pm 0.28^{b,A}$	$7.28 \pm 0.42^{a,A}$	$5.33 \pm 0.39^{c,A}$	$6.38 \pm 0.06^{b,A}$	$4.34 \pm 0.18^{d,A}$	$2.07 \pm 0.46^{c,B}$

3.1.2 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านเคมี

3.1.2.1 ผลของสารแบคเทอริโอซินกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อค่า water activity และ ความชื้นในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ

ผลการศึกษาค่า water activity (A_w) ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.21) พบว่าในวันแรกของการหมัก ค่า A_w ของไส้กรอกอีสานทั้ง 6 กลุ่ม มีค่าระหว่าง 0.96-0.98 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากนั้นค่า A_w ของไส้กรอกอีสานจะลดลง โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการลดลงน้อยสุด จาก 0.96-0.95 ส่วนที่เหลือ 5 กลุ่ม มีค่า A_w ลดลงจนวันที่ 4 ของการหมัก อยู่ระหว่าง 0.91-0.93 โดยลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ส่วนค่า water activity (A_w) ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานสภาวะการหมักแบบสูญญากาศ (ตารางที่ 4.22) พบว่า ในวันแรกของการหมัก ค่า A_w ของไส้กรอกอีสานทั้ง 6 กลุ่ม มีค่าระหว่าง 0.98-0.99 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นค่า A_w ของไส้กรอกอีสานจะลดลง แต่จะสังเกตเห็นว่าค่า A_w ของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าลดลงน้อยมากตั้งแต่วันที่ 0 จนวันที่ 4 คือ ค่า A_w ลดลงเพียง 0.03-0.04 (กลุ่มควบคุมจาก 0.98 เป็น 0.94 ลดลง 0.03 กลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% A_w จาก 0.98 เป็น 0.95 ลดลง 0.03 กลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 4% Aw จาก 0.99 เป็น 0.96 ลดลง 0.03 กลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 2% A_w จาก 0.98 เป็น 0.95 ลดลง 0.03 กลุ่มที่มีการเติมแบคเทอริโอซิน 4% A_w จาก 0.99 เป็น 0.96 ลดลง 0.03 กลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% A_w จาก 0.98 เป็น 0.94 ลดลง 0.04

ผลการศึกษาค่าความชื้นที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.23) พบว่า ในวันแรกของการหมักค่าความชื้นของไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ลงในไส้กรอกอีสาน มีค่าสูงสุด 57.33% และ 58.31% ตามลำดับ ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% , 4% และ ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%, 4% พบว่า มีค่าความชื้นใกล้เคียงกัน เท่ากับ 46.57%, 45.33%, 46.57% และ 45.33% ตามลำดับ จากนั้นค่าความชื้นของไส้กรอกอีสานทุกกลุ่มจะมีอัตราลดลงมากที่สุดระหว่างการหมักวันที่ 0 ถึงวันที่ 1 โดยกลุ่มควบคุมมีอัตราการลดลงน้อยสุด จาก 57.33-56.30 แต่เมื่อแขวนต่อจนครบ 4 วัน ค่าความชื้นของไส้กรอกอีสานกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีการลดลงตั้งแต่วันแรกมากที่สุด เหลือค่าความชื้นเพียง 37.27% (จาก 58.31% เป็น 37.27%) ซึ่งคิดเป็นอัตราการลดลงถึง 21.04% ส่วนการศึกษาค่าความชื้นที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.24) พบว่าทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับการทดลองของมัลลิกา ไชยวุฒิ (2556) ได้ทำการหมักไส้กรอกอีสานที่บรรจุด้วยไส้หมูและไส้คอลลาเจนหมักสภาวะแบบสด(สูญญากาศ) และกึ่งแห้ง พบว่าความชื้นของไส้กรอกอีสานอยู่ที่ 50% เมื่อหมักที่ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65% นาน 2 วัน ไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะหมักแบบสด มีค่าความชื้นเพิ่ม 51-55% มากกว่าหมักแบบกึ่งแห้ง ส่วนค่า A_w ทั้ง 4 แบบ อยู่ที่ประมาณ 0.968-0.969 เมื่อหมักค่า A_w จะลดลง โดยไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะหมักแบบสดมี A_w ลดลงเหลือ 0.9666-0.967 ซึ่งลดลงน้อยกว่าไส้หมูและไส้คอลลาเจนในสภาวะกึ่งแห้ง มี A_w ลดลง 0.959-0.961 โดยไส้กรอกอีสานที่หมักแบบสด ซึ่งบรรจุในถุงปิดสนิทไม่มีการถ่ายเทความชื้นระหว่างภายนอกกับภายในถุงบรรจุ เป็นเหตุให้ความชื้นถูกกักอยู่ภายในถุงบรรจุ ส่วนไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกมีค่า A_w ลดลง และความชื้นต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในไส้กรอกอีสานแบบแขวน อาจเนื่องมาจากการระเหยของสารละลายที่เติมเข้าไป การสังเกตในระหว่างการทดลองพบว่าไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกมีความแห้งและเหี่ยวกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.21 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า water activity (Aw) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D.)

ระยะเวลา (วัน)	Aw ± S.D.					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$0.96 \pm 0.01^{b,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.98 \pm 0.00^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.98 \pm 0.00^{a,A}$	$0.97 \pm 0.00^{a,A}$
1	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{a,AB}$
2	$0.94 \pm 0.00^{b,B}$	$0.93 \pm 0.01^{b,B}$	$0.96 \pm 0.01^{a,A}$	$0.93 \pm 0.01^{b,B}$	$0.96 \pm 0.01^{a,B}$	$0.96 \pm 0.02^{a,AB}$
3	$0.97 \pm 0.01^{a,A}$	$0.92 \pm 0.00^{c,C}$	$0.95 \pm 0.01^{b,B}$	$0.92 \pm 0.00^{c,C}$	$0.94 \pm 0.01^{b,C}$	$0.94 \pm 0.01^{b,BC}$
4	$0.95 \pm 0.0^{a,AB}$	$0.91 \pm 0.00^{b,D}$	$0.93 \pm 0.01^{b,B}$	$0.91 \pm 0.01^{b,C}$	$0.93 \pm 0.01^{b,C}$	$0.92 \pm 0.00^{b,C}$

[abc]ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

[ABCDE] ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม	B2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
L2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%	B4%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L4%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%	L2%+B2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่า water activity (Aw) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	Aw					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$0.98 \pm 0.00^{a,A}$	$0.98 \pm 0.01^{a,A}$	$0.99 \pm 0.00^{a,A}$	$0.98 \pm 0.01^{a,A}$	$0.99 \pm 0.00^{a,A}$	$0.98 \pm 0.00^{a,A}$
1	$0.97 \pm 0.00^{b,B}$	$0.97 \pm 0.01^{b,A}$	$0.99 \pm 0.00^{a,A}$	$0.97 \pm 0.01^{b,A}$	$0.99 \pm 0.00^{a,A}$	$0.96 \pm 0.01^{b,A}$
2	$0.95 \pm 0.00^{b,C}$	$0.95 \pm 0.00^{b,B}$	$0.98 \pm 0.00^{a,B}$	$0.95 \pm 0.00^{b,B}$	$0.97 \pm 0.00^{a,B}$	$0.96 \pm 0.03^{ab,A}$
3	$0.95 \pm 0.00^{b,C}$	$0.95 \pm 0.00^{b,B}$	$0.97 \pm 0.00^{a,C}$	$0.95 \pm 0.00^{b,B}$	$0.97 \pm 0.01^{a,B}$	$0.96 \pm 0.02^{ab,A}$
4	$0.94 \pm 0.01^{b,C}$	$0.95 \pm 0.00^{ab,B}$	$0.96 \pm 0.00^{a,C}$	$0.95 \pm 0.00^{ab,B}$	$0.96 \pm 0.00^{a,C}$	$0.94 \pm 0.01^{b,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

ตารางที่ 4.23 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความชื้น (%) ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก โดยการแขวน (Mean ± S.D.)

