รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัยและผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อน
Selection of lactic acid bacteria of safety and thermotolerant bacteriocin-production

ผศ.ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์
ผศ.ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี
ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก งบประมาณเงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัยและผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อน

Selection of lactic acid bacteria of safety and thermotolerant bacteriocin-production

ผศ.ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์
ผศ.ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี
ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

RCH
W662 ก
2559

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 147853
วัน.เดือน.ปี 15 ก.ค. 2560

.b 12862708
.i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก งบประมาณเงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัยและผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อน

แหล่งเงินทุน : งบประมาณเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 226,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2559

หัวหน้าโครงการวิจัย : ผศ. ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์

ผู้ร่วมวิจัย : ผศ.ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

หน่วยงาน : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมักพบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษและมีโอกาสในการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนจากวัตถุดิบเนื้อสัตว์ ซึ่งการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อในกระบวนการผลิตจะส่งเสริมให้อาหารที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคยิ่งขึ้น โดยงานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นที่ผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตหมูส้ม โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 42 ตัวอย่าง ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* อีกทั้งสามารถรอดชีวิตในสภาวะกรดที่ค่า pH 2 และ 3 และในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1% ทั้งนี้มีแบคทีเรียแลคติกเพียง 8 ไอโซเลท ได้แก่ KL1011C2, KL1011-1C2, KL1012C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และ KL8031C1 ที่สามารถรอดชีวิตในแบบจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองได้มากกว่า 60 % อีกทั้งสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ โดยไวต่อการตอบสนองยาปฏิชีวนะ penicillin, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin ซึ่งไอโซเลท KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 มีความสามารถในการรอดชีวิตที่ pH 2, 3, 4 และ 7 ในระบบทางเดินอาหารจำลองเป็นเวลา 360 นาที ได้ถึงร้อยละ 90 และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ KL1012C2, KL1011C2 และ KL601-21B1 สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Lactobacillus plantarum* strain LY-78 (Accession no. CP015308) ถึง 100% และตรวจเบื้องต้นไม่พบการสร้างไบโอเจนิกเอมีน จากนั้นเมื่อทำการทดสอบในแบบจำลองหมูส้ม พบว่าไอโซเลท KL1012C2 และกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 สามารถเจริญในแบบจำลองหมูส้มได้มากกว่า และทำให้ค่า pH ลดลงเร็วกว่าไอโซเลท KL1011C2 และ KL60121B1 ($P<0.05$)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูล้ม พบว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 เจริญและผลิตกรดได้มากกว่ากลุ่มควบคุมและเติมกล้าเชื้อ TISTR543 ทำให้ค่า pH อย่างรวดเร็วภายหลังการหมัก 1 วัน ($P<0.05$) อีกทั้งกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ coliform, *E. coli*, *S. aureus* ยีสต์และราได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม ค่า pH ที่ลดลงทำให้ทุกกลุ่มมีค่าการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่นานขึ้น ($P<0.05$) และส่งผลต่อค่าสีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม โดยกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 มีค่าความสว่าง (L*) และค่าสีแดง (a*) ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 ($P<0.05$) ในขณะที่ค่าสีเหลือง (b*) ของทุกกลุ่มมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ($P<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (pH $\leq$ 4.6) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดี โดยมีค่าความแข็งค่าการเกาะรวมตัวกัน ค่าความเหนียวคล้ายยางมากกว่ากลุ่มควบคุมควบคุม และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 ($P<0.05$) นอกจากนี้กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี โดยมีคะแนนการยอมรับด้านกลิ่นเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติ และคุณภาพโดยรวมมากกว่ากลุ่มควบคุมควบคุม และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 ($P<0.05$) อีกทั้งกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 ยังมีปริมาณ putrescine, spermidine, spermine, tyramine, histamine และ tryptamine น้อยกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อTISTR543 ($P<0.05$) ดังนั้นจึงควรใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก KL1012C2 ในผลิตภัณฑ์หมู เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและความน่ารับประทานของผลิตภัณฑ์ และนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่นๆ ได้ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : การคัดเลือก, แบคทีเรียแลกติก, ไบโอเจนิกเอมีน

Research Title: Selection of lactic acid bacteria of safety and thermotolerant bacteriocin-
Researcher: Assist. Prof. Dr. Pussadee Tangwatcharin
Assist. Prof. Dr. Supaluk Sorapukdee
Assist. Prof. Dr. Komkhae Pilasombut
Faculty: Agricultural technology
Department: Animal Production Technology and Fisheries

ABSTRACT

Fermented meat products are often contaminated with foodborne pathogenic microorganisms and have opportunity to create biogenic amines from meat raw materials. The application of the starter culture in the production process will enhance the food safety for consumers. The objective of this study was to isolate and select primary lactic acid bacteria with probiotic properties from fermented meat products. The 26 isolates of lactic acid bacteria (LAB) were isolated in 42 fermented meat products. It was able to have the ability to inhibit four pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*. They also survived in acidic conditions at pH 2 and 3, and at concentrations of 0.3, 0.6 and 1% with bile salts. There were only 8 LABs, namely KL1011C2, KL1011-1C2, KL1012C2, KL2021B1. KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 and KL8031C1, which can survive in gastrointestinal model more than 60%. It can also be resistant to antibiotics. By susceptibility to penicillin, tetracycline, chloramphenicol, and erythromycin antibiotics, KL1011C2, KL1012C2 and KL60121B1 have a survival rate of up to 90 percent in the gastrointestinal tract for 360 minutes. Based on sequencing, KL1012C2, KL1011C2 and KL601-21B1 can be classified as *Lactobacillus plantarum* strain LY-78 (Accession no. CP015308) up to 100% and preliminary studies did not find any biogenic amines. Then, when tested in the Mu som model, the LAB starter culture of KL1012C2 and commercial starter culture TISTR543 group were able to grow more than the control group and reduced pH faster than isolates KL1011C2 and KL60121B1 in the Mu Som model ($P < 0.05$)

Application of LAB as starter culture in Mu-Som product, It was found that the KL1012C2 cultured group was able to grow and produce acid better than control and supplemented with TISTR543, resulting in rapid pH after 1 day of fermentation ($P < 0.05$).

KL1012C2 was also able to inhibit the growth of coliform, E. coli, S. aureus, yeast and mold faster than the control group ($P < 0.05$). However, the decrease in pH resulted in a significant increase in weight loss over the longer fermentation period ($P < 0.05$). Group KL1012C2 had higher brightness (L *) and red (a *) than control group. And TISTR 543 ($P < 0.05$), while the yellow color (b *) of all groups decreased when the fermentation period was longer ($P < 0.05$). At the end of the fermentation process (pH ≤ 4.6), the KL1012C2 group was characterized by good texture. The hardness, cohesiveness and gumminess value was higher than control group and treated with TISTR 543 ($P < 0.05$). In addition, the KL1012C2 group has good sensory quality. There is an acceptance score for sourness, flavor and taste and overall quality would rather than control and treated with TISTR 543 ($P < 0.05$). In addition, the KL1012C2 group had less putrescine, spermidine, spermine, tyramine, histamine and tryptamine than the control group and TISTR543 group ($P < 0.05$). Therefore, the KL1012C2 starter culture should be used in Mu som products. To increase the safety and appearance of the product and also to apply in other fermented meat products in the future.

Keywords : Selection, Lactic acid bacteria, biogenic amines

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนงบประมาณเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (รหัสโครงการ 2559-01-04-019) ที่ได้ให้งบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้

อีกทั้ง คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณหทัย วิจิตโรทัย และคุณจรรยา คงฤทธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ และคุณสุภาพรรณ ศฤงฆาร ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผุสดี ตังวัชรินทร์
ศุภลักษณ์ สรภักดี
คมแข พิลาสมบัติ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย 3

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แบคทีเรียแลคติก 4

2.1.1 ลักษณะของกระบวนการหมัก 4

2.1.2 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 6

2.2 ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine : BAs) 17

2.2.1 กลไกการสร้างและชนิดของไบโอเจนิกเอมีน 17

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 18

2.2.3 ไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 20

2.2.4 พิษของไบโอเจนิกเอมีน 23

2.3 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 24

2.3.1 คุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 25

2.3.2 ความสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสัตว์และผลิตภัณฑ์ 26

2.3.3 การผลิตกรดในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 26

2.3.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 31

2.3.5 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส 31

2.4 ผลิตภัณฑ์หมูส้ม 35

2.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์หมูส้ม 35

สารบัญ

หน้า

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย 36
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ 36
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 37
3.3 ขอบเขตของงานวิจัย 39
3.3.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกในระดับต่ำ 41
3.3.2 การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย 45
3.3.3 การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม 46
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 53
4.1 การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย 53
4.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น. 53
4.2 การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก 64
4.3.1 การบ่งชี้สายพันธ์โดยใช้16S rRNA gene ลักษณะทางอณูวิทยาด้วย partial 16S DNA sequence analysis 65
4.3 การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม 65
4.3.1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม 65
4.4.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 67
4.4.3 ด้านคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 71
4.4.4 ผลของการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 76
4.4.5 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 83
4.4.6 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory) 87
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 89
5.1 สรุปผลการทดลอง 89
5.2 ข้อเสนอแนะ 90

สารบัญ

หน้า

บรรณานุกรม 91

ภาคผนวก 107

ภาคผนวก ก 108

ภาคผนวก ข 116

ภาคผนวก ค 119

ภาคผนวก ง 121

ภาคผนวก จ 132

ภาคผนวก ฉ 137

ภาคผนวก ช 139

ประวัติผู้วิจัย 152

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 อัตราการรอดชีวิตของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ในน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5 9

2.2 ความทนต่อเกลือน้ำดี *L. fermentum* วัดเป็นเวลาล่าช้าจากความเข้มข้น 0.3% ของเชื้อ จำนวน 11 สายพันธุ์ 10

2.3 เปอร์เซ็นต์การจัดเรียงตัวของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ 11

2.4 กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 5 สายพันธุ์ 12

2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกให้ความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) 13

2.6 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลอง 16

2.7 ไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น 18

2.8 ไบโอเจนิกเอมีนในอาหารและผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย 23

2.9 Texture profile analysis (TPA) ของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก 34

4.1 ความสามารถในยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลคติก ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร 53

4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร 55

4.3 ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH ต่างๆ 56

4.4 เปอร์เซ็นต์การรอดของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ 57

4.5 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และ ความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วย broth microdilution method 62

4.6 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ partial 16S rDNA 65

4.7 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน total coliform, fecal coliform และ *E. coli* (MPN/g) ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก 72

4.8 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH ≤ 4.6) 87

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดินอาหารเทียม และในลำไส้เทียม (pH 8) 8

2.2 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน 17

2.3 การสะสมของสารไบโอเจนิกใน Nham จากเนื้อหมูสด (a และ b) เนื้อหมูที่เก็บรักษาที่ 30 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (c และ d) การเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน (e และ f) และการเก็บรักษาที่ 20 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน (g และ h) ระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน 22

2.4 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และการลดลงของค่า pH ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน 27

2.5 การศึกษาทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติกที่เติมกล้าเชื้อ *L. casei* ATCC 393 28

2.6 ผลของการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 และ free *L. casei* ATCC 393 ต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มสุกของไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติก 29

2.7 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ค่า pH และกรดอินทรีย์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก โดยแถบแสดงค่าความแปรปรวน (n = 3) 30

2.8 SDS–PAGE pattern ของการแยกโปรตีนจากแหนมที่หมักเป็นเวลาที่ 0 และ72 ชั่วโมง 31

2.9 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการบ่มสุก (14 วัน) 32

2.10 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (40 วัน) 32

4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในระบบทางเดินอาหารจำลอง 59

4.2 การสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมกรดอะมิโน 60

4.3 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 1492R ในการทำ PCR 64

4.4 การเจริญของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ไอโซเลท KL1011C2 KL1012C2 และ KL60121B1 ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ 66

4.5 ค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ไอโซเลท KL1011C2 KL1012C2 และ KL60121B1 ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ 66

4.6 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจพบในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม 67

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.7 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) 69

4.8 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) 70

4.9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนยีสต์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก 74

4.10 ผลการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวน *S. aureus* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก 75

4.11 รูปแบบของโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 77

4.12 ปริมาณสารประกอบไบโอเจนิกในเนื้อหมูสดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 78

4.13 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ 80

4.14 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมูส้ม 84

4.15 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม 86

4.16 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ ด้านสี ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่นเปรี้ยว ด้านกลิ่นและรสชาติ ด้านเนื้อสัมผัส และด้านคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH ≤ 4.6) 88

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูล *Lactobacillaceae* เป็นแกรมบวกไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาว ท่อนสั้นกลมหรือเกาะกันเป็นสายยาว การเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) หรือบางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารช่วยในการเจริญ และวิตามินต่างๆ เช่น ไบโอติน (Biotin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น สามารถทนกรดได้ดี แหล่งที่พบแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากนม อาหารหมักดองต่างๆ (ชาญวิทย์ ยศโชติ และ จุฑามาส งั่วลำหิน, 2551) ดังนั้นในปัจจุบันการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักจึงเกิดขึ้นอย่างแพร่หลาย เพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ และการประยุกต์ใช้ในผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดย Dicks *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาผลของการเติม *L. plantarum* และ *L. curvatus* ที่สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตซาลามี่เนื้อนกกระจอกเทศ พบว่า *L. plantarum* สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้ดี นอกจากนี้ Cenci-Goga *et al.* (2008) ใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์จากนมเป็นกล้าเชื้อในการทำ Salame nostrano (ไส้กรอกหมักเค็มแบบแห้งของอิตาลี) พบว่า Salame nostrano ที่ไม่เติมกล้าเชื้อมีจำนวนจุลินทรีย์มากกว่า เนื้อสัมผัสแข็งกว่า และพบจุลินทรีย์ก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบซาลามี่ที่เติมกล้าเชื้อซึ่งมีรสชาติเค็มเล็กน้อย ฉ่ำน้ำ และเป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภคมากกว่า นอกจากนี้ Belgacem *et al.* (2008) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจาก Gueddid ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศตูนีเซีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ MMZ 04 09 13 และ 17 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าทั้งหมดเป็น *Enterococcus faecium* และแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำงานได้ดีในช่วง pH 3-9

แต่อย่างไรก็ตาม เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มักพบสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน โดยเฉพาะ tyramine, cadaverine, putrescine, spermidine และ spermine (Santos-Buelga *et al.*, 1986; Sayem-El-Daher *et al.*, 1984) เนื่องจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตเอนไซม์ decarboxylase ย่อยสลายกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน ซึ่งเป็นที่มีความเป็นพิษหรือทำให้เกิดอาการแพ้ เช่น เกิดผื่นคัน ลมพิษ คลื่นเหียน อาเจียน ท้องร่วง ปวดศีรษะ วิงเวียน หน้าแดง และมีเหงื่อออกมาก หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตต่ำ และบางรายอาจอาจมีอาการช็อกและเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะผู้ที่รับประทานยาโมโนเอมีนออกซิเดสอินฮิบิเตอร์ (monoamine oxidase inhibitor; MAOI)

ซึ่งพบมากในผู้ป่วยที่มีอาการทางจิตแบบซึมเศร้า นอกจากนี้ยังพบว่าสารในกลุ่มไดเอมีน ได้แก่ พูทรีซีน และคาดาเวอรีน สามารถทำปฏิกิริยากับไนไตรต์ (nitrite) เกิดเป็นไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Shalaby., 1996) อีกทั้งยังมีรายงานว่าแบคทีเรียแลกติก โดยเฉพาะ *L. sakei, L. curvatus* และ *L. plantarum* มียีนส์ที่เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ chloramphenical acetyltransferase (*cat*-TC) และยีนส์ดื้อต่อ erythromycin *erm*B และ tetracycline (*tet*l *tet*M และ *tet*S) ซึ่งอาจมีการถ่ายทอดยีนส์ดื้อยาเหล่านี้ให้กับจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ โดยได้มีการตรวจพบแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สไลด์พร้อมบริโภค โดยเฉพาะ ไส้กรอกหมักแห้งพบแบคทีเรียแลกติกที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเตตราไซคิน จำนวน 5 ×10 – 2.23 × 10^4 cfu/g (Gevers *et al.*, 2000) จึงทำให้การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก มักมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยว่าการกล้าเชื้อที่ใช้เป็นแบคทีเรียผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่การผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อนและปลอดภัย และการรอดชีวิตแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์แหนม เพื่อเก็บเป็นกล้าเชื้อในการนำไปประยุกต์ในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1 คัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัย ที่ไม่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

1.2 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่การผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อน

1.3 บ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกแบคทีเรียแลกติกที่การผลิตแบคเทอริโอซินชนิดทนความร้อนและปลอดภัย

1.4 ศึกษาการรอดชีวิตแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์แหนม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัย ได้แก่ การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ และการศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติก

การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัย โดยบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้ 16S rRNA gene ลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16P rDNA sequence

การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ได้แก่ การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

1.4 ระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย

12 เดือน (เริ่มตั้งแต่ 1 ต.ค. 2558- 30 ก.ย. 2559)

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. คัดแยกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัย ที่ไม่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิก เอมีน และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ

2. สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยระดับชาติ (National Conference)

3. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญในผลิตภัณฑ์หมูส้มได้

4. สามารถนำแบคทีเรียแลคติกไปประยุกต์ ต่อยอดงานวิจัยเป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก และจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาว ท่อนสั้นหรือกลม หรือเกาะกันเป็นสายยาว รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ความต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อน ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารช่วยในการเจริญ และวิตามินต่างๆ เช่น ไบโอติน (Biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น และต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดหมักได้โคโลนีขนาดเล็ก สามารถทนกรดได้ดี อาหารที่มักพบแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากนม อาหารหมักดองต่างๆ

2.1.1 ลักษณะของกระบวนการหมัก

แบคทีเรียแลคติกที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อสร้างพลัง และกรดอินทรีย์จากกระบวนการหมัก แบ่งกระบวนการหมักออกเป็น 3 ลักษณะ (Wood and Holzapfel., 1995 ; Litchfield., 1996) ดังนี้

2.1.1.1 Obligative homofermenter หมายถึง แบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว โดยมีกลไกการเกิดกรดแลคติกเป็นไปตาม Embden-Meyerhoff-Parnas pathway เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็นแลกเตส (lactate) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตกรดแลคติกชนิด D และกรดแลคติกชนิด L ได้ประมาณ 95% ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีรูปร่างเป็นแบบแท่งได้แก่ *Lactobacillus* และรูปร่างกลมได้แก่ *Leuconostoc* และ *Enterococcus* เป็นต้น

2.1.1.2 Facultative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดแลคติก 50% กรดอะซิติก หรือเอทานอล 25% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 25% ผ่าน Phoshoketolase pathway สามารถผลิตน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น เฮกโซส เพนโตส อาราบิโนส ไรโบส ไซโรส ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*

2.1.1.3 Obligative heterofermenter หมายถึงแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก 1 โมล กรดอะซิติก หรือเอทานอล 1 โมล และคาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล ผ่าน phoshoketolase pathway สามารถผลิตน้ำตาลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคสได้ เช่น เฮกโซส เพนโตส ได้ดี ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus brevis* และ *L. buchneri*

แบคทีเรียแลคติกผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยเอนไซม์ flavoprotein oxidase หรือ nicotinamide adenine dinuclcotide (NADH) peroxidase ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยา oxidation ของ sulfhydryl groups ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และจากการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้รูที่เยื่อหุ้มเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นทำให้สูญเสียความสามารถในการย่อยให้สารผ่านเข้าออก (Kong and Davison., 1980)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentative bacteria (Ammor *et al.*,. 2006) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคาร์บอนได ออกไซด์ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามคาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบพวกที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Farber, 1991) และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 20-50% (v/v) สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ (Lindgren and Dobrogosz., 1990)

ไดอะซิทิลเป็นสารประกอบที่มีกลิ่นหอมที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นจากกระบวนการใช้ citrate (Ammor *et al.*, 2006) ไดอะซิทิลสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบโดยจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine utilization ซึ่ง Jay (1982) พบว่า แบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อไดอะซิทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยไดอะซิทิลที่ความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ และไดอะซิทิลที่ความเข้มข้น 344 µg/ml สามารถยับยั้ง *Listeria Salmonella Yersinia E. coli* และ *Aeromonas* ได้

แบคเทอริโอซินสารจำพวกโปรตีน ซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซมของแบคทีเรียมีผลยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Spellhaug and Harlander, 1989) กลไกการยับยั้งเกิดจากแบคเทอริโอซินทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูจึงเกิดการรั่วไหลของโปรตอนภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดความไม่สมดุลภายในเซลล์ (Montville *et al.*, 1995)

สมาชิกที่สำคัญในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ สกุล *Streptococcus Vagococcus Lactococcus Enterococcus Pediococcus Tetragenococcus Aerococcus Leuconostoc Carnobacterium* และ *Lactobacillus* เป็นต้น การจัดจำแนกสกุลของแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้อาศัยทั้งลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี ปัจจุบันได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการจัดหมวดหมู่ ทำให้มีความชัดเจนถูกต้องมากขึ้น (วรรณดี บัญญัติ และคณะ, 2542)

2.1.2 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก (Ammor *et al.*,. 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ ดังนั้นในปัจจุบันการแยก และคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เช่น Belgacem *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลกติกจาก Gueddid ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศตูนีเซีย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ MMZ 04 09 13 และ 17 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าทั้งหมดเป็น *Enterococcus faecium* และแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำงานได้ดีในช่วง pH 3-9 ไวต่อ α-chymotrypsin trypsin และ proteinase K แต่ไม่ไวต่อ lysozyme และ lipase

Liu *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลคติกจาก Xuan-Wei Ham ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศจีน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้สายพันธุ์ 31-1 เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* 31-1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีชื่อว่า pentocin 31-1 แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีขนาด 14.2 kDa และสามารถยับยั้ง *Listeria* spp. *Staphylococcus* spp. *Bacillus* spp. *Lactobacillus* spp. *Streptococcus* spp. *Pediococcus* spp. และ *Escherichia* spp. มีสมบัติทนความร้อน มีความคงตัวในช่วง pH กว้าง และไวต่อ protease

Lee *et al.* (2006) แยกแบคทีเรียแลกติกจากกิมจิ ซึ่งเป็นอาหารหมักของประเทศเกาหลี และศึกษาความเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอก ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมด 31 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกได้ดีที่สุด คือ *Lactobacillus plantarum*

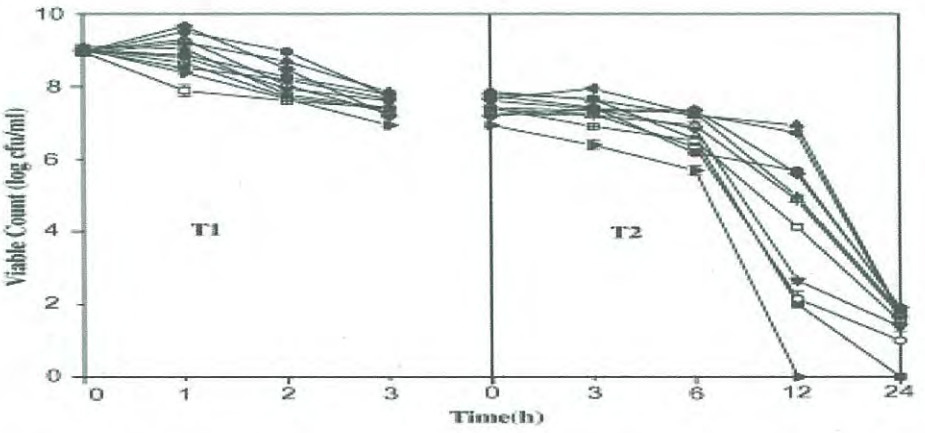
Sawatari *et al.* (2005) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปเส้นหมักของจีน พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่แยกมาจากอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ผักดอง เนย ผลิตภัณฑ์นม น้ำมะพร้าว ไส้กรอก ก๋วยเตี๋ยวเส้นหมัก หน่อไม้ดอง น้ำแอปเปิ้ล และกะหล่ำปลีดอง เป็นต้น จากทั้งหมด 46 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus plantarum* 6 สายพันธุ์ คัดเลือกได้ 9 สายพันธุ์ คือ *L. pentorus* จำนวน 3 สายพันธุ์ และ *L. plantarum* 6 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดดีที่สุด และผลิตภัณฑ์ (เส้นบะหมี่) ที่ได้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคคือ *L. plantarum* NRIC 0380 ที่แยกมาจากผักดองของไทย ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้11 g/kg เส้นบะหมี่หลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง และระดับพีเอชลดลงจาก 7.9 เป็น 3.9 โดยระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมที่สุด คือ 1.5 ชั่วโมง ที่ระดับพีเอช 7.5 เส้นบะหมี่ที่ได้จะมีความเหนียวนุ่ม ยืดหยุ่นดี และมีรสเปรี้ยวเล็กน้อย

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จำนวน 179 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 327 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าว 67 สายพันธุ์ เมื่อนำทั้ง 67 สาย

พันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ (*Stapphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus cereus Shigella sonnie S. flexneri Proteus vulgaricus P. rettgeri Enterobacter cloacae E. aerogenes Escherichia coli* ATCC 25922 *E. coli* O157:H7 *Salmonella* Typhimurium *S.* Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus*) โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร คือสายพันธุ์ LA6 LA13 LA71 LA102 และ LA198 ซึ่ง LA71 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหนมเมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum*

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2543) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย 329 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 212 ไอโซเลท ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* 198 ไอโซเลท และ *Pediococcus* 14 ไอโซเลท เมื่อนำทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium 3230 โดยวิธี agar spot พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก 193 ไอโซเลท เกิดจากกรดอินทรีย์ และเมื่อกำจัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลท เท่านั้นที่แสดงผลการยับยั้ง ซึ่ง 4 ไอโซเลท จาก 10 ไอโซเลท ดังกล่าวพบว่าแยกได้จากผักดอง เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* ได้แก่ สายพันธุ์ PS2 PS5 และ ST7 ส่วนสายพันธ์ ST16 เป็น *L. brevis*

Bao *et al.* (2010) ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 90 สายพันธุ์ ในกระเพาะจำลองและลำไส้เทียม พบว่า 35 สายพันธุ์ของ *L. fermentum* เจริญได้ดีที่ ($\Delta A_{600\ nm} \geq 0.500$) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดที่ pH 3.0 ปริมาณรวม 38.9% ซึ่งได้รับการคัดเลือกสำหรับความทนต่อการเคลื่อนย้าย ผลที่ได้อยู่ที่ความทนของสายพันธุ์ *L. fermentum* ที่ pH ต่ำ ก่อนที่จะถึงส่วนปลายของระบบลำไส้ และผลของโปรไบโอติก แบคทีเรียเหล่านี้ต้องรอดชีวิตในช่วงที่ผ่านกระเพาะอาหาร และส่วนบนของระบบลำไส้ ค่าพีเอชในกระเพาะอาหารของมนุษย์จาก 1.5 ถึง 4.5 หลังอาหาร และการบริโภคอาหารใช้เวลา 3 ชั่วโมง (Jacobsen *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่เจริญต่ำสุดที่ pH 3.0 จากการประเมินตรวจสอบจำนวนของ *L. fermentum* ซึ่ง Foligne *et al.* (2007) แสดงให้เห็นว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถรอดชีวิตที่ pH ต่ำ 2.5 ใน 3 ชั่วโมง ความอยู่รอดของสายพันธุ์ *L. fermentum* AD1 ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 3.0) เป็น 99.9% ในเวลา 1 ชั่วโมง 94.7% ในเวลา 2 ชั่วโมง และ 86.8% ในเวลา 3 ชั่วโมง (Strompfová *et al.*, 2006) เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่สมบูรณ์สำหรับเซลล์แบคทีเรีย $\Delta A_{600\ nm} \geq 0.500$ ถูกเลือกให้เป็นมาตรฐาน และวิธีนับได้อัตราการรอดชีวิตถูกนำมาใช้สำหรับการประเมินผลต่อไป



ภาพที่ 2.1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดินอาหารเทียม และในลำไส้เทียม (pH 8) โดย T1 คือน้ำย่อยจำลอง (pH 2.5) T2 คือลำไส้เทียม (pH 8.0) ของเชื้อ (■) IMAU60083 F6(▲) IMAU60092 (▼) IMAU60151 (○) IMA-U60071 (◀) IMAU60120 (▶) IMAU60145 (□) IMAU20044 (★) IMAU20081 (◆) IMAU20084 และ (△) IMAU20080

ที่มา : Bao *et al.* (2010)

ผลของน้ำย่อยจำลอง และการเคลื่อนย้าย *L. fermentum* มีการรอดชีวิตในลำไส้ ในตารางที่ 2.1 และภาพที่ 2.1 ใน 35 สายพันธุ์ และอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% เป็นมาตรฐาน 11 สายพันธุ์ (6 สายพันธุ์จากทิเบต 4 จากมองโกเลีย และ 1 จากภายในมองโกเลีย) ถูกตัดออกมีความทนต่อน้ำย่อยจำลองสูง (pH 2.5 บ่ม 3 ชั่งโมง) สัดส่วนจำนวนของสายพันธุ์ทั้งหมด 12.2% แม้ว่าสายพันธุ์ทดสอบส่วนใหญ่จะเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด รูปแบบที่ดีของการเจริญของสายพันธุ์ในน้ำย่อยเทียมที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.1) บ่ม 90 สายพันธุ์ในน้ำย่อยจำลอง (pH 2.0) พบว่าเพียง F6 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมแบบดั้งเดิมในเขตมองโกเลีย แสดงความทนกรดค่อนข้างดี และสามารถรอดชีวิตได้ (อัตราการรอดชีวิต 53.7%) และบ่มในลำไส้จำลอง 12 ชั่วโมง ไม่ได้ส่งผลต่อศักยภาพอย่างมีนัยสำคัญ F6 แสดงความต้านทานที่สูงขึ้นเมื่อน้ำย่อยเป็นกรด ต่อจากนั้นอัตราการรอดชีวิตที่มีความสำเร็จทนน้ำย่อยจำลอง 33.5% ที่ pH 8.0 ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.1) แสดงว่าความทนสูงกระตุ้นน้ำย่อยได้ดี

ตารางที่ 2.1 อัตราการรอดชีวิตของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ในน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5

สายพันธุ์	ความทนต่อน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5 (log CFU / ml)		อัตราการรอดชีวิต (%)
	0 h	3 h	
IMAU60120	9.115 ± 0.021	8.364 ± 0.060	91.8[a]
IMAU60092	8.730 ± 0.063	7.680 ± 0.011	88.0[b]
IMAU60083	9.206 ± 0.000	8.002 ± 0.002	87.0[c]
F6	8.488 ± 0.020	7.358 ± 0.021	86.7[c]
IMAU60151	9.135 ± 0.024	7.720 ± 0.029	84.5[d]
IMAU20044	9.122 ± 0.012	7.583 ± 0.018	83.1[e]
IMAU20080	9.039 ± 0.062	7.371 ± 0.018	81.6[f]
IMAU20081	9.143 ± 0.018	7.430 ± 0.005	81.3[f]
IMAU60071	9.136 ± 0.075	7.361 ± 0.032	80.6[g]
IMAU60145	9.043 ± 0.031	7.286 ± 0.007	80.6[g]
IMAU20084	9.029 ± 0.034	7.263 ± 0.032	80.4[h]

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a - h] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

การทนต่อความเข้มข้นที่แตกต่างกันของเกลือน้ำดีของสายพันธุ์นี้แสดงในตารางที่ 2.2 ผลที่ได้วิเคราะห์โดยข้อเสนอที่ทำโดย Chateau *et al.* (1994) ที่โดดเด่นในสี่กลุ่มนี้ตามความล่าช้าของการเจริญที่กระตุ้นโดย oxgall สายพันธุ์ที่ทนทาน (ความล่าช้าของการเจริญ d ≤ 15 นาที) สายพันธุ์ที่ทน (15 <d ≤40 นาที) สายพันธุ์ที่ช้า (40 < d ≤ 60 นาที) และสายพันธุ์ที่เร็ว (d > 60 นาที) เวลาที่จำเป็นสำหรับ 0.3 หน่วย เพิ่มขึ้นในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร สำหรับ F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth 2.33 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามเวลาที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มขึ้น 0.3 หน่วย ในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดย F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth ที่มีเกลือน้ำดี 2.99 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.2 ความทนต่อเกลือน้ำดี *L. fermentum* วัดเป็นเวลาล่าช้าจากความเข้มข้น 0.3% ของเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ต่อชั่วโมง		
	ไม่เสริม oxgall	เสริมด้วย oxgall 0.3% (w/v)	เวลาล่าช้า (LT)
F6	2.33 ± 0.02	2.99 ± 0.11	0.66 ± 0.13[a]
IMAU60145	2.35 ± 0.44	3.21 ± 0.36	0.86 ± 0.09[ab]
IMAU60071	2.64 ± 0.02	3.59 ± 0.16	0.95 ± 0.18[ab]
IMAU20084	2.94 ± 0.36	3.90 ± 0.05	0.96 ± 0.31[ab]
IMAU20080	2.98 ± 0.20	4.02 ± 0.22	1.03 ± 0.02[ab]
IMAU20081	3.46 ± 0.33	4.49 ± 0.10	1.03 ± 0.43[ab]
IMAU20044	2.79 ± 0.24	4.10 ± 0.01	1.32 ± 0.23[bc]
IMAU60092	2.65 ± 0.13	4.20 ± 0.31	1.55 ± 0.18[bc]
IMAU60120	2.66 ± 0.28	4.64 ± 0.42	1.97 ± 0.13[cd]
IMAU60083	3.15 ± 0.68	5.23 ± 0.30	2.08 ± 0.62[cd]
IMAU60151	3.82 ± 0.39	6.57 ± 0.31	2.74 ± 1.91[d]

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a-d] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

สำหรับสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ไวคือ F6 (0.66 ช.ม.) ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือน้ำดี (ตารางที่ 2.2) นอกจากนี้ระดับสูงสุดของ F6 เมื่อเกลือน้ำดีเป็น 1.8% ความล่าช้าของการเจริญ สำหรับ IMAU60145 IMAU60071 และ IMAU20084 เป็น 0.86, 0.95 และ 0.96 ชั่วโมงตามลำดับ และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยทน นอกจากนี้ระดับความทนสูงสุดของ IMAU60092, IMAU60071, IMAU60145 และ IMAU20084 ในเกลือน้ำดีเป็น 1.8% การศึกษาก่อนหน้าเมื่อระดับความทนต่อน้ำดีของ *L. fermentum* ที่ระดับต่างๆ ความทนสูงสุดของ *L. fermentum* ACA-DC 179 เกลือน้ำดีเป็น 2% (Zoumpopoulou *et al.*, 2007) สายพันธุ์ *L. fermentum* AD1 ก็สามารถที่จะเจริญในน้ำดี 1% และยังคงทำงานได้ 75.4% หลังจากบ่มที่ 24 ชั่วโมง (Strompfová *et al.*, 2006) หาก *L. fermentum* SGM3 ซึ่งแยกจากไก่มีความทนสูง 0.3% ของเกลือน้ำดีเป็น 100% แต่ไม่มีความทนในเกลือน้ำดีที่ PG3 และ PGM3 ซึ่งถูกแยกจากสัตว์ปีก (Lin *et al.*, 2007) ดังนั้น *L. fermentum* F6 จึงแสดงถึงการเป็นโปรไบโอติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีที่ดี

ตารางที่ 2.3 เปอร์เซ็นต์การจัดเรียงตัวของ *L. Fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์

สายพันธุ์	เวลา					
	2 ชม.	4 ชม.	6 ชม.	8 ชม.	10 ชม.	20 ชม.
F6	3.2 ± 0.5	3.5 ± 1.8	5.3 ± 1.1	7.9 ± 0.2	9.1 ± 2.0	27.0 ± 0.8^{b}
IMAU60092	2.7 ± 1.0	4.8 ± 0.9	7.9 ± 0.2	9.4 ± 0.4	10.0 ± 1.3	26.6 ± 1.2^{b}
IMAU60120	5.1 ± 0.2	5.7 ± 0.5	7.3 ± 0.7	9.0 ± 1.2	10.7 ± 0.9	20.6 ± 1.0^{c}
IMAU20084	4.1 ± 0.2	6.1 ± 0.3	7.2 ± 0.4	8.3 ± 0.4	9.1 ± 0.4	17.2 ± 0.4^{d}
IMAU60083	4.7 ± 0.3	6.1 ± 0.3	7.1 ± 0.3	8.3 ± 0.2	8.4 ± 0.0	13.5 ± 0.3^{e}
IMAU60071	3.7 ± 0.8	4.0 ± 0.8	5.5 ± 1.0	5.6 ± 0.4	4.8 ± 1.0	11.8 ± 0.6^{ef}
IMAU60151	7.8 ± 1.1	14.2 ± 0.6	20.2 ± 0.8	25.4 ± 0.7	29.2 ± 0.7	51.5 ± 0.8^{a}
IMAU20044	6.9 ± 0.8	11.0 ± 1.2	11.6 ± 0.6	12.6 ± 0.3	14.3 ± 0.8	13.4 ± 0.5^{e}
IMAU20080	4.5 ± 0.8	6.3 ± 1.2	6.5 ± 1.0	6.8 ± 1.1	6.5 ± 1.9	10.6 ± 1.8^{f}
IMAU20081	6.9 ± 0.8	11.0 ± 1.2	11.6 ± 0.6	12.6 ± 0.3	14.3 ± 0.8	13.4 ± 0.5^{e}
IMAU60145	3.1 ± 3.4	9.3 ± 2.0	12.1 ± 0.6	14.6 ± 0.9	15.6 ± 1.6	28.1 ± 1.4^{b}

นำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-f}$ อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

เกลือน้ำดีทำให้ไม่เป็นระเบียบต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต (Margolles *et al.*, 2003) ดังนั้นความทนต่อน้ำดีถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตเติบโต และมีแรงในการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร สายพันธุ์ที่สามารถเจริญ และเผาผลาญอาหารในน้ำดีปกติได้ ทางกายภาพสามารถรอดชีวิตได้ในระหว่างการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร (Sanders *et al.*, 1996) นอกจากนี้ Noriegal *et al.* (2004) รายงานถึงผลของเกลือน้ำดีเมื่ออยู่รอดของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน *Lactobacillus* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และสมบัติเฉพาะของสายพันธุ์ โดยเป็นที่ทราบกันดีว่ามีความเข้มข้นของน้ำดีเกลือในลำไส้มีความแปรปรวนไม่คงที่ตั้งแต่ 1.5% ถึง 2% (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3% (w/v) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการต่อต้านเกลือน้ำดีจากสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของไฮโดรเลสเกลือน้ำดี ซึ่งสามารถย่อยสลายเกลือน้ำดีทั้งหมด และทำให้ลดผลที่เป็นพิษ และผลข้างเคียงของเกลือน้ำดี

การยับยั้งการเน่าเสียของอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคจาก 11 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.4 การเพาะเลี้ยงเชื้ออิสระของ F6 ในอาหาร MRS ยับยั้งแกรมบวก (*L. monocytogenes* C53-3, *S. aureus* AC1.2465) และแกรมลบ (*E. coli* O157 882364 *S. flexneri* CMCC (B) 51592 *S.* Typhimurium S50333) ในเวลาเดียวกันก็ชี้ให้เห็นว่า เชื้อที่แตกต่างกันของ *L. fermentum* มีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ แม้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรดสูง เนื่องจากการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการต้านจุลชีพ

ตารางที่ 2.4 กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์	*Listeria monocytogenes*	*Salmonella* Typhimurium	*Escherichia coli*	*Shigella flexneri*	*Staphylococcus aureus*
F6	+++	++	++	++	+++
IMAU60092	+	±	±	+	±
IMAU60120	+	±	−	±	+
IMAU20084	±	±	−	±	±
IMAU60083	−	±	±	±	±
IMAU60071	+	−	+	+	+
IMAU60151	+	−	−	±	+
IMAU20044	+	−	±	−	±
IMAU20080	−	−	±	−	±
IMAU20081	−	−	−	±	±
IMAU60145	−	−	−	−	+

-: ≤0mm; ±: 0-4 mm; +: 4-8 mm; + + 8-12 mm; + + +:> 2 mm.

บริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย = การกระจายเส้นผ่าศูนย์กลาง - เส้นผ่าศูนย์กลางพีเอชควบคุม

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

ตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่า IMAU60092 แสดงความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียกับทุกสายพันธุ์ทั้งห้านี้ แต่ในระดับที่น้อยกว่า F6 ในทางตรงกันข้าม IMAU60145 แสดงเฉพาะการยับยั้งการทำงานกับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์อื่น ๆ ได้รับการที่ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ เฉพาะสายพันธุ์ที่มีศักยภาพต้านเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อที่ทดสอบ ตามธรรมชาติผลิตภัณฑ์นมหมักมักจะพิจารณาว่ามีความปลอดภัย เนื่องจากมีค่า pH ต่ำ และการผลิตสารต้านจุลชีพจากสิ่งมีชีวิตในอาหารหมัก (Svanberg *et al.*, 1992)

ทั้งนี้ *Lactobacilli* ผลิตสารต้านแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ได้แก่ สาร catabolites ที่ได้จากน้ำตาล เช่น กรดอินทรีย์ (เช่น กรดแลกติก และกรดอะซิติก) สาร catabolites ที่ได้จากออกซิเจน เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารยับยั้งจากโปรตีน เช่น bacteriocins เปปไทด์โมเลกุลต่ำมวลอื่น ๆ และเปปไทด์ต้านรา/โปรตีน ไขมัน และกรดอะมิโน อีกทั้ง metabolites ชนิดต่างๆ เช่น กรดไขมัน กรด phenyllactic และกรด OH-phenyllactic และสารประกอบอื่น ๆ เช่น reuterin และ reutericyclin (Lefteris *et al.*, 2006) เป็นหนึ่งกลไกที่สำคัญของสมบัติโปรไบโอติก จากการวิจัยมุ่งเน้นไปที่การผลิตสารต้านจุลชีพ (servin,. 2004) วิจัยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ผลิตโดย *L. plantarum* หรือ *L. reuteri* (Delgado

et al., 2007; Gänzle *et al.*, 2000) ดังนั้นขั้นตอนต่อไปมีการตรวจสอบสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย F6 ซึ่งจะมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Vrancken *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007)

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP01	*Lactobacillus casei*	87.5
CP02	*Lactobacillus casei*	25.9
CP03	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	29.1
CP04	*Lactobacillus casei*	24.3
CP05	*Lactobacillus* sp.	88.4
CP06	*Lactobacillus casei*	38.7
CP07	*Lactobacillus casei*	0
CP08	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP09	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP10	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP11	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP12	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP13	*Lactobacillus casei*	0
CP14	*Lactobacillus casei*	0
CP15	*Lactobacillus casei*	0
CP16	*Lactobacillus casei*	0
CP17	*Lactobacillus casei*	0
CP18	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP19	*Lactobacillus* sp.	0
CP20	*Lactobacillus casei*	0
CP21	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	48.6
CP22	*Lactobacillus casei*	51.8

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP23	*Lactobacillus casei*	0
CP24	*Lactobacillus* sp.	27.6
CP25	*Lactobacillus casei*	0
CP26	*Lactobacillus casei*	52.7
CP27	*Lactobacillus casei*	33.9
CP28	*Lactobacillus casei*	0
CP29	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	17.4
CP30	*Lactobacillus* sp.	31.5
CP31	*Lactobacillus casei*	27.7
CP32	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	30.2
CP33	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	42.9
CP34	*Lactobacillus casei*	41.8
CP35	*Lactobacillus casei*	18.3
CP36	*Lactobacillus paracasei/L. casei*	0
CP37	*Lactobacillus casei*	59.9
CP38	*Lactobacillus casei*	51.9
CP39	*Lactobacillus* sp.	43.1
CP40	*Lactobacillus casei*	67.16
CP41	*Lactobacillus casei*	26.21
CP42	*Lactobacillus casei*	0
CP43	*Lactobacillus casei*	46
CP44	*L. rhamnosus*	59.6
CP45	*L. rhamnosus*	39.3
CP46	*Lactobacillus casei*	72.3
CP47	*Lactobacillus casei*	51.6
CP48	*L. paracasei* sbsp *paracasei*	18.2
CP49	*Lactobacillus* sp.	25.5

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
CP50	*Lactobacillus* sp.	90.1
CP51	*Lactobacillus* sp.	37.1
CP52	*Lactobacillus* sp.	0
CP53	*Lactobacillus* sp.	18.5
CP54	*Uncultured bifidobacteria*	92.2
CP55	*Uncultured bifidobacteria*	95.6
CP56	*Enterococcus faecalis*	50.6
CP57	*Enterococcus faecalis*	48.8
CP58	*Enterococcus faecalis*	92.6
CP59	*Enterococcus faecalis*	47.2
CP60	*Enterococcus vaginalis*	41.4
CP61	*Enterococcus faecalis*	39
CP62	*Enterococcus faecalis*	54.7
CP64	*Enterococcus faecalis*	49.9
CP65	*Streptococcus anginosus*	57.7
CP66	*Streptococcus anginosus*	0
CP67	*Streptococcus anginosus*	0
CP68	*Streptococcus anginosus*	78.9
CP69	*Streptococcus anginosus*	86.8
CP71	*Enterococcus faecalis*	57
CP72	*Enterococcus faecalis*	40.8

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

นอกจากนี้ Nueno-Palop *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 70 สายพันธุ์ มากกว่า 50 % ของเกลือน้ำดี 0.3% พบว่า มีเพียง 22 สายพันธุ์สามารถรอดชีวิตในเกลือน้ำดีได้ และมีเพียง 7 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตได้มากกว่า 80% (ตารางที่ 2.6) ซึ่งสายพันธุ์มากที่สุดทนต่อเกลือน้ำดีคือ *L. casei* *Lactobacillus* sp. จากนั้นเมื่อนำแบคทีเรียแลกติก เหล่านี้มาทดสอบการรอดชีวิตในน้ำย่อยลำไส้เล็กจำลอง พบว่า 5 สายพันธุ์ สามารถรอดชีวิตในลำไส้เล็กจำลองได้ คือ *L. casei*

Lactobacillus sp. และ *E. faecalisc* และแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์นี้สามารถยึดเกาะ Caco-2 ได้โดยเชื้อ *E. faecalisc* สายพันธุ์ CP58 เป็นสายพันธุ์มากที่สุดกับค่าการยึดเกาะ 2.6 x 10^5 CFU / ml

ตารางที่ 2.6 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลอง

รหัส	สายพันธุ์	การอยู่รอดใน เกลือน้ำดี (%)	ความอยู่รอดของ การย่อยอาหาร (%)
CP01	*Lactobacillus casei*	87.5	27.0
CP05	*Lactobacillus* sp.	88.4	23.8
CP37	*Lactobacillus casei*	59.9	30.0
CP40	*Lactobacillus casei*	67.2	24.4
CP44	*Lactobacillus rhamnosus*	59.6	0
CP46	*Lactobacillus casei*	72.3	0
CP50	*Lactobacillus* sp.	90.1	0
CP54	Uncultured bifidobacteria	92.2	0
CP55	Uncultured bifidobacteria	95.6	0
CP58	*Enterococcus faecalis*	92.6	42
CP69	*Streptococcus anginosus*	86.8	0

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

นอกจากนั้น ในเนื้อสัตว์มี *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการขจัดพิษ (detoxification) ของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนโดยผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) จึงสามารถป้องกันการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการลดความเป็นพิษของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน และการป้องกันการเกิดสารเอมีนที่เกิดขึ้นใหม่โดยการลดค่าความเป็นกรดด่างได้อย่างรวดเร็วเพื่อยั้บยั้งการสร้างสารเอมีนจากจุลินทรีย์ อีกทั้งแบคทีเรียแลคติกยังต้องมีความสามารถในการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์จำนวนมากในระหว่างการผลิต และการเก็บรักษา (Ljungh and Wadström, 2006)

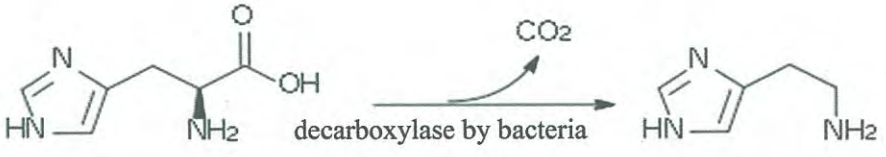
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.2 ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amines : BAs)

ไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) เป็นสารประกอบไนโตรเจนหรือสาร organic bases ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวภาพ เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยการรวมตัวหรือการเสียสภาพของสัตว์ พืชและเกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนอิสระ โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Kung *et al.*, 2007) หรือเกิดปฏิกิริยา amination และกระบวนการ transamination ของสารอัลดีไฮด์ คีโตน และเกิดจากการขจัดหมู่ α-carboxyl ของกรดอะมิโนตั้งต้น หรือเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมน สาร alkaloids กรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่ส่งผลต่อการควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย การรับประทานอาหาร และความดันโลหิต (Bouchereau *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2003) สารไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ โดย tyramine และ histamine ทำหน้าที่เป็น hormonal mediators ในมนุษย์และสัตว์ ในขณะที่ dopamine และ serotonin จัดเป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาท (Önal., 2007) อีกทั้งสามารถพบในอาหารหลายๆ ชนิด โดยเฉพาะอาหารหมัก เช่น ชีส กิมจิ ไวน์ มิโซ เนื้อหมักและอาหารทะเล เมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของ histamine สูง จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ที่เรียกว่า สคอมโบรทอกซิโคซิส (scombrotoxicosis) โดย histamine จะไปเพิ่มไบโอเจนิกเอมีนตัวอื่นๆ ได้แก่ cadaverine และ putrescine ซึ่งสารทั้งสองนี้จะส่งเสริมความเป็นพิษของ histamine โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ย่อย histamine เช่น diamine oxidase และ histamine methyl transferase ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อย histamine ได้จึงส่งผลให้ระดับของ histamine ในร่างกายสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปในแต่ละคน เช่น คลื่นไส้ หายใจขัด ปวดหัว มีผื่นแดง ความดันเลือดต่ำ เป็นต้น histamine, tyramine และ putrescine เป็นไบโอเจนิกเอมีนสำคัญที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Mo Dugo *et al.*, 2006)

2.2.1 กลไกการสร้างและชนิดของไบโอเจนิกเอมีน

สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนเกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ decarboxylase โดยย่อยสลายกรดอะมิโนและดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน เช่น การเกิดสาร histamine จากกรดอะมิโน histidine (ภาพที่ 2.2)



Histidine Histamine

ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน

ที่มา: Wikipedia (2010)

147853

แบคทีเรียเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา อาหารทะเลและอาหารหมัก เช่น ชีส ผักดอง ผลิตภัณฑ์หมักดอง และไวน์ ในอาหารหมักหลายชนิดสามารถพบแบคทีเรียแลคติกที่ผลิต histamine ได้ ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* (Kung *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006) ส่วนจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีรายงานว่าสามารถผลิต histamine ได้ในอาหารหมัก ได้แก่ *Staphylococcus* spp., *Enterobacter cloacae* และ *Candida* spp. (Lonvaud-Funel and Joyeux, 1994)

ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ฟังก์ชัน มีคุณสมบัติเป็นเบส น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนความร้อน สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี (Silla- Santos, 1996) ได้แก่

2.2.1.1 อะลิฟาติกเอมีน (aliphatic amine) ได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine และ spermine

2.2.1.2 อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ได้แก่ tyramine และ phenylethylamine

2.2.1.3 เฮทเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) ได้แก่ histamine และ tryptamine

สารประกอบ biogenic amine ที่พบได้ในอาหาร และกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นได้รวบรวมและแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น

กรดอะมิโน	ไบโอเจนิกเอมีน
อาร์จินีน (arginine)	แอกมาทีน (agmatine)
ไลซีน (lysine)	คาดาเวอรีน (cadaverine)
ฮีสติดีน (histidine)	ฮีสตามีน (histamine)
ออร์นิทีน (ornithine)	พูทรีซีน (putrescine)
ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine)	ฟีนิลเอธิลลามีน (phenylethylamine)
ไทโรซีน (tyrosine)	ไทรามีน (tyramine)
ทริปโตเฟน (tryptophane)	ทริปตามีน (tryptamine)

ที่มา: ศิริรัตน์ ตันไสว (2547)

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกิดขึ้นอาจเกิดจากปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและการสลายของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้แก่

2.2.2.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างจัดเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของ decarboxylase โดยเมื่อมีการเกิด decarboxylation ของกรดอะมิโนที่สูงขึ้น ส่งผลให้มีค่า pH ที่ต่ำลง และลดการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม amine-positive (Maijala *et al.*, 1995)

2.2.2.2 การเกิด Redox potential ของผลิตภัณฑ์

ปฏิกิริยาการเกิด Redox potential ของผลิตภัณฑ์ส่งผลต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน โดยการลด redox potential กระตุ้นให้เกิดการผลิตสาร histamine ซึ่งการเกิด decarboxylase ของสาร histidine ซึ่งไม่ทำงานหรือถูกทำลายในสภาวะที่มีออกซิเจน (Karovičová and Kohajdová, 2005)

2.2.2.3 อุณหภูมิและช่วงการเจริญ

แบคทีเรียมีช่วงการทำงานของเอนไซม์ decarboxylases ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิระหว่าง 20 °C และ 37 °C โดยการลดอุณหภูมิสามารถช่วยหยุดการเจริญของแบคทีเรียได้ (Karovičová and Kohajdová, 2005)

2.2.2.4 เกลือโซเดียมคลอไรด์

การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น (NaCl) ส่งผลต่อการลดการสะสมสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน ในขณะที่มีการย่อยสลายโปรตีนเกิดปฏิกิริยาที่สูงขึ้น โดย Karovičová and Kohajdová (2005) ได้รายงานถึงการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิด tyrosine decarboxylation ในขณะที่ยับยั้งการเกิด histidine decarboxylation

2.2.2.5 ขนาดของผลิตภัณฑ์

ขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางของผลิตภัณฑ์มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ในผลิตภัณฑ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่กว้าง มีความเข้มข้นของเกลือลดลงและมีค่า water activity ที่สูง จึงเป็นสาเหตุในการผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ในปริมาณสูง เช่น tyramine และ putrescine เป็นต้น (Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero, 2004; Suzzi and Gardini, 2003)

2.2.2.6 กระบวนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ

กระบวนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ ช่วยลดการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนโดยลดการปนเปื้อนของวัตถุดิบทุกชนิดและหน่วยการผลิต (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010)

2.2.2.7 การใช้กล้าเชื้อ

กล้าเชื้อที่เหมาะสมต้องมีเอนไซม์ amino oxidase เพื่อการป้องกันการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Karovičová and Kohajdová, 2005; Suzzi and Gardini, 2003) การลด pH อย่างรวดเร็วเกิดขึ้นจากกล้าเชื้อชนิด amine-negative สามารถยับยั้งการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก การใช้กล้าเชื้อสามารถบ่มสุก

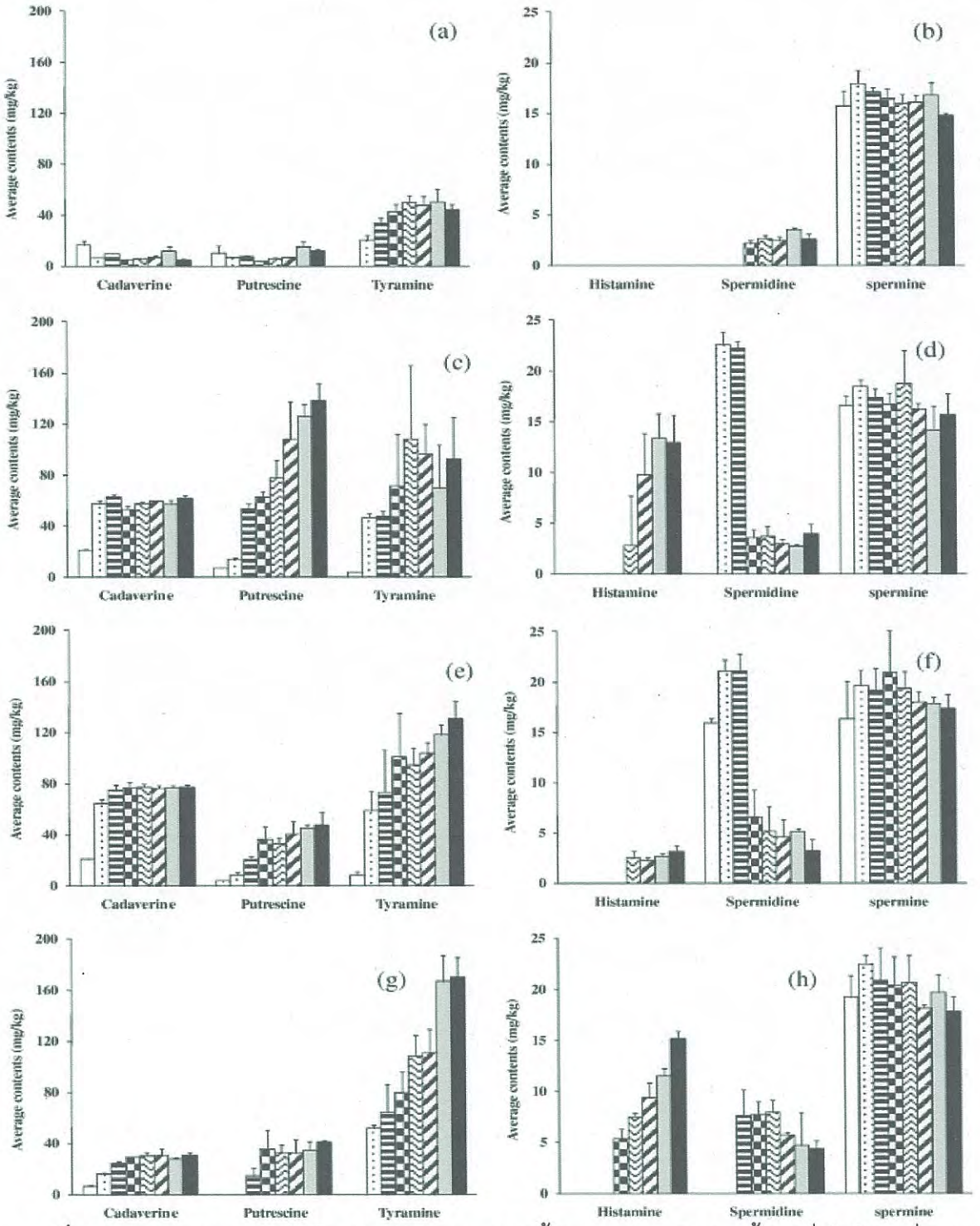
(ripening) ได้รวดเร็วกว่าในช่วงสุดท้าย และมีการสะสมสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ต่ำ เนื่องจากมีการจัดเก็บรักษาได้เร็วเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้กล้าเชื้อ (Suzzi and Gardini, 2003)

2.2.3 ไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก สามารถพบสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในกรณีที่มีการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ ซึ่งปนเปื้อน ในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม โดยกระบวนการหมักสามารถช่วยให้เกิดสารไบโอเจนิกได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ความเป็นกรด และการย่อยสลายโปรตีน ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก (González-Fernández *et al.,* 2003; Halász *et al.,* 1994) ในเนื้อสัตว์นั้นมีกระบวนการ decarboxylation ที่ส่งผลต่อการเร่งการเกิด endogenous decarboxylases หรือ exogenous enzymes โดยเกิดจากจุลินทรีย์ที่หลากหลายในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ หรือในกรณีที่มีการ decarboxylation ของแบคทีเรียส่งผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น และองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มักพบ tyramine, cadaverine, putrescine, spermidine และ spermine (Santos-Buelga *et al.,* 1986; Sayem-El-Daher *et al.,* 1984) โดยในเนื้อไก่ ซากไก่ ตับวัว และเนื้อสัตว์ พบไบโอเจนิกเอมีนในปริมาณน้อยกว่า 40, 1.8 - 938, 340 และ 10 - 700 ppm ตามลำดับ ส่วนในเนื้อวัวพบ tyramine และ cadaverine ในปริมาณมากกว่า 120 ppm (Vinci and Antonelli, 2002) สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก (dry fermented sausage) มีปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในช่วง 237.8-1,951 ppm ซึ่งพบว่าเป็น histamine, putrescine และ tyramine 285.9, 385.7 และ 1,506.3 ppm ตามลำดับ (Vandekerckhove, 1977) โดยใน Turkish fermented sausage (suck) พบ histamine tyramine และ tryptamine ปริมาณ 6.72 - 362.22, 208.66 - 1, 173.28 และ 25.01 - 619.11 ppm ตามลำดับ (Senoz *et al.,* 2000) ไส้กรอกหมักแห้งสเปน chorizo fuet sobrasada และ salsaichon พบ tyramine, putrescine, phenylethylamine และ tryptamine ปริมาณ 600, 450 และ มากกว่า 50 ppm ตามลำดับ domestic และ Russian sausage พบ histamine ในปริมาณน้อยกว่า 100 ppm French sausage พบ histamine tyramine และ putrescine ปริมาณ 100 400 และ 270 ppm ตามลำดับ (Suzzi and Gardini, 2003) Salsiccia และ Soppressala พบ tyramine 500 ppm และ histamine 50 ppm (Parente *et al.,* 2001) ในขณะที่ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก Cervelat พบสาร tyramine, putrescine, spermine และ spermidine โดยมีปริมาณเท่ากับ 58.9, 26.1, 34.1 และ 8.7 ppm ตามลำดับ (Trevino *et al.,* 1997)

Tosukhowong *et al.* (2011) ศึกษาการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในแหนมเนื้อหมูที่มีคุณภาพที่แตกต่างกัน โดยในระหว่างกระบวนการหมักแหนมที่ 30 °C ที่เก็บรักษามากกว่า 7 วันขึ้นไป พบว่า องค์ประกอบของไบโอเจนิกเอมีนในกระบวนการหมักแหนม A มีปริมาณต่ำ (ภาพที่ 2.3a และ 2.3b) ในระหว่างกระบวนการหมัก สาร tyramine และ spermidine มีระดับที่สูงขึ้น โดยไม่พบที่เวลาที่ 0 ไปจนถึงวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ สารไบโอเจนิกเอมีน (histamine, phenylethylamine และ

tryptamine) ในแหนม A ตรวจพบ cadaverine, putrescine และ spermine ในระยะแรก (ที่ 0 วัน) ดังนั้นการผลิตแหนมจากเนื้อสุกรที่มีคุณภาพจึงพบการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนมีนในระดับต่ำ (cadaverine, putrescine, histamine, phenylethylamine, tryptamine และ spermine) แม้ว่าการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำของ tyramine และ spermidine ในขณะที่แหนม B มีการตรวจพบ cadaverine, putrescine, tyramine and spermine ในระยะเริ่มแรก (ภาพที่ 2.3c และ 2.3d) ในการสร้างสาร cadaverine ที่สูงขึ้นในระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการเริ่มต้นกระบวนการหมัก และคงที่ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการสร้าง putrescine, tyramine และ histamine ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อเริ่มต้นระดับของ spermidine เพิ่มขึ้นจากเดิมโดยไม่พบภายใน 24 ชั่วโมง และลดลงภายหลัง 2 วัน ที่มีการผลิตแหนมเนื้อหมูคุณภาพต่ำ



ภาพที่ 2.3 การสะสมของสารไบโอเจนิกใน Nham จากเนื้อหมูสด (a และ b) เนื้อหมูที่เก็บรักษาที่ 30 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (c และ d) การเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน (e และ f) และการเก็บรักษาที่ 20 °C เป็นระยะเวลา 2 วัน (g และ h) ระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน (▫) วันที่ 1; (▬) วันที่ 2; (▩) วันที่ 3; (▨) วันที่ 4; (▧) วันที่ 5; (▥) วันที่ 6; (■) วันที่ 7 แผนภาพ แสดงความแปรปรวน

ที่มา: Tosukhowong *et al.* (2011)

2.2.4 พิษของไบโอเจนิกเอมีน

ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของร่างกาย เช่น กระตุ้นการเจริญ เมแทบอลิซึม ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ ระบบประสาท ระบบเลือด การสังเคราะห์โปรตีน และความคงตัวของเยื่อเลือกผ่าน (membrane) ไบโอเจนิกเอมีนแต่ละชนิดส่งผลต่อการทำงานของอวัยวะภายในร่างกายที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ไบโอเจนิกเอมีนในอาหารและผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย

Biogenic amine	ผลต่ออวัยวะภายในร่างกาย
Histamine	- การหลั่งอะดีนาลีน (adrenaline) และนอร์อะดีนาลีน (noradrenaline) - กระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ มดลูก และระบบทางเดินหายใจ - กระตุ้นการทำงานของระบบประสาท
Tyramine	- การหดตัวของหลอดเลือด - เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ - กระตุ้นการหลั่งของน้ำตา และน้ำลาย - เพิ่มระดับน้ำตาลในกระแสเลือด - การหลั่งนอร์อะดีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ - ก่อให้เกิดอาการไมเกรน (migraine)
Putrescine และ Cadaverine	- ความดันโลหิตต่ำ - หัวใจเต้นช้า - ขากรรไกรแข็ง - ชาตามปลายมือปลายเท้า - เพิ่มความเป็นพิษของเอมีนอื่น ๆ
Phenylethylamine	- การหลั่งนอร์อะดีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ - เพิ่มความดันโลหิต - ก่อให้เกิดอาการไมเกรน
Tryptamine	- เพิ่มความดันโลหิต

ที่มา: Shalaby (1996)

นอกจากนี้ไบโอเจนิกเอมีนปริมาณ 600 - 1,000 ppm เป็นพิษต่อมนุษย์ และไบโอเจนิกเอมีน 100-200 ppm ทำให้เกิดอาการหน้าแดง phenylethylamine ปริมาณ 3 ppm และtyramine

ปริมาณ 25 - 40 ppm ในไวน์ทำให้เกิดอาการไมเกรนและความดันโลหิตสูง อีกทั้งพบว่า มี isoamylamin, putrescine และcadaverine ที่พบในไวน์สามารถทำปฏิกิริยากับ histamine ส่งผลให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น สำหรับพวก volatile aliphatic monoamines, methylamine และethylamine ถ้าพบในไวน์ปริมาณ 1 ppm ทำ ให้เกิดอาการแพ้ สำหรับความเป็นพิษของhistamineสามารถแบ่งระดับความเป็นพิษได้เป็น 3 ระดับ คือพิษน้อยมีปริมาณ 8 - 40 ppm พิษปานกลางมีปริมาณ 70 - 1,000 ppm และพิษรุนแรงมีปริมาณ 1,500-4,000 ppm อย่างไรก็ตาม การผลิตไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมักเกิดขึ้นในขั้นตอนการบ่มผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์จะสามารถย่อยสลายกรดอะมิโนด้วยเอนไซม์ decarboxylase ดังนั้นการเลือกใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่ไม่ผลิตเอนไซม์ decarboxylase จะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ยิ่งไปกว่านั้นควรเลือกใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่ผลิตเอนไซม์ amine oxidase จะช่วยลดสารไบโอเจนิกเอมีนที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ ดังนั้นระดับของไบโอเจนิกเอมีนในอาหารจึงถูกใช้เป็นดัชนีคุณภาพในการพิจารณาปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และเพื่อประเมินการจัดการการผลิตที่ดี (GMP)

2.3 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

กล้าเชื้อแบคทีเรีย หมายถึง เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบแล้วจำนวนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งเมื่อใช้เป็นวัตถุดิบเติมลงในอาหารแล้วสามารถเร่งะบวนการหมักทำให้มีระยะเวลาการหมักที่สั้นลง (Leroy and De Vuyst., 2004) อีกทั้งการเติมกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ยังช่วยปรับปรุงผลิตภัณฑ์ในด้านการเก็บรักษาและความปลอดภัย รวมถึงยกระดับการยอมรับของผู้บริโภค (Paukatong *et al.,* 1999) ซึ่งแบคทีเรียแลคติก (LAB) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความโดดเด่นในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก อันได้แก่ Lactobacilli (*L. plantarum, L.pentosus* และ *L. sake*) และ Pediococci (*P. acidilactici* และ *P. pentosaceus*) แบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอินทรีย์จากคาร์โบไฮเตรตส่งผลให้ค่า pH ลดลง ซึ่งทำให้เกิดคุณลักษณะของแหนม และยังช่วยยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Visessanguan *et al.,*. 2003) ส่วนใหญ่ผู้ผลิตแหนมมีแนวโน้มในการเก็บสินค้า และการจัดการขนส่งในระหว่างการผลิตไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงส่งผลต่อกระบวนการหมักเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เช่น มีการสูญเสียน้ำ เกิดการเปลี่ยนสี และเกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งมีการแก้ปัญหานี้จัดการได้โดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ ส่งผลทำให้ค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.6 ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่เกิดลักษณะดังกล่าว (Jaichumjai *et al.,*. 2010)

ในปัจจุบันได้มีการใช้การแบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอย่างแพร่หลาย โดยในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแต่ละชนิดอาจใช้กล้าเชื้อแบบเดี่ยว หรือแบบผสมใช้จุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากกล้าเชื้อแต่ละชนิดมีบทบาทและหน้าที่ในการหมักแตกต่างกัน ในหลายปีนี้ได้มีการศึกษาการกิจกรรมเมแทบอลิซึมและการทนต่อสภาวะเครียดของกล้าเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อ *L. sakei* ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อ

L. sakei สามารถปรับตัวและรอดชีวิตในเนื้อสัตว์ได้ดี สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อกลูโคสในเนื้อสัตว์ถูกใช้หมดไป และสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งเป็นการพัฒนาต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเพื่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ควรต้องมีสมบัติต่อไปนี้

2.3.1 คุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมาใช้ควรพิจารณาถึงคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (อดิศร เศวตวิวัฒน์, 2543)

2.3.1.1 ลดระยะเวลาในการหมักผลิตภัณฑ์ให้สั้นลง เช่นการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักไส้กรอกยุโรป สามารถลดระยะเวลาการหมักจาก 150 ชม. เหลือเพียง 32 -48 ชม.

2.3.1.2 ควบคุมการหมักและคุณภาพ รวมถึงกลิ่นรสจำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น การเติมกล้าเชื้อ *S. carnosus* subsp. *utilis* หรือ Kocuria variance (Micrococcus varian) ในการผลิตไส้กรอกเยอรมัน (rohwurst)

2.3.1.3 ลดการสะสมของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในเนื้อสัตว์ที่ต้องใช้ไนเตรทหรือไนไตรท์เป็น curing agent จะสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วโดยส่งผลไนไตรท์ที่มีอยู่หรือรีดิวซ์จากไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนทรัสออกไซด์ อันเป็นผลทำให้มีปริมาณไนไตรท์ตกค้างลดลง

2.3.1.4 ควบคุมลักษณะสีของผลิตภัณฑ์ในผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมไนเตรทหรือไนไตรท์จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีที่คงตัว โดยมีสีชมพูอมแดง โดยกล้าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Pediococcus* spp. และ Kocuria spp. สามารถผลิตเอนไซม์ pseudocatalase ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน จึงไม่มีผลต่อสีชมพูอมแดงของผลิตภัณฑ์

2.3.1.5 ลดระดับ histamine ในอาหารหมัก เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ histidine decarboxylase ผลิต histamine จากกรดอะมิโน histidine ได้ลดลง

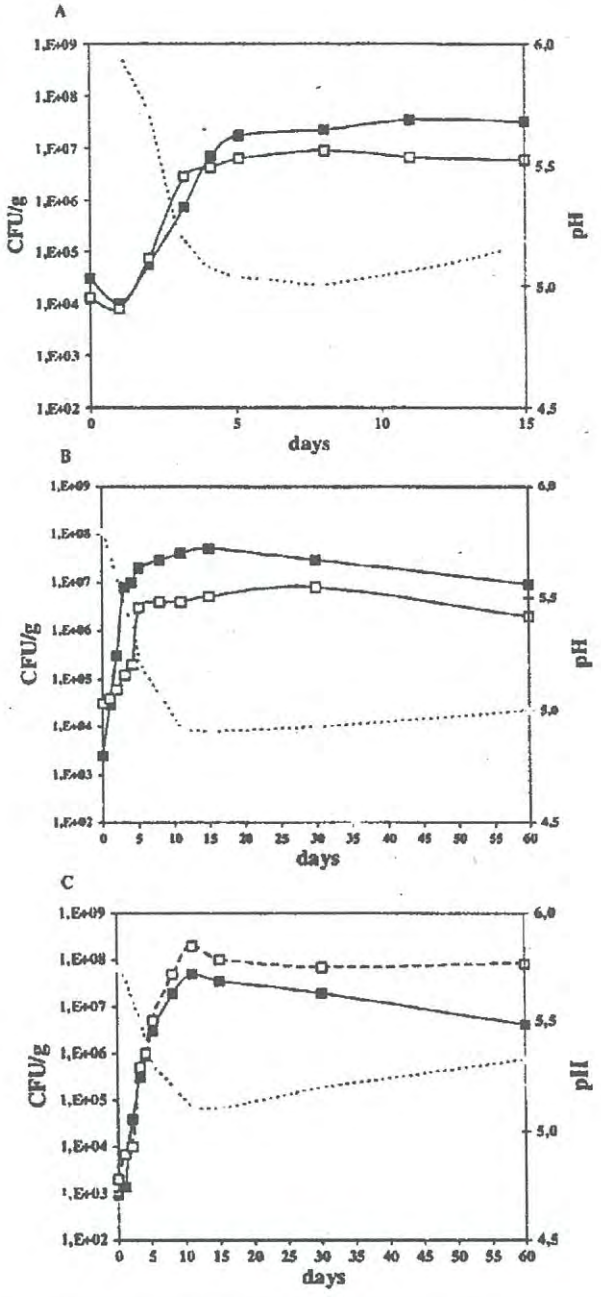
2.3.1.6 ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ทั้งนี้ อัจฉรา เพิ่ม (2550) ได้รายงานว่าคุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ดีควรมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งสามารถแข่งขันและต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหารได้ อีกทั้ง Leroy *et al.* (2006) กล่าวว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียจะช่วยเพิ่มรสชาติความปลอดภัย และการเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพโดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างสารให้กลิ่น (aroma compound) แบคเทอริโอซินหรือสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ช่วยพัฒนาสีของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ไม่สร้างเอมีนหรือสารประกอบที่เป็นพิษอื่นๆ เป็นต้น

2.3.2 ความสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

สมบัติการความเป็นกล้าเชื้อที่ดีต้องสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในเนื้อสัตว์ยึดเกาะสิ่งแวดล้อม และเป็นจุลินทรีย์หลักในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความเข้มข้นเกลือสูง อุณหภูมิต่ำ และค่า pH ต่ำได้ ซึ่งในขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในประเทศตะวันตกจะนิยมใช้อุณหภูมิต่ำและความเข้มข้นเกลือสูงร่วมกัน จึงนิยมใช้เชื้อ *L. sakei* เป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียกลุ่ม psychrotropic และทนต่อแรงดันออสโมติกได้ดี โดยสามารถเจริญในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำและมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10% ได้ และสามารถยึดเกาะบนผิวหน้าของเนื้อสัตว์ได้ดี นอกจากนี้ในสภาวะขาดกูลโคส แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถย่อยสลายกรดอะมิโนอาร์จีนีนในเนื้อสัตว์ได้ดี ทำให้สามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ได้

2.3.3 การผลิตกรดในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

กลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสามารถย่อยสลายกลูโคสเพื่อให้ได้พลังงานและกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ลดลงในระหว่างกระบวนการหมักและบ่ม ซึ่งช่วยถนอมอาหาร เนื่องจากกรดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตไม่เพียงแต่มีอิทธิพลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แต่ยังมีอิทธิพลต่อกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และปริมาณผลผลิตของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยระดับความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีผลต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค โดยระดับความเป็นกรดขึ้นอยู่กับกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและการบ่ม โดยค่า pH ในระหว่างกระบวนการบ่มเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* จากภาพที่ 4 แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และการลดของค่า pH ของไส้กรอกหมักที่มีกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน โดยภาพที่ 2.4ก แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และค่า pH ของไส้กรอกหมักที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ แต่เมื่อเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* พบว่าไส้กรอกหมักมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และมีค่า pH ภายหลังการบ่มต่ำกว่าไส้กรอกหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lactobacillus* มีบทบาทสำคัญต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2.4ข) ในขณะที่การเติมกล้าเชื้อกลับพบว่า ค่า pH ของไส้กรอกหมักลดช้า และมีค่า pH ภายหลังการบ่มสูงกว่าไส้กรอกหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* (ภาพที่ 2.4ค) โดยค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่มเป็นผลมาจากการเกิดเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน

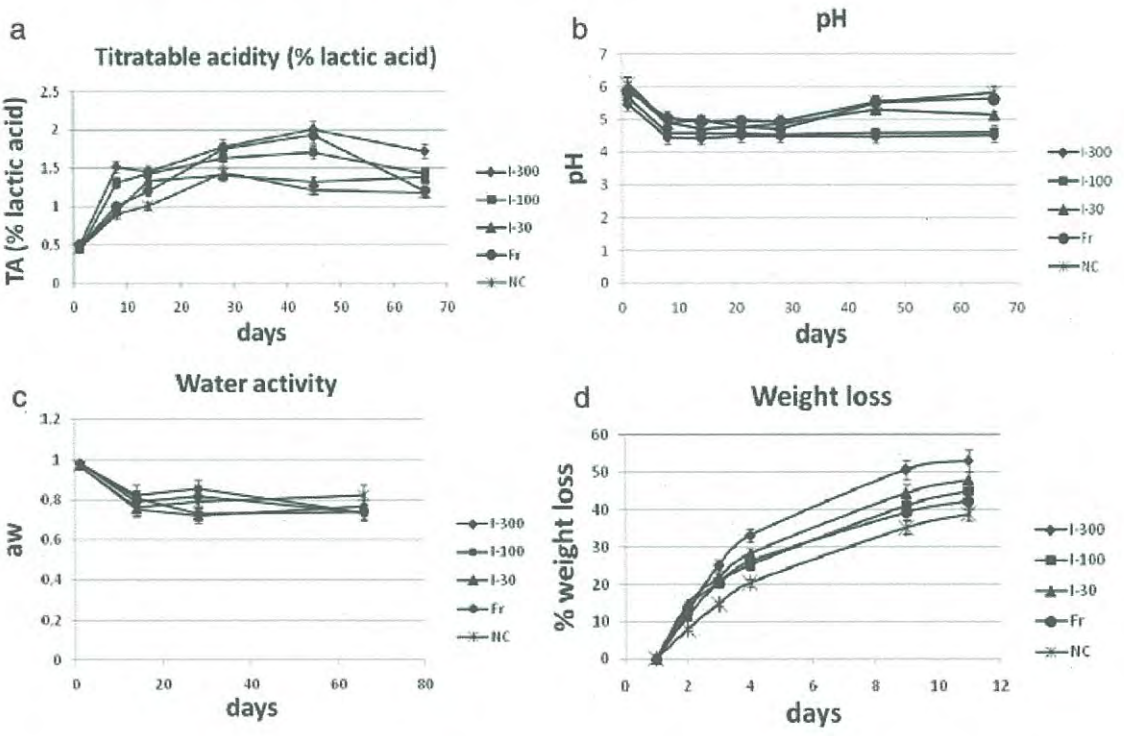


ภาพที่ 2.4 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* (■) และ *Staphylococcus* (□) และการลดลงของค่า pH ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน โดย ก) ไม่เติมกล้าเชื้อ ข) เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* และ ค) เติมกล้าเชื้อ *Staphylococcus*

ที่มา: Toldrá (2008)

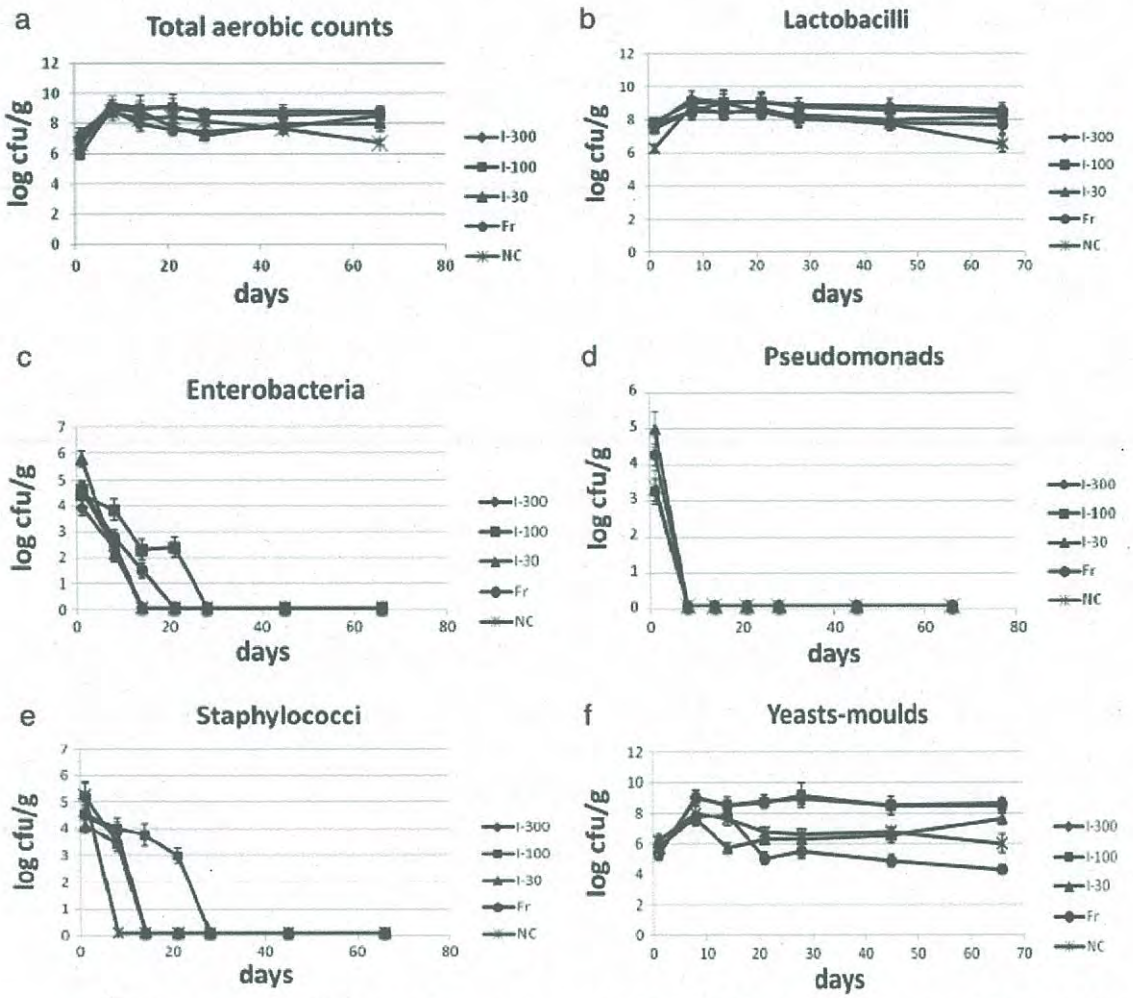
Sidira *et al.* (2014) ศึกษาการอยู่รอดของ *Lactobacillus casei* ในระหว่างการบ่มสุก และการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติกและตรวจหาจุลินทรีย์ (ภาพที่ 2.4) พบว่า การวิเคราะห์เคมีกายภาพมีค่าปริมาณการไตเตรตกรด (TA) ค่า pH ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) และน้ำหนักสูญเสียที่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งในกลุ่มที่มีการใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก ตามระยะการบ่มสุก

ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้ง ในระหว่างการบ่มสุกไส้กรอกหมักแห้งที่มีการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 พบว่า ปริมาณการไตเตรทกรดมีค่าสูงขึ้นทางสถิติ และมีค่า pH ต่ำทางสถิติ โดยสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) และค่าการสูญเสียน้ำหนักที่ลดลง



ภาพที่ 2.5 การศึกษาทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติกที่เติมกล้าเชื้อ *L. casei* ATCC 393 โดย: a) ปริมาณการไตเตรตกรด (TA) b) ค่า pH c) ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) และ d) น้ำหนักสูญเสีย I—300: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 300 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม, I—100: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 100 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม, I—30: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 30 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม, Fr: ไส้กรอกที่ผลิตโดย free *L. casei* และ NC: ไส้กรอกหมักที่ผลิตโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ โดย Error bars แสดงค่าความแปรปรวน (n = 3)

ที่มา: Sidira *et al.* (2014)



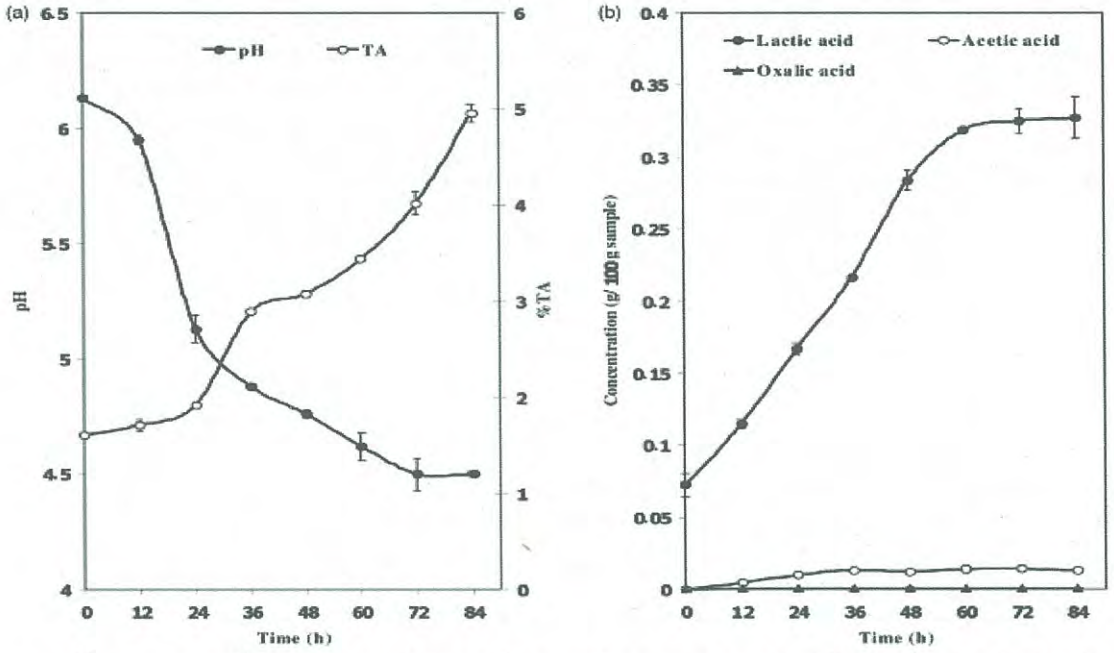
ภาพที่ 2.6 ผลของการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 และ free *L. casei* ATCC 393 ต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มสุกของไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติก: a) ปริมาณจุลินทรีย์ใช้อากาศทั้งหมด, b) ปริมาณของlactobacilli, c) ปริมาณของ enterobacteria, d) ปริมาณของ *Pseudomonas*, e) ปริมาณของ staphylococci และ f) ปริมาณของยีสต์หรือรา I—300: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 300 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม, I—100: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 100 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม I—30: ไส้กรอกหมักที่มีการเติม immobilized *L. casei* 30 กรัม ต่อกิโลกรัม ในส่วนผสม, Fr: ไส้กรอกหมักที่เติม free *L. casei*, NC: ไส้กรอกที่ไม่เติมกล้าเชื้อ; (โดยปริมาณของ enterobacteria มีค่าน้อยกว่า 1.50 log cfu/g และสำหรับ *Pseudomonas* และ staphylococci มีค่าน้อยกว่า 2.50 log cfu/g) Error bars แสดงค่าความแปรปรวน (n = 3)

ที่มา: Sidira *et al.* (2014)

สำหรับกลุ่มที่เติม immobilized หรือกลุ่ม free *L. casei* ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย ในขณะที่ไส้กรอกหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อมีการเน่าเสียในวันที่ 43 ของการบ่มสุก โดยมีสาเหตุมาจากยีสต์หรือรา ทำให้ผลิตภัณฑ์มีจุดขาวขึ้นที่ผลิตภัณฑ์ แต่ผลิตภัณฑ์ยังคงเป็นที่ยอมรับได้

เนื่องจากไม่มีกลิ่นและรสชาติที่ผิดไปมาก ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อและระยะเวลาการบ่มจึงมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ($P < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณจุลินทรีย์ใช้อากาศรวมและระดับของ lactobacilli และยีสต์หรือรายังคงมีค่าสูงขึ้นในระหว่างการบ่มสุก ในขณะที่ปริมาณของ enterobacteria, pseudomonas และ staphylococci มีปริมาณที่ลดลง (ภาพที่ 2.6) โดยตลอดทั้งกระบวนการบ่มสุกหรือการให้ความร้อนต่ำ *Clostridium* spp. ตรวจไม่พบในตัวอย่าง (70 – 72 °C เป็นเวลา 8 – 10 นาที; อุณหภูมิภายในผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 45 °C)

Visessanguan *et al.* (2004) ศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์แหนมในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่า ระยะการหมักของผลิตภัณฑ์แหนมที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก (ภาพที่ 2.7a) เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นโดยส่วนมากเป็นกรดแลคติก (ภาพที่ 2.7b)



ภาพที่ 2.7 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ค่า pH และกรดอินทรีย์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก โดยแถบแสดงค่าความแปรปรวน (n = 3)

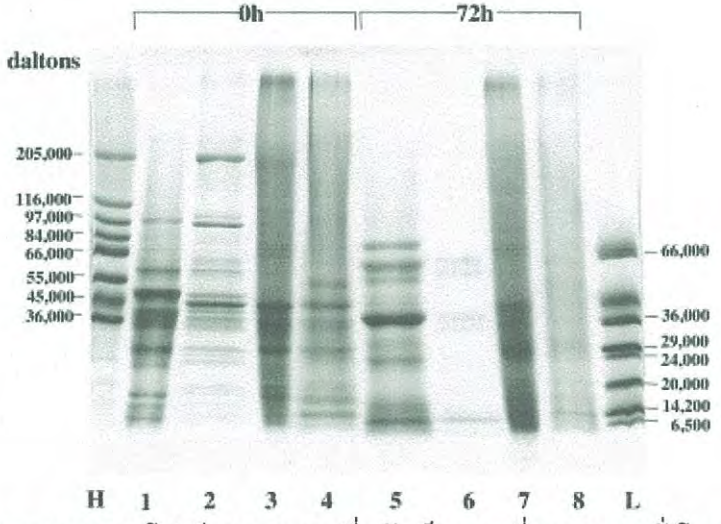
ที่มา: Visessanguan *et al.* (2004)

สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยภายหลัง 60 ชั่วโมง พบว่า กรดแลคติกและกรดอะซิติกมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งค่าความเป็นกรดและกรดอินทรีย์ส่งผลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์แหนมทำให้ลดต่ำถึง 4.6 ภายในระยะเวลา 60 – 72 ชั่วโมง โดยส่วนมาก lactobacilli จะผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก และรองลงมาคือ กรดอะซิติกและกรดออกซาลิกตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดบิวทิริก กรดซัคซินิก และกรดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์แหนมแต่มีค่าน้อย ซึ่งกรดแลคติกและกรดอะซิติกมีบทบาทต่อลักษณะกลิ่นกรดเปรี้ยว (tangy acidic) และส่งผลต่อการยอมรับ

ทางด้านประสาทสัมผัสเพิ่มขึ้น และให้ผิวสัมผัส ความไวสัมผัส (tactile) และลักษณะ mouthfeel เนื่องจากกรดเหนี่ยวนำให้โปรตีนไมโอซินและคอลลาเจนเกิดการเปลี่ยนแปลงไป

2.3.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมักจากการทำอิเลคโตโฟรเลซิส (ภาพที่ 2.8) พบว่า มวลโมเลกุล (MW) ของแถบโปรตีนที่ละลายน้ำ (sarcoplasmic proteins) อยู่ในช่วง 6500 ถึง 97,000 และส่วนที่ละลายได้ในเกลือคือ myofibrillar proteins รวมถึง myosin heavy chain (MHC), actin, tropomyosin, troponin และ myosin light chain ซึ่ง myofibrillar proteins มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการแปรรูปโดยเกิดการยึดเกาะโครงสร้างและให้เนื้อสัมผัสที่แข็ง



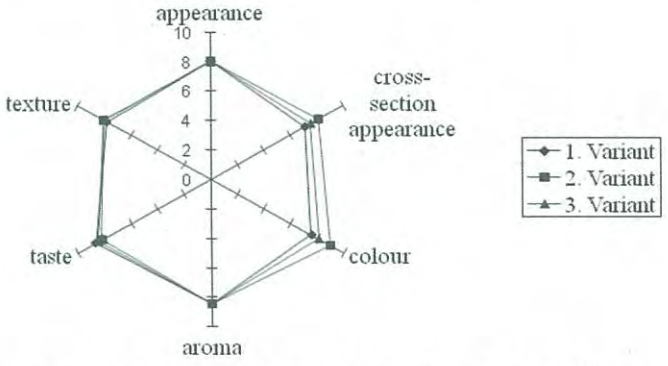
ภาพที่ 2.8 รูปแบบของการแยกโปรตีนจากแหนมที่หมักเป็นเวลาที่ 0 และ72 ชั่วโมงด้วยวิธี SDS–PAGE โดย (H) และ (L) น้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานต่ำและสูง (1) และ (5) sarcoplasmic fraction; (2) และ (6) myofibrillar fraction; (3) และ (7) alkaline-soluble fraction; (4) และ (8) alkaline-insoluble fraction

ที่มา: Visessanguan *et al.* (2004)

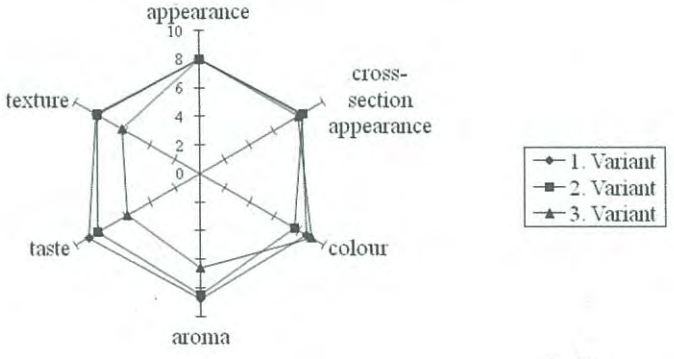
2.3.5 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

Radulović *et al.* (2011) ศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี โดยประเมินผลไส้กรอกหมักที่บ่มสุกในวันที่ 14 (ภาพที่ 2.9) และวันที่ 40 (ภาพที่ 2.10) พบว่า ตัวแปรทางด้านคุณภาพทุกด้านมีแนวโน้มสูงขึ้นภายหลัง 14 วัน โดยมีคะแนนมากกว่า 7 ไม่แตกต่างทางสถิติ และภายหลัง 40 วัน พบว่า กลุ่มไส้กรอกควบคุมใช้กล้าเชื้อ Bactoferm T-SPX (Chr-Hansen) และการใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus helveticus*

RO52 มีค่าใกล้เคียงโดยมากกว่า 7.6 ในขณะที่ ไส้กรอกหมักที่ใช้กล้าเชื้อ *Bifidobacterium longum* RO175 มีค่ากลิ่น (aroma) ที่ต่ำกว่า 6.75 ทางด้านกลิ่นรส (taste) มีค่า 6.0 และคะแนนเนื้อสัมผัส (texture) อยู่ที่ 6.25 โดยทุกตัวอย่างเป็นที่ยอมรับ



ภาพที่ 2.9 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการบ่มสุก (14 วัน)
ตัวแปรที่ 1 กลุ่มไส้กรอกควบคุมใช้กล้าเชื้อ Bactoferm T-SPX
ตัวแปรที่ 2 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus helveticus* RO52
ตัวแปรที่ 3 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Bifidobacterium longum* RO175
ที่มา : Radulović *et al.* (2011)



ภาพที่ 10 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (40 วัน)
ตัวแปรที่ 1 กลุ่มไส้กรอกควบคุมใช้กล้าเชื้อ Bactoferm T-SPX
ตัวแปรที่ 2 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus helveticus* RO52 .
ตัวแปรที่ 3 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Bifidobacterium longum* RO175
ที่มา : Radulović *et al.* (2011)

Visessaguan *et al.* (2004) วิเคราะห์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนมโดย texture profile analysis ภายหลังการบ่ม 36 ชั่วโมง ($P>0.05$) พบว่า แหนมมีคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ยังไม่ผ่านการหมัก โดยแหนมมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็ง (rigid) แต่มีความ

ยืดหยุ่น (elastic) และความเหนียว (cohesive) เมื่อมีระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2.9) ซึ่งการจัดโครงสร้างใหม่ของผลิตภัณฑ์แหนมส่วนมากเกิดจากการลดลงของค่า pH ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในกล้ามเนื้อ ซึ่งกรดเหนี่ยวนำให้เกิดเจลของโปรตีนโดยส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของแหนม

ตารางที่ 2.9 Texture profile analysis (TPA) ของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก

Time (h)	Force (g)	Hardness (g)	Fracturability (g)	Adhesiveness (g. s)	Springiness (mm)	Cohesiveness (g. mm)
0	866.8 ± 97.0^{a}	1001.2 ±124.4^{a}	7.3 ± 2.2^{a}	-325.8 ± 74.2^{a}	0.65 ± 0.05^{a}	0.45 ± 0.04^{a}
12	1403.8 ± 79.5^{b}	1644.5 ±101.6^{b}	12.6 ± 1.5^{b}	-125.1 ± 61.2^{b}	0.34 ± 0.01^{b}	0.32 ± 0.01^{b}
24	4080.6 ± 62.7^{c}	4820.7 ± 94.6^{c}	14.1 ± 1.6^{c}	-29.7 ± 6.0^{c}	0.78 ± 0.01^{c}	0.53 ± 0.01^{c}
36	5130.4 ± 72.3^{d}	5949.8 ± 58.7^{d}	12.4 ± 1.9^{b}	-51.1 ± 23.8^{c}	0.83 ± 0.02^{c}	0.59 ± 0.01^{d}
48	5476.0 ±322.7^{d}	6295.9 ±397.7^{d}	15.4 ± 1.5b^{c}	-14.0 ± 5.8^{c}	0.81 ± 0.01^{c}	0.59 ± 0.01^{d}
60	5345.6 ±382.4^{d}	6133.3 ±428.4^{d}	18.3 ± 4.3c^{d}	-9.9 ± 6.3^{c}	0.81 ± 0.01^{c}	0.58 ± 0.01^{d}
72	5474.9 ±614.7^{d}	6356.8 ±555.3^{d}	19.2 ± 1.2^{d}	-18.2 ± 5.9^{c}	0.83 ± 0.01^{c}	0.58 ± 0.03^{d}
84	6183.2± 31.1^{e}	7134.2 ± 58.9^{e}	17.1 ± 4.1c^{d}	-15.2 ± 2.6^{c}	0.81 ± 0.01^{c}	0.57 ± 0.01^{d}

$^{a-e}$ ค่าเฉลี่ย ± S.D. (n = 3) อักษรในคอลัมม์เดียวกันมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05)

ที่มา : Visessaguan *et al.* (2004)

2.4 ผลิตภัณฑ์หมูส้ม

หมูส้ม จัดเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย อีกทั้งมีลักษณะคล้ายผลิตภัณฑ์จิ้นส้มในภาคเหนือ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว โดยผลิตจากเนื้อหมูหั่นชิ้นหรือบด เกลือโซเดียมคลอไรด์ 2-3% ข้าวสุก กระเทียม และเกลือไนไตร์ท100-125 ppm และส่วนผสมอื่นๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก หรือห่อด้วยใบตอง ซึ่งวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตหมูส้ม คือ เนื้อบด คิดเป็น 90% ของวัตถุดิบทั้งหมด ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ (ประมาณ 60% ของน้ำหนักแห้ง) โดยเป็นลักษณะเฉพาะของหมูส้มโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เนื้อสัมผัสและสี กระบวนการหมักหมูส้มใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 30 ℃ (ประเทศไทยมีอุณหภูมิประมาณ 30-35 ℃) โดยไม่ต้องทำการบ่มเพิ่มเติม ซึ่งโดยมีค่า pH ประมาณ 4.4-4.8 และมีค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 0.77- 1.60 % กระบวนการหมักเกิดขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีอยู่จากวัตถุดิบเนื้อสด (Visessanguan *et al.*, 2003)

2.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์หมูส้ม

หมูส้ม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อหมู หมูสามชั้น หรือเอ็นหมู อย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมกันมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นหรือชิ้นบาง ผสมกับเกลือ (ไม่ต่ำกว่าร้อยละ ๓ โดยน้ำหนัก) เติมข้าวเจ้าสุกหรือข้าวเหนียวสุกและกระเทียมบด ผสมให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะบรรจุที่ปิดเพื่อให้เกิดการหมักในระยะเวลาที่เหมาะสมจนมีรสเปรี้ยว โดยมีค่าความเป็นกรดด่างไม่เกิน 4.6 และก่อนบริโภคต้องทำให้สุก (มผช., 876-2548)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดมาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.5.1 ซาโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

2.5.2 สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.5.3 ยีสต์และรา ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องบดเนื้อรูบดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (Biro, Germany)
2) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
3) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Germany)
4) ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow (Dwyer model merk II, USA)
5) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Germany)
6) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Germany)
7) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama model HVE 50, Japan)
8) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
9) เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
10) เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France)
11) เครื่อง Ultrasonic bath
12) ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Socorex, Switzerland)
13) เครื่องบรรจุสุญญากาศ และถุงสุญญากาศ (Ramon, Germany)
14) เครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler, Instron Model 1011)
15) เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunterlab MiniScan EZ 4000L, USA)
16) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax, Germany)
17) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu model UV – 1601, Japan)
18) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)
19) เครื่อง Centrifuge (Hettich Zentrifugen model Universal 16R, Germany)
20) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (AE-6530 mPEG, ATTO, Japan)
21) เครื่องวิเคราะห์ HPLC (Thermo separation products model ConstaMetric 4100 Bio, Japan)
22) เครื่องวัด UV วิเคราะห์ HPLC (Spectra System model UV1000, Japan)
23) เครื่องควบคุมอุณหภูมิคอลัมม์ (Eldex CH-150, USA)
24) คอลัมม์สำหรับวิเคราะห์ HPLC (Luna NH_2 column ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร, ขนาด pore size 3ไมครอน) (Phenominex, USA)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Agar-agar (Merck, Germany)
2) Baird-Parker agar (Merck, Germany)
3) Chromocult (Merck, Germany)
4) De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck, Germany)
5) Fluorocult LMX broth (Merck, Germany)
6) Hektoen enteric agar (Merck, Germany)
7) L- Histidine monohydrochloride monohydrate (Calbiochem, USA)
8) L- Ornithine monohydrochloride monohydrate (Calbiochem, USA)
9) L- Phenylalanine (Calbiochem, Japan)
10) L- Tryptophan (Calbiochem, China)
11) L- Tyrosine (Merck, Germany)
12) Lauryl Sulfate broth (Merck, Germany)
13) Malt agar (Merck, Germany)
14) Malt extract (Merck, Germany)
15) Methyl red-VogesProskauer (MR-VP) broth (Merck, Germany)
16) Modified Oxford Listeria supplement (Oxiod, UK)
17) Mueller-Hinton broth (Merck, Germany)
18) Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (Merck, Germany)
19) Novobiocin Sodium salt (Sigma-Aldrich, USA)
20) Nutrient Standard (Merck, Germany)
21) Oxford Listeria agar base (Oxoid, UK)
22) Plate Count agar (Merck, Germany)
23) Salmonella-Shigella (SS) agar (Merck, Germany)
24) Simmons Citrate agar (Merck, Germany)
25) Thiamine Hydrochloride (Calbiochem, Germany)
26) Triple Sugar Iron agar (Merck, Germany)
27) Tryptic Soy Broth (Merck, Germany)
28) Violet red bile agar (Merck, Germany)
29) Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) agar (Merck, Germany)
30) Yeast extract granulated (Merck, Germany)
31) Ammonium disulfate ($(NH4)_2SO_4$) (Merck, Germany)

32) Bromocresol purple (Alpha Chemika, India)

33) $CaCO_3$ (ScharlauChemie S. A., Spain)

34) Ethanol (Merck, Germany)

35) Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)

36) Glycerol (Bio-Rad, USA)

37) Magnesium Chloride ($MgCl_2$) (Merck, Germany)

38) Potassium Chloride (KCl) (Merck, Germany)

39) Sodium Chloride (NaCl) (Merck, Denmark)

40) Sodium bicarbonate ($Na_2(CO_3)_2$) (Alpha Chemika, India)

41) Sodiumhydroxide (NaOH) (Merck, Germany)

42) Potassiumhydroxide (KOH) (Merck, Germany)

43) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad, USA)

44) Acrylamide (Bio-Rad, USA)

45) 2- Mercaptoethanol (Bio-Rad, USA)

46) Bisacrylamide (Bio-Rad, USA)

47) Bromophenol blue (Sigma-Aldrich, Germany)

48) Acetic acid (Merck, Germany)

49) Methanol (HPLC grade) (Merck, Germany)

50) Trichloroacetic acid (Merck, Germany)

51) Acetonitrile (HPLC grade) (Merck, Germany)

52) Ammonium acetate (Merck, Germany)

53) Dansyl chloride (Sigma-Aldrich, Germany)

54) 1,7-diaminoheptane (Sigma-Aldrich, Germany)

55) Putrescine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

56) Cadaverine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

57) 2-phenylethylamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

58) Tryptamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

59) Histamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

60) Spermidine trihydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

61) Tyramine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

62) Spermine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Germany)

3.3 ขอบเขตของงานวิจัย

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัย	แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ 1) การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ 1.1) การทดสอบสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมัก 1.2) การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตที่สภาวะค่า pH ต่าง ๆ 1.3) การทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตที่เกลือน้ำดีความเข้มข้นต่าง ๆ 1.4) การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง 1.5) การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น ด้วยวิธี actual screening test 2) การศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติก ทำการศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญ (minimum inhibition concentration, MIC) และทำลายแบคทีเรียแลกติก (minimum bactericidal concentration, MBC) ของด้วยยาปฏิชีวนะ penicillin G, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin
การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่มีความปลอดภัย	1) การบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้ 16S rRNA gene ลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16P rDNA sequence
การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม	แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ 1) การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม โดยการทดลองนี้แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ทางการค้า TISTR543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 และที่ 72 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติก

	2) ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ส่วนผสมของหมูส้มทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (control) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ จำนวน 1 ไอโซเลท (จากการทดลองที่ 3.1)โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10^6 cfu/g เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าแบคทีเรียทางการค้าด้วยการทดสอบดังต่อไปนี้ 2.1) การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการตรวจนับแบคทีเรียแลคติก 1) วัดค่า pH ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 2) วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) 2.2) ด้านคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ Coliforms, *E. coli* (Chromocult, Merck, Germany, AOAC, 2006), Yeast/Mold (Malt agar, Merck, Germany, AOAC, 2005), *S. aureus* (Baird-parker, Merck, Germany, BAM, 2001), *Salmonella* spp. (Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn), Hektoen enteric agar, Merck, Germany, ISO 6579) 3) วิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก สำหรับการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการวิเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนด้วยวิธี HPLC ให้เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 °C 3.1) การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE 3.2) วิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนด้วยวิธี HPLC

	4) ด้านคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ 4.1) การหาค่าการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมัก (weight loss) 4.2) วัดค่าสี (CIE L*a*b*) 4.3) Texture profile analysis (TPA) 5) วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory) ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH ≤ 4.6) เพื่อวิเคราะห์คุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยศึกษาความชอบโดยรวมของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว และลักษณะโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7- Point hedonic scale

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย

แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.3.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำๆ

1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 42 ตัวอย่าง ซึ่งมีจำนวน 26 ไอโซเลท แต่ละสายพันธุ์จำนวน 1 loop นำมาถ่ายลงใน MRS broth แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในจานเพาะเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในข้อที่ 2 แบ่งเป็นช่องๆ ไว้ 4 ช่องห่างเท่า ๆ กัน ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้มาแตะบนผิวหน้า MRS ช่องละ 1 ตัวอย่าง จานละ 1 เชื้อ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยเพาะเชื้อแล้วทั้งหมดไปบ่มในสภาพ microaerobe โดยใช้ candle jar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการผสมเชื้อ *L. monocytogenes, S. aureus, S.* Typhimurium และ *E. coli* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE soft agar เป็นปริมาตร 2% (v/v) โดยแบคทีเรีย 1 ชนิดต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีความเข้มข้นแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 10^5 cfu/ml แล้วทำการเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน เท soft agar ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วจานอย่างเร็ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียแลคติก ถ้าเชื้อที่เป็นอินดิเคเตอร์ได

ถูกยับยั้งการเจริญจนเห็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดสอบ แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ และทำการบันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งของแบคทีเรียก่อโรค จำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในกรด และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี agar spot (Schillinger and Lucke, 1989) จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง เพื่อนำไปคำนวณหา ค่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ตามวิธีการของ Makras and DeVuyst (2006)

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

ประสิทธิภาพของการยับยั้ง แบ่งออกเป็น 3 ช่วง โดย 1 หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง 1.1-1.9 หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ 2.0 - 2.9 หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และ >3.0 หมายถึง มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง โดยทำการคัดเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยมีค่าประสิทธิภาพยับยั้งที่มากกว่า 1 ขึ้นไป ทั้งนี้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH และเกลือน้ำดีต่างๆ ต่อไป

1.2) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วงค่า pH ต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Erkkilä and Petäjä, 2000) นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมาศึกษาการทนกรดและการเจริญที่ระดับค่า pH ต่างๆ ในอาหารเหลว MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย กรดไฮโดรคลอริก (8M HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (5N NaOH) ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวน 7 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่ทำการปรับค่า pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยให้มีเชื้อที่ใช้ศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 cfu/ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดลองทุกระดับพีเอชหลังการบ่มที่ 18 ชั่วโมง โดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar และบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณโคโลนีของเชื้อ และสุ่มตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในที่ช่วงค่า pH ต่าง ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ โดยทุกระดับค่า pH ต้องมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^6 cfu/ml ขึ้นไป เพื่อนำไปศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อไป

1.3) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Gilliland and Speck, 1984 ; Erkkilä and Petäjä, 2000) การ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มีจำนวน 4 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% โดยการเตรียม MRS broth ให้มีค่า pH ใกล้เคียงกับลำไส้เล็กส่วนต้น คือ มีค่า pH 8 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ดังกล่าวให้มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% เติมแบคทีเรียแลคติกที่ทำการศึกษาโดยให้มีเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเริ่มต้นในหลอดทดลองปริมาณ 10^6 cfu/ml ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำหลอดทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจนำปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดลองทุกระดับ pH หลังการบ่มที่ 18 ชั่วโมง โดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar และบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณโคโลนี และสุ่มตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ โดยทุกความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ต้องมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^6 cfu/ml ขึ้นไป

1.4) การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง (ดัดแปลงวิธีจาก Zárate *et al.*, 2000)

ถ่ายเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเชื้อในอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที (12,000 rpm/min for 10 min) อุณหภูมิ 4 °C ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเซลล์ลงในน้ำย่อยกระเพาะจำลอง (pepsin) ที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่รอด ชีวิตที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที โดยวิธี standard plate count หลังจากสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะจำลองนาน 180 นาที จากนั้นนำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง (pepsin) 25 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C ถ่ายส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำย่อยลำไส้จำลอง (bile salt ที่ความเข้มข้น 0.15 และ pancreatin 0.1% ปรับ pH ที่ 8 ด้วย NaOH) ที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที 37 °C ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที โดยวิธี standard plate count รายงานผลจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตเป็นค่า log cfu/ml แสดงคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ดังสมการด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลา (log cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log cfu/ml)}}$$

1.5) การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น ด้วยวิธี actual screening test

การคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น ด้วยวิธี actual screening test ดัดแปลงจากวิธีการของ Bover-Cid และ Holzapfel (1999) ซึ่งเป็นการพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ decarboxylase ในการย่อยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ โดยนำแบคทีเรียแลคติก ทำการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 0.25% NaCl, 0.001% thiamine, 0.01% $CaCO_3$, 0.005% pyridoxal-5-phosphate, 1% กรดอะมิโนแต่ละชนิด, 0.006% bromocresol purple และ 0.6% agar ปรับ pH ให้มีค่า 5.3 ด้วย 0.1 N HCl และ 0.1N NaOH จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 4 วัน ทำการอ่านผล คือ (+) หมายถึง การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกย่อยกรดอะมิโน และคาดว่าผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ และ (–) หมายถึง การไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกไม่ย่อยกรดอะมิโน และคาดว่าไม่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน

2) การศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติก

ทำการศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญ (minimum inhibition concentration, MIC) และทำลายแบคทีเรียแลกติก (minimum bactericidal concentration, MBC) ของด้วยยาปฏิชีวนะ penicillin G, tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin โดยทำการศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติก และจัดเก็บ stock culture เมื่อต้องการทำการทดลอง นำ stock culture ที่อุณหภูมิ -20 °C มาละลายน้ำแข็ง และเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายแบคทีเรียแลคติกให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml (0.5 McFarland standard) เพื่อทำการศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (minimum inhibition concentration, MIC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-A4 (2013) ทั้งนี้ทำการเจือจางสารแต่ละชนิดแบบ two fold dilution ใน micro plate โดย penicillin G, tetracycling และ chloramphenicol มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 256 - 0.25 µg/ml และ erythromycin อยู่ในช่วง 2,565 - 2 µg/ml โดยทำการเตรียมสารให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate ตามข้างต้น และใส่แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5x 10^5 cfu/ml โดยเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 3 แบบ ดังนี้

- growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรียแลคติก

- negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย-แลคติก

- sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง UVM 340 Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยความสามารถในการวัดความขุ่นต่ำสุดคือ มีค่าน้อยกว่า 0.05 จากนั้นทำการหาค่า MBC โดยนำสารละลายในหลุมของ microplate ที่ใสมาปริมาตร 10 ไมโครลิตรเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 99.9% ของจำนวนแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้น และสรุปผลโดยการประเมินระดับไวต่อยาปฏิชีวนะตามตารางผนวกที่ ค2

3.3.2 การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย

การบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้ 16S rRNA gene และลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rRNA sequence analysis โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรียแลคติกมีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดจำนวน 3 สายพันธุ์ ส่งตรวจที่สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการสกัดโคโมโซมจากแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2% ลงในอาหารเหลว MRS หลอดใหม่แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอด microtube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 2 - 5 นาที ทำการเก็บตะกอนซ้ำประมาณ 2-3 รอบ เติม TE Buffer (10 mM Tris-HCl ที่ pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปต้ม 10 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เป้าหมาย (PCR product) ด้วยเทคนิคเพิ่มขนาดจำนวนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction, PCR) ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณปลาย 3' และ 5' ของยีน 16S rRNA ด้วยเครื่อง Thermalcycler PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์พีเอช 8.8 (1X) (10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCl, 2 mM $MgSO_2$, 0.1% Triton X-100) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.0 mM ดีเอ็นเอแม่แบบ 2-5 ไมโครลิตร, นิวคลีโอไทด์ (dNTP) 0.4 μM, ไพรเมอร์ชนิดละ 0.4 μM ไพรเมอร์ที่ใช้คือ 27F 5'-AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG-3' และ 1492R 5' -GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3' เอนไซม์ *Taq DNA* polymerase (Biolad) 1 ยูนิต ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากันโดยไมโครปิเปต จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermalcycler PCR

และใช้โปรแกรมในการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอดังนี้ ในปฏิกิริยาเริ่มต้นใช้อุณหภูมิช่วง Denaturation 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ช่วง Primer annealing ใช้อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และช่วง Primer extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาครบ 35 รอบแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

PCR condition		
94°C	3	min
94°C	30	ses
55°C	30	ses
72°C	2	min
72°C	5	min

Primer สำหรับ sequencing คือ 530F (5' GTG CCA GCM GCC GCG G 3') 907R (5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT '3) จากนั้นอ่านลำดับเบสของ DNA โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing นำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเตอร์เนต เพื่อหาชนิดของเชื้อที่มีลำดับเบสของ DNA (ในที่นี้คือส่วนยีน 16S rRNA) โดยเข้าไปที่เวปไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.3.3 การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

3.3.3.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

โดยการทดลองนี้แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทางการค้าชื่อเชื้อ TISTR543 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 และที่ 72 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

1.1) การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

นำกล้าเชื้อทางการค้าชื่อเชื้อ TISTR543 และแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 มาทำการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ ก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อ บริสุทธิ์ โดยการดูดเชื้อ ปริมาณ 100 µl ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) + 1% NaCl 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา

16 - 18 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้ปริมาตร 1 ml (2%) ลงในอาหารเหลว MRS + 1% NaCl 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง นำเชื้อใส่ลงแบบจำลองหมูส้มปริมาณ 10^5 cfu/ml

1.2) การเตรียมแบบจำลองหมูส้ม ดัดแปลงวิธีการจากแบบจำลองแหนมของอดิศร เสวตวิวัฒน์ และคมแข พิลาสมบัติ (2555) โดยแบบจำลองหมูส้มมีส่วนประกอบได้แก่ meat extract 0.009%, tryptone 0.009%, sodium ascorbate 0.0005%, sodium tripolyphosphate 0.003%, glucose 0.009%, sodium chloride 0.024%, ข้าวสุก 0.002% และน้ำกลั่น 0.943% โดยทำการผสมส่วนประกอบ ละลายให้ส่วนผสมละลายจนหมดและปรับพีเอชประมาณ 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เสร็จแล้วบรรจุลงขวดที่มีฝาปิดปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำกระเทียมสดมาปอกเปลือก ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 95% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำไปหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ในตู้ปลอดเชื้อ ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้หั่นผ่านการฆ่าเชื้อ เติมกระเทียมและโซเดียมไนไตรต์ลงในขวดแบบจำลองหมูส้มให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 5% และ 100 ppm ตามลำดับ

1.3) การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

ทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม โดยการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.4) การวัด pH ในแบบจำลองหมูส้ม

การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของแบบจำลองหมูส้มแต่ละกลุ่ม ตามวิธีการของ AOAC (1984) โดยวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH Mettler Toledo 320 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.3.3.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ส่วนผสมของหมูส้มทั้ง 3 กลุ่ม ทั้งที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (control) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ จำนวน 1 ไอโซเลท โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10^5 cfu/g ลงในส่วนผสมของหมูส้ม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าแบคทีเรียทางการค้า

2.1) การเตรียมตัวอย่างหมูส้ม

วิธีการเตรียมหมูส้มดัดแปลงจากวิธีการเตรียมแหนมหมูตามวิธีการของจุฑารัตน์ เศรษฐกุล และพรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ (2553) โดยมีรายละเอียดดังนี้ เนื้อหมูบดส่วนสะโพก 84.00% กระเทียม 6.50% ข้าวสุก 6.50% และวัตถุดิบอื่นๆ 3.00% นวดให้ส่วนผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และเหนียว อัดเป็นแท่งๆ ละ 100 กรัม นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 7 วัน

2.2) การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และแสดงข้อมูลตามตารางผนวกที่ จ3

2.3) การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

การวัดค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์หมูส้มตามวีธีที่อ้างอิงจาก AOAC. (1984) ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 โดยเตรียมตัวอย่าง 2 กรัม ใส่น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH รุ่น Mettler Toledo 320 (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) บันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ วัดค่า pH ของน้ำกลั่นไว้เพื่อเปรียบเทียบ และแสดงข้อมูลตามตารางผนวกที่ จ4

2.4) วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ของผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยดัดแปลงวิธีการจาก Friedrich (2001) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบ อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาแต่ส่วนใส นำไปไตเตรทด้วย 0.1 NaOH กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ และแสดงข้อมูลตามตารางผนวกที่ จ4 โดยคำนวณหาปริมาณกรดจากสูตร

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

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH ที่ใช้

2.5) วิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ Coliforms, *E. coli* (Chromocult, Merck, Germany,

AOAC, 2006) โดยจำแนกชนิดเชื้อ *E. coli* ตามตารางผนวกที่ จ 1 และคำนวนค่า MPN ตามตารางผนวกที่ จ 2, Yeast/Mold (Malt agar, Merck, Germany, AOAC, 2005) , *S. aureus* (Baird-parker, Merck, Germany, BAM, 2001) โดยแสดงข้อมูลดังตารางผนวกที่ จ 3, *Salmonella* spp. (Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn), Hektoen enteric agar, Merck, Germany, ISO 6579)

3.3.3.3 วิเคราะห์คุณภาพด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการวิเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนด้วยวิธี HPLC ให้เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 °C

3.1) การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นแยกโปรตีนในตัวอย่างโดยกระแสไฟฟ้าตามความแตกต่างของมวลโมเลกุลด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้ความเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์สำหรับการแยก (running gel) ที่ความเข้มข้น 10% และความเข้มข้นของเจลสำหรับการทำให้โปรตีนเข้มข้น (stacking gel) ที่ความเข้มข้น 4 % จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ผสม SDS ความเข้มข้น 5% ไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) นำมาโหลดลงเจล 15 µg/gel แบบแนวตั้งด้วยเครื่องอิเล็กโตรไฟรีซิส (AE-6530 mPEG, ATTO, Japan) หลังจากแยกเสร็จแล้วนำเจลมาย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue R-250 ที่ประกอบด้วยสารละลายผสมของเอทานอล 45% และกรดอะซิติก 10% แช่ทิ้งไว้ข้ามคืนด้วยเครื่อง Incubator shaker (Daiki Model KBLee 1001, Bio-Active, USA.) และล้างสีย้อมด้วยตัวทำละลายผสมเอทานอล 30% และกรดอะซิติก 10%

3.2) การวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์โดยตัดตัวอย่างตัวอย่างเนื้อและหมูส้มชิ้นเล็กๆ และปั่น (Osterizer, South Shelton, CT, USA) เป็นเวลา 30 วินาที (2 รอบ) ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ในถุงพลาสติก (15 - 23 เซนติเมตร) และสกัดด้วย 5% tricholoaceticacid โดยใช้เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France) ด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 8 นาที และใช้ 1,7-diaminoheptane ปริมาณ 500 µl (10 mg/ml) เป็น internal standard โดยสัดส่วนของตัวอย่างและ tricholoaceticacid ความเข้มข้น 5% คิดเป็น 1:5 (w/v) เก็บส่วนใสที่ได้จากการสกัดตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15นาที จากนั้นนำส่วนใสเก็บรักษาทันทีที่อุณหภูมิ -20 °C

การวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์หมูส้มดัดแปลงวิธีการของ Tosukhowong *et al.* (2011) เตรียมสารละลาย dansyl chloride ใหม่ (สาร 1 มิลลิกรัมใช้ acetone 10มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็น derivatising agent ส่วนใสหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 300 µl ผสมกับ sodium hydroxide 2 M ปริมาตร 60 µl และสารละลายอิ่มตัว sodium hydrogen carbonate ปริมาตร 90 µl และ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย dansyl chloride ปริมาตร 600 µl เพื่อทำปฏิกิริยา และบ่มที่ 40 °C เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น เติมสารละลาย ammonia ความเข้มข้น 32% ปริมาตร 30 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรของตัวอย่างด้วย acetonitrile ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,500 µl ภายหลังจากการผสม นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนใสด้วย Minisart RC4 filter ขนาด 0.45 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) และฉีดตัวอย่างที่ผ่านการกรองปริมาตร 20 µl เพื่อการวิเคราะห์ HPLC แยกสารประกอบไบโอเจนิกโดยใช้ Luna NH_2 column 3µm, 4.6 x 250 ม.ม. (Phenomenex, USA) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (Thermo separation products model ConstaMetric 4100 Bio, Japan) ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมม์ที่ 40 °C และฉีดสารละลายมาตรฐานหรือ derivatised sample ปริมาตร 20 µm โดย mobile phase ใช้ ammonium acetate 0.1M เป็นตัวทำละลาย A และ acetonitrile ใน acetonitrile เป็นตัวทำละลาย B กำหนดอัตราการไหลของสารเป็น 1.2 มล./นาที โดยใช้ isocratic programme ตัวทำละลาย A 10% และ B 90% ภายใน 25 นาที หลังจากนั้นทำ Equilibium time เป็นเวลา 10 นาทีโดยก่อนเริ่ม run ใหม่ ตรวจวัดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยใช้ UV detector (Shimadzu, Japan) โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในหมูส้มเปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

3.3.3.4 วิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพของหมูส้ม

ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมัก (weight loss), ค่าสี (CIE L*a*b*), Texture profile analysis (TPA)

4.1) การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมัก (weight loss) แสดงผลในตารางผนวกที่ จ 6

การหาค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมักด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Nakoa *et al.* (1998) ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 โดยนำตัวอย่างที่ใช้สำหรับวัด % weight loss บรรจุในถุงปริมาณ 25 กรัม จำนวน 2 ซ้ำ ทำการชั่งน้ำหนักก่อนซับน้ำออกเมื่อครบระยะเวลา จากนั้นตัดถุงออกใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกเบาๆ ข้างละ 2 ครั้ง และชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณหา % weight loss จากสมการ

เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมัก $= \left[\frac{A-B}{A}\right] \times 100$

A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนกระบวนการหมัก

B = น้ำหนักตัวอย่าง ณ กระบวนการหมัก

4.2) วัดค่าสี (CIE L*a*b*)

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 โดยนำตัวอย่างหมูส้มทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง (กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (control) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลท) กลุ่มทดลองละ 2 ชิ้น ขนาด 3 x 8 x 0.5 เซนติเมตรนำมาวัดค่าสีในรูปแบบ CIE (L* a* b*) ชิ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี Colorimeter MiniScan EZ 4000L (Hunter Lab Inc., Reston, VA, USA) ปรับเทียบค่าเครื่อง (calibrate) ด้วยแผ่นสีมาตรฐานก่อนการวัดทุกครั้ง แสดงผลค่าสี L*, a* และ b* ในตารางผนวกที่ จ 7, จ 8 และ จ 9 ตามลำดับ

4.3) วัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม (Texture profile analysis)

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 เพื่อการประเมินคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้มทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง โดยประเมินคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสดัดแปลงวิธีการของ Bourne (1976) โดยใช้หัววัด cylindrical aluminium probe (50mm diameter) ด้วยเครื่อง Instron (model 1011. USA) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้น ขนาด 30 x 30 มิลลิเมตร วัดค่าที่อุณหภูมิห้อง และตัดด้วยเครื่อง Instron บันทึกค่าความแข็ง (hardness : N), ความเหนียวคล้ายยาง (gumminess : N), ความเคี้ยวได้ (chewiness : N), ความยืดหยุ่น(springiness : ratio) และค่าการเกาะรวมตัว (cohesiveness : ratio)

3.3.3.5 วิเคราะห์คุณภาพด้านประสาทสัมผัส

ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมูส้มเมื่อผลิตภัณฑ์มีค่า pH ที่ 4.5 - 4.6 เพื่อวิเคราะห์คุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยศึกษาความชอบโดยรวมของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว และลักษณะโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-Point hedonic scale โดยใช้คะแนนความชอบ 9 ระดับ ตั้งแต่ 1-9 ดังต่อไปนี้

1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด

2 หมายถึง ไม่ชอบมาก

3 หมายถึง ไม่ชอบ

4 หมายถึง เฉยๆ

5 หมายถึง ชอบ

6 หมายถึง ชอบมาก

7 หมายถึง ชอบมากที่สุด

จำนวนผู้ทำการทดสอบทั้งหมด 30 คน อาชีพอาจารย์บุคลากรและนักศึกษา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยใช้แบบประเมินจากภาคผนวก ฉ

3.3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองที่ 4 วิเคราะห์ข้อมูลโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized design, CRD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่ากลางระหว่างหน่วยทดลองโดยวิเคราะห์ผ่านค่าความแปรปรวน (variance) หรือ Analysis of variance (ANOVA) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for windows version 17.0: SPSS Inc.)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย

4.1.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำๆ

4.1.1.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยเทคนิค agar spot assay ตามมีวิธีการของ Schillinger and Lucke (1989) ดังตารางที่ 4.10 พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมดจำนวน 254 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *E. coli* จำนวน 53, 57, 45 และ 57 ไอโซเลท ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร

แบคทีเรียก่อโรค	แบคทีเรียแลคติก	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค			
		(+++)	(++)	(+)	(-)
L. monocytogenes	จำนวนไอโซเลท	1	9	43	201
	ร้อยละ	0.39	3.54	16.93	79.13
S. aureus	จำนวนไอโซเลท	5	10	42	197
	ร้อยละ	1.97	3.94	16.54	77.56
S. Typhimurium	จำนวนไอโซเลท	2	9	34	209
	ร้อยละ	0.79	3.54	13.39	82.28
E. coli	จำนวนไอโซเลท	2	4	51	197
	ร้อยละ	0.79	1.57	20.08	77.56

(-) : ≤ 0 มม. ; (+) : 1 - 8 มม. ; (++) : 8 - 12 มม. ; (++) : > 12 มม.

ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (*L. monocytogenes* และ *S. aureus*) มีผนังเซลล์ชนิด peptidoglycan ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*S.* Typhimurium และ*E. coli*) โดยคิดเป็น 50 - 90% ของผนังเซลล์ จึงส่งผลการยับยั้งแบคทีเรียลบได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีผนังเซลล์บางกว่า คิดเป็น 10% ของผนังเซลล์ และมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเป็นลิพิด และมีช่องว่างที่แยกออกจากผนังเซลล์ โดยอยู่ระหว่างชั้น peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์

ชั้นนอก อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Tharmaraj and Shah (2009) ที่พบว่าโปรไบโอติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีบริเวณการยับยั้งการเจริญ 19 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้งสอดคล้องกับ Shanthya *et al.* (2010) ที่ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบของแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อ Lactobacilli สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ได้ โดยมีค่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 26 และ 28 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้ง Hwanhlem *et al.* (2010) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปลาส้มจำนวน 14 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ *S. salivarius* LD219, *Enterococcus faecalis* LPS04, LPS17 และ LPS18 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด

จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ (ตารางที่ 4.2) โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษแกรมบวกและแกรมลบได้เป็นจำนวน 42 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lima *et al.* (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อ Lactobacilli จากกระเพาะพักและไส้ติ่งของลูกไก่ พบว่าเชื้อ Lactobacilli จำนวน 265 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *L. reuteri* และ *L. salivarius* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ (26 ไอโซเลท) เพื่อนำไปศึกษาการรอดชีวิตในช่วง pH ต่างๆ และการทนต่อเกลือน้ำดีต่อไป

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหาร

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหาร[a, b]	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติก
1 สายพันธุ์ (แกรมบวกหรือแกรมลบ)	44
2 สายพันธุ์ (แกรมบวกและแกรมลบ)	54
2 สายพันธุ์ (แกรมบวก)	42
2 สายพันธุ์ (แกรมลบ)	36
3 สายพันธุ์	23
4 สายพันธุ์	26

[a] แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (*S. aureus, L. monocytogenes, S.* Typhimurium และ *E. coli*)

[b] แบคทีเรียแลคติกจำนวน 29 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร

4.1.1.2 การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะค่า pH ต่าง ๆ

จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกใน MRS broth ที่มีการปรับค่า pH ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 (ตารางที่ 4.3) พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 26 ไอโซเลท มีแบคทีเรียแลคติกเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถในการรอดชีวิตได้ในสภาวะค่า pH 2 โดยมีจำนวนอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^2 cfu/ml ในขณะที่สภาวะค่า pH 3 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^4 cfu/ml ที่สภาวะค่า pH 4 มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 18 และ 8 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตอยู่ในช่วง 10^4 ถึง 10^5 และมากกว่า 10^6 cfu/ml ตามลำดับ และที่สภาวะค่า pH 5 - 8 แบคทีเรียแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตและเจริญได้มากกว่า 10^6 cfu/ml ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกมีค่า pH เหมาะสมต่อการเจริญโดยอยู่ในช่วง 5.58 ถึง 6.20 แต่จะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อมีค่า pH ลดลง เป็นกลางหรือเป็นด่างมากขึ้น (Salminen and Wright, 1993) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Ruiz - Moyano *et al.* (2008) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรียโดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีที่ค่า pH 5 และ 5.5 โดยมีความสามารถในการรอดชีวิตได้ถึง 34.6 % โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ 6 - 8 log cfu/g ภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง ในขณะที่สภาวะค่า pH 4 แบคทีเรียแลคติกสามารถรอดชีวิตได้ลดลงเหลือเพียง 10 %

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH ต่างๆ

pH	จำนวนไอโซเลทต่อระดับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก[a] (cfu/ml)					
	$< 10^1$	10^1-10^2	10^2-10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	$> 10^6$
2	23	3	-	-	-	-
3	-	9	11	6	-	-
4	-	-	-		18	8
5	-	-	-	-	-	26
6	-	-	-	-	-	26
7	-	-	-	-	-	26
8	-	-	-	-	-	26

[a] จำนวนไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร

4.1.1.3 ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.4 แสดงความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกโดยดัดแปลงวิธีการจาก Erkkilä and Petäjä (2000) และ Garcia-Ruiz *et al.* (2014) พบว่า แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนและเจริญได้มากกว่า 10^6 cfu/ml ที่ทุกระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี โดยแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1.0 % ได้ร้อยละ 100 มีจำนวน 10, 7 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Bao *et al.* (2010) ได้ทำการคัดเลือกโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* จากผลิตภัณฑ์นมหมักจำนวน 11 สายพันธุ์ โดย *L. fermentum* F6 สามารถทนต่อเกลือน้ำดี ในขณะที่ *L. fermentum* IMAU60151, IMAU60083, IMAU20080 และ IMAU60120 มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ต่ำกว่า

เช่นเดียวกับ Zoumpopoulou *et al.* (2007) พบว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ถึงความเข้มข้น 2 % ในขณะที่ Bao *et al.* (2010) ทำการคัดแยก *L. fermentum* SGM จากไก่ พบว่าสามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3 % ได้ 100 % และ *L. fermentum* F6 สามารถทนต่อความเข้มข้นเกลือน้ำดีได้มากที่สุด อีกทั้งการศึกษานี้ยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกบางไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้ Sanders *et al.* (1996) ได้กล่าวว่าเกลือน้ำดีส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้มีการจัดเรียงเซลล์ที่ไม่เป็นระเบียบ จึงส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตได้ในการย่อยและการดูดซึมของระบบทางเดินอาหาร

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซนต์การรอดของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ

เกลือน้ำดีเข้มข้น	ไอโซเลท	การเจริญ (%)	ไอโซเลท	การเจริญ (%)	ไอโซเลท	การเจริญ (%)
0.3 %	KL1011B1	99.55	KL13-12B1	100.00	KL601-22B1	12.00
	KL1011B2	98.42	KL13-12B2	45.43	KL601-21B1	100.00
	KL1011C2	100.00	KL14-21A2	98.83	KL612-32C1	100.00
	KL1011-1C2	100.00	KL14-22B1	97.37	KL73-21A2	100.00
	KL1012C2	100.00	KL2021B1	98.88	KL73-11C2	100.00
	KL1031B1	90.19	KL4011A1	12.20	KL73-11A1	88.72
	KL1031C2	11.77	KL43-11A2	97.86	KL8031C1	93.43
	KL1032A1	94.19	KL5031A2	97.13	KL9011B1	98.31
	KL12-11A3	100.00	KL60112A2	100.00		
0.6 %	KL1011B1	100.00	KL13-12B1	93.46	KL601-22B1	13.20
	KL1011B2	86.54	KL13-12B2	25.61	KL601-21B1	96.04
	KL1011C2	100.00	KL14-21A2	84.84	KL612-32C1	66.33
	KL1011-1C2	98.77	KL14-22B1	65.70	KL73-21A2	75.04
	KL1012C2	100.00	KL2021B1	98.01	KL73-11C2	100.00
	KL1031B1	83.02	KL4011A1	13.20	KL73-11A1	100.00
	KL1031C2	15.44	KL43-11A2	92.44	KL8031C1	95.42
	KL1032A1	67.99	KL5031A2	100.00	KL9011B1	93.75
	KL12-11A3	100.00	KL60112A2	60.59		
1.0 %	KL1011B1	100.00	KL13-12B1	64.14	KL601-22B1	12.80
	KL1011B2	54.66	KL13-12B2	12.80	KL601-21B1	85.97
	KL1011C2	91.42	KL14-21A2	30.38	KL612-32C1	56.98
	KL1011-1C2	68.41	KL14-22B1	22.43	KL73-21A2	61.76
	KL1012C2	100.00	KL2021B1	82.95	KL73-11C2	100.00
	KL1031B1	72.39	KL4011A1	12.60	KL73-11A1	38.80
	KL1031C2	18.76	KL43-11A2	21.42	KL8031C1	66.26
	KL1032A1	29.94	KL5031A2	79.67	KL9011B1	30.41
	KL12-11A3	8.22	KL60112A2	14.50		

นอกจากนี้ Noriega *et al.* (2004) ได้รายงานถึงความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ทั้งนี้ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้มีแปรปรวนตั้งแต่ 1.5 % ถึง 2.0 % (w/v) ในชั่วโมง

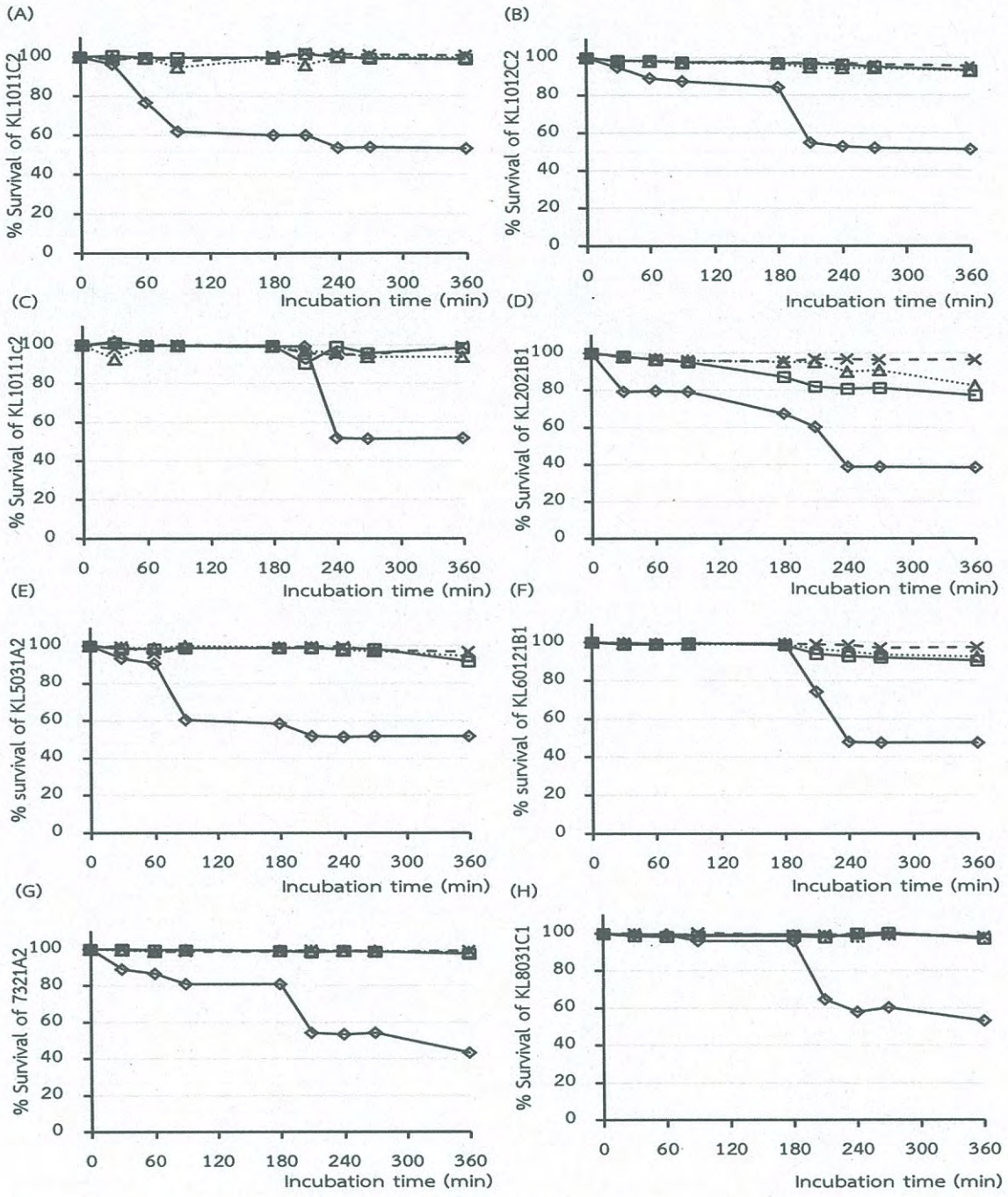
แรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3 % (w/v) โดยการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับความสามารถในการไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดความเป็นพิษเกลือน้ำดีต่อเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก

ดังนั้นเมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะ pH 2 - 3 ร่วมกับเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ได้มากกว่า 60% มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ KL1011C2, KL1011-1C2, KL1012C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และ KL8031C1

4.1.1.4 การทดสอบความสามารถการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

การศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียแลคติกในระบบกระเพาะและลำไส้จำลองที่ pH 2, 3, 4, และ 7 โดยวิธี standard plate count (ภาพที่ 4.1) พบว่าความสามารถในการรอดชีวิตของไอโซเลท KL1011C2, KL1012C2, KL10111C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และไอโซเลท KL8031C1 ในระบบกระเพาะจำลองที่ pH 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที มีการรอดชีวิตคงที่ในช่วง 8.23 – 9.53 log cfu/ml โดยภายหลังเมื่อแบคทีเรียแลคติกสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะจำลองที่ pH 8 เป็นเวลา 180 นาที พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทมีความสามารถในการรอดชีวิตที่คงที่ ยกเว้นไอโซเลทที่ KL2021B1 ซึ่งมีความสามารถในการรอดชีวิตลดลงในช่วง 0.93 - 1.01 log cfu/ml ในขณะที่เมื่อแบคทีเรียแลคติกสัมผัสน้ำย่อยลำไส้จำลองที่สภาวะ pH 2 เป็นเวลา 180 นาที พบว่า ไอโซเลทที่ KL8031C1, KL10111C2 และไอโซเลท KL60121B1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่สูงกว่า 95 % และภายหลังสัมผัสน้ำย่อยระบบลำไส้จำลองได้ 180 นาที พบว่า มีเปอร์เซนต์ในการรอดชีวิตที่ลดลงคิดเป็น 53.11, 52.14 และ 47.68% ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ มีความสามารถในการรอดชีวิตลดลงอย่างมากเมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะจำลองเป็นเวลา 180 นาที และภายหลังสัมผัสน้ำย่อยลำไส้จำลอง 180 นาที ในขณะที่ไอโซเลท KL1012C2 และ KL73-21A2 มีความสามารถในการรอดชีวิตลดลงปานกลางเมื่อสัมผัสน้ำย่อยระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง

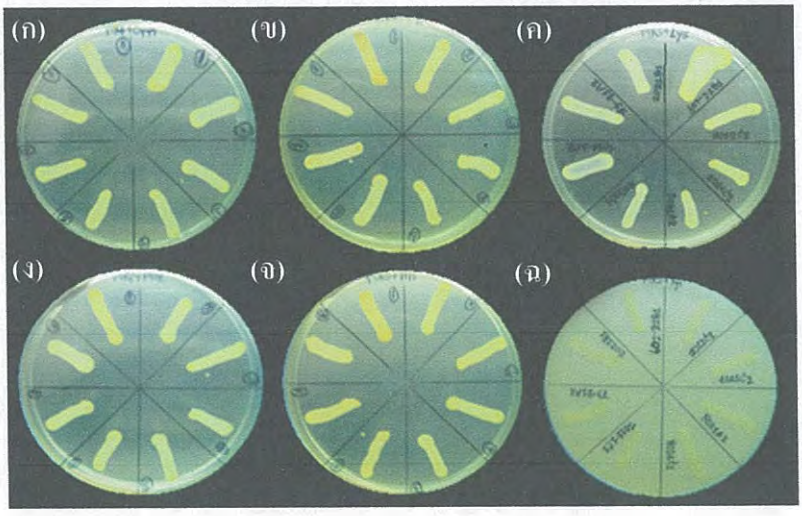
นอกจากนั้น Dunne *et al.* (2001) ได้รายงานว่าแบคทีเรียแลคติกในหลอดทดลองส่วนมากมีความอ่อนไหวต่อเกลือน้ำดีของโคและสุกร ซึ่งการทนต่อเกลือน้ำดีของมนุษย์แปรผันตามความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลอง ดังนั้นน้ำดีที่หลั่งภายในลำไส้เล็กจึงส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิพิด และกรดไขมันภายในผนังเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการ Charteris *et al.* (1998) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. สามารถทนต่อน้ำย่อยที่สภาวะกรดในระดับปานกลางในระหว่าง 90 นาที และบางสายพันธุ์ลดลงภายหลัง 2 ชั่วโมง นอกจากนั้น Kawther *et al.* (2010) ได้รายงานถึงความสามารถในการรอดชีวิตของ *L. johnsonii*, *L. gasseri* และ *L. salivarius* ในระบบกระเพาะจำลอง โดยการรอดชีวิตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับสภาวะ pH โดยที่ความสามารถในการอยู่รอดในระบบกระเพาะจำลองที่สภาวะ pH 3 และ 4 มีการรอดชีวิตที่สูงกว่าในสภาวะ pH 2 ภายหลัง 180 นาที



ภาพที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติก (A) ไอโซเลทที่ KL1011C2, (B) ไอโซเลทที่ KL1012C2, (C) ไอโซเลทที่ KL10111C2, (D) ไอโซเลทที่ KL2021B1, (E) ไอโซเลทที่ KL5031A2, (F) ไอโซเลทที่ KL601-21B1, (G) ไอโซเลทที่ KL73-21A2 และ (H) ไอโซเลทที่ KL8031C1 ในระบบทางเดินอาหารจำลองเป็นเวลา 360 นาที ; แบบจำลองกระเพาะอาหารที่ (-◇-) pH2, (-□-) pH3, (-△-) pH4 และ (-×-) pH7 เป็นเวลา 180 นาที และแบบจำลองลำไส้ที่ pH 8 เป็นเวลา 180 นาที

4.1.1.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น ด้วยวิธี actual screening test

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำโดยดัดแปลงวิธีการของ Bover-Cid *et al.* (1999) ดังภาพที่ 4.2 แสดงการการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ทำการเติมกรดอะมิโน ornithine, tryptophan, lysine, phenylalanine, histidine และ tyrosine โดยพบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่างๆ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ bromophenol purple โดยให้ผลเป็นลบ ซึ่ง bromocresol purple เป็นสารอินดิเคเตอร์สีที่มีช่วงการเปลี่ยนสีที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 5.2 - 6.8 (สีเหลืองไปสีม่วง) ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนชนิดต่างๆ อาจต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงทำให้ไม่ปรากฏการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงจากการใช้กรดอะมิโนในตัวอย่าง ดังนั้นจากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ KL1012C2, KL1011C2 และ KL60121B1 ไม่พบการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน



ภาพที่ 4.2 การสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ทำการเติมกรดอะมิโน ornithine (ก) , tryptophan (ข), lysine (ค), phenylalanine (ง), histidine (จ) และ tyrosine (ฉ)

4.1.2 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

ดังตารางที่ 4.5 แสดงการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้วิธี broth microdilution procedure ที่มียาปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ penicillin G, tetracycling, chloramphenicol และ erythromycin โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติกได้ (MIC) อยู่ในช่วง 0.125 ถึง 8 µg/ml ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติก 90% (MIC_{90}) อยู่ในช่วง 0.125 ถึง 32 µg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถทำลายแบคทีเรียแลคติก (MBC) ของยา tetracycling และ chloramphenicol มีค่าตั้งแต่ 128 ถึงมากกว่า 256 µg/ml อย่างไรก็ตาม เมื่อประเมินระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะที่คัดเลือกได้ (ภาคผนวก ข.) พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 8 ไอโซเลท ประกอบด้วย KL1011C2, KL10111C2, KL1012C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และ KL8031C2 มีความไวต่อการตอบสนองยาปฏิชีวนะทั้งสี่ชนิด ได้แก่ยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin และไวต่อการตอบสนองยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้แก่ ยาปฏิชีวนะ tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin เป็นต้น

ตารางที่ 4.5 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

Antibiotic	Isolate	Antibiotic resistant (µg/ml) [a]			Antibiotic susceptibility [b]
		MIC	MIC90	MBC	
PEN	KL1012C2	0.25	0.25	8	S
	KL10111C2	0.125	0.125	4	S
	KL1011C2	0.125	0.25	4	S
	KL2021B1	0.5	1	64	S
	KL5031A2	0.25	0.25	8	S
	KL601-21B1	0.5	0.5	32	S
	KL73-21A2	0.125	0.25	8	S
	KL8031C2	0.5	0.5	16	S
TET	KL1012C2	4	8	>256	S
	KL10111C2	4	8	128	S
	KL1011C2	4	16	256	S
	KL2021B1	4	8	128	S
	KL5031A2	4	8	256	S
	KL601-21B1	4	8	>256	S
	KL73-21A2	8	32	>256	S
	KL8031C2	2	16	128	S

[a] สถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (CLSI) ตามวิธี CLSI M7-A4 (2013)

[b] ประเมินระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตารางผนวกที่ ค 2

PEN= Penicillin G; TET= Tetracycline; CMP= Chloramphenicol; ERY= Erythromycin

MIC= Minimal inhibition concentration; MIC_{90}= Minimal inhibition concentration 90%;

MBC= Minimal bactericidal concentration; S= Susceptibility

ตารางที่ 4.5 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (ต่อ)

Antibiotic Antibiotic	Isolate Isolate	Antibiotic resistant (µg/ml) [a]			Antibiotic susceptibility
		MIC	MIC90	MBC	
CMP	KL1012C2	2	4	128	S
	KL10111C2	2	4	128	S
	KL1011C2	2	4	128	S
	KL2021B1	2	4	128	S
	KL5031A2	2	4	128	S
	KL60121B1	2	4	128	S
	KL7321A2	2	8	128	S
	KL8031C2	2	8	128	S
ERY	KL1012C2	1	4	9	S
	KL10111C2	2	2	64	S
	KL1011C2	1	1	32	S
	KL2021B1	2	4	128	S
	KL5031A2	1	2	2	S
	KL60121B1	1	2	64	S
	KL7321A2	1	2	128	S
	KL8031C2	2	2	128	S

[a] สถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (CLSI) ตามวิธี CLSI M7-A4 (2013)

[b] ประเมินระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตารางผนวกที่ ค 2

PEN= Penicillin G; TET= Tetracycline; CMP= Chloramphenicol; ERY= Erythromycin

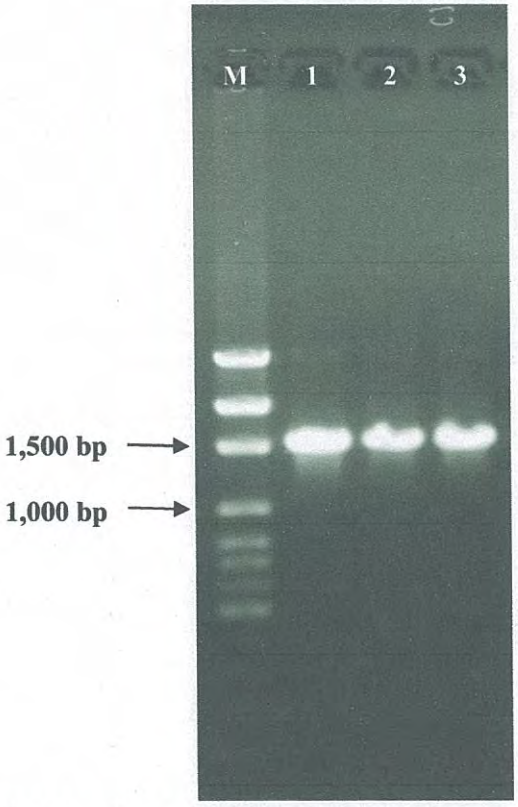
MIC= Minimal inhibition concentration; MIC_{90}= Minimal inhibition concentration 90%;

MBC= Minimal bactericidal concentration; S= Susceptibility

4.2 การทดลองที่ 2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีความปลอดภัย

4.2.1 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้ partial 16S rDNA และลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis

เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกด้วยการหาลำดับเบสของ 16s rDNA โดยการใช้ primer 27F (5'-AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG-3') และ 1492R (5' -GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3') ในการทำ PCR และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ primer 530F (5' GTG CCA GCM GCC GCG G 3') และ 907R (5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT '3) พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลทได้แก่ KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 มีแถบ DNA ที่ชัดเจนเกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.3) และมีความเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* strain LY-78 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง) โดยมี Accession no. คือ CP015308 (ตารางที่ 4.6)



ภาพที่ 4.3 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 1492R ในการทำ PCR
ช่อง M คือ แถบ DNA มาตรฐาน 100 bp Ladder
ช่อง 1 คือ แถบลายพิมพ์ DNA ไอโซเลท KL1011C2
ช่อง 2 คือ แถบลายพิมพ์ DNA ไอโซเลท KL1012C2
ช่อง 3 คือ แถบลายพิมพ์ DNA ไอโซเลท KL60121B1

ตารางที่ 4.6 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ partial 16S rDNA

Sample Name	Closets sequence[a]	% Similarity	Accession number
KL1011C2	*Lactobacillus plantarum* strain LY-78	Identities = 1498/1498 (100%)	CP015308
KL1012C2	*Lactobacillus plantarum* strain LY-78	Identities = 1493/1493 (100%)	CP015308
KL60121B1	*Lactobacillus plantarum* strain LY-78	Identities = 1500/1500 (100%)	CP015308

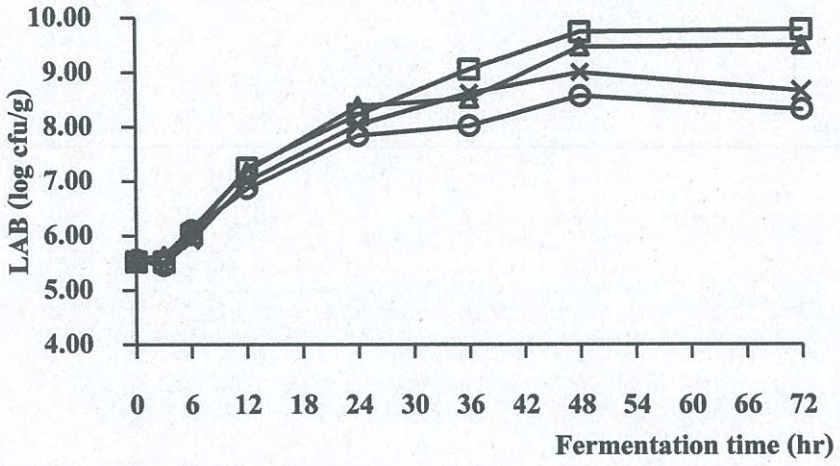
[a] closets sequence : KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 (Accession number on 12/10/2559)

เช่นเดียวกับ Luxananil *et al.* (2009) ที่ตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* BCC9546 (LpBCC9546) ที่คัดแยกจากได้ผลิตภัณฑ์แหนม โดยพบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ LpBCC9546 มีลักษณะทางกายภาพ และความต้องการของสารอาหารที่มีความคล้ายคลึงกับ *L. plantarum* สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในวัตถุดิบเนื้อสัตว์

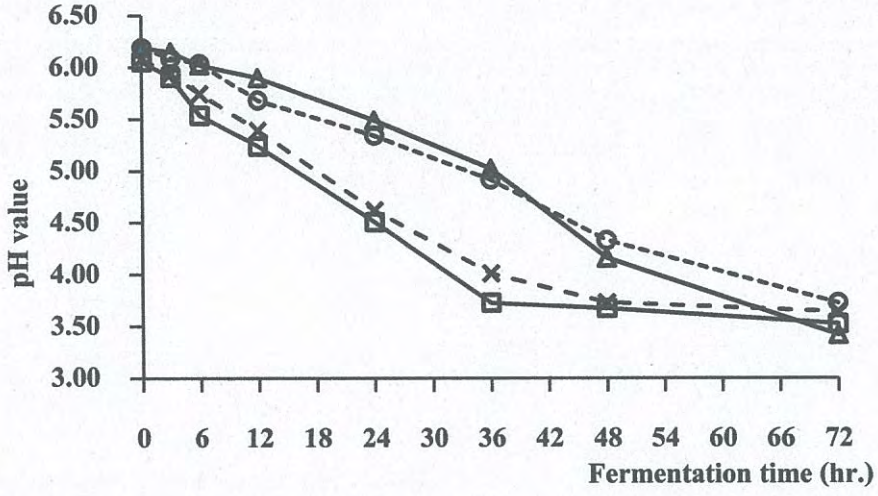
4.3 การทดลองที่ 3 การประยุกต์แบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.3.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้มดังภาพที่ 4.4 พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์มีจำนวนเพิ่มขึ้นภายหลังการหมักในชั่วโมงที่ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยภายหลังของกระบวนการหมัก 12 ชั่วโมง แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 มีค่าความสามารถในการเจริญในแบบจำลองหมูส้มได้ดีกว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทางการค้า TISTR543 และกล้าเชื้อกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ภายหลัง 48 ชั่วโมงของการหมักโดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 9.50 ถึง 9.79 log cfu/g หลังจากนั้นพบว่า กล้าเชื้อทั้ง 2 มีจำนวนคงที่ ในขณะที่กลุ่มกล้าเชื้อ KL1011C2 และ KL60121B1 มีจำนวนลดลงอย่างคงที่ภายหลังทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.4 การเจริญของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (▲) ไอโซเลท KL1011C2 (✱ ·) KL1012C2 (⊟) และไอโซเลท KL60121B1 (●) ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ



ภาพที่ 2.15 ค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (▲) ไอโซเลท KL1011C2 (✱) KL1012C2 (⊟) และไอโซเลท KL60121B1 (●) ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ

ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างในแบบจำลองหมูส้ม (ภาพที่ 4.5) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการหมักส่งผลต่อค่าความเป็นกรดด่างของแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้พบว่าในระหว่างกระบวนหมักทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 มีความสามารถในการสร้างกรดได้เร็วกว่ากล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P<0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 มีความสามารถในการเป็นกล้าเชื้อที่ดีเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทอื่นๆ ทั้งนี้ในกระบวนการหมัก 9 ชั่วโมงแรกของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองมีค่าความ

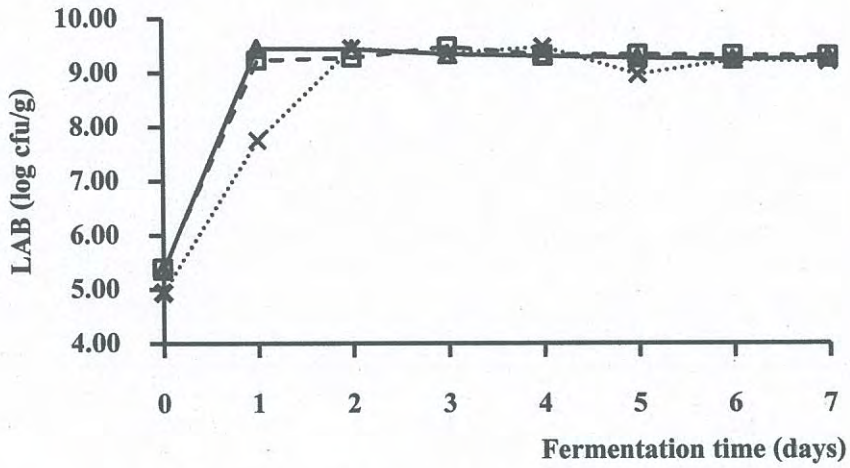
เป็นกรดด่างที่ลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยแบคทีเรียแลคติกจะเข้าสู่ระยะคงที่เมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.5 (Liao *et al.*, 2010)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลการเจริญของกล้าเชื้อร่วมกับค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 กล้าเชื้อไอโซเลท KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 ในแบบจำลองหมูส้ม สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเป็นกล้าเชื้อที่ดี ซึ่งกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 แสดงคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อที่ดีสุด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้มต่อไป

4.3.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.3.2.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

จากการศึกษาจำนวนแบคทีเรียติกในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.6) และตารางผนวกที่ จ3 พบว่า กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 4.94, 5.40 และ 5.35 log cfu/g ตามลำดับ



ภาพที่ 4.6 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนแบคทีเรียแลคติกของกลุ่มควบคุม (··✖··) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (—⊟—) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (—▲—)ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

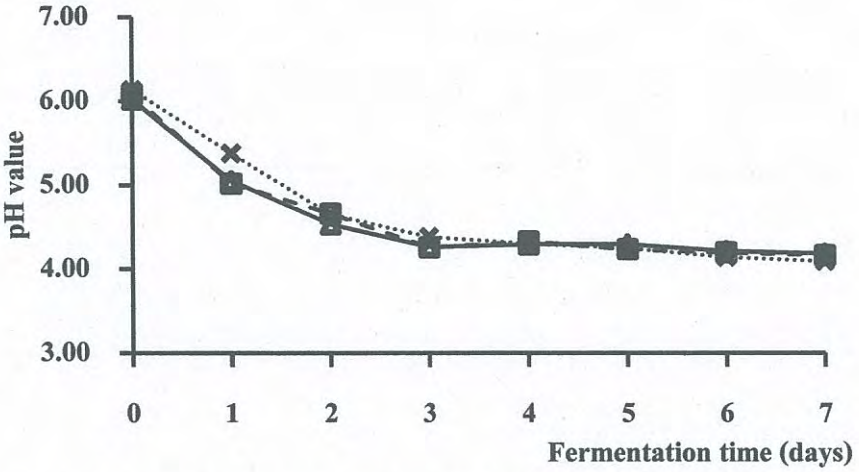
ภายหลังกระบวนการหมัก 1 วัน พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ TISTR543 และ KL1012C2 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 2 พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกคงที่ในช่วง 8.97 - 9.48 log cfu/g ซึ่งเนื้อสัตว์ในกลุ่มควบคุมอาจมีการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกจะ

ย่อยสลายคาร์โฮเดรตและสารอาหารต่างๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน อีกทั้งสร้างสารต่างๆที่ใช้ในการเจริญที่มีในผลิตภัณฑ์ทำให้มีจำนวนแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อ

Fontana *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* และ *Weissella* เป็นต้น ในขณะที่ Federici *et al.* (2014) และ Wanangkarn *et al.* (2014) ได้รายงานถึงสายพันธุ์แบคทีเรีย แลคติกที่พบมากในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแบบแห้งได้แก่ *Lactobacillus sakei, L. curvatus, L. plantarum, Leuconostoc mesenteroideus, Pediococcus* spp. และ *Enterococcus* spp. ซึ่งสามารถเจริญเติบโตและปรับตัวได้ในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร นอกจากนี้ Visessanguan *et al.* (2015) พบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมมากสุดได้แก่ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ lactobacilli และสายพันธุ์ pediococci อีกทั้งวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536) ได้รายงานถึงกิจกรรมการหมักของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม โดยพบว่าระยะแรกของการหมักจะมีจุลินทรีย์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดี และเจริญเติบโตในที่มีอากาศน้อย ได้แก่ homofermentative cocci เช่น *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เจริญร่วมกับ heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *L. brevis* และหลังจากกระบวนการหมัก 3 วัน homofermentative cocci จะใช้น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกจึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ลดลง และในวันที่ 4 ของกระบวนการหมักจะพบ *L. plantarum*

4.3.2.2 ผลการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความเป็นกรดด่างในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์

จากการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อในกระบวนการผลิต (ภาพที่ 4.7) และตารางผนวกที่ จ4 พบว่า ณ วันที่ 0 ของกระบวนการหมักของหมูส้มทั้ง 3 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์โดยเฉลี่ยในช่วง 6.02 - 6.14 ซึ่งมีความเป็นกรดด่างที่ใกล้เคียงกับวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่นำมาโดยมีค่าเฉลี่ยในช่วง 5.92 – 6.09 (ค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อหมูสด 5.97 ± 0.12) ซึ่งการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 1 ถึง 3 ของกระบวนการหมัก ($P<0.05$) และค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงของในวันแรกของกระบวนการหมักมีความสำคัญอย่างมากต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์

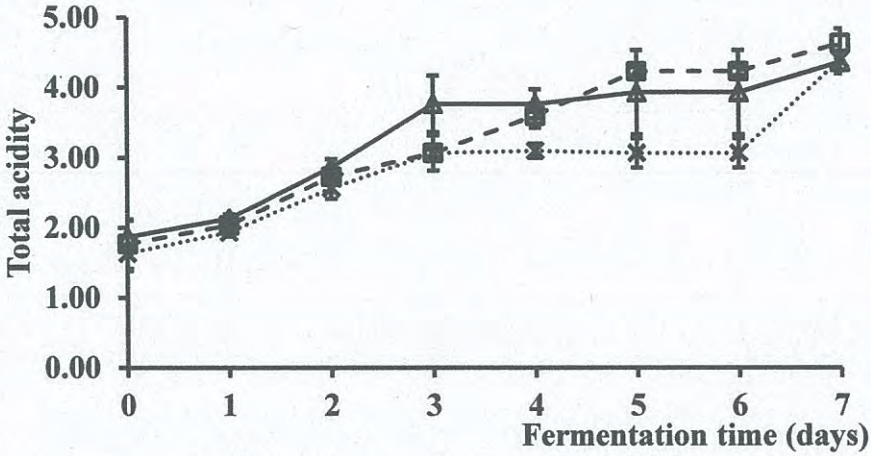


ภาพที่ 4.7 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) ของกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-▲-)

นอกจากจำนวนแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักจะส่งผลต่อค่าความเป็นกรดด่าง และยังส่งต่อค่าปริมาณกรดทั้งหมดของผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.8) เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกโดยส่วนมากมีการสร้างกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมัก จึงยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ ซึ่งช่วยลดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งทำให้เกิดกลิ่นเปรี้ยว (acid aromas) และรสชาติเปรี้ยว (acid tastes) และยังให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ได้หลังการหมักเป็นลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนม (Visessanguan *et al.* 2004)

4.3.2.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

การศึกษาปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้มดังภาพที่ 4.8 และตารางผนวกที่ จ3 พบว่า หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ในระหว่างกระบวนการหมักส่งผลให้ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งปริมาณกรดทั้งหมดของตัวอย่างหมูสดมีค่าเท่ากับร้อยละ 1.47 ± 0.51 โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม การเติมกล้าเชื้อในระหว่างกระบวนการผลิตหมูส้มส่งผลให้มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ($pH<4.6$) ในขณะที่มีการผลิตกรดที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีกระบวนการหมักที่นานขึ้น ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.8 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH ≤ 4.6) ในกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-△-)

ทั้งนี้สอดคล้องกับผลเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ซึ่งเมื่อมีระยะการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลให้แบคทีเรียแลคติกเกิดการหมักน้ำตาลได้กรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำ ทั้งนี้ พรรณี ศิริโฉม (2551) ได้รายงานถึงปริมาณของกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักแหนมโดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.47 คิดเป็นปริมาณ 4 เท่าของปริมาณกรดในวันแรกของกระบวนการหมัก นอกจากนี้งานวิจัยของ Visessanguan *et al.* (2004) ได้รายงานถึงปริมาณกรดทั้งหมดของผลิตภัณฑ์แหนม โดยพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 60 ของกระบวนการหมักแหนมโดยมีปริมาณกรดทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 0.77 - 1.60 ซึ่งค่าความเป็นกรด และกรดอินทรีย์ส่งผลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์แหนมทำให้ลดต่ำถึง 4.6 ภายในระยะเวลา 60 – 72 ชั่วโมง โดยส่วนมาก lactobacilli จะผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก และรองลงมาคือ กรดอะซิติก และกรดออกซาลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดบิวทิริก กรดซัคซินิก และกรดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์แหนมแต่มีค่าน้อย อีกทั้ง Zhang *et al.* (2013) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก silver carp โดยพบว่า ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก โดยการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* ZY-40 ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเริ่มเกิดกระบวนการหมัก โดยมีค่า pH ลดลงจาก 6.67 เป็น 4.54 และ 4.30 ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นการเติมกล้าเชื้อจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัย โดยลดความเสี่ยงทางด้านจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* และเชื้อ *L. monocytogenes* เนื่องจากการสร้างกรดอย่างรวดเร็วในระยะเริ่มต้นของกระบวนการผลิตภัณฑ์หมูส้ม (Aymerich *et al.*, 2003)

กลุ่มตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 1 ถึง 3 พบว่ามีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และผ่านตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่ 2 ของกระบวนการหมักโดยมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.6 (มผช., 876/2548) และมีค่าปริมาณกรดทั้งหมดที่สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.3.3.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน total coliform, fecal coliform และ *E. coli*

จากการศึกษาจำนวนเชื้อ total coliform ในผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ (ตารางที่ 4.7) พบว่า การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตหมูส้มสามารถลดจำนวนของเชื้อ total coliform ได้เร็วกว่าการผลิตหมูส้มด้วยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม โดยในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า (TISTR543) และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (KL1012C2) มีจำนวนเชื้อ total coliform เริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันในวันแรกของกระบวนการผลิตโดยมีค่าเท่ากับ 39, 9 และ 9 MPN/g ตามลำดับ แต่ภายหลังกระบวนการหมัก 1 วัน พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวน total coliform ที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่ามากกว่า 2,400 MPN/g ในขณะที่จำนวน fecal coliform ของผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างระยะเวลาการหมัก 7 วัน พบว่า ณ วันแรกของกระบวนการผลิต (วันที่ 0) ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน fecal coliform ที่น้อยกว่า 3 MPN/g และภายหลังกระบวนการหมัก 1 วัน มีจำนวน fecal coliform ที่เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 1,100, 93 และ 23 MPN/g ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ

ซึ่งกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 สามารถควบคุมจำนวนของ fecal coliform ได้เร็วสุดโดยมีค่าต่ำกว่า 3 MPN/g ภายหลังกระบวนการหมัก 2 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมยังคงตรวจพบจำนวนของ fecal coliform โดยมีค่าเป็น 150 MPN/g ของตัวอย่าง สำหรับจำนวนเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์หมูส้มทุกกลุ่มการทดลอง พบว่า กลุ่มควบคุมมีปริมาณ *E. coli* ที่มากกว่ากลุ่มเติมกล้าเชื้อ TISTR543 และ KL1012C2 โดยมีค่า 1,100, 23 และน้อยกว่า 3 MPN/g ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน *E. coli* ที่ต่ำกว่า 3 MPN/g ภายหลังกระบวนการหมัก 1 วัน อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นภายหลังกระบวนการหมัก ซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์และสารอื่นๆ เพิ่มขึ้น อีกทั้งส่งผลให้มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ($pH \leq 4.6$) จึงมีความเหมาะสมในการควบคุมจำนวนเชื้อ coliform และ *E. coli* จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค (< 3 MPN/g)

ตารางที่ 4.7 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน total coliform, fecal coliform และ *E. coli* (MPN/g) ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

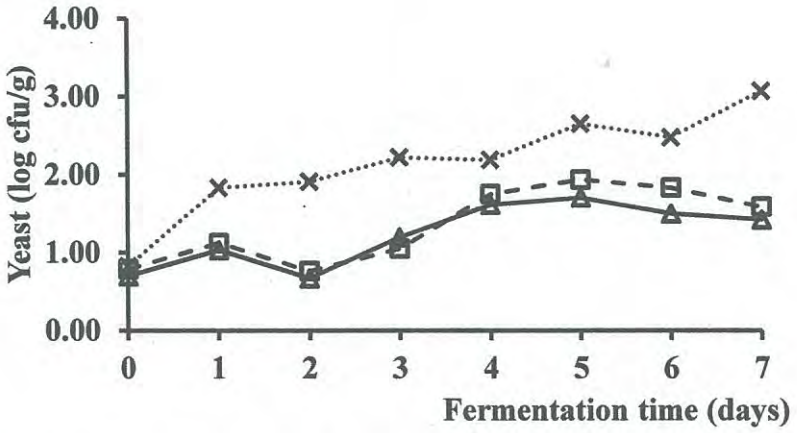
เชื้อที่ศึกษา	ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนจุลินทรีย์ (MPN/g)		
		กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อ TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2
Total Coliform	0	39	9	9
	1	>2,400	>2,400	>2,400
	2	>2,400	43	<3
	3	>2,400	<3	<3
	4	1,100	<3	<3
	5	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3
	7	<3	<3	<3
Fecal Coliform	0	<3	<3	<3
	1	1,100	93	23
	2	240	9	<3
	3	150	<3	<3
	4	<3	<3	<3
	5	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3
	7	<3	<3	<3
E. coli	0	<3	<3	<3
	1	1,100	23	<3
	2	<3	<3	<3
	3	<3	<3	<3
	4	<3	<3	<3
	5	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3
	7	<3	<3	<3

Tosukhowong *et al.* (2011) พบว่า ณ วันที่ 2 ของกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์แหนมมีจำนวนของ Enterococci ที่ลดลง และภายหลังเพิ่มขึ้นและคงที่ ในวันที่ 3 ของ

กระบวนการหมัก เนื่องจากมีค่า pH ลดลงในขณะที่แบคทีเรียแลคติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงถึง 10^8 cfu/g ในวันที่ 1 และคงที่ในวันที่ 3 และปริมาณของ Enterobacteriaceae ลดลงอย่างรวดเร็ว 10^2 cfu/g ภายใน 2 วัน จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ total aerobic bacteria, Enterococci และปริมาณของ Enterobacteriaceae ในตัวอย่างแหนม ทั้งนี้ Conner and Krotola. (1995) พบว่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 สามารถอยู่รอดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE ที่มีสภาวะความเป็นกรดด่างที่ 4.5 ที่อุณหภูมิที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อ *E. coli* O157:H7 ไม่สามารถรอดชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.0

4.3.3.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวนยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวนยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมักดังภาพที่ 4.9 และตารางผนวกที่ จ3 ประกอบด้วยกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 โดยพบว่า หมูส้มทุกกลุ่มมีจำนวนราน้อยกว่า 1 log cfu/g ตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน ในขณะที่จำนวนยีสต์เริ่มต้นในวันแรกของการหมักเท่ากับ 0.83, 0.79 และ 0.70 log cfu/g ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ และภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 2 หมูส้มทุกกลุ่มมีจำนวนยีสต์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก ผลิตภัณฑ์หมูส้มมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับยีสต์โดยอยู่ในช่วง 4.0 – 4.5 โดยผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 มีจำนวนยีสต์คงที่ภายหลังวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก เนื่องจากการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่งผลต่อการสร้างกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก อีกทั้งสร้างสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และรวมถึงสร้างสารยับยั้งต่างๆ เช่น diacetyl, acetaldehyde และ ethanol ซึ่งสาร diacetyl มีความไวต่อการยับยั้งยีสต์และรา เนื่องจากรบกวนการใช้กรดอะมิโน arginineโดยเกิดจากการเมตาบอลิซึมของ citrate (Jay, 1982) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีจำนวนยีสต์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากอาจผลิตกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่ำจึงส่งผลให้ยีสต์สามารถใช้กรดอะซิติกเป็นอาหารสำหรับการเจริญ (Mumine and Mihriban, 2013)

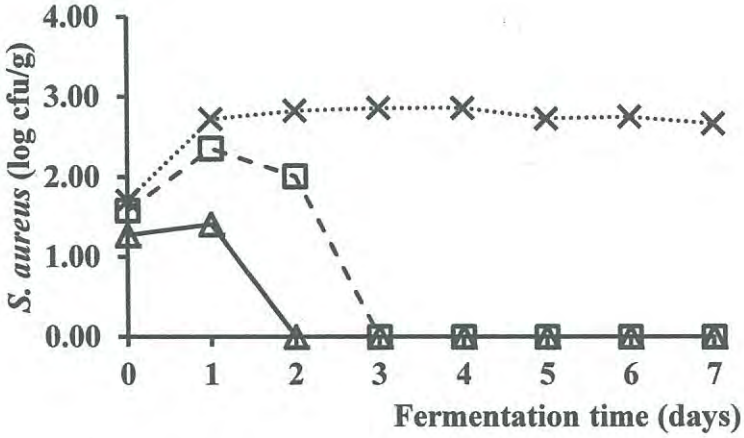


ภาพที่ 4.9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มในกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-▲-)

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาข้างต้นมีความสอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของผลิตภัณฑ์หมูส้ม (มผช. 876, 2548) โดยมีค่ายีสต์และราที่น้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (< 2 log cfu/g) ดังนั้นผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 สามารถผ่านมาตรฐานในการผลิตตามที่กล่าวข้างต้น ในขณะที่กลุ่มควบคุมไม่ผ่านมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนภายหลัง วันที่ 3 ของกระบวนการหมัก

4.3.3.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน *S. aureus* ในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาจำนวนเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.10) และตารางผนวกที่ จ3 พบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถควบคุมเชื้อ *S. aureus* ให้มีปริมาณต่ำ และเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($P<0.05$) โดยผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ศึกษามีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ในระหว่างกระบวนการผลิต (วันที่ 0 ของกระบวนการหมัก) เท่ากับ 1.70, 1.58 และ 1.27 log cfu/g ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ แต่เมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 1 วันพบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า อีกทั้งพบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์ภายหลังกระบวนการหมัก 2 วัน ในขณะที่การเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4.10 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวน *S. aureus* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมักในกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-⧋-)

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆในระหว่างกระบวนการหมัก อาทิเช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งมีการออกฤทธิ์ของกรดที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อน และกรดอินทรีย์ ส่วนที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้เกิดการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้กรดอินทรีย์ภายในเซลล์แตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน และมีความเป็นกรดด่างที่สูงกว่าภายนอกจึงรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย ทั้งนี้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่าง ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ โดยกรดอ่อนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ความเป็นกรดด่างต่ำ (De vuyst and Vandamme, 1994)

อย่างไรก็ตาม การเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในอาหารแสดงให้ถึงความเสี่ยงทางด้านสาธารณสุขศาสตร์ เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) อันเป็นเหตุให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ (Bromberg *et al.*, 2004) ซึ่งสารเอนเทอโรทอกซินที่พบบ่อยคือ ชนิด A และ D ทำให้เกิดอาการอักเสบของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร และถูกดูดซึมเข้ากระแสโลหิตแล้วกลับมาทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง แต่มักไม่มีไข้และหายเองภายใน 8 ชม. แต่อาจเกิดอาการรุนแรงได้ในเด็ก คนชรา หรือผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

4.3.3.4 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน *Salmonella* spp. ในระหว่างกระบวนการหมัก

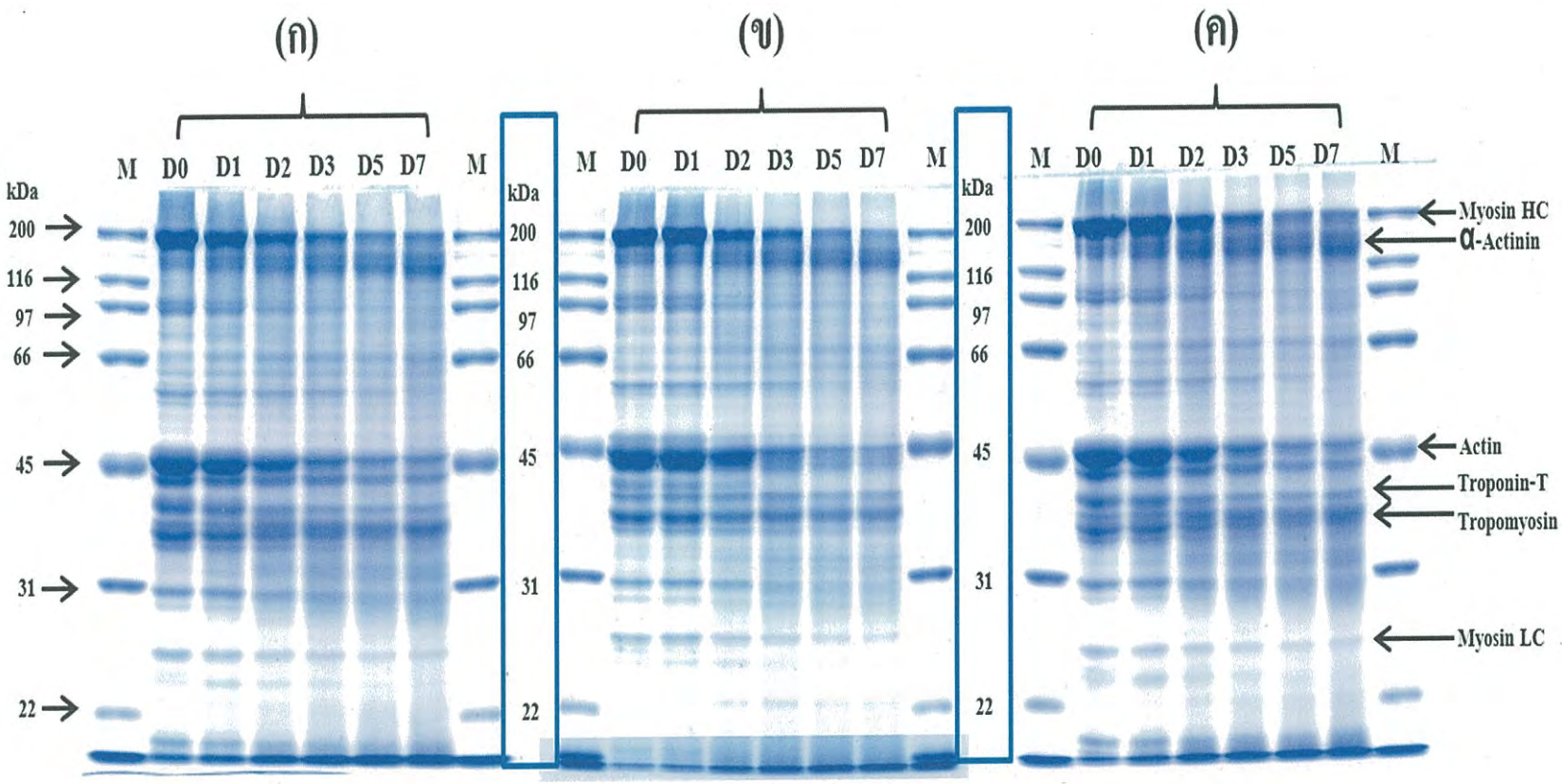
จากการศึกษาจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ในระหว่างกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมูส้ม พบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มทุกกลุ่มทดลองได้แก่ หมูส้มกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ใน

ระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากเนื้อหมูที่ใช้เป็นวัตถุดิบตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. เริ่มต้น อีกทั้งผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ผลิตในครั้งนี้มีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.6 จึงส่งผลให้ ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ และทั้งกระบวนการผลิตหมูส้มตรวจพบ *Salmonella* spp. ซึ่ง Zottola and Smith (1990) ได้รายงานถึงปัจจัยการปนเปื้อนที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ การจัดการก่อนฆ่าสัตว์ และการจัดการระหว่างกระบวนการฆ่าสัตว์

4.3.4 ผลของการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.3.4.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อต่อรูปแบบของโปรตีนในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

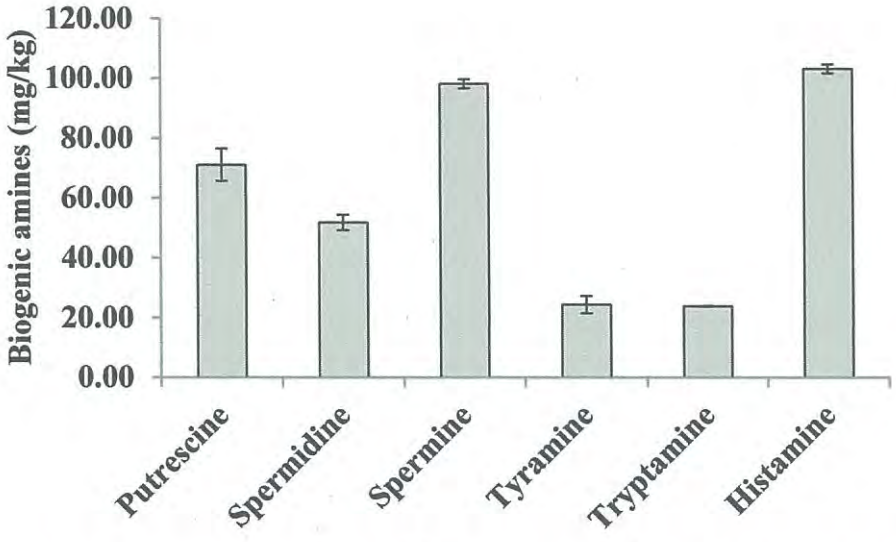
จากการศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อต่อรูปแบบของโปรตีนของผลิตภัณฑ์หมูส้ม โดยการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.11) แสดงรูปแบบของโปรตีนจากผลิตภัณฑ์หมูส้มกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.11ก) ผลิตภัณฑ์หมูส้มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (ภาพที่ 4.11ข) และกล้าเชื้อ KL1012C2 (ภาพที่ 4.11ค) ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมักพบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar proteins) ซึ่งมีโปรตีน myosin heavy chain (Myosin HC) มีขนาดประมาณ 200 kDa และมีการเสียสภาพของโปรตีนแอคติน (actin) โดยผลิตภัณฑ์หมูส้มที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติหรือกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.11ก) และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ KL1012C2 (ภาพที่ 4.11ค) มีการเสียสภาพของโปรตีนแอคตินในวันที่ 2 ของกระบวนการหมักอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่การเสียสภาพโปรตีนไมโอซินของหมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 มีแถบ Myosin HC ที่จางเร็วกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 ซึ่งแสดงว่า หมูส้มกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 จะมีความนุ่มของผลิตภัณฑ์ที่มากสุด เนื่องจากกระบวนการหมักและการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อสัตว์ในกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 มีค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงช้ากว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 จึงส่งผลให้มีกระบวนการย่อยสลายของโปรตีน (proteolysis) ภายในกล้ามเนื้อที่มีสภาวะที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้เอนไซม์ cathepsins L ถูกทำลายไปเนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 5.0 (Kato *et al.*, 1994)



ภาพที่ 4.11 รูปแบบของโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของผลิตภัณฑ์หมูส้มหมักตามธรรมชาติ (ก) หมักโดยกล้าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 543 (ข) หมักโดยกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (ค) ระหว่างกระบวนการหมักวันที่ 0 (D0), วันที่ 1 (D1), วันที่ 2 (D2), วันที่ 3 (D3), วันที่ 5 (D5) และวันที่ 7 (D7)

4.3.4.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

จากการวิเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในเนื้อหมูสด ได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine, tryptamine และ histamine ดังภาพที่ 4.12 พบว่าเนื้อหมูที่ทำการศึกษาตรวจพบ histamine และ spermine เป็นสารไบโอเจนิกเอมีนหลักที่พบมากในเนื้อหมูสดที่ทำการศึกษาโดยมีค่า 103.21 ± 1.48 mg/kg และ 392.80 ± 1.49 mg/kg ตามลำดับ นอกจากนั้นเนื้อหมูที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตหมูส้มยังตรวจพบ putrescine และ histamine โดยมีค่าเท่ากับ 71.10 ± 5.40 และ 103.21 ± 1.48 ตามลำดับ อีกทั้งพบ spermidine, tyramine และ tryptamine ปริมาณเท่ากับ 51.81 ± 2.53, 24.40 ± 2.91 และ 23.89 ± 0.10 mg/kg ตามลำดับ และไม่พบ cadaverine ในเนื้อหมูสด ซึ่ง Bover-Cid *et al.* (2000) ได้พบว่า cadaverine เป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนหลักที่พบทั้งในเนื้อสัตว์ และในผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษายาวนาน โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิต cadaverine ก่อนกระบวนการหมักคือ Enterobactericeae ซึ่งอาศัยกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโนภายในเนื้อสัตว์



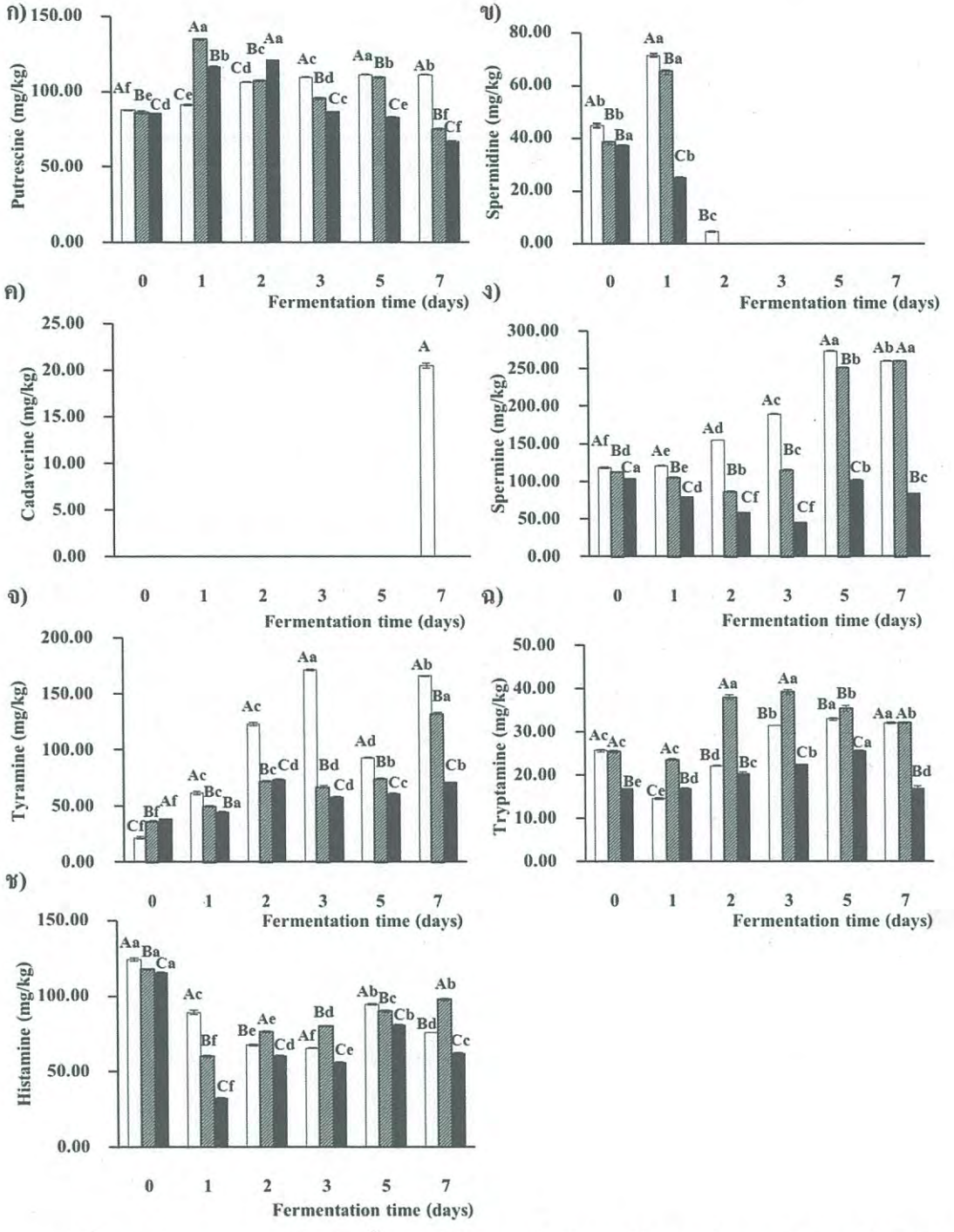
ภาพที่ 4.12 ปริมาณสารประกอบไบโอเจนิกในเนื้อหมูสดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Vinci and Antonelli (2002) ได้ศึกษาถึงสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่มีผลต่อความสดของเนื้อโคและเนื้อไก่ โดยใช้ระดับของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในเนื้อสัตว์เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการเน่าเสียในเนื้อโค และเนื้อไก่ เช่น cadaverine สามารถบ่งชี้ถึงการเน่าของเนื้อสัตว์ ในขณะที่ tyramine แสดงถึงอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์ ซึ่งสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในเนื้อไก่จะมีค่าสูงกว่าเนื้อวัวเมื่อมีการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น อีกทั้ง Silva and Gloria (2002) ยังพบว่าสัตว์ที่ผ่านการฆ่าใหม่มักจะพบ spermidine

และ spermine เป็นหลักในเนื้อ ในขณะที่พบสาร putrescine เล็กน้อย และไม่พบสารประกอบไบโอเจนิกชนิดอื่นๆ

ดังภาพที่ 4.13 แสดงผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์หมูส้มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยมีกลุ่มหมูส้มหมักธรรมชาติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 พบว่า หมูส้มทุกกลุ่มมีปริมาณการตรวจพบของ histamine และ spermine ใกล้เคียงกับปริมาณที่ตรวจพบในหมูสด ณ ก่อนกระบวนการหมัก และภายหลังวันที่ 3 ของกระบวนการหมักหมูส้มพบว่าหมูส้มกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนทั้ง 7 ชนิดได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine, tryptamine และ histamine ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ($P<0.05$)

ดังภาพที่ 4.13ก แสดงผลการตรวจพบ putrescine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มระหว่างกระบวนการหมักโดยพบว่า ก่อนกระบวนการหมักทุกกลุ่มมีค่าอยู่ในช่วง 85.49 - 87.71 mg/kg และภายหลังวันที่ 1 ของกระบวนการหมัก พบว่ากลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณสาร putrescine ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิม 31.03 mg/kg และ 48.22 mg/kg ในกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ตามลำดับ ในขณะที่วันที่ 2 ของกระบวนการหมักพบว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่า putrescine สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และภายหลังวันที่ 3 ของกระบวนการหมักพบว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 67.15 – 86.66 mg/kg ทั้งนี้ Bover-Cid *et al.* (2001) กล่าวว่า putrescine ในอาหารส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโน arginine เกิดเป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน ornithine ในจุลินทรีย์ อีกทั้งสามารถเปลี่ยนรูปเป็น agmatine ด้วยกระบวนการขจัดหมู่อะมิโน ซึ่งจากการศึกษาการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิด spermidineในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ กระบวนการหมักวันที่ 1 พบว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 และในกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 พบสาร spermidine ในปริมาณต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 37.51 และ 38.24 mg/kg ตามลำดับ และภายหลังวันที่ 1ของกระบวนการหมักพบว่า หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณของ spermidine ต่ำสุด ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 25.09 mg/kg ทั้งนี้หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 2 กลุ่มตรวจไม่พบ spermidine ในกลุ่มทดลอง (ภาพที่ 4.13ข) ซึ่ง halász *et al.* (1994) ได้รายงานว่าการลดของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนสามารถเกิดจากการใช้สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนเป็นแหล่งไนโตรเจน หรือเกิดปฏิกิริยา deamination



ภาพที่ 4.13 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ หมูส้มกลุ่มควบคุม (□) หมูส้มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (▨) และหมูส้มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (■)ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน ของกระบวนการหมัก

$^{a-f}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองในวันเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{A-C}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันระหว่างกระบวนการหมักมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ดังภาพที่ 4.13ค แสดงผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร cadaverine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยพบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อในระหว่างกระบวนการผลิตตรวจไม่พบสาร cadaverine ในขณะที่กลุ่มควบคุมตรวจพบ cadaverine ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 20.47 ± 0.25 mg/kg ของตัวอย่างหมูส้ม

สำหรับผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการสร้างสาร spermine ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.13ง) พบว่า ณ ก่อนกระบวนการหมักหมูส้มทุกกลุ่มมีค่า spermine เริ่มต้นในช่วง 103.40 – 118.44 mg/kg และภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณของ spermine ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่หมูส้มกลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 มีค่าปริมาณของสาร spermine เพิ่มขึ้น ภายหลังกระบวนการหมัก 3 วัน ($P<0.05$) และในวันที่ 5 และ 7 ของกระบวนการหมักพบว่าหมูส้มกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าต่ำสุด ($P<0.05$) โดยมีค่าลดลงจาก 101.95 ± 0.41 เหลือ 83.62 ± 0.29 mg/kg ของผลิตภัณฑ์ ตามลำดับ ในขณะที่หมูส้มกลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักมีปริมาณของ spermine ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ในขณะที่การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร tyramine ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.13จ) พบว่า ระยะเวลาการหมักส่งผลต่อการสะสมปริมาณของ tyramine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เพิ่มขึ้น โดยในวันที่ 0 ถึง 3 ของกระบวนการหมักพบว่า หมูส้มทุกกลุ่มมีปริมาณของ tyramine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าของ tyramine ในอยู่ช่วง 21.74 – 171.12, 36.79 – 72.34 และ 38.77 – 44.68 mg/kg ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ และ ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมักพบว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณของสาร tyramine ที่ต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 165.81 ± 0.28, 132.70 ± 0.68 และ71.06 ± 0.34 mg/kg ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ ดังนั้นการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 จึงสามารถควบคุมการสร้าง tyramine โดยการยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถสร้าง tyramine ให้ต่ำกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ อีกทั้งอาจลดการเกิดปฏิกิริยาของ tyrosine decarboxylase ในระหว่างกระบวนการหมักได้ โดย Hugas and Monfort (1997) และ Shalaby (1996) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* สามารถเร่งการผลิตกรดภายในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก ซึ่งมีข้อกำหนดการปนเปื้อนของ tyramine ในอาหารอยู่ที่ 100-800 mg/kg และมีความเป็นพิษที่ 1,080 mg/kg อีกทั้ง Parente *et al.* (2001) และ Roig-Sagués and Eerola (1997) ได้รายงานว่าการใช้กล้าเชื้อในกระบวนการผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักสามารถลดระดับของ tyramine (Latorre-Moratalla *et al.*, 2010) ทั้งนี้การปนเปื้อน *Enterococcus* spp. ซึ่งมีความสำคัญต่อการสะสมของ tyramine (Suzzi and Gardini, 2003)

การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร tryptamineในผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.13ฉ) พบว่า หมูส้มกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ก่อนกระบวนการหมักมีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 16.73 ± 0.14 mg/kg และภายหลังกระบวนการหมัก 1 วันพบว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 มีปริมาณของ tryptamine ที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้กลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 พบว่ามีปริมาณของ tryptamine ในวันที่ 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมักที่ต่ำสุด ($P<0.05$) ทั้งนี้กลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในวันที่ 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก ($P>0.05$)

การศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร histamine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มดังภาพที่ 4.13ช แสดงถึงหมูส้มทุกกลุ่มก่อนกระบวนการหมักมีปริมาณของ histamine สูงสุด ($P<0.05$) โดยอยู่ในช่วง 115.59 – 124.29 mg/kg ของผลิตภัณฑ์ จากนั้นหมูส้มทุกกลุ่มมีค่าลดลง ณ วันที่ 1 ของกระบวนการหมักโดยมีปริมาณของ histamine เท่ากับ 89.12 ± 1.31, 60.27± 0.72 และ 32.50 ± 0.18 mg/kg ของตัวอย่าง ตามลำดับ ทั้งนี้หมูส้มกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าต่ำสุดในระหว่างกระบวนการหมัก ($P<0.05$) และภายหลังวันที่ 3 และ 5 ของกระบวนการหมักพบว่าหมูส้มทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่หมูส้มกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณของ histamine ต่ำสุด ($P<0.05$) โดยมีค่าในช่วง 55.98 – 80.87 mg/kg ในขณะที่ภายหลังกระบวนการหมัก 7 วัน พบว่ากลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณของ tyramine ที่ต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 62.16 ± 0.64 mg/kg ของตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม หมูส้มที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 พบว่ามีปริมาณของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ($P<0.05$) เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ($P<0.05$) จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม จึงพบการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2013) ที่รายงานถึงการลดการสะสมของสารไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลาหมักที่เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ส่งผลต่อการลดการสร้างสารประกอบเอมีน โดยพบว่า ในกลุ่มควบคุมที่มีกระบวนการหมักธรรมชาติจะมีความเข้มข้นของ putrescine และ cadaverine ที่เพิ่มขึ้นทุกช่วงของกระบวนการผลิต โดยกล้าเชื้อ *L. plantarum* ZY-40 สามารถลดการสะสมของสาร putrescine และ cadaverine ได้มากกว่า 70% อันเป็นผลดีต่อการควบคุมการเจริญของ Enterobacteriaceae ในผลิตภัณฑ์ทั้งนี้ Enterobacteriaceae จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโน lysine และ ornithine ที่สูงในกระบวนการผลิตสาร cadaverine และ putrescine (Bover-Cid *et al.*, 2001; Durlu-Özkaya *et al.*, 2001)

Tosukhowong *et al.* (2011) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อและสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน tyramine ในระหว่างกระบวนการหมักแหนมโดย พบว่า การสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักแหนมที่เติมกล้าเชื้อทางแหนมทางการค้า *L. plantarum* BCC 9546 หรือกล้าเชื้อสายพันธุ์ *L. brevis* BCC 26756 ซึ่งสามารถย่อย tyramine ได้ทั้งการใช้กล้าเชื้อเดี่ยวและการใช้กล้าเชื้อร่วมกัน โดยทำการตรวจติดตามในวันที่ 0, 3 และวันที่ 7 เพื่อเปรียบเทียบกลิ่นรสกับแหนมกลุ่มควบคุมโดยพบว่า เมื่อมีกระบวนการหมักกลุ่มควบคุมมีการสะสมของ tyramine, putrescine, cadaverine, histamine และ spermidine ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่การสะสม cadaverine และ histamine มีระดับการสร้างที่ต่ำกว่า และลดการสะสมของ spermidine เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักไม่พบการสะสมของ spermine ในแหนมกลุ่มควบคุม ค่า pH ลดลงจาก 6.4 เป็น 4.35 และภายหลังกระบวนการหมัก 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* BCC 9546 กับแหนมกลุ่มควบคุม พบว่าการสะสมของ tyramine, putrescine, cadaverine, histamine และ spermidine มีค่าลดลง และแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อมีค่า pH ที่ลดลงเร็วกว่าแหนมกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยมีค่า pH สุดท้ายอยู่ที่ 4.21 แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *L. brevis* BCC 26756 มีระดับการสะสมของ tyramine ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีการสะสมของ putrescine, cadaverine, histamine และ spermidine ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกทั้งแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *L. brevis* BCC 26756 มีค่าความเป็นกรดด่างที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 0, 3, และวันที่ 7 โดยระยะเวลาในการหมักส่งผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง และค่า pH สุดท้ายที่ 4.41

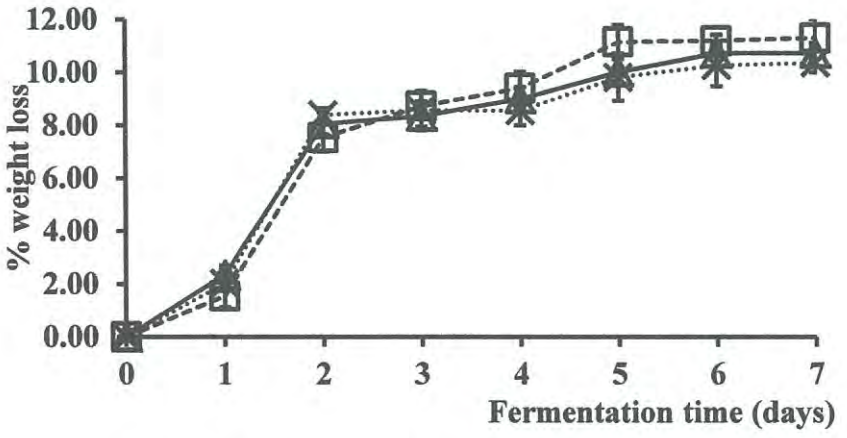
ทั้งนี้ spermine และ spermidine อาจลดลงโดยจุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้มีปริมาณต่ำในวัตถุดิบ (Bardöcz, 1995) ทั้งนี้อะมิโนอาร์จินีนอาจเปลี่ยนรูปเป็น putrescine ในระหว่าง arginine deiminase pathway (ADI) ซึ่งทำให้เกิดสาร ornithine (Motel and Champomier, 1987) และเกิดการสังเคราะห์ putrescine และ agmatineโดยกระบวนการ decarboxylation และกำจัดยูเรียออกมา (Moreno-Arribas *et al.*, 2003) และเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอาร์จินีนสะสมในปริมาณมากจึงสังเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีน putrescine และอาจเปลี่ยนโครงสร้างสารเคมีใหม่เป็น spermine และspermidine ด้วยปฏิกิริยา transamination ของกรดอะมิโนอาร์จินีน (Lehninger *et al.*, 1999)

4.3.5 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.3.5.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อต่อการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ดังภาพที่ 4.14 และตารางผนวกที่ จ6 พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มทดลองมีแนวโน้มมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยวันที่ 2 ของกระบวนการหมักพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่า

เปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8.39, 7.53 และ 8.06 ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.14 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-□-) และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 (-△-)

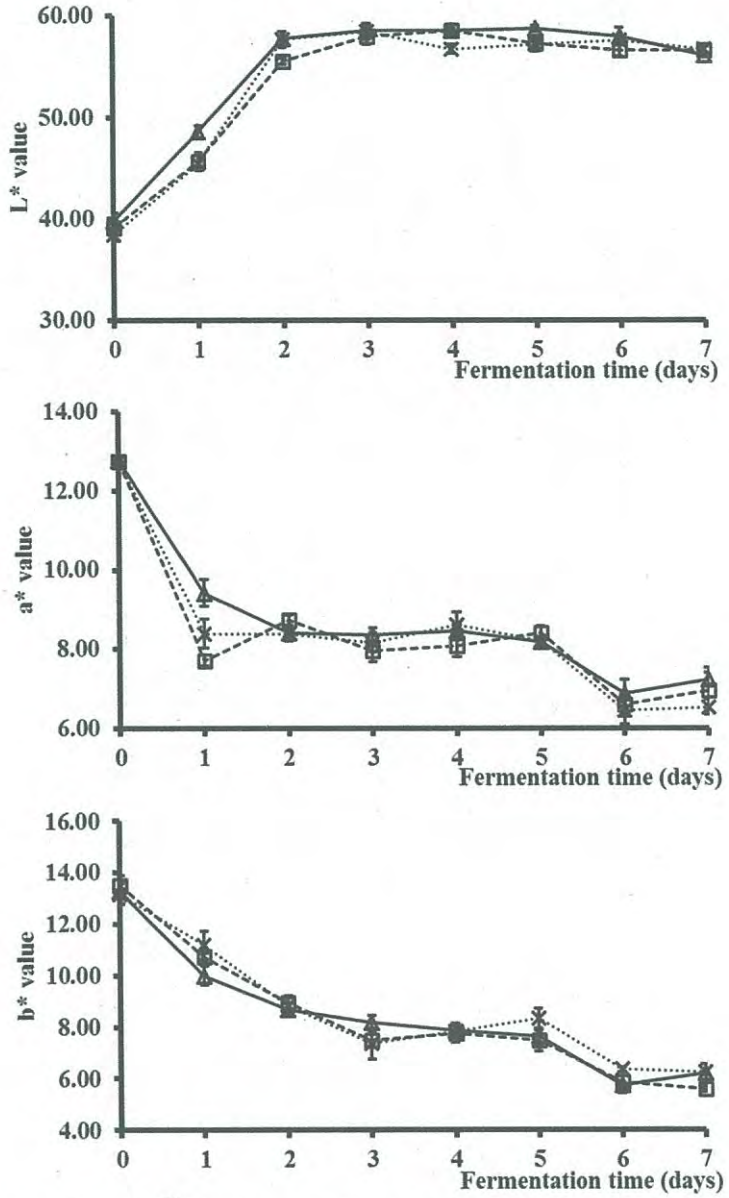
ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ โดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดและค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ที่ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น อันส่งผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน ด้วยเหตุนี้จึงเกิดการสูญเสียปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก (Visessanguan *et al.*, 2006)

4.3.5.2 การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อค่าสีในระหว่างกระบวนการหมัก

ดังภาพที่ 4.15 แสดงการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อค่าสีในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยหมักแบบธรรมชาติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 โดยดังภาพที่ 4.15ก แสดงถึงผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 มีค่าความสว่าง (L*) สูงสุดในวันแรกของกระบวนการหมัก ($P<0.05$) และภายหลังวันที่ 2 ของกระบวนการหมักพบว่าหมูส้มทุกกลุ่มมีค่าความสว่างของ (ตารางผนวก จ7) ซึ่งสอดคล้องกับ Swetwiwathana *et al.* (2005) ที่ได้รายงานถึง อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI-47 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ *L. salivarius* D4 ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในขณะที่ค่าความสว่างของแหนมกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงทำให้มีค่าความสว่างที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ผลการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*) ดังภาพที่ 4.15ข แสดงให้เห็นว่า ณ วันที่ทำการผลิตผลิตภัณฑ์หมูส้มมีค่าสีแดงในช่วง 12.64 ถึง 12.89 ในขณะที่ภายหลังวันที่ 1 ของกระบวนการหมักทุกกลุ่มทดลองมีค่าสีแดงที่ต่ำ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าสีแดงที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 (ค่าสีแดงของหมูสดเท่ากับ 12.43 ± 0.99) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 9.42, 8.40 และ7.72 ตามลำดับ และภายหลังวันที่ 2 ถึงวันที่ 5 ของกระบวนการหมักพบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีแนวโน้มของค่าสีแดงที่คงที่ ในขณะที่กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้าพบว่ามีค่าสีแดงที่ลดลงจาก 8.74 เป็น 7.95 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Visessanguan *et al.* (2004) โดยพบว่า ค่าความสว่าง (L*) จะลดลงในระหว่างกระบวนการหมักในช่วง 12 ชั่วโมง และหลังจากนั้นค่าความสว่างจะเพิ่มสูงสุดในช่วง 36 ชั่วโมงของการหมัก (ตารางผนวก จ8)

การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b*) ดังตารางที่ 4.15ค พบว่า ก่อนกระบวนการหมักทุกหมูส้มทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีเหลืองอยู่ในช่วง13.18 -13.49 (ค่าสีเหลืองของเนื้อหมูสดเท่ากับ 12.45 ± 0.29) ของการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม และทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีเหลืองที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อมีระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Visessaguan *et al.* (2004) ได้รายงานถึงค่าสีเหลืองของผลิตภัณฑ์แหนมจะลดลงใน 24 ชั่วโมงของการหมัก และลดลงอย่างชัดเจนที่ 36 ชั่วโมง ทั้งการเปลี่ยนแปลงค่าสีขึ้นอยู่กับรงควัตถุที่อยู่ภายในเนื้อ คุณสมบัติในการกระเจิงแสงของเส้นใยกล้ามเนื้อ และค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น (ตารางผนวก จ9)



ภาพที่ 4.15 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม (···✖···) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-□-) และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 (-△-)

4.3.5.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH ≤ 4.6ในวันที่สองของกระบวนการหมัก)

ดังตารางที่ 4.8 แสดงผลการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ ซึ่งจำแนกกลุ่มทดลองหมูส้ม 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มหมักด้วยธรรมชาติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 พบว่า ผลของการเติมกล้าเชื้อส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้มมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มหมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้าไอโซเลท KL1012C2 มีค่าความแข็ง

(Hardness) ค่าความเหนียวคล้ายยาง (Gumminess) ค่าความเคี้ยวได้ (Chewiness) ค่าความยืดหยุ่น (springiness) และค่าการเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ซึ่งพบว่ากลุ่มเติมกล้าเชื้อสามารถสร้างความเป็นกรดด่างได้ที่ช่วง 4.59 – 4.60 และมีปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ในช่วง 1.93 – 2.13 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.38 และมีปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.93 ดังนั้นลักษณะของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตจึงมีลักษณะแข็ง และมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

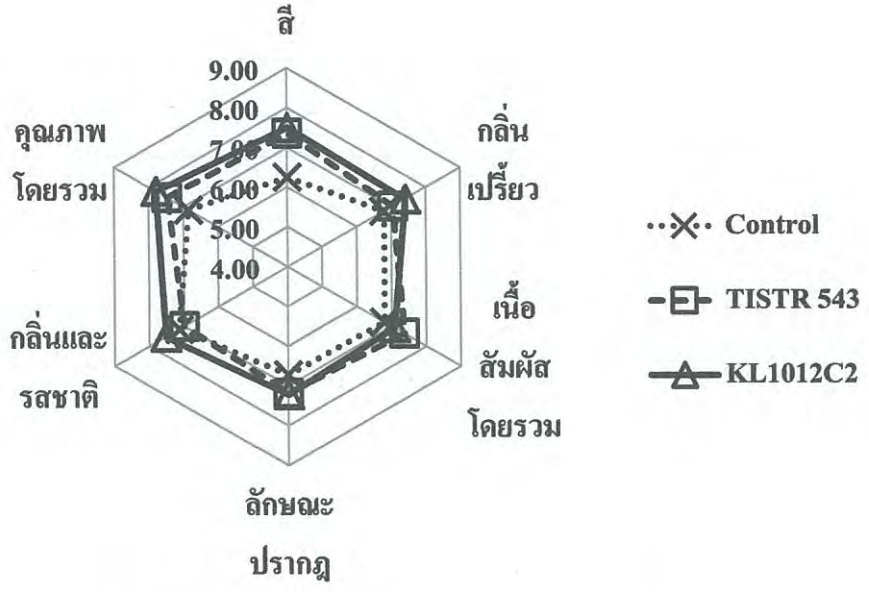
ตารางที่ 4.8 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH ≤ 4.6)

คุณภาพหมูส้ม	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
ลักษณะเนื้อสัมผัส			
- ความแข็ง (N)	27.63 ± 1.62^{c}	34.91 ± 1.46^{b}	37.64 ± 1.79^{a}
- ความเหนียวคล้ายยาง (N)	15.79 ± 0.86^{c}	19.57 ± 1.51^{b}	22.31 ± 1.03^{a}
- ความเคี้ยวได้ (N)	15.77 ± 0.87^{c}	19.58 ± 1.52^{b}	22.31 ± 1.01^{a}
- ความยืดหยุ่น (ratio)	0.90 ± 0.03^{c}	0.90 ± 0.01^{ab}	0.92 ± 0.01^{a}
- การเกาะรวมตัวกัน (ratio)	0.57 ± 0.02^{b}	0.58 ± 0.01^{a}	0.59 ± 0.02^{a}

$^{a-c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.6 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory)

จากผลการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH ≤ 4.6) ดังภาพที่ 4.16 แสดงผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ ด้านสี ด้านกลิ่นเปรี้ยว ด้านเนื้อสัมผัสโดยรวม ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่นและรสชาติ และด้านคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH ≤ 4.6)โดยมีกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (หมักด้วยกรรมวิธีธรรมชาติ) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 จากผลการศึกษาพบว่าผู้บริโภคส่วนมากมีความพึงพอใจต่อด้านสี กลิ่นเปรี้ยว ลักษณะปรากฏ กลิ่นและรสชาติ อีกทั้งพบว่าคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าสูงสุด ($P<0.05$) ในขณะเดียวกันพบว่าผู้บริโภคชอบเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 มากสุด ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.16 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ ด้านสี ด้านกลิ่นเปรี้ยว ด้านเนื้อสัมผัสโดยรวม ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่นและรสชาติ กลิ่นและรสชาติ และด้านคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ ($pH \leq 4.6$)

กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่แข็งและมีเนื้อสัมผัสแน่นกว่ากลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า ($P<0.05$) ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะเนื้อสัมผัสที่กล่าวมาข้างต้น โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่งผลต่อค่าการยอมรับของผู้บริโภคทางด้านประสาทสัมผัสเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ซึ่งการเติมกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ช่วยปรับปรุงผลิตภัณฑ์ในด้านการเก็บรักษาและความปลอดภัย รวมถึงสามารถยกระดับการยอมรับของผู้บริโภคให้เป็นที่พอใจได้ (Paukatong *et al.* 1999)

สำหรับผลการประเมินความชอบทางด้านกลิ่นเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาค่าความเป็นกรดด่าง และค่าปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ ซึ่งเมื่อมีกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติกมีบทบาทต่อลักษณะกลิ่นกรดเปรี้ยว (tangy acidic) โดยสอดคล้องกับ Claeys *et al.* (2004) และ Stahnke *et al.* (2002) พบว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว คือ แหล่ง ปริมาณ และประเภทของวัตถุดิบ เช่น เนื้อสัตว์ เกลือ และเครื่องเทศ และรวมถึงอุณหภูมิ เวลาในการแปรรูป การรมควัน และการใช้กล้าเชื้อ โดยทั่วไปกลิ่นจะสัมพันธ์กับรสชาติ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอะมิโนอิสระเป็นผลจากการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อ และกลิ่นเกิดจากอนุพันธ์ของสารประกอบระเหยได้ อีกทั้ง Hierro *et al.* (1999) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเนื้อสัตว์โดยมีบทบาทอย่างยิ่งต่อการสร้างกลิ่น (flavor)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 42 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 26 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* และมีเพียง 8 ไอโซเลท ได้แก่ KL1011C2, KL1011-1C2, KL1012C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และ KL8031C1 สามารถรอดชีวิตที่สภาวะpH 2 - 3 ร่วมกับเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ได้ และต้านทานต่อต่อยาปฏิชีวนะทั้งสี่ชนิด ได้แก่ penicillin , tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin

5.1.2 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้ partial 16S rDNA และลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทได้แก่ KL1011C2, KL1012C2 และ KL60121B1 มีลำดับเบสเหมือน *Lactobacillus plantarum* strain LY-78 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมี Accession no. คือ CP015308

5.1.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 สามารถลดจำนวน Total coliform, Fecal coliform, *E. coli, S. aureus,* ยีสต์และรา และคุณภาพทางเคมีระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มทดลองมีแนวโน้มมีค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ออกมาระหว่างกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งส่งผลต่อค่าสีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม โดยการเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b*) ลดลง นอกจากนี้การเติมกล้าเชื้อส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture profile analysis) ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) โดยมีค่าความแข็ง(Hardness) ค่าการเกาะรวมตัวกัน (Cohesiveness) ค่าความเหนียวคล้ายยาง (Gumminess) ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) ค่าความเคี้ยวได้ (Chewiness) ที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นลักษณะของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตจึงมีลักษณะแข็ง และมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่าแบบหมักธรรมชาติ กล้าเชื้อสามารถลดระดับสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 3 ได้แก่ spermine, spermidine, histamine และ tryptamine และไม่พบสาร cadaverine ในผลิตภัณฑ์ สำหรับการศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของหมูส้มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติและ ด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) สูงกว่าทุกกลุ่ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เพื่อให้ทราบถึงอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่แน่ชัด จึงควรทดสอบความสามารถในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

5.2.2 แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาสามารถประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และรวมถึงอาหารหมักต่อไปได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. 2553. **การแปรรูปเนื้อสัตว์**. เอกสารประกอบการอบรมการแปรรูปเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชาญวิทย์ ยศโชติ และจุฑามาส งั่วลำหิน. 2551. "การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง." ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณี ศิริโฉม. 2551. "การศึกษาผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Aerobic plate count (APC) และ Lactic acid bacteria (LAB) นกระบวนการผลิตแหนม เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2531. **แพ็ธโธเจนนิก แบคทีริออลโลจิ.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเสน.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. 2557. "การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง." หน้า 667-676. *ใน* **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 15.** ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรรณดี บัญญัติ, พรรษา ขอย้ายกลาง และ อาฐิติ ต้นเกษร. 2542. "แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักดอง." ว. **วิทยาศาสตร์. มข.** 27 : 255-264.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2538. **ปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม**. กรุงเทพฯ : สหมิตรออฟเซท. 153 หน้า.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, ดวงพร คันธโชติ และวราภรณ์ วุฑฒะกุล. 2550. "โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ." **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 29 : 981-991.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. "ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย." **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 22 : 177-189.

ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547. "การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกทนร้อนที่ผลิตสารไบโอเจนิกเอมีนจากอาหารหมักไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค ประวัติ อังประภาพรชัย ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. "การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้." **ว. วิทยาสาสตร์ มศว.** 23: 92-114.

สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549. **พรีไบโอติก และโปรไบโอติก: อาหารสุขภาพ.** ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2543. ประโยชน์ของงานวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักดองประเภทเนื้อของไทย. **เอกสารประกอบการประชุมระดมความคิดเรื่อง "การยกระดับคุณภาพแหนมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ".** สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคมแข พิลาสมบัติ. 2555. **การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ.** รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

อนุสรา รัตนบุรี. 2553. "การผลิตน้ำหมักชีวภาพจากสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria fisheri*) โดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิต γ–Aminobutyric acid (GABA)." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **แบคทีเรียแลคติก.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อัจฉรา หนูเพชร, ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. "การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย." **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 26 : 659-670.

Akm, M.B., Akin, M.S. and Kirmaci, Z. 2007. "Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream." **Food Chem.** 104 : 93-99.

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

Ammor, S., Tauveron, G., Dofour, E. and Chevallier, L. 2006. "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds." **Food Control.** 17 : 454-461.

Andersen, L. 1998. "Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures." 826-827. *In* **the Proceedings of the 44th International Committment of Meat Science and Technology**. Spain : Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries.

AOAC. 1984. **Official Methods of Analysis**. 14th ed. Washington DC : Association of Official Analytical Chemists.

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

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

Arena, M.E. and Manca de Nadra, M.C. 2001. "Biogenic amine production by *Lactobacillus.*" **J. Appl. Microbiol.** 90: 158-162.

Axelsson., L.T. 1993. "Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology." pp 1-64 *In* Salminen, S., Ed. Von Wright, A. **Lactic Acid Bacteria.** New York : Marcel Dekker.

Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 : 4583– 4594.

Bacteriological Analytical Manual. 2001. Chapter 12 on ***Staphylococcus aureus***. [Online] available : https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm0714 29.htm. 05/01/2014.

Bacteriological Analytical Manual. 2001a. **Aerobic plate count**. [Online] available : https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm. 12/07/2014.

Bacteriological Analytical Manual. 2001b. **Yeasts, Molds and Mycotoxins U.S. Food and Drug Administration.** [Online] available http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory Methods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm. 12/07/2014

Bacteriological Analytical Manual. 2001c. ***Staphylococcus aureus.*** **U.S. Food and Drug Administration.** [Online] available : http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ Laboratory Methods/Bacter iologicalAnalyticalManualBAM/UCM071429. 30/07/2014

Bacteriological Analytical Manual. 2002. ***Escherichia coli.*** **U.S. Food and Drug Administration.** [Online] available : http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ LaboraoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM064948. [30 July 2010]

Bacteriological Analytical Manual. 2003. ***Listeria monocytogenes.*** **U.S. Food and Drug Administration**. [Online] available : http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory Methods/BacteriologicalAnalytical ManualBAM/ucm071400.htm. 09/07/2014

Bacteriological Analytical Manual. 2007. ***Salmonella.*** **U.S. Food and Drug Administration.** [Online] available : http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ LaboratoryMethods/Bac. 30/07/2014.

Bardocz, S. 1995. "Polyamines in food and their consequences for food quality and human health." **Trends Food Sci. Tech.** 6 : 341-346.

Bao, Y., Zhang, Y.C., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S.Q., Dong, X.M., Wang, Y.Y. and Zhang, H. 2010. "Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products." **Food Control.** 21: 695-701.

Belgacem, B. Z., Ferchichi, M., Prevost, H., Dousset, X. V. and Manai, M. 2008. "Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria form "Gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat." **Meat Sci.** 78 : 513-521.

Bojana, B.M. and R. Irena. 1998. "Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helvticus* ATCC 15009." **Process Biochem.** 33 : 345-352.

Bourne, M. C. 1976. "Interpretation of force curves from instrumental texture measurements." *In* **deMan, J.M., Voisey, P.W., Rasper, V.F. and Stanley, D.W. Rheology and texture in food quality**. Westport, CT : AVI Publ. Co.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, H. 1999. "Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 53 : 33-41.

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. 2000. "Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausage." **J. Food Prot.** 63 : 1544-1550.

Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. 2001. "Amino acid decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages." **Int. J. Food Microbiol.** 66 : 185-189.

Brennan, M., Wanismail, B., and Ray, B. 1993. "prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products." **J. Food Prot.** 46 : 887-892.

Bromberg, R., Moreno, I., Lopez Zaganini, C., Regina Delboni, R. and De oliveria, J. 2004. Isolation of bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from meat and meat products and spectrum of inhibitory activity. **Brazilian J. Microbiol. 35** : 137-144.

Cenci-Goga, B.T., Ranucci, D., Miraglia, D. and Cioffi, A. 2008. "Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage." **Meat Sci.** 78 : 381–390.

CLSI. 2013. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI document M100-S23—Twenty third Informational supplement. CLSI, Wayne, Pennsylvania

CLSI. 2002. **Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., 2011. "Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem." **Meat Sci.** 89 : 296–302.

Coman, D., Yaplito-Lee, J. and Boneh, A. 2008. "New indications and controversies in arginine therapy." Clin. Nutr. Aug. 27 : 489-96.

Conway, P. L., S.L. Gorbach, and B. R. Goldin. 1987. "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells." **J. Dairy Sci.** 70 : 1-12.

Daeschel, M.A. 1989. "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives." **Food Technol.** 43 : 164-167.

Daramola, B. and Osanyinlusi, S.A. 2006. "Production, characterization and application of banana (*Musa* spp.) flour in whole maize." **African J. Biotechnol.** 5 : 992-995.

Demarigny, Y. (2012). "Fermented food products made with vegetable materials from tropical and warm countries: microbial and technological considerations." **Int. J. Food Sci. Technol.** 47 : 2469–2476.

Dicks, L.M.T., Mellett, F.D and Hoffman, L.C. 2004. "Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami." **Meat Sci.** 66 : 703–708.

Dubois, M.K., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." **Anal. Chem.** 28 : 350-356.

Englyst, H.N., Veenstra, J. and Hudson, G.J. 1996. "Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential *in vitro* prediction of the glycaemic response." **Br. J. Nutr.** 75 : 327-337.

Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." **Meat Sci.** 55 : 297-300.

Farber, J.M. 1991. "Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review." **J. Food Prot.** 54 : 58-70.

Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.-P., Gardner, N., Fliss, I. and Champagne, C. 2007. "Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation." **Int. J. Food Microbiol.** 116 : 174-181.

Federici, S., Ciarrocchi, F., Campana, R., Ciandrini, E., Blasi, G., Baffone, W. 2014. "Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. **Meat Sci.** 98 : 575–584.

Fernández, M.F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. "Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract." **J. Appl. Microbiol.** 94 : 449-445.

Ferrando, V., Quiberoni, A., Reinhemer, J., and Suárez, V. 2015. "Resistance of functional Lactobacillus plantarum strains against food stress conditions." **Food Microbiol.** 48 : 63–71.

Fontana, C., Fadda, S., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., 2012. "Lactic acid bacteria in meat fermentations." p. 247–264. *In* Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von Wright, A. (Eds.), **Lactic Acid Bacteria—Microbiological and Functional Aspects**, 4th ed. UK : CRCPress. Taylor & Francis Group.

Fraqueza, M. J. 2015. "Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages." **Int. J. Food Microbiol.** 212 : 76–88.

Friedrich, J.E. 2001. **Titratable Activity of Acid Tastants.Current Protocols in Food Analytical Chemistry.** Minesota : John Wiley and sons, Inc, Cargill Incorporated Minneapolis.

García Font_an, M.C., Lorenzo, J.M., Parada, A., Franco, I. and Carballo, J. 2007. "Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish traditional pork sausage." **Food Microbiol.** 24 : 52–58.

GarcÍa-Ruiz, A., de LIano, D.G., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B. and Moreno-Arribas, M.V. 2014. "Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine." **Food Microbiol.** 44 : 220-225.

Gevers, D., Huys, G., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debevere. J. and Swings, J. 2000. "Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products." **Syst. Appl. Microbiol.** 23 : 279-284.

Gilliland, S.E. and Speck, M. 1984. "Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli." **Appl. Environ. Microbiol.** 33 : 15-18.

González-Fernández, C., Santos, E. M., Jaime, I., and Rovira, J. 2003. "Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage." **Food Microbiol.** 20 : 275–284.

Guo, C. F., Zhang, S., Yuan, Y. H., Yue, T. L., and Li, J. Y. 2015 . "Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties." **J. Funct. Foods.** 12 : 294–302.

Guyot, J. 2012. "The need of a global and comprehensive approach to investigate tropical cereal fermented foods." **Int. J.Food Sci. Technol.** 47 : 1109–1114.

Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W. 1994. "Biogenic amines and their production by microorganisms in food." **Trends Food Sci. Technol.** 5 : 42–49.

Han, Q., Kong, B.H., Chen, Q., Sun, F.D. and Zhang, H. 2017. "In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics". **J. Funct. Foods.** 32 : 391–400.

Hernández-Jover, T., Izauierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T. and Vidal-Carou, M.C. 1996. "Ion pair high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products." **J. Agric. Food Chem.**. 44 : 2710-2715.

Hierro, E., de la Hoz, L. and Ordo´n˜ez, J. A. 1999. "Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages." **J. Agri. Food Chem.** 47 : 1156– 1161.

Holzapfel, W.H. 2002. "Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries." **Int. J. Food Microbiol.** 75 : 197-212.

Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S. and Razavi, S.H. 2008. "Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream." **Food Chem.** 111 : 50-55.

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

Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, M.T. and Monfort, J.M. 2002. "Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients." **Food Microbiol.** 19 : 519– 528.

Hwanhlem, N. , Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S. 2011. "Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains." **Food Control.** 22 : 401-407.

Ingles, D.L. and Back, J.F. 1985. "Estimation of biogenic amines in food." **J. Sci. Food Agric.** 36 : 402-406.

ISO-6579. 2002. **Microbiology general guidance on methods for the detection of *Salmonella*.** 4th Ed. Switzerland : International organisation for standardization.

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T.S., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Montcheva, P., Nikolova, I., Dousset, X. and Boyaval, P. 1998. "Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81." **Int. J. Food Microbiol.** 42 : 147-158.

Jay, J.M. 1982. "Antimicrobial properties of diacetyl." **Appl. Environ. Microbiol.** 44 : 525-532.

Jay, J.M. 1992. "Fermented foods and related products of fermentation." pp. 371-412. *In* **Modern Food Microbiol.** USA : Chapman and Hall.

Joosten, H. M. L. J. 1988. "The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance." **Netherlands Milk Dairy J.** 42 : 25–42.

Judprasong, K., Tanjor, S., Puwastien, P. and Sungpuag, P. 2011. "Investigation of Thai plants for potential sources of inulin-type fructans". **J. Food Compos. Anal.** 24 : 642-649.

Kailasapathy, K., Harmstorf, I. and Phillips, M. 2008. "Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts." **LWT - Food Sci. Technol.** 41 : 1317-1322.

Kingcha, Y. Tosukhowong, A. Zendo, T.Roytrakul, S. Luxananil, P. Chareonpornsook, K. Valyasevi, R. Sonomoto, K. and Visessanguan, W. 2011. "Anti-listeria activity of Pediococcus pentosaceus BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage." **Food Control.** 25 : 190-196.

Klaenhammer, T.R. 1988. "Bacteriocins of lactic acid bacteria." **Biochimie.** 70 : 337-349.

Kong, S. and Davison, A.J. 1980. "The role of interactions between O_2, H_2, OH^-, e^- and O^{2-} in freeradical damage to biological systems." **Arch Biochem. Biophys.** 204 : 18-29.

Kung, H.F., Tsai, Y.H. and Wei, C.I. 2007. "Histamine and other biogenic amines and histamine-forming in miso products." **Food Chem.** 101 : 351-356.

Kung, H.F., Tsai, Y.H., Hwang, C.C., Lee, Y.H., Hwang, J.H., and Wei, C. 2005. "Hygienic quality and incidence of histamine-forming *Lactobacillus* species in natural and processed cheese in Taiwan." **J. Food Drug Anal.** 13 : 51-56.

L'homme, C., Peschet, J.L., Puigserver, A. and Biagini, A. 2001. "Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection." **J. Chromatogr. A.** 920 : 291-297.

Laemmli UK. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature.** 227 : 185-680.

Lee. J.Y., Kim, C.J. and KunZ, B. 2006. "Identificalion of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages." **Meat Sci.** 72 : 437-445.

Lee, H.M. and Lee, Y. 2008. "A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture". **Lett. Appl. Microbiol.** 46 : 676–681.

Lehane, L. and Olley, J., 2000. "Histamine fish poisoning revisited." **Int. J. Food Microbiol.** 58: 1–37.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. 1999. **Principi di biochimica. Bologna (Italy)** : Zanichelli.

Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. "Lactic acid bacteria as functional starter culture for the food fermentation industry." **Trends Food Sci. Technol.** 15 : 67-78.

Leroy F., Verluyten, J. and Vuyst, L. 2006. "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." **Int. J. Food Microbiol.** 106 : 270-285.

Liao, Q., Hang, X. M., Liu, X. L., Pian, J. L., Zhang, H. C. and Yang, H. 2010. "The influence of pH on heat stress response by probiotic *Lactobacillus plantarum* LP-Onlly. **Ann. Microbiol.** 60 : 341–348.

Lima, E.T., Filho, R.L.A, Okamoto, A.S., Noujaim, J.C., Barros, M. R. and Crocci, A.J. 2007. **Can. J. Vet. Res.** 71 : 103-107.

Lindgrev, S.E. and Dobrogsz, W.J. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations." **FEMS Microbiol. Rev.** 7 : 149-163.

Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K. and Zhang, J. 2008. "Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product." **Food Control.** 19 : 353-359.

Lonvaud-Funel, A. and Joyeux, A. 1994. "Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos.*" **J. Appl. Bacteriol.** 77 : 401–407.

Lowry, O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall, R. J. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J. Biol. Chem.** 193 : 265-75.

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

Lucke, F.K. 1994. "Fermented meat products." **Food Research Intern.** 27 : 299-307.

Luxananil, P., Promchai, R., Wanasen, S., Kamdee, S., Thepkasikul, P., Plengvidhya, V., Visessanguan, W. and Valyasevi, R., 2009. "Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham, a traditional Thai pork sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 129 : 312–315.

Makras, L. and Vuyst, L. D. 2006. "The *in vitro* inhibition of gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids." **Int. Dairy J.** 16 : 1049-1057.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S.S., Webb, C., Fukuda, H. and Kondo, A. 2006. "Effect of cereal extract and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions." **Biochem. Eng. J.** 28 : 73-78.

Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." **Anal. Chem.** 31 : 426–428.

Miyamoto, M., Seto, Y., Hao, H.D., Teshima, T., Sun, B.Y., Kabuki, T., Yao, B.L. and Nakajima, H. 2005. "*Lactobacillus harbinensis* sp. Nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables 'Suancai' in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745." **Sys. Appl. Microbiol.** 28 : 688-694.

Mo Dugo, G., Vilasi, F., La Torre, G.K. and Pellicano, T.M. 2006. "Reverse phase HPLC/ DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines." **Food Chem.** 95 : 672–676.

Montel, M.C. and Champomier, M.C. 1987. "Arginine catabolism in Lactobacillus sake from meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 53 : 2683-2685

Montville, T.J., Winkowski, K. and Ludescher, R.D. 1995. "Models and mechanisms for bacteriocin action and application." **Int. Dairy J.** 5 : 797-814.

Moreno-Arribas MV, Polo MC, Jorganes F and Munoz R. 2003. "Screening of biogenic amine production by acid lactic bacteria isolated from grape must and wine." **Int. J. Food Microbiol.** 84 : 117-123.

Motarjemi, Y. 2002. "Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries." **Int. J. Food Microbiol.** 75 : 213-229.

Murray, J.M., Tavassoli, M., Al-Harithy, R., Sheldrick, K.S., Lehmann, A.R., Carr A.M. and F.Z. Watts. 1994. "Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pomberad2*gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage." **Mol. Cell. Biol.** 14 : 4878-4888.

Nakao, Y. Konno, A. Taguchi, T. Tawada, T. Kasai, H. Toda, J. and Terasaki, M. 1998. "Curdland: properties and application to foods" **Int. J. Food Microbiol.** 56 : 769-772.

Nguyen, H., Elegado, F., Librojo-Basilio, N., Mabesa, R. & Dizon, E. 2010. "Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nem chua, a traditional fermented meat from Vietnam." **Benef. Microbes.** 1 : 67–74.

Niven, C.F., Jeffrey, M.R. and Corlett, D.A., 1981. "Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria." **Appl. Environ. Microbiol.** 41 : 321-322.

Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A., de los ReyesGavilan, C.G. 2004. "Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and crossresistance to bile salts in *Bifidobacterium*." **Int. J. Food Microbiol.** 94 : 79-86.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2000. "*In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria" **Br. J. Nutri.** 83 : 247-255.

Omar, N.B., Abriouel, H., Lucas, R., Canamero, M.M., Guyot, J.P. and Galvez, A. 2006. "Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso." **Int. J. Food Microbiol.** 112 : 44-50.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. p.375–395 *In* **Salminen, S., Ouwehand, A. and von Wright, A. (eds.), "Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects"**, 3rd ed. New York : Marcel Dekker.

Özge Yüceer and Banu Özden Tuncer. 2015. "Determination of antibiotic resistance and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from fermented turkish sausage (Sucuk)." **J. Food Safety.** 35 : 1-10.

Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M.A. and Suzzi, G. 2001. "Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produce in Southern Italy." **J. Appl. Microbiol.** 90 : 882-891.

Paukatong, K. V., Smitinont, T., Prapailong,W. and Kunawasen, S. 1999. **Development of quality control system, quality assurance and standard for Nham industry and Nham product (in Thai).** Pathumthani : National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency.

Piard, J.C. and DesmaZeaud, M. 1991. "Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end products." **Lait.** 71 : 113-142.

Piard, J.C. and DesmaZeaud, M. 1992. "Factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances." **Lait.** 72 : 113-142.

Pichpol, D., Padungtod, P., Saksangawong, Chantharawimol, S. and Chanayad N. 2004. "Quantification and serotyping *Salmonella* spp. Of fermented sausages (Nham) Chiang Mai, Thailand." **Vet. J.** 10 : 125-136.

Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L. and Fung, D.Y.C. 1996. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids." **J. Food Prot.** 59 : 370-373.

Pringsulaka, O. Patarasinpaiboon, N. Suwannasai, N. Atthakor, W.and Rangsiruji, A. 2010. "Isolation and characterisation of a novel Podoviridae-phage infecting *Weissellacibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 28 : 518-525.

Prosky, L., Asp, N.G. Schwitzer, T.F., DeVries, W.J. and Furda, I. 1988. "Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory." **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71 : 1017-1024.

Roberfroid, M.B. 2005. "Introducing inulin-type fructans." **Br. J. Nutr.** 93 : S13–S25.

Rodriguez, R., Jimenez, A., Fernandez-Bolanos, J., Guillen, R. and Heredia, A. 2006. "Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients." **Trends Food Sci. Technol.** 17 : 3-15.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P. and Córdoba, M.D.G. 2008. "Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages." **Meat sci.** 80 : 715-721.

Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2001. "A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides." **J. Appl. Microbiol.** 91 : 878-887.

Salminen, S.and von Wright, A. 1993. **Lactic acid bacteria.** 1st ed. New York : Marcel Dekker Inc.

Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., Kondo, Y. 1998. "Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 41 : 1-7.

Sansit, J. 2004. "Detection of bacteriocins from starch-utilizing and lactic acid-producing bacteria." Thesis of Master of Science Degree in Microbiology, Suranaree University of Technology, Thailand.

Santos-Buelga, S.C., Pena-Eqido, M.J. and Rivas- Gonzalo, J.C. 1986. "Change in tyramine during Chorizo-sausage opening." **J. Food Sci.** 51 : 518-519.

Sasidharan, S., Prema, B. and Latha, L.Y. 2011. "Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products." **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 1 : 130 - 132.

Sawatari, Y., Sugiyama, H., Suzuki, Y., Hanaoka, A., Saito, K., Yamauchi, H., Okada, S. and Yokota, A. 2005. "Development of fermented instant Chinese noodle using *Lactobacillus plantarum.*" **Food Microbiol.** 22 : 539-546.

Sayem-El-Daher, N., Simard, R.E. and Fillion, J. 1984. "Change in the amine content of ground beef during storage and processing." **Lebensm. Wiss. Technol.** 17 : 319-323.

Schillinger U and Lucke FK. 1989. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat" **Appl. Environ. Microbiol.** 55 : 1901-1906.

Senoz, B., Isikli, N. and Coksoyler, N. 2000. "Biogenic amines in Turkish sausages (sucks)." **J. Food Sci.** 65 : 764-767.

Shakila, R.J., Vasundhara, T.S. and Kumudaually, K.V. 2001. "A comparison of the TLC densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products." **Food Chem.** 75 : 255-259.

Shalaby, A.R. 1996. "Significance of biogenic amines to food safety and human health." **Food Res. Int.** 29 : 675-690.

Shanthya, R., Saranya, S. and Shenpagam, N.H. 2011. "Antagonistic Effects of Lactobacilli on Gram-Negative Bacteria." **J. Adv. Lab. Res. Biol.** 2 : 70-72.

Sharavathy, M.K., Urooj, A. and Puttaraj, S. 2001. "Nutritionally important starch fractions in cereal based Indian food preparations." **Food Chem.** 75 : 241-247.

Silla-Santos, M.H. 1996. "Biogenic amines: their importance in foods." **Int. J. Food Microbiol.** 29 : 213-231.

Smêlá, D., Pechová, P., Komprda, T., Klejdus, B. and Kubáñ, V. 2003. "Liquid chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage." **Czech J. Food Sci.** 21 : 167-175.

Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K. 1989. "Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*." **J. Food Prot.** 52 : 856-862.

Steinkraus, K.H. 1997. "Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques." **Food Control.** 8 : 311-317.

Stephen, F., Thomas, A., Madden, L., Schäffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs." **Nucleic Acids Res.** 25 : 3389-3402.

Stratton, J.E., Hotkins, R.W. and Taylor, S.L. 1991. "Biogenic amines in cheese and other fermented foods A." **J. Food Prot.** 54 : 460-470.

Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. "Biogenic amines in dry fermented sausages: A review." **Int. J. Food. Microbiol.** 88 : 41-54.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. "Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria associated with Thai fermented meat-rice sausage." pp. 59-60. *In* **the Proceeding of 53rd International Congress of Meat Science Technology**. Bangkok : Protext.com

Tahiri, R. 2005. "A comparison on microbial conditions between traditional dairy products sold in Karak and same products produced by modern dairies." **Pak. J. Nutr.** 4 : 345-348.

Tamang, P.L., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, M.A.P.C., Gores, M. and Holzapfel, H.W. 2005. "Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas." **Int. J. Food Microbiol.** 105 : 347-356.

Tamin, N.M., Bennett, L.W., Shellem, T.A. and Doerr, J.A. 2002. "High performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses." **J. Agric. Food Chem.** 50 : 5012-5015.

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

Taylor, S.L. 1986. "Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects." **Crit. Rev. Toxicol.** 17 : 91–128.

Tharmaraj, N. and Shah, N. P. 2009. "Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-base dips." **Int. Food Res.** J. 16 : 261-276.

Toldrá, F. 2008. **Meat Biotechnology.** New York : Springer Science+Business Media, LLC.

Tosukhowong, A., Vissessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A. and Valyasevi, R. 2011. "Biogenic amine formation in Nham, a Thai fermented sausage, and the reduction by commercial starter culture, *Lactobacillus plantarum* BCC 9546." **Food Chem.** 129 : 846-853.

Trevino, E., Beil, D. and Steinhart, H. 1997. "Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage." **Food Chem.** 64 : 521-526.

Tsai, Y.H., Lin, C.Y., Chien, L.T., Lee, T.M., Wei, C.I. and Hwang, D.F. 2006. "Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine forming bacteria." **Food Chem.** 98 : 64–70.

Valyasevi, R. and Rolle, R.S., 2002. "An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: scope for their improvement." **Int. J. Food Microbiol.** 75 : 231–239.

Vandekerhove, P. 1977. "A research note: Amines in dry fermented sausage." **J. Food Sci.** 42: 283-285.

Villegas, B., Tárrega, A., Carbonell, I. and Costell, E. 2010. "Optimising acceptability of new prebiotic low-fat milk beverages." **Food Qual Prefer.** 21 : 234-242.

Vinci, G. and Antonelli, M.L. 2002. "Biogenic amines quality index of freshness in red and white meat." **Food Control.** 8 : 519-524.

Visessanguan, W. Benjakul, S. Riebroy, S. and Thepkasikul, P. 2003. "Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics." **Meat Sci.** 66 : 579–588.

Visessanguan, W. Benjakul, S. Smitinont, T. Kittikun, C. and Panya A. 2004. "Influence of minced pork and rind ratios on physico-chemical and sensory quality of Nham– a Thai fermented pork sausage." **Meat Sci.** 69 : 355–362.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Yarchai, M., Tapingkae, W., 2006a. "Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation." **Food Chem.** 94 : 580–588.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P., Panya, A., 2006b. "Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham

inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*." **LWT- Food Sci. Technol.** 39 : 814–826.

Walsh, C. 2003. "Natural and producer immunity versus acquired resistance". *In* **Antibiotics: action, origin, resistance.** p. 91-105. ASM press : Washington DC.

Wanangkarn, A., Liu, D.-C., Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A., Phraephaisarn, C., Chumnqoen, W., Tan, F.-J., 2014. "Lactic acid bacterial population dynamics during fermentation and storage of Thai fermented sausage according to restriction fragment length polymorphism analysis." **Int. J. Food Microbiol.** 186 : 61–67.

Wikipedia. 2010. Histamine. [Online] available : http://en.wikipedia.org/wiki/Histamine. [24/10/2014.]

Winugroho, M. 1999. "Nutritive values of major feed ingredient in Tropics." **Asian-Australian J. Anim. Sci.** 12 : 493-502.

Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. 1995. **The genera of lactic acid bacteria bacteria.** London : Chapman and Hall. .

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2005. "Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria." **Bioresource. Technol.** 97 : 1427-1430.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2008. "Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chung Kukjang, a fermented soy product." **Lebensm. Wiss. Technol.** 41 : 925-933.

Zottola, E. A. and L. B. Smith. 1990. Pathogenic bacteria in meat and meat products, pp. 157-177. *In* A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds). **Meat and Health, Advances in Meat Research Volumn 6.** New York : Elsevier Science Publishing.

Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2007. "*Lactobacillus fermentum* ACA-DA 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)- induced colitis and salmonella infection in murine models." **Int. J. Food Microbiol.** 121 : 18-26.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-parker's medium (BP)

ประกอบด้วย	Tryptone enzymatic digest of casein	4.50 กรัม
	Meat extract	2.25 กรัม
	Yeast extract	0.45 กรัม
	sodium pyruvate	4.50 กรัม
	glycine	5.40 กรัม
	lithium chloride	2.25 กรัม
	agar-agar	6.75 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.80 ± 0.20 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาทีแล้วทิ้งให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพื่อเติมสารละลายดังต่อไปนี้

การเตรียม egg yolk solution

(i) นำไข่ไก่สดมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 15 นาที

(ii) นำไข่ไก่มาวางในบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองรองปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหย

(iii) ตอกไข่ไก่ในตู้ปลอดเชื้อ ทำการแยกไข่ขาวออกให้หมดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และแยกส่วนไข่แดงลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ เติมไข่แดงลงในขวด duran ขนาด 200 มิลลิลิตรที่มีน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่140 มิลลิลิตร ใส่ไข่แดงจนมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียมสาร potassium telluriteความเข้มข้นร้อยละ 1 (1% PT)

(i) ชั่งสาร Potassium tellurite น้ำหนัก 1กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แก้ว และใส่น้ำกลั่นทำการคนจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

(ii) นำสารละลาย Potassium tellurite ที่ปรับปริมาตรแล้ว ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองปลอดเชื้อ และใส่ลงขวดปลอดเชื้อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

การผสม egg yolk-tellurite emulsion

(i) นำสารละลาย Potassium tellurite ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่เตรียมไว้ 40 มิลลิลิตร (ใช้ปิเปตขนาด 25 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ผสมกับ egg yolk solution ที่เตรียมไว้ข้างต้น

(ii) ทำการผสมให้เข้ากันจะได้สารละลาย egg yolk tellurite 240 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียม Baird- Parker medium

(i) เตรียมอาหาร Baird- Parker agar ปริมาตร 285 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

(ii) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปปรับอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงจึงทำการเติม egg yolk telluriteลงในขวดอาหาร 15 มิลลิลิตร

2. Buffered peptone water (BPW)

ประกอบด้วย	Peptone from casein	10.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม
	disodium hydrogen phosphate dodecahydrate	9.00 กรัม
	potassium dihydrogen phosphate	1.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.20 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. Eosin methylene blue agar (EMB agar)

ประกอบด้วย	Peptones	10.00 กรัม
	di-potassium hydrogen phosphate	2.00 กรัม
	lactose	5.00 กรัม
	sucrose	5.00 กรัม
	eosin Y, yellowish	0.40 กรัม
	methylene blue	0.07 กรัม
	agar-agar	13.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.10 ± 0.20 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที (เก็บหากจากแสงแดด)

4. Fluorocult LMX broth

ประกอบด้วย	Tryptone	5.00 กรัม
	Sodium chloride	5.00 กรัม
	Sorbitol	1.00 กรัม

Tryptophan	1.00 กรัม
di- Potassium hydrogen phosphat	2.70 กรัม
Potassium di-hydrogen phosphate	2.00 กรัม
Lauryl sulfate sodium salt	0.10 กรัม
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside,(X-GAL)	0.08 กรัม
4- Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG)	0.05 กรัม
1-isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside	0.10 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.80 ± 0.20 แบ่งบรรจุใส่หลอดทดลองตามปริมาตรสารที่ต้องการ จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. Hektoen-entero-agar (HE)

ประกอบด้วย		
	Peptones	15.00 กรัม
	Sodium chloride	5.00 กรัม
	Yeast extract	3.00 กรัม
	sucrose	14.00 กรัม
	lactose	14.00 กรัม
	salicin	2.0 กรัม
	sodium thiosulfate	5.0 กรัม
	ammonium iron(III) citrate	1.5 กรัม
	bile salt mixture	2.0 กรัม
	bromothymol blue	0.05 กรัม
	acidic fuchsin	0.08 กรัม
	agar-agar	13.5 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.70 ± 0.20 จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ และรอให้อุณหภูมิเย็นลง (ประมาณ 50 องศาเซลเซียส) เติมสาร novobiocin น้ำหนัก 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานเพาะเชื้อ

6. Lysine iron agar (LIA)

ประกอบด้วย		
	Peptone from meat	5.00 กรัม
	yeast extract	3.00 กรัม

D(+)glucose	1.00 กรัม
L-lysine monohydrochloride	10.00 กรัม
sodium thiosulfate	0.04 กรัม
ammonium iron(III) citrate	0.50 กรัม
bromocresol purple	0.02 กรัม
agar-agar	12.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.70 ± 0.20 แบ่งบรรจุใส่หลอดทดลองๆ ละ 3 มิลลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้ววางหลอดเอียงทำมุม 30 องศาเซียสกับแนวนอน (slant) ให้มีทั้ง butt และ slant

7. Mueller hinton agar (MHA)

ประกอบด้วย	Meat infusion	2.00 กรัม
	casein hydrolysate	17.50 กรัม
	starch	1.50 กรัม
	agar-agar	13.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. Mueller hinton broth (MHB)

ประกอบด้วย	Meat infusion	2.00 กรัม
	casein hydrolysate	17.50 กรัม
	starch	1.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9. Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth (MKTTn)

ประกอบด้วย	Meat extract	4.30 กรัม
	peptone from casein	8.60 กรัม
	sodium chloride	2.60 กรัม

calcium carbonate	38.7 กรัม
sodium thiosulfate water free	30.5 กรัม
ox bile	4.78 กรัม
brillant green	9.60 มิลลิกรัม
novobiocin	4.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.00 ± 0.20 จากนั้นเติมสารละลาย potassium iodide 5.00 กรัม และสาร iodine 4.00 กรัมที่ละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร

10. MRS broth

ประกอบด้วย

Peptone from casein	10.00 กรัม
meat extract	8.00 กรัม
yeast extract	4.00 กรัม
D(+)-glucose	20.00 กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	2.00 กรัม
Tween® 80	1.00 กรัม
di-ammonium hydrogen citrate	2.00 กรัม
sodium acetate	5.00 กรัม
magnesium sulfate	0.20 กรัม
manganese sulfate	0.04 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 5.7 ± 0.02 และบรรจุลงหลอดทดลองตามปริมาณต้องการ จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ และทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

11. MRS agar

ประกอบด้วย

Peptone from casein	10.00 กรัม
meat extract	10.00 กรัม
yeast extract	4.00 กรัม
D(+)-glucose	20.00 กรัม
dipotassium hydrogen phosphate	2.00 กรัม
Tween® 80	1.00 กรัม
di-ammonium hydrogen citrate	2.00 กรัม
sodium acetate	5.00 กรัม

	magnesium sulfate	0.20 กรัม
	manganese sulfate	0.04 กรัม
	agar-agar	14.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 5.7 ± 0.02 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

12. Methyl-red VOGES-PROSKAUER Broth (MR-VP)

ประกอบด้วย	Peptone from meat	7.00 กรัม
	D(+) glucose	5.00 กรัม
	phosphate buffer	5.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

13. Plate count agar (PCA)

ประกอบด้วย	Peptone from casein	5.00 กรัม
	yeast extract	2.50 กรัม
	D(+) glucose	1.00 กรัม
	agar-agar	14.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.90 ± 0.02 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

14. RV broth

ประกอบด้วย	Peptone from soymeal	4.50 กรัม
	magnesium chloride hexahydrate	28.60 กรัม
	sodium chloride	7.20 กรัม
	di-potassium hydrogen phosphate	0.18 กรัม
	potassium di-hydrogen phosphate	1.26 กรัม
	malachite-green	0.036 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

15. SIMMONS Citrate Agar

ประกอบด้วย	Ammonium dihydrogen phosphate	1.00 กรัม
	di-potassium hydrogen phosphate	1.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม
	sodium citrate	2.00 กรัม
	magnesium sulfate	0.20 กรัม
	bromothymol blue	0.08 กรัม
	agar-agar	13.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

16. Triple sugar iron agar (TSI)

ประกอบด้วย	Peptone from casein	10.00 กรัม
	peptone from meat	10.00 กรัม
	meat extract	3.00 กรัม
	yeast extract	3.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม
	lactose	10.00 กรัม
	sucrose	10.00 กรัม
	D(+)glucose	1.00 กรัม
	ammonium iron(III) citrate	0.50 กรัม
	sodium thiosulfate	0.50 กรัม
	phenol red	0.024 กรัม
	agar-agar	12.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 - 5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้ววางหลอดเอียงทำมุม 30 องศาเซียสกับแนวนอน (slant)

17. DEV Tryptophan broth (TB)

ประกอบด้วย	Peptone from meat	10.00 กรัม
	DL-tryptophan	1.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บรรจุใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

18. TSA agar

ประกอบด้วย	Peptone from casein	15.00 กรัม
	peptone from soymeal	5.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม
	agar-agar	15.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

19. VRB Agar (Violet Red Bile Agar)

ประกอบด้วย	Peptone from meat	7.00 กรัม
	yeast extract	3.00 กรัม
	sodium chloride	5.00 กรัม
	lactose	10.00 กรัม
	neutral red	0.03 กรัม
	bile salt mixture	1.50 กรัม
	crystal violet	0.002 กรัม
	agar-agar	13.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.40 ± 0.20 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

1.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

Sodium chloride (NaCl) 8.50 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากานั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70

95% ethanol 737.00 มิลลิลิตร

Distilled water 233.00 มิลลิลิตร

สารละลายเอทานอลผสมกับน้ำกลั่น และเขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาปิดฝาสนิท

1.3 สารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 (40 % Potassium hydroxide)

Potassium hydroxide 40.00 กรัม

Distilled water 100.00 มิลลิลิตร

สาร Potassium hydroxide ผสมกับน้ำกลั่น และเขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาปิดฝาสนิท

1.4 สารละลายเนฟทอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 (5 % α- naphtol solution)

Naphtol 5.00 กรัม

Distilled water 100.00 มิลลิลิตร

สาร Naphtol ผสมกับน้ำกลั่น และเขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาปิดฝาสนิท

1.5 สารละลายเมทิลเรด (Methyl red solution)

Methyl red 0.50 กรัม

95% ethanol 300.00 มิลลิลิตร

Distilled water 100.00 มิลลิลิตร

ละลายสารเมทิลเรดในสารละลายเอทานอลจนเข้ากันดี จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่เตรียมไว้

1.6 สารละลาย Kovac's reagent

Para-dimethyl- aminobenzaldehyde	5.00	กรัม
Amyl or buthyl alcohol	75.00	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (37%) C.P.	25.00	มิลลิลิตร

ละลาย Para-dimethyl- aminobenzaldehyde ใน Amyl or buthyl alcohol อุ่นส่วนผสมจนละลายเข้ากันดี เติมเกลือด้วยความระมัดระวัง และคนให้เข้ากันเทเก็บใส่ขวดสีชา

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า

2.1 สารละลาย 30% Monomer solution (acrylamide monomer)

ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ครบ 100 ml และเก็บที่ 4 °C ในขวดสีชา

Acrylamide	30.00	กรัม
Bisaacrylamide	0.8	กรัม

ละลายสาร Acrylamide 30 กรัม และ Bisaacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 สาร 4X Resolving gel buffer (1.5 M Tris, pH 8.8)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	18.15	กรัม
Deionized water	90.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร และใช้ HCl ความเข้มข้น 0.1 N ปรับpH ให้มีค่า 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรโดยใช้ deionized water และเก็บที่ 4 °C ในขวดสีชา (MW trismabaze =121.14 กรัมต่อโมล)

2.3 สาร Stacking gel buffer (0.5 M Tris, pH 6.8)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	6.00	กรัม
Deionized water	90.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร และใช้ HCl ความเข้มข้น 0.1 N ปรับpH ให้มีค่า 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ deionized water และเก็บที่ 4 °C ในขวดสีชา

2.4 สาร Sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้น 10%

SDS	10.00	กรัม
Deionized water	90.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรโดยใช้ deionized water และเก็บที่ 4 °C

2.5 สาร Tank buffer for SDS-PAGE

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	30.28	กรัม
Glycine	144.13	กรัม
SDS	10.00	กรัม
Distilled water	900.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้ deionized water และเจือจางก่อนใช้ 10 เท่า (50 มิลลิลิตร และ 450 มิลลิลิตร) อายุการเก็บรักษา 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

2.6 สาร Sample buffer สำหรับ SDS-PAGE

4X Stacking gel buffer (0.5 M Tris ที่ pH 6.8)	2.50	มิลลิลิตร
Glycerol	2.00	มิลลิลิตร
SDS 10% (w/v)	4.00	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	1.00	มิลลิลิตร
β - mercaptoethanol	0.20	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มล. มิลลิลิตร

2.7 สาร Staining solution

Coomassie brilliant blue (R-250)	1.25	กรัม
Ethanol	450.00	มิลลิลิตร
Acetic acid	100.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2.8 สาร Destaining solution

ethanol	300	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตารางผนวกที่ ค1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลกติก

ลักษณะ	รูปร่างแท่ง		รูปร่างกลม								
	Carnobacterium	*Lacto bacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus,*	*Vagococcus.*	*Leuconostoc,*	*Oenococcus*	*Pediococcus*	*Streptococcus.*	*Tetragenococcus*	*Weissella*
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-		-	+				-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส[b]	-	±	-	-	-		+	-	-	+		+
เจริญที่อุณหภูมิ 10°C	+	±	+	+	+		+	±	-	-		+
เจริญที่อุณหภูมิ 45°C	-	±	-	+	-		-	±	-	+		-
เจริญใน 6.5%NaCl	ND[d]	±	+	+	-		±	±	±	-		±
เจริญใน18%NaCl	-	-	-	-	-		-	-	-	+		-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±		±	+	-	+		±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-		-	-	-	-		-
ชนิดของกรดแลกติก[c]	L	D,L,D L[f]	L	L	L		D	L, D L[f]	- L	+ L		D, DL[f]

หมายเหตุ +, ใช่ ; -, ไม่ใช่ ; ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์ ; ND, ไม่ระบุ

[a] *Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน

[b] +, homofermentative; -, heterofermentative

[c] อาจผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

[d] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น8 เปอร์เซ็นต์

[e] ชนิดของกรดแลกติกจากการหมักกลูโคส

[f] ชนิดของกรดแลกติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

D,ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงซ้าย

L,ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงขวา

DL, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Axelsson (2004)

ตารางผนวกที่ ค2 ระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

Susceptible (S)	Moderately resistant (M)	Resistant (R)
(MICs <8 µg/ml)	(MICs ≥8 µg/ml)	(MICs >32 µg/ml)
Ampicillin		Aztreonam
Bacitracin		Nalidixic acid
Clindamycin		Polymyxin B
Erytromycin		
Penicillin G		
Chloramphenicol		
Tetracycline		
Rifampicin		

Subdivision of the antibiotic in three classes in function of thier effect on the bacterial species evaluated bytheir MIC_S values as indicated by Walsh (2003)

ภาคผนวก ง

การจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : KL1012C2

BLASTN 2.5.1+
Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
RID: 0GF3HA7H015
Database: Nucleotide collection (nt)
39,465,323 sequences; 129,318,010,758 total letters
Query= 1012C2 contig
Length=1493
>1012C2 contig

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTG
GTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA
CCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG
ACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCG
TATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT
CGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTG
ACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG
AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA
GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG
ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTT
GGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGA
ACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
CGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTG
GGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA

ALIGNMENTS
>CP015308.1 *Lactobacillus plantarum* strain LY-78, complete genome
Length=3119435

Score = 2693 bits (2986), Expect = 0.0
Identities = 1493/1493 (100%), Gaps = 0/1493 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1        AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210843  AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTG
2210902

Query  61       GTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210903  GTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA
2210962

Query  121      CCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210963  CCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGG
2211022

Query  181      ACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCG  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211023  ACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCG
2211082

Query  241      TATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211083  TATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
2211142

Query  301      GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211143  GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
2211202

Query  361      GAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211203  GAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT
2211262

Query  421      CGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTG  480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211263  CGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTG
2211322

Query  481      ACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  540
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211323  ACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
2211382

Query  541      TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG  600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211383  TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG
2211442

Query  601      ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG  660
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211443  ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG
2211502

Query  661      AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA  720
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211503  AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA
2211562
```

```
Query  721      GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA  780
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211563  GTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
2211622

Query  781      ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGT  840
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211623  ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGT
2211682

Query  841      TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA  900
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211683  TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
2211742

Query  901      AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT  960
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211743  AGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
2211802

Query  961      TCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG
1020
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211803  TCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAG
2211862

Query  1021     ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
1080
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211863  ACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
2211922

Query  1081     GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTT
1140
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211923  GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTT
2211982

Query  1141     GGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
1200
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211983  GGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
2212042

Query  1201     TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGA
1260
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212043  TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGA
2212102

Query  1261     ACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
1320
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212103  ACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
2212162

Query  1321     CGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
1380
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212163  CGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
2212222

Query  1381     CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTG
1440
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212223  CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTG
2212282
```

```
Query  1441     GGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA  1493
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212283  GGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA  2212335
```

ภาคผนวกที่ ง 1 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 16S rDNAของไอโซเลท KL1012C2

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : KL1011C2

BLASTN 2.5.1+
Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 0G87KG5M01R
Database: Nucleotide collection (nt)
39,465,323 sequences; 129,318,010,758 total letters
Query= contig1011C2
Length=1498

>contig1011C2
GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT
GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG
GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA
CTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG
CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT
GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
GGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG
TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAG
TGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGT
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGG
AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAG
ATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGT
TGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
CAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGT
CGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA

ALIGNMENTS
>CP015308.1 Lactobacillus plantarum strain LY-78, complete genome
Length=3119435

Score = 2702 bits (2996), Expect = 0.0
Identities = 1498/1498 (100%), Gaps = 0/1498 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1        GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210838  GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATT
2210897

Query  61       GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210898  GATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTG
2210957

Query  121      GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2210958  GGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA
2211017

Query  181      CTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211018  CTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG
2211077

Query  241      CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211078  CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCT
2211137

Query  301      GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211138  GAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCA
2211197

Query  361      GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211198  GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
2211257

Query  421      GGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG  480
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211258  GGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGG
2211317

Query  481      TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  540
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211318  TATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
2211377

Query  541      GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA  600
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211378  GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
2211437

Query  601      GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAG  660
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211438  GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAG
2211497

Query  661      TGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA  720
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211498  TGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAA
2211557
```

```
Query  721      CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGT  780
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211558  CACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGT
2211617

Query  781      AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGG  840
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211618  AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGG
2211677

Query  841      AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGG  900
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211678  AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGG
2211737

Query  901      CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  960
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211738  CCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
2211797

Query  961      TTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAG
1020
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211798  TTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAG
2211857

Query  1021     ATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
1080
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211858  ATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
2211917

Query  1081     CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
1140
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211918  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT
2211977

Query  1141     AAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
1200
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2211978  AAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
2212037

Query  1201     AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGT
1260
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212038  AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGT
2212097

Query  1261     TGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
1320
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212098  TGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG
2212157

Query  1321     CAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
1380
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212158  CAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
2212217

Query  1381     ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGT
1440
                 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212218  ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGT
2212277
```

```
Query  1441     CGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA  1498
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2212278  CGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAA
2212335
```

ภาคผนวกที่ ง 2 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 16S rDNAของไอโซเลท KL1011C2

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : KL60121B1

BLASTN 2.5.1+
Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 0GFKDUS001R

Database: Nucleotide collection (nt)
39,465,323 sequences; 129,318,010,758 total letters
Query= 60121B1contig

Length=1500
>60121B1contig
CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATT
GGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAA
ACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTG
GACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGC
GTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA
GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTT
TCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATT
GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA
GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGG
TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTA
GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGT
TGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG
AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAAC
TCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGT
GGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA

ALIGNMENTS
>CP015308.1 Lactobacillus plantarum strain LY-78, complete genome
Length=3119435

Score = 2706 bits (3000), Expect = 0.0
Identities = 1500/1500 (100%), Gaps = 0/1500 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1      CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13676  CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATT  13735

Query  61     GGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13736  GGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAA  13795

Query  121    ACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTG  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13796  ACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTG  13855

Query  181    GACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGC  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13856  GACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGC  13915

Query  241    GTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13916  GTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA  13975

Query  301    GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  13976  GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  14035

Query  361    GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTT  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14036  GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTT  14095

Query  421    TCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATT  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14096  TCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATT  14155

Query  481    GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14156  GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  14215

Query  541    GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14216  GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT  14275

Query  601    GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14276  GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCA  14335

Query  661    GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14336  GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC  14395

Query  721    AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCA  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14396  AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCA  14455

Query  781    AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGG  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14456  AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGG  14515

Query  841    TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14516  TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC  14575
```

```
Query  901    AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14576  AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA  14635

Query  961    TTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTA  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14636  TTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTA  14695

Query  1021   GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14696  GACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG  14755

Query  1081   AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGT  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14756  AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGT  14815

Query  1141   TGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14816  TGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC  14875

Query  1201   ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14876  ATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCG  14935

Query  1261   AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAAC  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14936  AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAAC  14995

Query  1321   TCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14996  TCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  15055

Query  1381   TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGT  1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  15056  TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGT  15115

Query  1441   GGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA  1500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  15116  GGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA  15175

Query  1321  TCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1330  TCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT  1389

Query  1381  TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGT  1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1390  TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGT  1449