ระยะเวลา (วัน)	ความชื้น (%)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$57.33 \pm 1.47^{a,A}$	$46.57 \pm 0.03^{b,A}$	$45.33 \pm 0.12^{b,A}$	$46.57 \pm 0.03^{b,A}$	$45.33 \pm 0.12^{b,A}$	$58.31 \pm 1.03^{a,A}$
1	$56.30 \pm 0.59^{a,A}$	$44.59 \pm 0.25^{b,B}$	$40.68 \pm 0.19^{c,B}$	$44.59 \pm 0.25^{b,B}$	$41.01 \pm 0.76^{c,B}$	$44.68 \pm 1.02^{b,B}$
2	$52.15 \pm 1.06^{a,B}$	$43.31 \pm 0.10^{b,C}$	$40.52 \pm 0.13^{d,B}$	$43.32 \pm 0.10^{b,C}$	$40.86 \pm 0.70^{d,B}$	$42.03 \pm 0.55^{c,C}$
3	$50.39 \pm 2.51^{a,B}$	$40.38 \pm 0.07^{b,D}$	$40.15 \pm 0.13^{bc,C}$	$40.40 \pm 0.06^{b,D}$	$40.22 \pm 0.0^{bc,BC}$	$38.27 \pm 0.67^{c,D}$
4	$43.62 \pm 1.63^{a,C}$	$39.72 \pm 0.15^{b,E}$	$39.50 \pm 0.06^{b,D}$	$39.52 \pm 0.70^{b,E}$	$39.46 \pm 0.05^{b,C}$	$37.27 \pm 1.60^{c,D}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.24 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อค่าความชื้น (%)ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	ความชื้น (%)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$54.72 \pm 0.97^{a,A}$	$52.57 \pm 0.56^{b,A}$	$54.45 \pm 0.11^{a,A}$	$52.57 \pm 0.56^{b,A}$	$54.45 \pm 0.11^{a,A}$	$52.64 \pm 1.56^{b,A}$
1	$54.19 \pm 0.25^{a,AB}$	$52.40 \pm 0.01^{b,A}$	$53.49 \pm 0.28^{a,B}$	$52.40 \pm 0.01^{b,A}$	$53.49 \pm 0.28^{a,AB}$	$52.32 \pm 1.01^{b,A}$
2	$53.99 \pm 0.49^{a,AB}$	$52.02 \pm 0.02^{b,A}$	$53.28 \pm 0.32^{ab,B}$	$52.02 \pm 0.02^{b,A}$	$53.28 \pm 0.32^{ab,B}$	$46.26 \pm 2.96^{c,B}$
3	$53.27 \pm 0.15^{a,BC}$	$51.27 \pm 0.10^{b,B}$	$51.41 \pm 0.08^{b,C}$	$51.27 \pm 0.10^{b,B}$	$51.41 \pm 0.08^{b,C}$	$51.31 \pm 0.19^{b,AB}$
4	$52.34 \pm 0.22^{a,C}$	$50.48 \pm 0.38^{b,C}$	$52.47 \pm 0.12^{a,D}$	$50.84 \pm 0.32^{b,B}$	$51.08 \pm 1.16^{ab,C}$	$51.03 \pm 1.33^{ab,AB}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.1.3 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

3.1.3.1 ผลของต่อจำนวนแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ

ทำการศึกษาการใช้กรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซินเติมลงในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.25) แบ่งเป็น 6 กลุ่ม พบว่า ในวันที่แรกของการหมักทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อยู่ระหว่าง 2.45-4.03 log cfu/g จากนั้นเมื่อผ่านไปวันที่ 1 จะเห็นว่ามีจำนวนแบคทีเรียแลกติกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างน้อย 2 log cfu/g ในทุกกลุ่มและมีอัตราการเพิ่มช้าลงหลังจากวันที่ 1 จนตลอดระยะเวลาการหมัก ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% , 4% และ ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%, 4% พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน แต่ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีจำนวนแบคทีเรียแลกติกน้อยกว่าทุกกลุ่มตลอด 4 วัน รวมถึงกลุ่มควบคุม เมื่อทำการหมักครบวันที่ 4 พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีจำนวนแบคทีเรียแลกติก 7.21 และ 6.13 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2%, 4% และ กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%, 4% มีจำนวน แบคทีเรียแลกติก 8.60, 8.36, 8.16 และ 8.39 log cfu/g ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (ตารางที่ 4.26) พบว่าในวันที่แรกของการหมักทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 4.02-4.15 log cfu/g ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และมีอัตราการเพิ่มช้าลงหลังจากวันที่ 1 จนตลอดระยะเวลาการหมัก จากนั้นเมื่อผ่านไปวันที่ 1 จะเห็นว่ามีจำนวนแบคทีเรียแลกติกเพิ่มสูงขึ้นทุกกลุ่ม ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% , 4% และ ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%, 4% พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลกติก มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน แต่ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีจำนวนแบคทีเรียแลกติกน้อยกว่าทุกกลุ่มตลอด 4 วัน รวมทั้งกลุ่มควบคุม เมื่อทำการหมักครบวันที่ 4 พบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีจำนวนแบคทีเรียแลกติก น้อยสุด คือ 6.22 log cfu/g ส่วนกลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2%, 4% และ กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%, 4% มีจำนวนแบคทีเรียแลกติก 8.16, 8.25, 8.46, 8.37 และ 8.47 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ผลการศึกษา พบว่า จำนวนแบคทีเรียแลกติก เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน เนื่องจาก ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แบบเปรี้ยว (Fermented meat product) ที่เกิดการหมักตามธรรมชาติ โดยแบคทีเรียแบคทีเรียแลกติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus brevis, L. farcininis, L. fermentum, L.plantarum,L. sakei, Pediococcus acidilactici, P.pentosaceus, Weisella cibaria* และ *W.confuse* (อพัชชา จินดาประเสริฐ และคณะ. 2557) รวมถึงมีการสนับสนุนของแมงกานีสในกระเทียมที่มีส่วนช่วยสนับสนุนปริมาณของแบคทีเรียแลกติกให้เจริญเพิ่มขึ้น (Swetwiwathana *et al.* 1999) สอดคล้องกับการทดลองของ Jindaprasert *et al.* (2011) ซึ่งพบว่าจำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่พบในวันแรก เท่ากับ 6.19 log cfu/g และเพิ่มขึ้นเป็น 8 log cfu/g จนระยะเวลาการหมัก เมื่อ 48 ชั่วโมง วัชรียา วงษ์หาญ และคณะ (2558) ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียแลกติกของไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม พบว่า มีจำนวน เพิ่มขึ้น 5 log cfu/g อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 2 (จาก 6 log cfu/g เป็น 11 log cfu/g) หลังจากวันที่ 2 ถึง 4 ของการหมักมีจำนวนเพิ่มขึ้นที่ลดลง

ทั้งนี้การเติมกรดแลกติก 2%, 4% แบคเทอริโอซิน 2%, 4% ในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวน แบคทีเรียแลกติก ตลอดระยะเวลา 4 วัน โดยมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่การเติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียแลกติก น้อยกว่าทุกกลุ่ม นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินจาก 2% เป็น 4% ของไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสูญญากาศ ไม่มีความแตกต่าง ($p>0.05$) ของจำนวนแบคทีเรียแลกติก แต่เมื่อเติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีผลทำให้แบคทีเรียแลกติกลดลงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งการเติมกรดแลกติกทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในสภาวะนี้จะทำให้ช่วงเจริญเติบโต (lag phase) ใช้ระยะเวลานานขึ้น จึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช้าลง (Woolthuis and Smulders. 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Pilasombut *et al.* (2015) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *S.* Anatum, *E. coli* TISTR780 และ *S. aureus* TISTR118 โดยการใช้กรดแลกติก ความเข้ม 1, 2, 3และ 4% ร่วมกับ สารแบคเทอริโอซิน 2% ในหลอดทดลอง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดแลกติกจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยการใช้สารละลายกรดแลกติก 3 และ 4% สามารถยับยั้งได้ ขณะที่เมื่อใช้สารแบคเทอริโอซิน 2% จะไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แต่เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติก 4% ร่วมกับ สารแบคเทอริโอซิน 2% สามารถลดจุลินทรีย์ทดสอบได้มากกว่าใช้สารละลายกรดแลกติก 4% เพียงอย่างเดียว จะเห็นว่าสาร 2 ชนิดทำงานร่วมกันเพิ่มประสิทธิภาพทำลายเชื้ออื่นได้มากขึ้น โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถทนต่อภาวะความเป็นกรดและแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ที่อยู่ในไส้กรอกอีสานซึ่งอาจถูกทำลายโดยการทำงานร่วมกันของสารทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 4.25 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	จำนวน Lactic acid bacteria (log cfu/g)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$3.09 \pm 1.48^{a,C}$	$3.01 \pm 0.01^{a,E}$	$4.04 \pm 0.01^{a,E}$	$4.03 \pm 0.02^{a,E}$	$4.03 \pm 0.00^{a,E}$	$2.45 \pm 0.15^{a,B}$
1	$5.65 \pm 0.42^{bc,B}$	$6.11 \pm 0.01^{b,D}$	$7.02 \pm 0.02^{a,D}$	$6.12 \pm 0.01^{b,D}$	$7.05 \pm 0.01^{a,D}$	$5.26 \pm 0.85^{c,A}$
2	$6.52 \pm 0.50^{b,AB}$	$7.11 \pm 0.01^{ab,C}$	$8.08 \pm 0.01^{a,C}$	$7.14 \pm 0.01^{ab,C}$	$8.12 \pm 0.01^{a,C}$	$5.35 \pm 1.49^{c,A}$
3	$7.10 \pm 0.02^{b,A}$	$8.09 \pm 0.01^{a,B}$	$8.32 \pm 0.00^{a,B}$	$8.10 \pm 0.01^{a,B}$	$8.35 \pm 0.01^{a,B}$	$5.99 \pm 0.97^{c,A}$
4	$7.21 \pm 0.12^{ab,A}$	$8.60 \pm 0.42^{a,a}$	$8.36 \pm 0.00^{a,A}$	$8.16 \pm 0.12^{a,A}$	$8.39 \pm 0.01^{a,A}$	$6.13 \pm 1.76^{b,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.26 จำนวน แบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการ บรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	จำนวน Lactic acid bacteria (log cfu/g)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$4.02 \pm 0.05^{a,D}$	$4.05 \pm 0.04^{a,D}$	$4.15 \pm 0.00^{a,E}$	$4.04 \pm 0.02^{a,E}$	$4.02 \pm 0.01^{a,E}$	$4.03 \pm 1.68^{a,B}$
1	$6.03 \pm 0.01^{bc,C}$	$6.12 \pm 0.05^{ab,C}$	$7.23 \pm 0.01^{a,D}$	$6.30 \pm 0.01^{ab,D}$	$7.28 \pm 0.01^{a,D}$	$4.75 \pm 1.16^{c,A}$
2	$6.92 \pm 0.29^{b,B}$	$7.94 \pm 0.28^{ab,B}$	$8.14 \pm 0.00^{a,C}$	$8.20 \pm 0.00^{a,C}$	$8.23 \pm 0.03^{a,C}$	$5.44 \pm 1.46^{c,A}$
3	$8.12 \pm 0.01^{a,A}$	$8.18 \pm 0.04^{a,A}$	$8.40 \pm 0.03^{a,B}$	$8.28 \pm 0.01^{a,B}$	$8.42 \pm 0.00^{a,B}$	$6.10 \pm 0.90^{b,A}$
4	$8.16 \pm 0.04^{a,A}$	$8.25 \pm 0.01^{a,A}$	$8.46 \pm 0.00^{a,A}$	$8.37 \pm 0.03^{a,A}$	$8.47 \pm 0.01^{a,A}$	$6.22 \pm 1.61^{b,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.1.3.2 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อจำนวนยีสต์และราในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสุญญากาศ

ผลการศึกษาจำนวนยีสต์และราที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.27) พบว่า ในวันที่ 0 ของการหมักจำนวนยีสต์และราทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) มีค่าระหว่าง 2.54-2.89 log cfu/g จากนั้นวันที่ 1 พบว่า กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% ลงในไส้กรอกอีสาน มีการลดลงของจำนวนยีสต์และรา คือ จาก 2.62 เป็น 2.46 log cfu/g ต่างจากกลุ่มอื่นคือมีการเพิ่มขึ้น และจำนวนยีสต์และราเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก 4 วัน เมื่อครบวันที่ 4 ของการหมักพบว่าจำนวนยีสต์และราของกลุ่มที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% น้อยที่สุด คือ 4.06 log cfu/g ส่วนกลุ่มควบคุมมีจำนวนยีสต์และรามากสุด คือ 4.78 log cfu/g ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.27

การศึกษาจำนวนยีสต์และราที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (ตารางที่ 4.28) พบว่า ในวันที่ 0 ของการหมักจำนวนยีสต์และราทุกกลุ่มทดลองมีค่าระหว่าง 2.57-2.80 log cfu/g มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) จากนั้นวันที่ 1 และ 2 พบว่า ทุกกลุ่มมีการเพิ่มขึ้น จนวันที่ 3 และ 4 ของการหมักพบจำนวนยีสต์และราที่ตรวจพบน้อยกว่า 10 log cfu/g โดยตามมาตรฐาน มผช. 144 / 2546 ที่กำหนดให้มีจำนวนยีสต์และราในไส้กรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีสานที่ผลิตต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งจะเห็นว่าไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศทุกตัวอย่างมีจำนวนยีสต์และราไม่เกินมาตรฐานกำหนด

จากการทดลองของกฤษณา ประภัสสรวัฒนา และคณะ (2552) พบว่าจำนวนยีสต์จากการหมักไส้กรอกอีสานเพิ่มขึ้นจากวันแรกประมาณ 1 log cfu/g (จาก 1 log cfu/g เป็น 2 log cfu/g) หลังการหมัก 2 วัน โดยยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้นได้เนื่องจากเจริญในสภาวะที่ความเป็นกรดด่างดีกว่าแบคทีเรีย นอกจากนี้ยีสต์และรายังชอบเจริญในสภาวะมีออกซิเจน การที่ยังมีการเจริญของยีสต์และราตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 2 เนื่องจาก ยังเหลือออกซิเจนในถุงบรรจุ ถึงแม้จะเป็นสภาวะสุญญากาศก็ตาม (Phromraksa *et al*. 2005) แต่จากการทดลองเมื่อเทียบกับการหมักไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสุญญากาศ จะเห็นว่าจำนวนยีสต์และราที่พบในสภาวะแขวนทุกกลุ่มมีจำนวนมากกว่าไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ เหตุผลเนื่องจากยีสต์และราชอบเจริญในสภาวะออกซิเจน สอดคล้องกับการทดลองของ Phromraksa et al. 2005 ได้หมักไส้กรอกกอีสานในสภาวะแขวน เทียบกับสูญญากาศ พบว่า จำนวนยีสต์และราของไส้กรอกกอีสานในสภาวะแขวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่เริ่มหมักถึงวันที่ 2 (จากน้อยกว่า 30 cfu/g เป็น 120-150 cfu/g) ส่วนไส้กรอกกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ พบจำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 30 cfu/g ตั้งแต่วันที่เริ่มหมักจนกระทั่งวันที่ 6

ตารางที่ 4.27 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อจำนวนยีสต์และราในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก โดยการแขวน (Mean $\pm$ S.D.)

ระยะเวลา (วัน)	จำนวนยีสต์และรา (log cfu/g)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$2.61 \pm 0.26^{ab,C}$	$2.63 \pm 0.02^{ab,E}$	$2.89 \pm 0.01^{c,E}$	$2.52 \pm 0.04^{b,E}$	$2.54 \pm 0.01^{b,D}$	$2.62 \pm 0.25^{ab,B}$
1	$3.00 \pm 0.18^{a,C}$	$2.88 \pm 0.01^{ab,D}$	$3.07 \pm 0.02^{a,D}$	$2.78 \pm 0.06^{ab,D}$	$3.07 \pm 0.01^{a,C}$	$2.46 \pm 0.54^{b,B}$
2	$3.80 \pm 0.30^{b,B}$	$4.01 \pm 0.00^{b,C}$	$4.09 \pm 0.01^{ab,C}$	$3.82 \pm 0.28^{b,C}$	$4.08 \pm 0.02^{ab,B}$	$4.40 \pm 0.28^{a,A}$
3	$4.73 \pm 0.06^{a,A}$	$4.08 \pm 0.01^{bc,B}$	$4.14 \pm 0.01^{b,B}$	$4.06 \pm 0.01^{c,B}$	$4.12 \pm 0.02^{bc,B}$	$4.09 \pm 0.05^{bc,A}$
4	$4.78 \pm 0.07^{a,A}$	$4.55 \pm 0.03^{ab,a}$	$4.46 \pm 0.03^{b,A}$	$4.62 \pm 0.01^{ab.A}$	$4.57 \pm 0.06^{ab,A}$	$4.06 \pm 0.32^{c,A}$

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม	B2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
L2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%	B4%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%
L4%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%	L2%+B2%	หมายถึง	ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.28 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อจำนวนยีสต์และราในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)

ระยะเวลา (วัน)	จำนวนยีสต์และรา (log cfu/ml)					
	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
0	$2.57 \pm 0.01^{a,D}$	$2.77 \pm 0.03^{a,A}$	$2.80 \pm 0.02^{a,B}$	$2.60 \pm 0.01^{b,B}$	$2.60 \pm 0.02^{b,A}$	$2.60 \pm 0.17^{b,A}$
1	$2.69 \pm 0.02^{b,A}$	$2.76 \pm 0.01^{ab,A}$	$2.95 \pm 0.02^{a,A}$	$2.70 \pm 0.04^{b,A}$	$2.76 \pm 0.23^{ab,A}$	$2.92 \pm 0.10^{a,A}$
2	$2.48 \pm 0.03^{ab,C}$	$2.47 \pm 0.01^{ab,B}$	$2.63 \pm 0.03^{a,C}$	$2.49 \pm 0.04^{ab,C}$	$2.58 \pm 0.12^{a,A}$	$2.16 \pm 0.41^{b,B}$
3	<10	<10	<10	<10	<10	<10
4	<10	<10	<10	<10	<10	<10

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.1.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวนและบรรจุถุงสุญญากาศ

จากการทดลองผลิตไส้กรอกอีสานโดยเติมกรดแลกติก 2% แบคเทอริโอซิน 2% และเติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% จากนั้นนำไปหมักในสภาวะการหมักแบบแขวนและบรรจุถุงสุญญากาศ ครบ 4 วัน นำมาย่างให้สุก แล้วทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส จากผู้ชิมที่ไม่ผ่านการฝึกจำนวน 30 คน ด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสความชอบโดยรวมด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว ลักษณะโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 7 point hedonic scale ตั้งแต่ 1-7 ดังต่อไปนี้

คะแนน	1	หมายถึง	ไม่ชอบมากที่สุด
คะแนน	2	หมายถึง	ไม่ชอบมาก
คะแนน	3	หมายถึง	ไม่ชอบ
คะแนน	4	หมายถึง	เฉยๆ
คะแนน	5	หมายถึง	ชอบ
คะแนน	6	หมายถึง	ชอบมาก
คะแนน	7	หมายถึง	ชอบมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสความชอบโดยรวมด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว ลักษณะโดยรวม ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (ตารางที่ 4.29) พบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่าง ($p>0.05$) ด้านสี ลักษณะปรากฏ และเนื้อสัมผัส ส่วนกลิ่นรส ความเปรี้ยวและลักษณะโดยรวม ไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เท่ากับ 4.73, 4.63 และ 4.70 ซึ่งหมายถึงผู้ประเมินมีความชอบถึงชอบมาก ส่วนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสความชอบที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (ตารางที่ 4.30) พบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่าง ($p>0.05$) ด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และความเปรี้ยว ส่วนลักษณะโดยรวมไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เท่ากับ 4.93 ซึ่งหมายถึงผู้ประเมินมีความชอบถึงชอบมาก กล่าวโดยรวมพบว่าผู้ประเมินชอบกลิ่นรส ความเปรี้ยวและลักษณะโดยรวมของไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2% จากการศึกษาความสว่าง (L*) ของไส้กรอกเปรี้ยว ก่อนนำมาย่างจะพบความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม โดยกลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินจะมีความสว่างมากกว่า (ซีดกว่า) กลุ่มควบคุม แต่เมื่อนำมาผ่านการย่างจะพบว่าไม่มีความแตกต่าง ($p>0.05$) ด้านสี ลักษณะปรากฏ และเนื้อสัมผัส สอดคล้องกับการทดลองของ ณัฐธิดา แปวกระโทก (2554) ได้ทำไส้กรอกอีสานที่เติม *Lb.plantarum* RS21 ซึ่งสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ พบว่าผู้ประเมินมีความชอบเฉลี่ยด้านสีและกลิ่นรส มากกว่าไส้กรอกที่ผลิตทางการค้า

ตารางที่ 4.29 ค่าเฉลี่ยความชอบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน (Mean±S.D)

Parameter	Con	L2%	B2%	L2%+B2%
สี	4.50 ± 1.17^{a}	4.67 ± 1.32^{a}	4.70 ± 1.18^{a}	4.57 ± 1.01^{a}
ลักษณะปรากฏ	4.60 ± 1.50^{a}	4.57 ± 1.22^{a}	4.60 ± 1.13^{a}	5.03 ± 1.16^{a}
เนื้อสัมผัส	4.00 ± 1.51^{a}	4.43 ± 1.68^{a}	4.30 ± 1.42^{a}	4.47 ± 1.11^{a}
กลิ่นรส	3.97 ± 1.59^{b}	3.57 ± 1.48^{b}	3.50 ± 1.53^{b}	4.73 ± 1.23^{a}
ความเปรี้ยว	3.37 ± 1.73^{b}	4.03 ± 1.18^{ab}	3.90 ± 1.81^{ab}	4.63 ± 1.43^{a}
ลักษณะโดยรวม	4.10 ± 1.58^{ab}	4.17 ± 1.33^{b}	3.77 ± 1.33^{b}	4.70 ± 1.24^{a}

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.30 ค่าเฉลี่ยความชอบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกอีสานที่เติมสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ (Mean ± S.D)

	Con	L2%	B2%	L2%+B2%
สี	4.83 ± 1.09^{a}	4.43 ± 1.22^{a}	4.63 ± 1.19^{a}	4.80 ± 0.92^{a}
ลักษณะปรากฏ	4.87 ± 1.04^{a}	4.37 ± 1.43^{a}	4.70 ± 1.21^{a}	4.83 ± 1.18^{a}
เนื้อสัมผัส	4.63 ± 1.45^{a}	4.13 ± 1.55^{a}	4.53 ± 1.43^{a}	4.40 ± 1.50^{a}
กลิ่นรส	4.77 ± 1.55^{a}	4.00 ± 1.66^{b}	4.57 ± 1.50^{a}	4.70 ± 1.70^{a}
ความเปรี้ยว	4.33 ± 1.56^{a}	3.93 ± 1.78^{ab}	4.10 ± 1.63^{a}	4.40 ± 1.63^{a}
ลักษณะโดยรวม	4.63 ± 1.30^{ab}	4.10 ± 1.52^{b}	4.57 ± 1.50^{ab}	4.93 ± 1.51^{a}

^{abc}ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม
L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%
B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%
L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

3.2 ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน

โดยศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน กรดแลกติก และสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน เมื่อแขวนไว้ที่อุณหภูมิห้องและเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C ผลการศึกษาพบว่าสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกมีผลต่อการลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S. aureus* ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแขวน ต่อการยับยั้ง *S. aureus* (ตารางที่ 4.31) พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่บรรจุแบบแขวนทุกกลุ่มมีจำนวนเพิ่มมากกว่าวันที่ 0 แต่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) จากวันที่ 1 ทุกกลุ่มมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งวันที่ 4 ของการหมัก โดยในวันที่ 0 กลุ่มควบคุม มีจำนวนมากที่สุด คือ 5.14 log cfu/g. จนถึงวันที่ 4 ก็พบว่ายังมีจำนวนมากที่สุด คือ 6.76 log cfu/g. ส่วนกลุ่มที่มีการเติมกรดแลกติก แบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซิน มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยเมื่อวันที่ 4 กลุ่มที่เติมกรดแลกติก 4% มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 2.56 log cfu/g ซึ่งน้อยกว่าทุกกลุ่ม ส่วน *S. aureus* ที่ตรวจพบจากการเติมลงในการผลิตไส้กรอกอีสาน ทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 3.36 – 3.96 log cfu/g และมีแนวโน้มลดลงจนกระทั่งวันสุดท้าย โดยพบว่ากลุ่มที่มีการเติมกรดแลกติก แบคเทอริโอซิน และกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซิน มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) และให้ผลไปแนวทางเดียวกับไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ตารางที่ 4.32) คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบทุกกลุ่มมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งวันที่ 4 ของการหมัก แต่ *S. aureus* ที่ตรวจพบในวันที่ 4 ทุกกลุ่ม น้อยกว่า 10 cfu/g (<10 cfu/g)

จากการศึกษาการเติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินมีผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S. aureus* ที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสานที่ตรวจพบน้อยกว่ากล่มควบคุม การเติมแบคเทอริโอซินในแบบจำลองไส้กรอกอีสานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเซลล์ ซึ่งโดยปกติแบคเทอริโอซินไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในสภาพแข็งแรงได้ จึงต้องใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น กรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูง จนทำให้เชื้อกลุ่มเป้าหมายเกิดการบาดเจ็บ แบคเทอริโอซินจึงช่วยให้เชื้อในกลุ่มแกรมลบที่บาดเจ็บถูกทำลายเร็วขึ้น (Swetwiwathana *et al.* 2007) โดยแบคเทอริโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายและขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนจากกรดอินทรีย์ภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ กระตุ้นให้เซลล์ใช้พลังงาน ATP ในการปรับสมดุล เมื่อพลังงาน ATP หมดเซลล์ก็ตาย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550) Swetwiwathana and Lotong (1999) รายงานว่า pediocin PA-1 ที่ผลิตจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแต่จะไม่ยับยั้ง S. aureus ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Schillinger and Lucke (1989) ที่ทดลองใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus sake* ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งก็พบว่าแบคเทอริโอซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* แต่เมื่อใช้กรดอินทรีย์บางชนิดร่วมกับแบคเทอริโอซิน พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ Pilasombut *et al.* (2015) พบว่าการใช้สารละลายกรดแลกติก 4% ร่วมกับ แบคเทอริโอซิน 2% จาก Lactic acid bacteria isolate KL-1 ในหลอดทดลอง มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. aureus* TISTR118 ชั่วโมง ที่ 24 และ 30 มากกว่าการใช้สารละลายกรดแลกติก 4% เพียงอย่างเดียว โดยประสิทธิภาพของการใช้กรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซินช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคได้จริงในหลอดทดลอง (in vitro) แต่เมื่อนำมาใช้เติมในไส้กรอกอีสาน พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่ดีเหมือนกับการทดลองในหลอดทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินลงในไส้กรอกอีสานนั้น โปรตีนและไขมันที่เป็นส่วนประกอบหลักอาจเป็นตัวดักจับสารละลายไว้ ทำให้สารดังกล่าวไม่สามารถแสดงประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้อย่างเต็มที่ (ชลัท ศานติวรางคนา. 2542) รวมถึงอาจเกิดจากการยับยั้งประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจากกลูต้าไธโอนในเนื้อสัตว์ (Rose *et al.* 1999) กฤษณา ประภัสสรวัฒนา และคณะ (2552) พบว่า จำนวน Total Staphylococci ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ซึ่งในวันที่ 0 ของการหมักมีจำนวน 4.20 ถึง 4.42 log cfu/ml. และมีจำนวนไม่เปลี่ยนแปลงมากเมื่อเสร็จสิ้นการหมักไส้กรอกอีสาน นาน 2 วัน ส่วน *S. aureus* มีจำนวนเริ่มต้น 0.77 log cfu/g หลังจากหมักครบ 2 วัน ยังพบเชื้ออยู่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกับวันเริ่มต้น นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* CP 2-11 และ *L. plantarum* 1-15 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและเร่งกระบวนการผลิต คือทำให้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำลง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างแบคเทอริโอซินทำให้สามารถลดจำนวน *S. aureus* ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการหมักแบบธรรมชาติ มัลลิกา ไชยวุฒิ (2556) ทำไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติเทียบกับหมักโดยเติมหัวเชื้อ *L. plantarum* RS49 เมื่อนำไส้กรอกอีสานมาทำการตรวจ *S. aureus* ซึ่งตามมาตรฐาน มผช. 144/2546) ต้องไม่พบ *S. aureus* ในตัวอย่าง 0.1 กรัม โดยวันที่ 0, 1 สามารถตรวจพบ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสานทั้งสองตัวอย่าง ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบเริ่มต้น แต่เมื่อหมักต่อวันที่ 2 พบว่า *S. aureus* ในไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยควบคุมการหมักตามธรรมชาติ แต่กลับไม่พบ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสานที่เติมหัวเชื้อ *L. plantarum* RS49 เนื่องจาก *L. plantarum* RS49 สามารถสร้าง pediocin-like bacteriocin ยับยั้ง *S. aureus* ATCC12600 โดยวิธี direct method บน Bacteriocin Screening Medium (BSM) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 และ 0.3 เซนติเมตร ส่วน S. aureus NP-SA1 ยับยั้งเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 และ 0.6 เซนติเมตร ณัฐธิดา แปวกระโทก (2554) ได้ทำการผลิตไส้กรอกอีสานสูตรโรงงานสุทธิลักษณ์อินโนฟู้ด แล้วเติม S. aureus NP-SA1 (สูตรที่ 1) ความเข้มข้น 104 cfu/ml. ส่วนสูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานสูตรโรงงานสุทธิลักษณ์อินโนฟู้ด แล้วเติม *S. aureus* NP-SA1 ความเข้มข้น 104 cfu/ml. และ *Weissella cibraria* SI21 ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml. สูตรที่ 3 คือ ไส้กรอกอีสานสูตรโรงงานสุทธิลักษณ์อินโนฟู้ด แล้วเติม *S. aureus* NP-SA1 ความเข้มข้น 10^4 cfu/ml. แล้วเติม *Lb. plantarum* NP-SA1 ความเข้มข้นเชื้อ 10^6 cfu/ml. จากนั้นตรวจการเหลือรอดของ *S. aureus* NP-SA1 พบว่า สูตรที่ 2 ในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณ *S. aureus* ลดลงจาก 1.2×10^5 cfu/ml. เป็น 9.2×10^3 cfu/ml. ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก ส่วนสูตรที่ 3 ในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณ *S. aureus* ลดลงจาก 1.3×10^5 cfu/ml. เป็น 9.0×10^3 cfu/ml. ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เมื่อตรวจความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อดังกล่าวผลิตขึ้น ด้วยวิธี spot on lawn โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157T เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่า ทั้งสูตรที่เติม *Weissella cibraria* SI21 และ *Lb. plantarum* NP-SA1 พบแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 200 Au/ml. ในชั่วโมงที่ 30 ซึ่งการลดลงของ *S.aureus* NP-SA1 ในชั่วโมงที่ 0 ถึง 48 มากกว่าสูตรที่ 1 เนื่องจากประสิทธิภาพของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างกรดแลกติกได้อย่างรวดเร็วทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงและขยายช่วง lag phase ของจุลินทรีย์และเชื้อก่อโรค (Kostinek *et al.* 2007) อีกทั้ง ยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซินในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน จึงทำให้สูตรที่ 2 และ 3 ที่มีการเติมแบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่าสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ

ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าการผลิตไส้กรอกอีสานทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ ไม่สามารถตรวจพบ *S. aureus* ในทุกกลุ่มในวันที่ 4 ซึ่งเป็นผลดี โดย ณัฐธิดา แปวกระโทก (2554) ได้สุ่มตรวจ *S. aureus* จากร้านจำหน่ายไส้กรอกอีสานบริเวณตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพ พบ มากถึง 2,000 cfu/g เนื่องจากการบรรจุไส้กรอกอีสานเป็นการบรรจุแบบไม่มีออกซิเจน หรือมีออกซิ เจนน้อย จึงทำให้เหมาะที่จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดย Gonzaales-Fandos *et al.* 1999 ได้พบว่าสารพิษที่สร้างจาก *S. aureus* หากมีการปนเปื้อนจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษนี้มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง ซึ่งเมื่อนำไส้กรอกอีสานไปปิ้งย่างแล้วก็ตามก็มีโอกาสได้รับสารพิษนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.31 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S. aureus* ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการแช่วน (Mean±S.D.)

จุลินทรีย์ที่ศึกษา	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)						
	เวลา (วัน)	Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
Total microbial count	0	$5.14 \pm 0.14^{a,B}$	$4.12 \pm 0.05^{b,A}$	$4.08 \pm 0.09^{b,A}$	$3.92 \pm 0.09^{b,B}$	$4.56 \pm 0.84^{ab,A}$	$3.76 \pm 0.07^{b,B}$
	1	$6.98 \pm 1.53^{a,AB}$	$4.39 \pm 0.57^{b,A}$	$4.27 \pm 0.66^{b,A}$	$5.07 \pm 0.01^{ab,A}$	$5.37 \pm 0.75^{ab,A}$	$4.98 \pm 0.33^{ab,A}$
	2	$7.29 \pm 0.37^{a,A}$	$3.68 \pm 1.40^{bc,A}$	$2.50 \pm 0.08^{bc,B}$	$4.42 \pm 0.65^{b,AB}$	$4.86 \pm 0.01^{b,A}$	$4.92 \pm 0.12^{b,A}$
	3	$7.10 \pm 0.69^{a,AB}$	$3.42 \pm 1.05^{a,A}$	$2.78 \pm 0.10^{a,B}$	$4.20 \pm 0.65^{a,AB}$	$4.20 \pm 0.06^{a,A}$	$4.20 \pm 0.41^{a,B}$
	4	$6.76 \pm 0.05^{a,AB}$	$3.22 \pm 0.02^{bc,A}$	$2.56 \pm 0.01^{c,B}$	$3.97 \pm 0.07^{b,AB}$	$4.26 \pm 0.10^{b,A}$	$3.72 \pm 0.23^{b,B}$
S.aureus	0	$3.98 \pm 0.07^{a,A}$	$3.84 \pm 0.10^{a,A}$	$3.69 \pm 0.07^{a,A}$	$3.69 \pm 0.17^{a,A}$	$3.36 \pm 0.25^{b,A}$	$3.37 \pm 0.53^{b,A}$
	1	$3.69 \pm 0.32^{a,A}$	$2.75 \pm 0.18^{a,B}$	$2.15 \pm 0.91^{b,B}$	$2.70 \pm 0.70^{ab,A}$	$2.48 \pm 0.65^{ab,A}$	$3.20 \pm 0.76^{ab,A}$
	2	$2.79 \pm 0.52^{a,A}$	$1.95 \pm 0.67^{a,BC}$	$1.56 \pm 0.12^{a,B}$	$2.91 \pm 0.86^{a,A}$	$2.17 \pm 0.98^{a,A}$	$1.98 \pm 0.00^{a,AB}$
	3	$3.17 \pm 1.83^{a,A}$	$1.00 \pm 0.00^{a,C}$	$1.55 \pm 0.44^{a,B}$	$2.60 \pm 1.20^{c,A}$	$2.71 \pm 1.53^{a,.A}$	$1.87 \pm 0.81^{a,B}$
	4	$3.45 \pm 1.42^{a,A}$	$2.00 \pm 0.53^{a,BC}$	$1.37 \pm 0.18^{a,B}$	$2.95 \pm 2.55^{a,A}$	$3.08 \pm 1.14^{a,.A}$	$1.55 \pm 0.07^{a,B}$

[abc]ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

[ABCDE] ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

ตารางที่ 4.32 ผลของสารแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *S.aureus* ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสานที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักโดยการบรรจุถุงสูญญากาศ (Mean ± S.D)

จุลินทรีย์ที่ศึกษา	เวลา (วัน)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)					
		Con	L2%	L4%	B2%	B4%	L2%+B2%
Total microbial count	0	$5.14 \pm 0.14^{a,B}$	$4.12 \pm 0.05^{b,AB}$	$4.08 \pm 0.04^{b,A}$	$3.92 \pm 0.09^{b.A}$	$4.56 \pm 0.84^{b.A}$	$3.76 \pm 0.07^{b,A}$
	1	$7.36 \pm 1.08^{a,AB}$	$4.39 \pm 0.54^{b,A}$	$3.86 \pm 0.22^{b,A}$	$4.73 \pm 0.21^{b.A}$	$4.65 \pm 0.25^{b.A}$	$4.09 \pm 0.89^{b,A}$
	2	$7.68 \pm 0.11^{a,AB}$	$3.40 \pm 0.33^{b,BC}$	$3.33 \pm 0.92^{b,AB}$	$4.58 \pm 0.70^{b.A}$	$4.58 \pm 0.59^{b.A}$	$4.20 \pm 0.74^{b,A}$
	3	$8.03 \pm 0.04^{a,A}$	$2.92 \pm 0.15^{d.CD}$	$2.50 \pm 0.10^{d,B}$	$3.92 \pm 0.49^{c.A}$	$4.85 \pm 0.18^{b.A}$	$3.11 \pm 0.36^{d,A}$
	4	$5.41 \pm 0.02^{a,AB}$	$2.63 \pm 0.00^{b,D}$	$2.96 \pm 0.05^{a\,b,AB}$	$3.75 \pm 0.12^{ab.A}$	$4.76 \pm 0.05^{ab.A}$	$3.79 \pm 0.12^{a\,b,A}$
S.aureus	0	$3.98 \pm 0.07^{a,A}$	$3.84 \pm 0.10^{a,A}$	$3.69 \pm 0.07^{ab,A}$	$3.69 \pm 0.17^{ab.A}$	$3.36 \pm 0.25^{b.A}$	$3.37 \pm 0.53^{b,A}$
	1	$3.47 \pm 1.11^{a,A}$	$3.39 \pm 1.70^{a,AB}$	$2.48 \pm 1.54^{a,AB}$	$2.79 \pm 1.10^{a.A}$	$2.97 \pm 0.71^{a.A}$	$3.69 \pm 0.20^{a,A}$
	2	$3.57 \pm 1.62^{a,A}$	$1.24 \pm 0.34^{a,B}$	$1.33 \pm 0.46^{a,B}$	$2.80 \pm 0.71^{a.A}$	$2.61 \pm 0.98^{a,A}$	$1.87 \pm 0.00^{a,B}$
	3	$3.43 \pm 1.40^{a,A}$	$2.16 \pm 0.30^{a,AB}$	$1.39 \pm 0.21^{a,AB}$	$2.27 \pm 1.58^{a.A}$	$3.01 \pm 1.04^{a,.A}$	$1.77 \pm 0.24^{a,B}$
	4	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*

[abc]ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

[ABCDE]ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

<10* หมายถึง จำนวนยีสต์และราที่นับได้น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม

Con หมายถึง ไส้กรอกอีสานกลุ่มควบคุม

L2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2%

L4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 4%

B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 2%

B4% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมแบคเทอริโอซิน 4%

L2%+B2% หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกรดแลกติก 2% ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 2%

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซินและสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยของไส้กรอกอีสาน โดยใช้สารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในการศึกษา โดยในการศึกษาการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลองโดยใช้สารละลายกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินพบว่ากรดแลกติกที่ความเข้มข้น 3 และ 4% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum, *E. coli* และ *S. aureus* ที่ระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง โดยจำนวนเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้กรดร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน 2 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากขึ้น ที่ระยะเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง เมื่อนำกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซินมาเติมลงในไส้กรอกอีสานพบว่าภายใต้กระบวนการหมักสองแบบ ได้แก่ การหมักในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C และการหมักโดยการแขวนที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองพบว่ากระบวนการหมักที่แตกต่างมีผลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์และคุณลักษณะต่างในไส้กรอกอีสาน ในกระบวนการหมักแบบแขวนที่อุณหภูมิห้องพบว่าจำนวนเชื้อ yeast/mold ในกลุ่มที่เติม กรดแลกติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินมีจำนวนต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มอื่นจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ในกระบวนการหมักแบบบรรจุในถุงสุญญากาศกลับไม่พบเชื้อยีสต์รา (น้อยกว่า 10 cfu/g)ในการหมักวันที่ 3 ในการศึกษาค่า pH พบว่าไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซิน ส่วนค่าสีพบว่าพบว่าในกลุ่มที่เติมกรดแลกติกและสารแบคเทอริโอซิน มีค่าความสว่างมากว่า (L*) และค่าสีแดง (a*) น้อยกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปในทางเดียวกันในสภาวะการหมักทั้งสองแบบ จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสานพบว่ากลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคเทอริโอซินมีจำนวนเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในการหมักแบบแขวนที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการหมักในถุงสุญญากาศตรวจไม่พบเชื้อ *S. aueus* และจากการทดสอบการชิมพบว่าผู้บริโภคมีความพึงพอใจไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมกรดแลกติกร่วมกับแบคเทอริโอซินมากที่สุด ดังนั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานให้มีความปลอดภัยมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กฤษณา ประภัสสรวัฒนา, สาวิตรี วทัญญูไพศาล และจันทร์พร ผลากรกุล. 2552. การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินเป็นหัวเชื้อในการทำไส้กรอกเปรี้ยว. ใน**การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. 17-20 มีนาคม 2552**. หน้า 516-523. กรุงเทพฯ.

คมแข พิลาสมบัติ. 2550. **จุลินทรีย์เนื้อสัตว์.** เอกสารประกอบการสอน. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ชลัท ศานติวรางคนา. 2542. **การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งจากน้ำนมโคในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ.

ชนัญญา กงทะสร. 2547. **ผลของสารแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลคติกต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ณัฐธิดา แปวกระโทก. 2554. **ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน *Weissella cibraria* SI21 และ *Lactobacillus plantarum* RS49 ต่อ *Stapylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท วิทยาศาสตร์การอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มัลลิกา ไชยวุฒิ. 2555. **ผลของส่วนผสมของไส้กรอกอีสานและกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* RS49 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อ *Salmonella* Anatum ในระหว่างการหมัก.** วิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

มัลลิกา ไชยวุฒิ. 2556. **ผลของส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกอีสานและการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน *Lactobacillus plantarum* RS49 ต่อ *Salmonella*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

วัชรียา วงษ์หาญ, คณิต วิชิตพันธุ์ และ สุกานดา วิชิตพันธุ์. 2558. การผลิตไส้กรอกอีสานเสริมแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอสิด (กาบา) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus plantarum* SKKL1. ใน **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 34. 27 มีนาคม 2558.** หน้า 654-664. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

สุมาลี เหลืองสกุล. 2539. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ชัยเจริญ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 25445. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีเรียที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 23 (2) : 145-160.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **แบคทีเรียแลกติก.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาพพิมพ์.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. **ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อ *Salmonella* ในการหมักแหนม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหาร เลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหา *Salmonella* ในแหนม. ใน**การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34** หน้า 272-279. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อพัชชา จินดาประสริฐ, กัญญา จิระเจริญรัตน์ และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2557. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ ของไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Weisella cibaria.* ใน**การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 5. 25-26 มิถุนายน 2557**. หน้า 24-28. กรุงเทพฯ.

Abee, T. 1995. "Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms." **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.

Adams, M.R. and Hall, C.A. 1988. "Growth inhibition of food-born pathogens by lactic acid and acetic acid and their mixture." **J. Food Sci. Technol**. 23 : 287-292.

AOAC. 2006. Chapter 17 AOAC Official Method 966.23c-24. In Horwitz, W. and W. Latimer, **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. [Online]. Available: http://www.fda.gov/Food/ FoodScience Research/ Laboratory Methods/ucm 071429.html. [สืบค้นวันที่ 9 ธันวาคม 2556]

Bayles, D., Annous, B.A. and Wilkinson, B.J. 1996. "Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature down shock and growth at low temperatures." **Appl. Environ. Microbiol.** 62(3) : 1116-1119.

Bolton, D.J., Pearce, R.A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. and Harrington, D. 2002. "Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems." **J. Appl. Microbiol**. 92 : 893-902.

Bruno, M.E.E. and Montville, T.J. 1993. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria." **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 3003-3010.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chokesajjawatee, N., Pornaem, S., Young-Gun Zo, Kamdee, S., Luxananil, P. Wanasen, S. and Valyasevi, R. 2009. "Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product." **Food Microbiol.** 26 : 547–551.

Colak, H., Hampikyan, H. Ulusoy, B. and Bingol, E.B. 2007. "Presence of *Listeria monocytogenes*in Turkish style fermented sausage (sucuk)." **Food Control.** 18 : 30-32.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. **Antimicrobial components from lactic acid bacteria**, pp. 127-159. *In* S. Salminen and A. Von Wright (eds.). Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York.

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. **Antimicrobial potential of lactic acid bacteria**. *In* De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (ed.). Bacteriocins of lactic acid bacteria - Microbiology, Genetics and Applications. New York : Chapter and Hall.

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. **Nisin, a antibiotic produced by Lactococcus lactis subsp. lacties : properties, biosynthesis, fermentation and application**. *In* : bacteriocin of lactic acid bacteria : microbiology , genetic and applications. Blackie Academic and Profession, London, England.

Duffy, G., Cloak, O.M., O' Sullivan, M.G., Guiller, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S. and McDowell, D.A. 1999. "The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products." **Food Microbiol**. 16 : 623-631.

Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.

Ennahar, S., Zendo, T. Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Investigation of bacetriocin production and purification from *Nukadoko* isolates displaying antimicrobial activity." **Japanese. J. Lactic Acid Bacteria**. 10: 29-36.

Gonzalez-Fandos, M.E. Sierra, M., Garcia-Fernandez, M.C. and Otero, A. 1999. "The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spinish dry sausages (Chorizo and Salchichon). **Meat Sci**. 52 : 411-419.

Gonçalves, A.C., Almeida, R.C.C., Alves, M.A.O. and Almeida, P.F. 2005. "Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* population on chicken breast meat." **Food Control.** 16 : 617-622.

Hwang, C.A., Porto-Fett, A.C.S., Juneja, V.K., Ingham, S.C., Ingham, B.H. and Luchansky, J.B. 2009. "Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmonella Typhimurium during fermentation, drying and storage of soudjouk-style fermented sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 129 : 244-252.

Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., Egounlety, M. and Sossa, C. 2007. "Characterization and Biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter culture." **Int. J. Food Microbiol.** 114 : 342-351.

Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P. and Nurmi, E. 2001. "Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures." **Food Microbiol.** 18 : 75-85.

Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. 2007. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria." **Food Microbiol.** 24 : 82-88.

Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. 2003. "Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage." **Int. J. Food Microbiol.** 80 : 201-210.

Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Gomes Neto, N.J. and De Souza, E.L. 2010. "Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids." **Int. J. Food Microbiol.** 137 : 312-316.

Phromraksa, P., Wiriyacharee, P., Rujanakraikarn, L. and Pathomrungsiyungkul, P. 2005. "Using Potasium Sorbate and Vaccuum Packageing to Extend Shelf Life of Thai Fermented Pork Sausages (Sai Krok Prew)." **CMU Journal.** 4(1) : 27-38.

Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Doan Duy, L.N. 2015. In Vitro Inhibitory Activities of Lactic Acid Solution and Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria Isolate KL-1 against Food Pathogenic Bacteria. **In International Conference on Engineering and Applied Science. July 2015. Hokkaido Japan.**

Pipek, P., P. Fíla, J. Jelení-Ková, J. Bryechta and M. Miyahara, 2004. Technological aspects of acid decontamination of carcasses. Chem Listy. 98 : 885-869

Rose, N.L., Sporn, P., Stiles, M.E. and Mcmullen, L.M. 1999. "Inactivation of Nisin by Glutathione in Fresh Meat." **J. Food Sci.** 64 : 760-762.

Schillinger, U. and Lucke, F. 1989. "Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat." **Appl.Environ Microbiol.** 55(8) : 1901-1906.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swetwiwathana, A. and Lotong, N. 1999. Selection of the bacteriocin producing lactic acid bacteria from Nham (Thai Fermented Meat). **Proceeding of international conference on ASIAN network on Microbial Researches." November 29- December 1 , 1999**. Chaingmai, Thailand. PIII / 16 : 543-548.

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. "Maturation of Nham-A Thai fermented meat product." **Fleisch Wirtschaft Int.** 22(3) : 46-49.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S. Khopaiboo, P and Griffiths, M.W. 2006. "Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress." **J. Food Prot.** 69 : 2747-2753.

Van Netten , P., Mossel, D. A. A. and Huis In' t Vel, J. 1995. "Lactic acid decontamination of fresh meat pork carcasses : a pilot plant study." **Int. J. Food Microb.** 25 : 1-9.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinonta, T., Kittikuna, C., Thepkasikula, P. and Panya, A. 2006. "Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculums levels of *Lactobacillus curvatus*." **LWT**. 39 : 814-826.

Warriss, P.D. 2000. **Meat Science**. CABI publishing, UK.

Woolthuis, C. H. J. and Smulders, F. J. M. 1985. "Microbiological contamination of calf carcasses by lactic acid sprays." **J. Food Prot.** 48 : 832-837.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การประเมินความพึงพอใจต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกอีสาน

วันที่.....

ลำดับที่.....

<u>ตอนที่ 1</u> รายละเอียดของผู้ประเมิน

1.1 เพศ O ชาย O หญิง

1.2 กรุณาระบุช่วงอายุของท่าน

O ต่ำกว่า 20 ปี O 20 - 35 ปี O 36 - 50 ปี O สูงกว่า 50 ปี

1.3 รายได้ของท่านต่อเดือน O น้อยกว่า 5,000 บาท O 5,001 - 15,000 บาท

O 15,001 - 25,000 บาท O มากกว่า 25,000 บาท

1.4 อาชีพ O นักเรียน นักศึกษา O รับราชการ พนักงานของรัฐ

O บริษัทเอกชน O ทำงานส่วนตัว

O อื่น ๆ โปรดระบุ.....

คุณชอบรับประทานไส้กรอกอีสานหรือไม่

O ไม่ชอบมาก O ไม่ชอบ O ไม่ค่อยชอบ O เฉยๆ

O ค่อนข้างชอบ O ชอบ O ชอบมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรุณากลั้วปากด้วยน้ำดื่มก่อนชิมตัวอย่างแรก

ก่อนชิมตัวอย่างถัดไป กรุณาทานแครกเกอร์เล็กน้อย ตามด้วยการกลั้วปากด้วยน้ำดื่มอีกเล็กน้อย (ท่านสามารถบ้วนทิ้งลงในถ้วยสูงที่เตรียมไว้ให้)

<u>ตอนที่ 2</u> กรุณาให้คะแนนระดับความชอบของท่าน (จาก 1 ถึง 7 คะแนน) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ท่านกำลังทดสอบชิมทีละตัวอย่าง โดยกรอกคะแนนลงให้ตรงกับรหัสตัวอย่างในตารางด้านล่าง

คะแนน		ระดับความชอบ
7	=	ชอบมากที่สุด
6	=	ชอบมาก
5	=	ชอบ
4	=	เฉยๆ
3	=	ไม่ชอบ
2	=	ไม่ชอบมาก
1	=	ไม่ชอบมากที่สุด

ลักษณะของผลิตภัณฑ์	รหัสผลิตภัณฑ์		
สี			
ลักษณะปรากฏ			
เนื้อสัมผัส			
กลิ่นรส			
ความเปรี้ยว			
ลักษณะโดยรวม			

ความคิดเห็นเพิ่มเติม

.....

.....

.....ขอบคุณที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ☺

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

1. ชื่อ - นามสกุล ดร. คมแข พิลาสมบัติ

Dr. Komkhae Pilasombut

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. สถานที่ติดต่อ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
วท.บ. (เกษตรศาสตร์/สัตวศาสตร์)	2534	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเทศไทย
วท.ม. (สัตวศาสตร์)	2540	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเทศไทย
ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)	2549	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

5. ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2540 - ปัจจุบัน อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

6. สาขาที่มีความชำนาญ

จุลชีววิทยาเนื้อสัตว์

<u>ผู้ร่วมวิจัย</u>

1. ชื่อ - นามสกุล นางอังคนา ทุมดี

Mrs. Aungkana Tumdee

2. สถานที่ติดต่อ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T145147

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้