Query  1441  GGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA  1500
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1450  GGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTA  1509
```

ภาคผนวกที่ ง 3 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 16S rDNAของไอโซเลท KL60121B1

ภาคผนวก จ
ตารางวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ จ1 การจำแนกเชื้อ *E.coli* โดยวิธีทางชีวเคมี (IMViC test)

Type	Indole	MR	VP	Citrate
Typical *E.coli*	+	+	-	-
Atypical *E. coli*	-	+	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจากอรอนงค์ รัชตราเชนชัย (2549)

ตารางภาคผนวกที่ จ2 ค่า Most probable numbers (MPN) ต่อตัวอย่าง 1กรัม โดยใช้ตัวอย่าง 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 กรัม

Combination of Positive	MPN	Combination of Positive	MPN	Combination of Positive	MPN
0-0-0	<3	1-1-2	15	2-3-0	29
0-0-1	3	1-1-3	19	2-3-1	36
0-0-2	6	1-2-0	11	2-3-2	44
0-0-3	9	1-2-1	15	2-3-3	53
0-1-0	3	1-2-2	20	3-0-0	23
0-1-1	6.1	1-2-3	24	3-0-1	39
0-1-2	9.2	1-3-0	16	3-0-2	64
0-1-3	12	1-3-1	20	3-0-3	95
0-2-0	6.2	1-3-2	24	3-1-0	43
0-2-1	9.2	1-3-3	29	3-1-1	75
0-2-2	12	2-0-0	9	3-1-2	120
0-2-3	16	2-0-1	14	3-1-3	160
0-3-0	9.4	2-0-2	20	3-2-0	93
0-3-1	13	2-0-3	26	3-2-1	150
0-3-2	16	2-1-0	15	3-2-2	210
0-3-3	19	2-1-1	20	3-2-3	290
1-0-0	3.6	2-1-2	27	3-3-0	240
1-0-1	7.2	2-1-3	34	3-3-1	460
1-0-2	11	2-2-0	21	3-3-2	1,100
1-0-3	15	2-2-1	28	3-3-3	>2,400
1-1-0	7.3	2-2-2	35		
1-1-1	11	2-2-3	42		

ที่มา : ดัดแปลงจาก AOAC (2005)

ตารางผนวกที่ จ3 ผลการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนแบคทีเรียแลคติก *S. aureus* และยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

เชื้อที่ศึกษา	ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนจุลินทรีย์ (log cfu/g)		
		กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อ TISTR 543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
แบคทีเรียแลคติก	0	4.94 ± 0.13^{E,b}	5.40 ± 0.08^{D,a}	5.35 ± 0.16^{D,a}
	1	7.75 ± 0.09^{CD,c}	9.23 ± 0.03^{C,b}	9.45 ± 0.04^{A,a}
	2	9.45 ± 0.03^{AB,b}	9.28 ± 0.11^{BC,a}	9.43 ± 0.04^{A,a}
	3	9.35 ± 0.15^{BC,a}	9.48 ± 0.00^{A,a}	9.34 ± 0.03^{B,a}
	4	9.48 ± 0.00^{A,a}	9.33 ± 0.00^{B,b}	9.31 ± 0.04^{BC,b}
	5	8.97 ± 0.72^{AB,a}	9.33 ± 0.02^{B,a}	9.27 ± 0.02^{BC,a}
	6	9.23 ± 0.03^{CD,b}	9.32 ± 0.01^{B,a}	9.24 ± 0.01^{BC,b}
	7	9.20 ± 0.02^{D,b}	9.31 ± 0.02^{BC,a}	9.27 ± 0.02^{C,b}
S. aureus	0	1.70 ± 0.31^{C,a}	1.58 ± 0.28^{C,ab}	1.27 ± 0.21^{A,b}
	1	2.72 ± 0.01^{AB,a}	2.36 ± 0.08^{A,a}	1.41 ± 0.21^{A,b}
	2	2.83 ± 0.02^{AB,a}	2.01 ± 0.05^{B,b}	0.00 ± 0.00^{B,c}
	3	2.86 ± 0.06^{A,a}	0.00 ± 0.00^{D,b}	0.00 ± 0.00^{B,b}
	4	2.86 ± 0.08^{A,a}	0.00 ± 0.00^{D,b}	0.00 ± 0.00^{B,b}
	5	2.73 ± 0.07^{AB,a}	0.00 ± 0.00^{D,b}	0.00 ± 0.00^{B,b}
	6	2.75 ± 0.12^{AB,a}	0.00 ± 0.00^{D,b}	0.00 ± 0.00^{B,b}
	7	2.66 ± 0.09^{B,a}	0.00 ± 0.00^{D,b}	0.00 ± 0.00^{B,b}
ยีสต์	0	0.83 ± 0.11^{D,a}	0.79 ± 0.11^{C,a}	0.70 ± 0.14^{BC,a}
	1	1.83 ± 0.15^{C,a}	1.12 ± 0.13^{AB,b}	1.03 ± 0.51^{ABC,b}
	2	1.91 ± 0.12^{C,a}	0.76 ± 0.11^{C,b}	0.67 ± 0.06^{C,b}
	3	2.22 ± 0.11^{BC,a}	1.05 ± 0.11^{AB,b}	1.19 ± 0.06^{ABC,b}
	4	2.19 ± 0.15^{BC,a}	1.75 ± 0.09^{A,b}	1.61 ± 0.23^{A,b}
	5	2.65 ± 0.33^{AB,a}	1.94 ± 0.10^{A,ab}	1.71 ± 0.09^{A,b}
	6	2.48 ± 0.02^{ABC,a}	1.83 ± 0.16^{A,b}	1.50 ± 0.34^{AB,b}
	7	3.07 ± 0.1^{A,a}	1.59 ± 0.33^{AB,b}	1.42 ± 0.42^{ABC,b}

ตารางผนวกที่ จ4 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

ค่าความเป็นกรดด่าง	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 0	6.14 ± 0.13^{Aa}	6.08 ± 0.03^{Aa}	6.02 ± 0.02^{Aa}
วันที่ 1	5.38 ± 0.08^{Bb}	5.02 ± 0.04^{Ba}	5.05 ± 0.05^{Bc}
วันที่ 2	4.65 ± 0.05^{Ca}	4.66 ± 0.03^{Ca}	4.53 ± 0.07^{Cb}
วันที่ 3	4.38 ± 0.02^{Da}	4.26 ± 0.01^{Eb}	4.26 ± 0.01^{EFb}
วันที่ 4	4.30 ± 0.03^{DEa}	4.33 ± 0.04^{Da}	4.29 ± 0.02^{Da}
วันที่ 5	4.25 ± 0.01^{Ea}	4.23 ± 0.06^{Ea}	4.29 ± 0.01^{DEa}
วันที่ 6	4.14 ± 0.02^{Fb}	4.20 ± 0.02^{EFa}	4.21 ± 0.03^{FGa}
วันที่ 7	4.09 ± 0.03^{Fb}	4.16 ± 0.02^{Fa}	4.18 ± 0.04^{Ga}

ตารางผนวกที่ จ5 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

Total acidity (%)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 0	1.63 ± 0.25^{Ae}	1.77 ± 0.35^{Af}	1.87 ± 0.23^{Ad}
วันที่ 1	1.93 ± 0.06^{Bd}	2.03 ± 0.06^{ABf}	2.13 ± 0.06^{Ad}
วันที่ 2	2.57 ± 0.15^{Bc}	2.73 ± 0.06^{ABf}	2.87 ± 0.12^{Ac}
วันที่ 3	3.07 ± 0.06^{Bb}	3.07 ± 0.25^{Bd}	3.77 ± 0.40^{Ab}
วันที่ 4	3.10 ± 0.10^{Bb}	3.60 ± 0.17^{Ac}	3.77 ± 0.21^{Aab}
วันที่ 5	3.07 ± 0.21^{Bb}	4.23 ± 0.06^{Ab}	3.93 ± 0.60^{Aab}
วันที่ 6	3.07 ± 0.21^{Bb}	4.23 ± 0.06^{Ab}	3.93 ± 0.60^{Aab}
วันที่ 7	4.40 ± 0.20^{Aa}	4.63 ± 0.21^{Aa}	4.37 ± 0.06^{Aa}

ตารางผนวกที่ จ6 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม

weight loss (%)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 1	2.02 ± 0.28^{ABc}	1.54 ± 0.43^{Bd}	2.35 ± 0.34^{Ae}
วันที่ 2	8.39 ± 0.24^{Ab}	7.53 ± 0.52^{Bc}	8.06 ± 0.42^{ABd}
วันที่ 3	8.56 ± 0.75^{Ab}	8.72 ± 0.18^{Ab}	8.35 ± 0.41^{Ad}
วันที่ 4	8.56 ± 0.56^{Ab}	9.41 ± 0.60^{Ab}	9.00 ± 0.44^{Ac}
วันที่ 5	9.82 ± 0.89^{Ba}	11.15 ± 0.64^{Aa}	10.02 ± 0.16^{ABb}
วันที่ 6	10.27 ± 0.80^{Aa}	11.20 ± 0.22^{Aa}	10.73 ± 0.11^{Aa}
วันที่ 7	10.37 ± 0.36^{Aa}	11.31 ± 0.70^{Aa}	10.74 ± 0.37^{Aa}

ตารางผนวกที่ จ7 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความสว่าง (L*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2

ค่าความสว่าง (L*)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 0	38.49 ± 0.62^{Bd}	39.15 ± 0.70^{Bf}	43.89 ± 0.74^{Ae}
วันที่ 1	45.47 ± 0.23^{Bc}	45.70 ± 0.87^{Be}	48.61 ± 0.63^{Ad}
วันที่ 2	57.70 ± 0.74^{Aab}	55.57 ± 0.31^{Bd}	57.79 ± 0.20^{Ab}
วันที่ 3	58.50 ± 0.80^{Aab}	58.04 ± 0.83^{Aab}	58.58 ± 0.55^{Aa}
วันที่ 4	56.73 ± 0.44^{Bb}	58.55 ± 0.34^{Aa}	58.59 ± 0.49^{Aab}
วันที่ 5	57.18 ± 0.70^{Bb}	57.31 ± 0.38^{Bbc}	58.81 ± 0.28^{Aa}
วันที่ 6	57.60 ± 0.21^{ABab}	56.60 ± 0.54^{Bcd}	58.02 ± 0.88^{Aab}
วันที่ 7	56.70 ± 0.26^{Ab}	56.62 ± 0.53^{Acd}	56.12 ± 0.02^{Bc}

ตารางผนวกที่ จ8 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าสีแดง (a*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดย กลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2

ค่าสีแดง (a*)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 0	12.74 ± 0.15^{Cb}	12.74 ± 0.09^{Ae}	12.77 ± 0.10^{Bd}
วันที่ 1	8.40 ± 0.36^{Aa}	7.72 ± 0.14^{Cc}	9.42 ± 0.33^{Aa}
วันที่ 2	8.38 ± 0.17^{Aa}	8.74 ± 0.13^{Aa}	8.41 ± 0.20^{ABb}
วันที่ 3	8.16 ± 0.24^{Aa}	7.95 ± 0.26^{Abc}	8.37 ± 0.16^{Ab}
วันที่ 4	8.60 ± 0.34^{Aa}	8.08 ± 0.27^{BCa}	8.46 ± 0.15^{Ab}
วันที่ 5	8.20 ± 0.12^{Aa}	8.40 ± 0.19^{Aab}	8.19 ± 0.04^{Ab}
วันที่ 6	6.46 ± 0.35^{Bb}	6.61 ± 0.31^{Ad}	6.89 ± 0.34^{Ac}
วันที่ 7	6.54 ± 0.19^{Ba}	6.96 ± 0.57^{Ad}	7.24 ± 0.17^{Ac}

ตารางผนวกที่ จ9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าสีเหลือง (b*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดย กลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2

ค่าสีเหลือง (b*)	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
วันที่ 0	13.18 ± 0.42^{Aa}	13.49 ± 0.41^{Aa}	13.26 ± 0.46^{Aa}
วันที่ 1	11.20 ± 0.54^{Ab}	10.73 ± 0.14^{ABb}	10.00 ± 0.36^{Bb}
วันที่ 2	8.85 ± 0.29^{Ac}	8.95 ± 0.28^{Ac}	8.67 ± 0.23^{Ac}
วันที่ 3	7.35 ± 0.60^{Ae}	7.50 ± 0.28^{Ad}	8.18 ± 0.28^{Ad}
วันที่ 4	7.82 ± 0.13^{Ade}	7.76 ± 0.34^{Ad}	7.87 ± 0.26^{Ad}
วันที่ 5	8.34 ± 0.39^{Acd}	7.48 ± 0.41^{Bd}	7.63 ± 0.29^{ABd}
วันที่ 6	6.35 ± 0.10^{Af}	5.85 ± 0.40^{Be}	5.73 ± 0.04^{Be}
วันที่ 7	6.25 ± 0.29^{Af}	5.58 ± 0.11^{Be}	6.21 ± 0.34^{Ae}

ภาคผนวก ฉ

แบบประเมินความพึงพอใจต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์หมูส้ม

วันที่.....

ลำดับที่.....

<u>ตอนที่ 1</u> รายละเอียดของผู้ประเมิน

เพศ O ชาย O หญิง

กรุณาระบุช่วงอายุของท่าน

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

รายได้ของท่านต่อเดือน O น้อยกว่า 5,000 บาท O 5,000 – 15,000 บาท

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

อาชีพ O นักเรียน นักศึกษา O รับราชการ พนักงานของรัฐ

O บริษัทเอกชน O ทำงานส่วนตัว

O อื่น ๆ โปรดระบุ.....

คุณชอบรับประทานหมูส้มหรือไม่

O ไม่ชอบมาก O ไม่ชอบ O ไม่ค่อยชอบ O เฉยๆ

O ค่อนข้างชอบ O ชอบ O ชอบมาก

- กรุณากลั้วปากด้วยน้ำดื่มก่อนชิมตัวอย่างแรก
- ก่อนชิมตัวอย่างถัดไป กรุณาทานแครกเกอร์เล็กน้อย ตามด้วยการกลั้วปากด้วยน้ำดื่มอีกเล็กน้อย (ท่านสามารถบ้วนทิ้งลงในถ้วยสูงที่เตรียมไว้ให้)

<u>ตอนที่ 2</u> กรุณาให้คะแนนระดับความชอบของท่าน (จาก 1 ถึง 9 คะแนน) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ท่านกำลังทดสอบชิมทีละตัวอย่าง โดยกรอกคะแนนลงให้ตรงกับรหัสตัวอย่างในตารางด้านล่าง

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

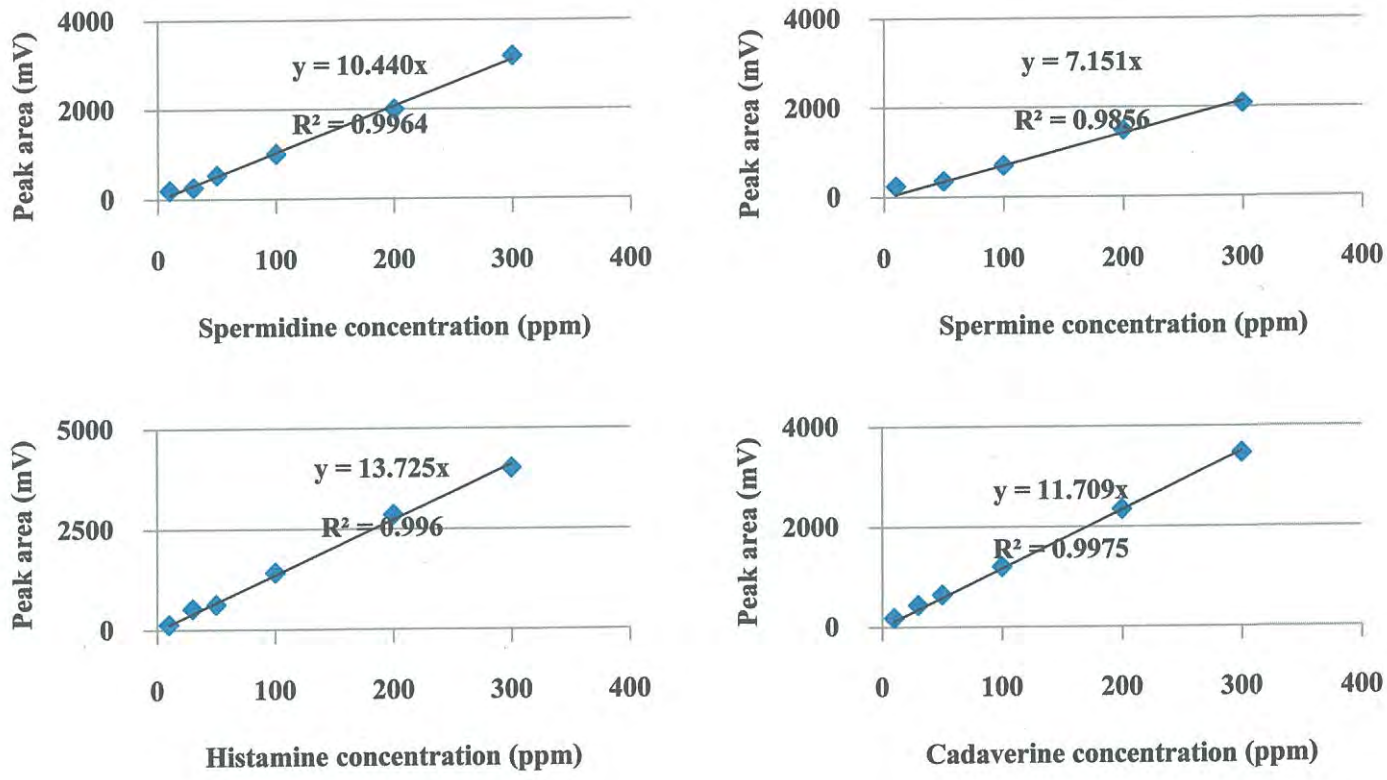
ลักษณะของผลิตภัณฑ์	คะแนนความชอบ		
สี			
กลิ่นเปรี้ยว			
เนื้อสัมผัสโดยรวม			
ลักษณะปรากฏ			
กลิ่นและรสชาติ			
คุณภาพโดยรวม			

ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

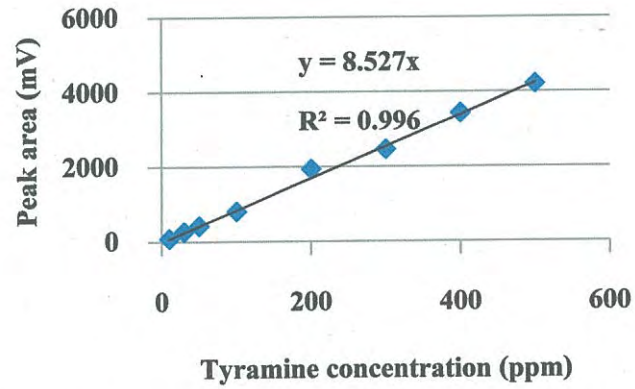
.....

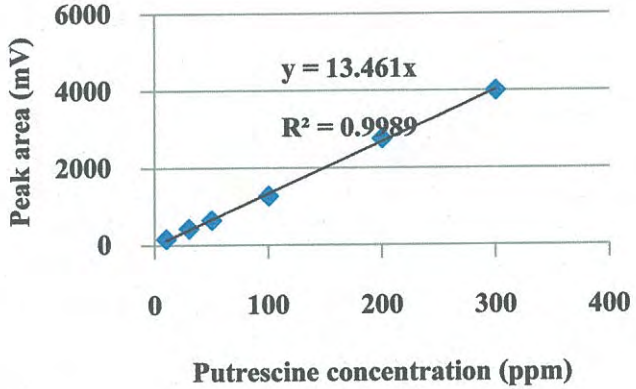
.....ขอบคุณที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ☺

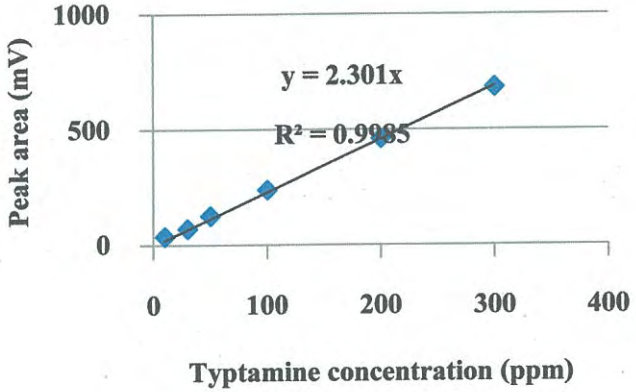
ภาคผนวก ช

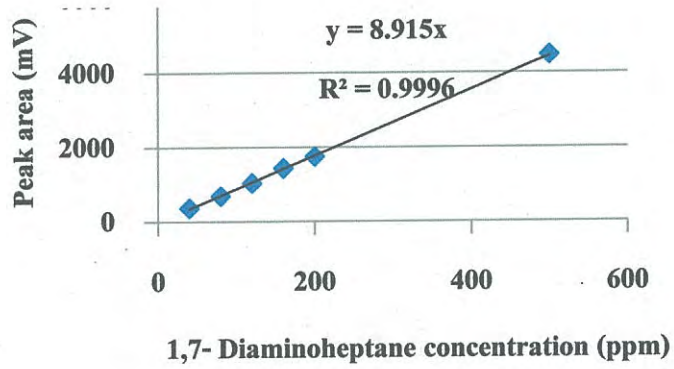


ภาคผนวกที่ ช1 กราฟมาตรฐานของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (spermidine, spermine, histamine และ cadaverine)

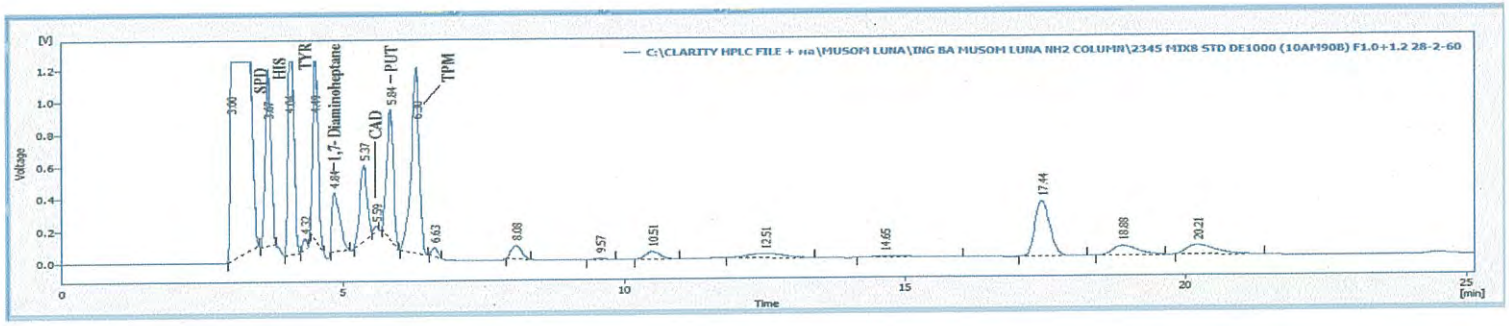




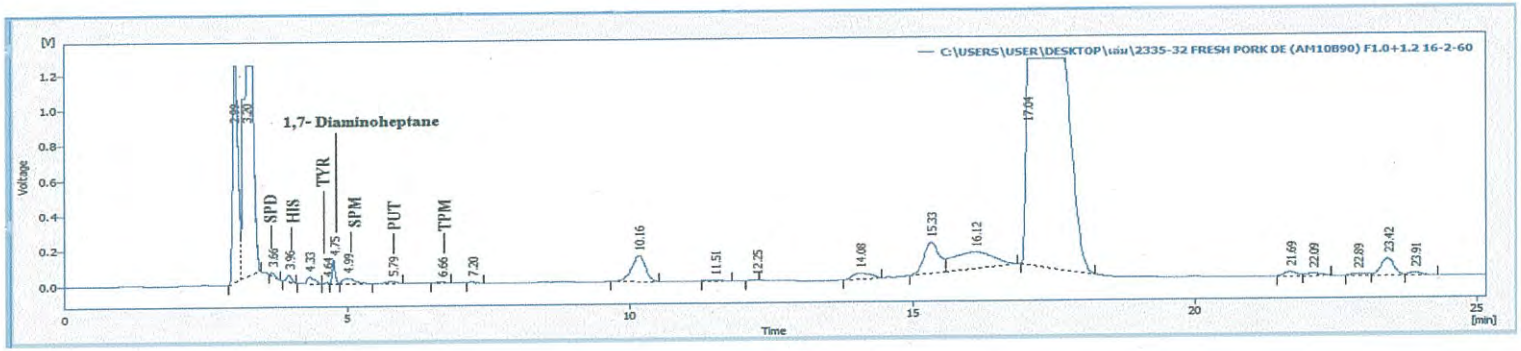




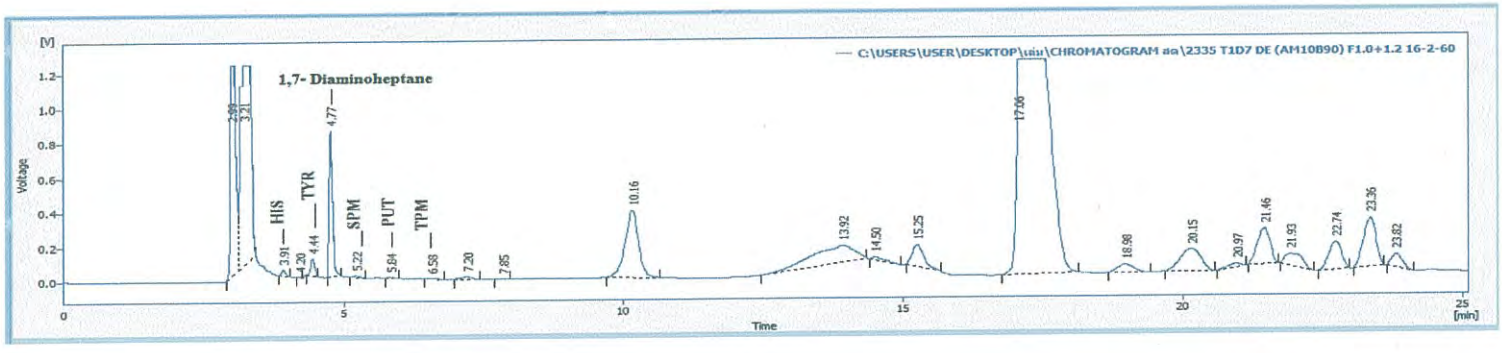
ภาคผนวกที่ ช2 กราฟมาตรฐานของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (Tyramine, Putrescine, Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



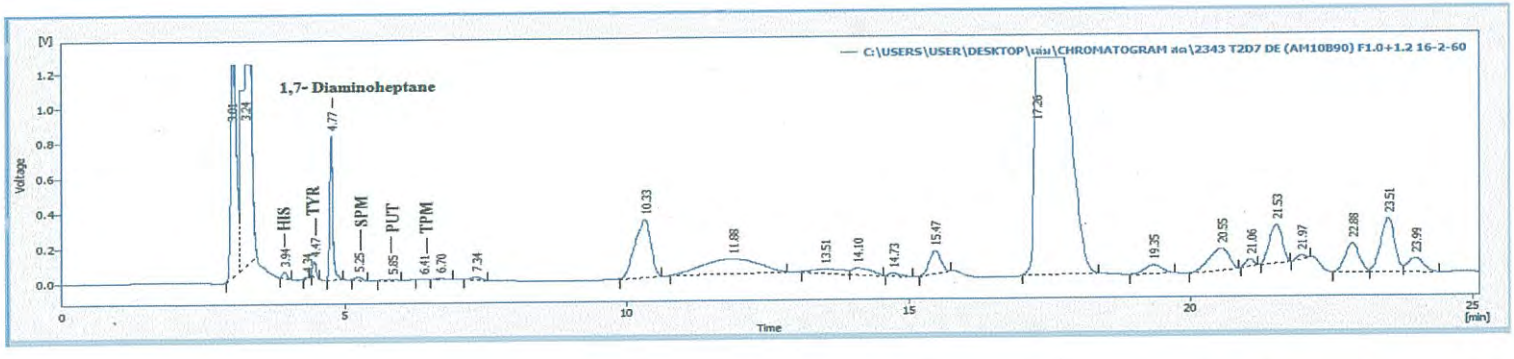
ภาคผนวกที่ ช3 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนมาตรฐาน 7 ชนิด (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, CAD-Cadaverine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



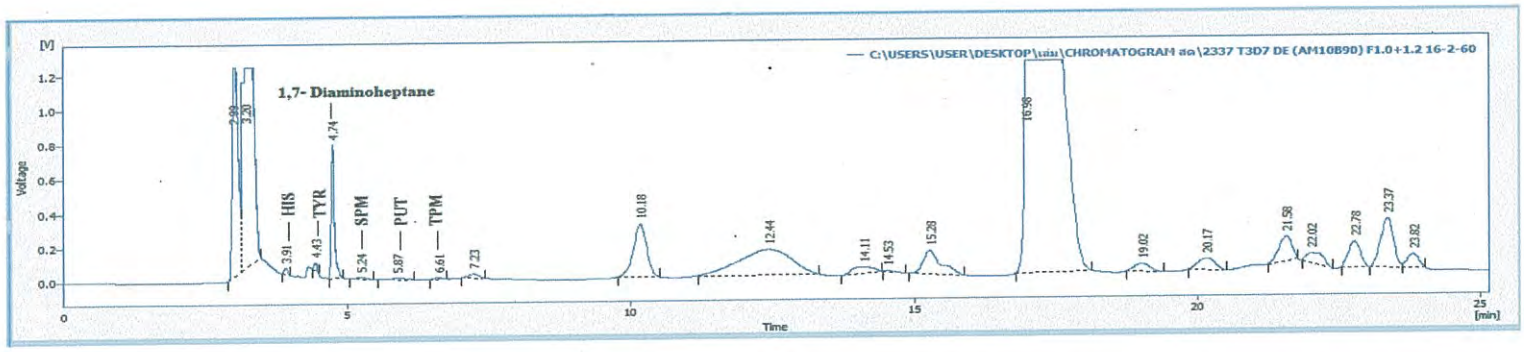
ภาคผนวกที่ ช4 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่พบในเนื้อหมูสด (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



ภาคผนวกที่ ช5 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane) ที่พบในผลิตภัณฑ์หมูส้ม (หมักธรรมชาติ) ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมัก



ภาคผนวกที่ ช6 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane) ที่พบในผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อทางค้า TISTR543 ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมัก



ภาพที่ ช7 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane) ที่พบในผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมัก

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Pussadee Tangwatcharin

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 02662 48 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

4. หน่วยงาน/ที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์ 02-326-4313 ต่อ 3641 **มือถือ** 086-9593742

โทรสาร 02-326-43134

E-mail putang3009@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่สำเร็จการศึกษา	ระดับ	ชื่อปริญญา	สถาบัน
2539	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง (เกษตรศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2543	ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2550	ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) จุลชีววิทยาทางในอาหาร

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.2.1 การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของแป้ง ใยอาหาร และรีซิสแทนต์สตาร์ชจากวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปกล้วยไข่และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนมสด

7.2.2 ประสิทธิภาพของเกลือของกรดอินทรีย์ และสารลอริกอาร์จิเนทต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในเนื้อสุกร

7.2.3 อุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่ในฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง

7.2.4 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและเมทิลลีนคลอไรด์ในการต้านทานเชื้อ *Listeria monocygenes*

7.2.5 ประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ สารละลายกรด lauric สาร monolaurin และกรด lactic ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria monocytogenes* บนเนื้อสุกรสด

7.2.6 ประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ สารละลายกรด lauric สาร monolaurin และกรด lactic ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylcoccus aureus* บนเนื้อสุกรสด

7.2.7 คุณสมบัติความคงตัวและการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่แยกได้จากเนื้อสุกร

7.2.8 อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกและอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* sp. ที่อยู่ในสภาวะเครียดด้วยความร้อนในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์และเนื้อสุกร

7.2.9 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในกระบวนการฆ่าและตัดแต่งซากสุกรที่ถูกสุขลักษณะและไม่ถูกสุขลักษณะใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

7.2.10 การเสื่อมเสียทางจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในระหว่างการเก็บรักษาของปลาดุกร้า

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

7.3.1 หัวหน้าโครงการวิจัย โดยได้รับทุน Consortium programs ทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2545 ระยะเวลา 4 ปี

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., Intrasungkha N. and Griffiths, M.W. 2005. Comparison of methods for the isolation of thermotolerant *Campylobacter* from poultry. J. Food Prot. 68: 616-620.

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

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M.W. 2007. Media for the aerobic resuscitation of *Campylobacter jejuni*. J. Food Prot. 70: 1099-1109.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M.W. 2010. Media for aerobic resuscitation of *Campylobacter jejuni* supported by fumarate respiration. As. J. Food Ag-Ind. 3: 93-107.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P., Intasungkha, N. and Griffiths, M.W. 2004. Evidence of thermotolerant *Campylobacter* contamination in fresh Meat at Songkhla Province, Thailand. Proceeding of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development Bangkok, Thailand. 25-26 August 2004. Vol 2: 367-370.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P.and Griffiths, M.W. 2006. Survival of *Campylobacter jejuni* following starvation or acid-induced stress. Proceeding of the 11th Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition, Bangkok, Thailand. 8-10 March 2006. pp. 161.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P.and Griffiths, M.W. 2006. Resuscitation of non-stressed or stressed *Campylobacter jejuni* in different enrichment broths. Proceeding of IAFP 2006 the 93rd Annual Meeting, Calgary, Alberta, Canada. 13-16 August 2006. pp. 144.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P.and Griffiths, M.W. 2006. A combination of enrichment broth and immunomagnetic separation for the detection of *Campylobacter jejuni* in chicken under aerobic conditions. Proceeding of IAFP 2006 the 93rd Annual Meeting, Calgary, Alberta, Canada. 13-16 August 2006. pp. 144.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M.W. 2009. Media for aerobic resuscitation of *Campylobacter jejuni* supported by fumarate respiration. Food Innovation Asia Conference 2009. 18-19 June 2009. pp. 24.

7.3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่องการเสื่อมเสียทางจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในระหว่างการเก็บรักษาของปลาดุกร้า โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 2 ประจำงบประมาณ พ.ศ. 2550

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ อำนวย บินแหละ ศราวุธ เหมหมัด และวลัยรัตน์ นาเลื่อน. 2553. คุณภาพทางจุลินทรีย์และทางกายภาพของปลาดุกสดและปลาดุกร้าในอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 29: 404-412.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin P, Thanonkaew A, Juntachote T, Raungrat W, Auksornnieum A. 2008. Effect of Spoilage and *Escherichia coli* Contaminations in Fresh Farmed and Wild Catfish to Microbiology Quality of Dry Fermented Catfish (Pla-Duk-Ra). Food Innovation Asia Conference 2008. 12-13 June, 2008. pp. 122.

Tangwatcharin P, Binlah A, Hemmad S, Naleung W, Latae M. 2007. Evidence of spoilage and spoilage and presence of *Escherichia coli* in dry fermented catfish (Pla-duk-ra) produced from farmed and wild fish in Phatthalung province. 33rd Congress on Science and Technology of Thailand 2007, Nakornsrithammarat, Thailand. 18-20 October, 2007. pp. 266.

7.3.3 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในกระบวนการฆ่าและตัดแต่งซากสุกรที่ถูกสุขลักษณะและไม่ถูกสุขลักษณะในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) ประจำปี พ.ศ. 2550

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ และไชยวรรณ. 2552. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในกระบวนการฆ่าสุกรแบบสัมผัสพื้นและไม่สัมผัสพื้นในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 27: 122-131.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Wattanachant, C., Molan, J., Charalak, N., Chotirat, P., Chuaybumrung, S., Choudoungchan, C. and Manrech, R. 2009. Transmission of pathogenic bacteria to unhygienic pig slaughtering process at abattoir, Songkhla Province. 35rd Congress on Science and Technology of Thailand 2009, Chonbury, Thailand. October 15-17, 2009.

7.3.4 หัวหน้าโครงการวิจัย : อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกและอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* sp. ที่อยู่ในสภาวะเครียดด้วยความร้อนในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์และเนื้อสุกร แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี พ.ศ. 2551

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ ทิพวัลย์ กุลรัตน์ และนิตยา คงผอม. 2553. ผลความร้อนและความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* Rissen. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 28 (ฉบับพิเศษ): 68-75.

ผุสดี ตังวัชรินทร์ วิภา รักษ์ทอง และธัญพิสิษฐ์ พรหมศิริวรกุล. 2553. อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกและความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* Rissen ในเนื้อสันนอกสุกร.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23: 44-51.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ ทิพวัลย์ กุลรัตน์ และนิตยา คงผอม. 2553. ผลของกรดแอสคอร์บิกและความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* Rissen ในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์. การนำเสนองานวิจัยแห่งชาติ 2553. วันที่ 26-30 สิงหาคม 2553. ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์, กรุงเทพมหานคร.

7.3.5 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่องคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำอุปโภค-บริโภคของมหาวิทยาลัยในจังหวัดพัทลุง แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณรายได้ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ (ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี) ประจำปี พ.ศ. 2551

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ สุนี แหละหลัะ และฝารีดา เห็นดีน. 2553. คุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำอุปโภค-บริโภคของมหาวิทยาลัยในจังหวัดพัทลุง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 29: 23-31.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Laehlah, S., Hendeen, F. and Pechkeo, W. 2009. Contaminations of Total Plate Count, Coliform and *Escheriachia coli* in Drinking Water of University, South Thailand. 35rd Congress on Science and Technology of Thailand 2009, Chonbury, Thailand. October 15-17, 2009.

7.3.6 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง คุณสมบัติความคงตัวและการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่แยกได้จากเนื้อสุกร แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี พ.ศ. 2552

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์. 2554. ความคงตัวและกิจกรรมการต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำต่อการต้านเชื้อ coagulase positive *Staphylococcus aureus* ที่แยกจากเนื้อสุกร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. Accepted paper.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Irat, A., Umayee, K. and Thingdomkhaw, S. 2010. Antimbacterial activity of mangosteen hull extract against *Staphylococcus aureus*. The 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology, August 25-27, 2010. Bangkok, Thailand.

ผุสดี ตังวัชรินทร์. 2553. ผลของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อการต้านเชื้อ coagulase positive *Staphylococcus aureus* ที่แยกจากเนื้อสุกร. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. วันที่ 17-18 ธันวาคม 2553. โรงแรมรามาการ์เดนส์, กรุงเทพมหานคร.

7.3.7 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง ประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ สารละลายกรด lauric สาร monolaurin และกรด lactic ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylcoccus aureus* บนเนื้อสุกรสด แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน สำนักงานสนับสนุนกองทุนวิจัย ประจำปี 2552 ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Tangwatcharin, P. and Khopaibool, P. 2011. Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against *Staphycoccus aureus*. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health. Accepted paper.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P. and Khopaibool, P. 2010. Combined actions of virgin coconut oil, lauric acid and monolaurin with lactic acid on *Staphylococcus aureus*. 56th International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010. Jeju, Republic of Korea.

Tangwatcharin, P. and Khopaibool, P. 2012. Effects of lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid on *Staphylococcus aureus* and physical qualities of pork. International Congress of Food Engineering and Technology (IFET2012). March 26-28, 2012, IMPACT Convention Center Bangkok, Thailand.

7.3.8 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง ประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ สารละลายกรด lauric สาร monolaurin และกรด lactic ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria monocytogenes* บนเนื้อสุกรสด แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2553

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Tangwatcharin, P., Suksathit, S., Klomvisad, C., Nudput, S. and Pechkeo, W. 2013. Effects of virgin coconut oil or monolaurin and in combinations with lacitc acid, on the growth of *Listeria monocytogenes* in lab medium and fresh pork. Chaing Mai J. Sci. (Accepted)

ผุสดี ตังวัชรินทร์ พัชนี ชอบธรรม และมัทธิชา ช่างสนั่น. 2554. กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes*. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29: 9-17.

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Klomvisad, C. and Nudput, S. 2012. Combined actions of virgin coconut oil or monolaurin with lactic acid on *Listeria monocytogenes* in pork.

International Congress of Food Engineering and Technology (IFET2012). March 26-28, 2012, IMPACT Convention Center Bangkok, Thailand.

ผุสดี ตังวัชรินทร์ พัชนี ชอบธรรม และมัทธิชา ช่างสนั่น. 2553. การใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์กรดลอริกและโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. วันที่ 17-18 ธันวาคม 2553. โรงแรมรามาการ์เดนส์, กรุงเทพมหานคร.

7.3.9 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำและเมทิลลีนคลอไรด์ในการต้านทานเชื้อ *Listeria monocygenes* แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2554

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Tangwatcharin, P. and Meannui, N. 2013. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in meat media using mangosteen pericarp extract. Asian Pacific J. Trop. Med. (Accepted)

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

Tangwatcharin, P., Meannui, N. and Onyen, A. 2012. Antibacterial activity of mangosteen hull extract against *Listeria monocytogenes*. Proceedings of 2012 International Conference on Chemical Engineering and Applications (CCEA 2012) 26-28 February, 2012. Quality Hotel, Singapore.

7.3.10 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง ประสิทธิภาพของเกลือของกรดอินทรีย์ และสารลอริกอาร์จิเนทต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารในเนื้อสุกร แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2555

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Suksathit, S. and **Tangwatcharin, P.** 2013. Activity of salts of organic acid in combination with lauric arginate against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Rissen. ScienceAsia. (Accepted)

2. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ รมณียา จารึก และสุนิษา แสงทอง. 2555. ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของเกลือของกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 3. วันที่ 21-22 มิถุนายน 2555. ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุม อิมแพ็คเมืองทองธานี. จังหวัดนนทบุรี.

7.3.11 อุบัติการณ์ของโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการและไม่แสดงอาการและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่ในฟาร์มโคนม อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ประจำปี 2554

1. การเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการ

ผุสดี ตังวัชรินทร์ และสุชาติ สุขสถิตย์. 2554. Data of dairy farm for evidence of clinical and subclinical mastitis in Paphayom district, Phatthalung province. งานประชุมทางวิชาการสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ครั้งที่ 4 CHE-USDC CONGRESS IV. วันที่ 14-16 กันยายน 2554. โรงแรม เดอะซายน์ พัทยา. จังหวัดชลบุรี.

7.3.12 การผลิตและศึกษาคุณลักษณะของแป้ง ใยอาหาร และรีซิสแทนต์สตาร์ชจากวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปกล้วยไข่และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไอศกรีมนมสด แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2556

1. งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

สุชาติ สุขสถิตย์ และ ผุสดี ตังวัชรินทร์. 2558. ผลของการเตรียมเปลือกกล้วยไข่ดิบต่อองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และคุณภาพทางจุลินทรีย์บางประการของผงเปลือกกล้วย. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. In press.

สุชาติ สุขสถิตย์ และ ผุสดี ตังวัชรินทร์. 2558. องค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติความเป็นพรีไบโอติกบางประการของใยอาหารและรีซิสแทนต์สตาร์ชจากเปลือกและเนื้อกล้วยไข่ดิบ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. In press.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเสริมโปรไบโอติกร่วมกับพรีไบโอติก แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณรายได้ (โครงการนักวิจัยพี่เลี้ยง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี 2557-2559 ระยะเวลา 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 13 มกราคม 2557 ถึง 12 มกราคม 2540 ซึ่งได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 35

7.4.2 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุมในกระบวนการผลิตเลือดเป็ดและการยืดอายุการเก็บรักษาเลือดเป็ด แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน บริษัท ดั๊กคิง จำกัด ประจำปี 2557 ระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม 2557 ถึง 30 เมษายน 2558 ซึ่งได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 95

7.4.3 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานเสริมโปรไบโอติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินร่วมกับใยอาหาร และรีซิสแทนต์สตาร์ชจากวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปกล้วย แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน งบประมาณแผ่นดิน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี 2558 ระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558 ซึ่งได้ทำการวิจัยเสร็จแล้วประมาณร้อยละ 15

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี
Dr. Supaluk Sorapukdee
2. หมายเลขบัตรประชาชน : 5800700027371
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. สถานที่ติดต่อ ภาคเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์ 085-0642039 โทรสาร 0-2326-4313
E-mail address kssupalu@kmitl.ac.th, supaluk.sor@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
วท.บ. เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง เหรียญทอง (เทคโนโลยีอาหาร)	2546	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ปร.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)	2555	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

6. ประวัติการทำงาน

2546-2548 เจ้าหน้าที่วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด

2548-2550 เจ้าหน้าที่พัฒนาการใช้ผลิตภัณฑ์ บริษัท นิวทรีชัน เอส ซี จำกัด

พ.ศ. 2556-ปัจจุบัน อาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

7. สาขาที่มีความชำนาญ

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์: คุณภาพเนื้อ, ความนุ่มเนื้อและเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้อง

8. ผลงานวิจัย

ก. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับระดับชาติและนานาชาติ

1. Sorapukdee, S., Kongtasorn, C., Benjakul, B. and Visessanguan, W. 2013. Influences of muscle composition and structure of pork from different breeds on stability and textural properties of cooked meat emulsion. *Food Chemistry*, 38: 1892-1901. (Impact factor, 3.655)
2. Sorapukdee, S., Visessanguan, W., Benjakul, B., Kongtasorn, C., Punchai, K. and Taharnklaew, R. 2010. Effect of breed on physical properties, chemical composition

and muscle structure of porcine meats. The RGJ-Ph.D. Congress XI 2010, Jomtien Palm Beach Resort, Chonburi, Pattaya: April 1-3, 2010.

3. Sorapukdee, S., Visessanguan, W., Benjakul, B., Kongtasorn, C., Punchai, K. and Taharnklaew, R. 2011. Differences in endogenous proteolytic activities of porcine *m. longissimus* among breeds during aging and their relationship to pork tenderness. RGJ Seminar Series, Advanced researches in food value chain. Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University: February 10, 2011.
4. Sorapukdee, S., Visessanguan, W., Benjakul, B. and Kongtasorn, C. 2012. Effects of purebred and crossbred pigs on technological quality of porcine *M. longissimus thoracis et lumborum*. Food Innovation Asia 2012: Green and Sustainable Food Technology for all. BITEC Bangna, Bangkok. June 15, 2012.
5. Sorapukdee, S., Kongtasorn, C., Benjakul, B. and Visessanguan, W. 2012. Differences in early postmortem myofibril degradation and total proteolytic activity in meats derived from different pig breeds. The 15th AAAP Animal Science Congress. Thammasart University: November 26-30, 2012.

1. ชื่อ - นามสกุล ดร. คมแข พิลาสมบัติ
Dr. Komkhae Pilasombut
2. หมายเลขบัตรประชาชน :
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. สถานที่ติดต่อ ภาคเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์ 085-0642039 โทรสาร 0-2326-4313
E-mail address kpkomkha@kmitl.ac.th, komkhae@hotmail.com

5. 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

6. ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2540-ปัจจุบัน อาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

7. สาขาที่มีความชำนาญ

จุลชีววิทยาเนื้อสัตว์

8. งานวิจัยที่รับผิดชอบ *(กำลังดำเนินงาน) (ชื่อโครงการ แหล่งทุน และระยะเวลาดำเนินการ*

9. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับระดับชาติและนานาชาติ

1. Pilasombut, K., Waljjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A and Sakpuaram, T. 2002. Isolation of lactic acid bacteria and its characterization of bacteriocin-like activity from chicken intestine. 2002. The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. November 12-15. Khon Kaen, Thailand.

2. Pilasombut, K., Tanjak, P. and Nitisinprasert, S. 2005. Screening of lactic acid bacteria isolated from chicken intestine for use as Probiotic. Symposium on Lactic Acid Bacteria. Genetics, Metabolism and Applications. August 28 to Septemper 1. Egmond ann Zee, The Netherlands.

3. Komkhae Pilasombut, Worawidh Wajjwalku, Sunee Nitisinprasert, Adisorn Swetwiwathana , Takeshi Zendo, Koji Fujita, Jiro Nakayama, Kenji Sonomoto. and Thavajchai Sakpuaram. 2005. Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 39: 612-621.

4. Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K, Nakayama, J and Sonomoto, K. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. J. Sci. and Technol. Vol. 28 (Suppl. 1): 121-132.

5. Pilasombut, K., Srithaneadchai, P., and Mekhora, T., 2007. A study of bacterial contamination on beef obtained from fresh market in Bangkok, Thailand. Proceeding of the international conference, On integration of science and technology for sustainable development "biological diversity, food and agricultural technology. 26-27 April, 2007. Bangkok, Thailand. 86-89 p.

6. Pilasombut. K., Ounruan, A., Opatpatanakit, Y., and Sethakul, J. 2007. Influence of lactic acid on reduction of bacterial population of Thai native beef. Thailand. Proceeding of the international conference, On integration of science and technology for

sustainable development " biological diversity, food and agricultural technology. 26-27 April, 2007. Bangkok, Thailand. 410-414 p.

7. Pilasombut. K.,Ounruan, A., Opatpatanakit, Y., and Sethakul, J. 2007. Microbial decontamination by dipping lactic acid solution on pork stored at room temperature. Proceedings of 53rd International Congress of Meat Science and Technology. 5th-10th August 2007, Beijing, China. 35-36p.

8. คมแข พิลาสมบัติ. 2550. การลดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเอนบนเนื้อสัตว์โดยใช้สารละลายกรดแลกติก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 25: 103-112.

9. คมแข พิลาสมบัติ ปริดา ธนสุกาญจน์ พิสิฐ วงศ์สง่าศรี และ ปุณฑริกา รัตนตรัยวงศ์. 2550. การยืดอายุการเก็บรักษาและยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ในเนื้อสุกรแช่เย็นด้วยกรดและเกลือของกรดอินทรีย์. การประชุมทางวิชาการ "นเรศวรวิจัย" ครั้งที่ 3: ความสำเร็จของการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2550. มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก. 75-82 น.

10. คมแข พิลาสมบัติ พิสิฐ วงศ์สง่าศรี และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2551. การลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสุกรในการเก็บที่สภาวะอุณหภูมิห้องโดยการฉีดพ่นด้วยสารละลายกรดแลกติก. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 4: การรุกคืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 305-308 น.

11. คมแข พิลาสมบัติ อังคณา ทุมดี พงศ์ศักดิ์ ศรีธเนศชัย และ ธำรงค์ เมฆโหรา. 2551. การสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อโคในเขตกรุงเทพมหานคร. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 4: การรุกคืบของการผลิตพลังงานทดแทนต่อการผลิตปศุสัตว์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 318-321 น.

12. ปุณฑริกา รัตนตรัยวงศ์ คมแข พิลาสมบัติ พิสิฐ วงศ์สง่าศรี และ อังคณา ทุมดี. 2551. ผลของสารละลายกรดและเกลือของกรดอินทรีย์ต่อการยืดอายุการเก็บรักษา การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อไก่แช่เย็น, วารสารเกษตรนเรศวร. 11 : 107-117.

13. Meesawat, P., Thongkhao, K., Choowongkomon, K., and Pilasombut, K. 2007. Cloning and Over expression of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus salivarius* K4 IN *Escherichia coli*. การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา สจล. ครั้งที่ 1. 28 สิงหาคม 2551, Bangkok, Thailand. 402-408p.

14. Thongkhao, K., Meesawat, P., Choowongkomon, K., Nitisinprasert, S., and Pilasobut, K., 2008. Cloning, Expression and Purification of ABP118β like Bacteriocin in

Escherichia coli. Chulabhorn Research Institute Conference Center. 28th-29th August 2008, Thailand. 43p.

15. Pilasombut, K. 2008. Effects of lactic acid solution associated with postmortem aging on Longissimus M. quality of Thai Native beef. Proceedings of 13rd Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22th-26th. Animal Husbandry Association of Vietnam. 76p.

16. Limsupavanich, R., Thumdee, A., Pilasombut, K., and Sethakul, J., 2008. Display Quality of Longissimus Steaks from NaturalGrass Grazed Native Thai and Pineapple Byproducts-fed Brahman Cross-bred Cattle. Proceedings of 13rd Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. 22th-26th. Animal Husbandry Association of Vietnam. 75p.

17. Pilasombut, K., Swetwiwathana, A., Sitthigripong, R., and Sethakul, J. 2009. Screening of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria for fermented meat starter culture. the 55th International Congress of Meat Science and Technology, Meat - Muscle, Manufacturing and Meals. August 16-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

18. Swetwiwathana, A., Pilasombut, K. and Sethakul, J. 2009. An in-vitro screening of isolated bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat for probiotic prospect. the 55th International Congress of Meat Science and Technology, Meat - Muscle, Manufacturing and Meals. August 16-22, 2209, Copenhagen, Denmark.

19. Rumjuankiat, K., Pilasombut, K., Wangwibulkit, S. and Swetwiwathana, A. 2009. Screening and partial characterization of bacteriocin from lactic acid bacteria in fish gastrointestinal tract. Pp. 1-10. in: Proceeding of the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Thailand.

20. Narakaew, T., Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Swetwiwathana, A. 2009. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. Pp. 1-10. *In*: Proceeding of the 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Thailand.

21. คมแข พิลาสมบัติ นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิสร เสวตวิวัฒน์. 2553. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28:2 (19-28).

22. Veerawatanayotin, S., Jindaprasert, A., Pilasombut, K., Sethakul, J. and Swetwiwathana, A., 2010. Effect of pediocin PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and *S.* Ratchaburi in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth. the 56th International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, Korea.

23. Pawkratok, N., A. Jindaprasert, K. Pilasombut, J. Sethakul and A. Swetwiwathana. 2010. Effect of Bacteriocin-Producing *Weissella cibaria* SI 21 and *Lactobacillus plantarum* RS 49 on *Staphylococcus aureus in* Isan sausage (traditional Thai fermented meat-rice sausage) model broth. the 56th International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, Korea.

24. Pilasombut, K., Swetwiwathana, A., Ngamyeesoon, N., Sitthigripong, R., and Sethakul, J. 2010. Synergistic activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria as starter culture and fresh garlic against *Salmonella* Typhimurium in Nham model broth, Thai fermented meat product. the 56th International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, Korea.

25. Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Sethakul, J. 2010. Antimicrobial activity of green tea extract (*Camellia Sinessis*) on refrigerated ground pork. the 56th International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, Korea.

26. Thongkhao, K., Meesawat, P., Pilasombut, K., Nitisinprasert, S. and Chuwongkomon, K. 2008. Optimization of expression vector to produce Abp118α like bacteriocin and Abp118β like bacteriocin in *Escherichia coli*. 34th Congress on Science and Technology Thailand (STT 34). October 31 - November 2, 2008. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok Thailand.

27. Tuntivisoottikul, K., Pilasombut, K., Limsupavanich, R. and Sethakul, J. 2010. The effect of ageing technique associated with lactic acid spray and ageing times on beef quality. The 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan.

28. Maneenin, N., Pilasombut, K., Bundit, J. and Sethakul, J. 2010. Effect of green tea (*Camellia Sinessis*) extract on lipid oxidation and meat quality in raw ground pork refrigerated storage. The 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan.

29. Luangvaree, P., Pilasombut, K., Tuntivisoottikul, K. and Sethakul, J. 2010. Shelf-life extension and microbial reduction of beef on dry ageing by lactic acid solution. The 14th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan.

30. คมแข พิลาสมบัติ และอังคณา ทุมดี. 2553. การลดเชื้อจุลินทรีย์บนเนื้อสุกรเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 10-15°C โดยการจุ่มด้วยสารละลายกรดแลกติก.การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 2. 17-18 สิงหาคม 2553, Bangkok, Thailand. 59-64p.

31. อรุณวรรณ อินทร์ช่วย คมแข พิลาสมบัติ รุจริน ลิ้มศุภวานิช จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. คุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโคเมื่อใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 เป็นกล้าเชื้อ. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 2. 17-18 สิงหาคม 2553, Bangkok, Thailand. 65-70p.

32. ปรมาภรณ์ เจ็ดวรรณะ คมแข พิลาสมบัติ รุจริน ลิ้มศุภวานิช จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. ผลของการใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ที่มีต่อคุณสมบัติทาง
จุลินทรีย์ของแหนมเนื้อโค. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 2. 17-18 สิงหาคม 2553, Bangkok, Thailand. 71-77p.

33. คมแข พิลาสมบัติ จตุพร บัณฑิต กัลยาณี เต็งพงศธร และจุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2553. ผลของการใช้สารสกัดจากชาเขียวและระยะเวลาการเก็บต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อเจอร์กี้. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 2. 17-18 สิงหาคม 2553, Bangkok, Thailand. 120-127p.

34. Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N. and Sethakul, J. 2011. Characterization and detection of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* sb2 as probiotic starter in beef Nham. the 57th International Congress of Meat Science and Technology, August 7-12, 2011, Gent, Belgium.

35. Sitthigripong, R., Pilasombut, K. and Ngamyeesoon, N. 2011. *In vitro* studied of Lactic acid bacteria as probiotic starter for fermented meat product. the 57th International Congress of Meat Science and Technology, August 7-12, 2011, Gent, Belgium.

36. อรุณวรรณ อินทร์ช่วย คมแข พิลาสมบัติ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล รุจริน ลิ้มศุภวานิช และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. การใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D4 ในแหนมเนื้อโค. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29 (3-2) : 37-45.

37. ปรมาภรณ์ เจ็ดวรรณะ คมแข พิลาสมบัติ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล รุจริน ลิ้มศุภวานิช และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. การศึกษาคุณภาพและจุลินทรีย์ของแหนมเนื้อโคโดยใช้เชื้อ *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* P2 และ Sb2 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29 (3-2) : 46-54.

38. สุกัญญา วาวงค์ คมแข พิลาสมบัติ นวลพรรณ งามยี่สุ่น และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. การตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเนื้อโคด้วยวิธีพีซีอาร์อาร์เอพีดี. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 29 (3-2) : 65-72.

39. Pilasombut, K, Ngamyeesoon, N and Teerarak, M. 2012. Application of green tea extract as an antioxidant and extend shelf-life in raw steak. 58th International congress of meat science and technology, 12-17th August, 2012, Montreal, Canada.

40. Pilasombut, K and A. Thumdee. 2012. Preliminary screening of probiotic lactic acid bacteria from pig intestinal content. The 15th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. November 26-30, 2012, Bangkok, Thailand.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

Nithisantawakhupt, J., Tangwatcharin, P. and Vijitrothai, N. "Survival of lactic acid bacteria isolated from fermented meat products in gastrointestinal tract model." 1075-1079. *In* Proceeding of the 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress (AAAP2016). Fukuoka : Japan.

ทุนวิจัยที่ได้รับ

ทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (รหัสโครงการ 2559-01-04-019)

PO-02-40

Survival of lactic acid bacteria isolated from fermented meat products in gastrointestinal tract model

Jiraroj Nithisantawakhupt, Pussadee Tangwatcharin, Nahathai Vijitrothai

Department of Animal Production Technology and Fisheries, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the survival of lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditional fermented meat products in gastrointestinal tract model. The 8 LABs were isolated from traditional fermented meat products, Thai traditional fermented sausages and Nhams, and screened preliminary probiotic property. Their survival in artificial gastric juice at pH 2, 3, 4 and 7 for 0, 30, 60, 90 and 180 min and intestinal fluid at pH 8 for 180 min were investigated. The result showed that the viability of all strains tended to remain stable, in the range of 8.23 – 9.53 log cfu/ml, in gastric model at pH 3, 4 and 7 for 180 min. After simulated intestinal fluid at pH 8 for 180 min, their viabilities tended to remain stable excepted isolate no. 2021B1 decreased in the range of 0.93 - 1.01 log cfu/ml. Isolate no. 10111C2, 601-21B1 and 8031C1 exhibited gastric juice at pH 2 and intestinal fluid tolerance as well as more viability and survival in gastrointestinal tract model. They can be probiotic and applied to fermented meat products.

INTRODUCTION

The probiotic concept has been defined as a living microorganism which upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition (Guarner and Schaafsma, 1998). Lactic acid bacteria are regard as a major group of probiotic bacteria (Collin et al., 1998). Lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly used microorganisms in food preservation techniques such as fermentation. Most scientists agree that probiotic strains shall be able to survive transit through the gastric acid environment as well as exposure to bile and pancreatic juice in the upper small intestine to be able to exert beneficial effects in the lower small intestine and the colon, although there are convincing data on beneficial immunological effects also from dead cells (Mottet and Michetti, 2005). The viability and survival of probiotic bacteria are the most important parameters for providing therapeutic functions. Several factors have been claimed to affect the viability of probiotic bacteria in fermented meat products including low pH and bile salts. In order to be used as potential probiotics (Chou and Weimer, 1999). The aim of this study was to investigate the survival of lactic acid bacteria isolated from Thai traditional fermented meat products in gastrointestinal tract conditions.

MATERIALS AND METHODS

Lactic acid bacteria isolates and growth condition

The lactic acid bacteria were previously isolated from traditional fermented meat products including 6 traditional fermented sausages and 16 Nhams (traditional fermented pork). The cultures have already screened and assessed preliminary probiotic property, well-growth selection, antagonistic activity of foodborne pathogen and survival of LAB in pH conditions and bile salt concentrations in previous study (Nithisantawakhupt et al., 2015). The LAB isolates were stored in MRS broth (de Man Rogosa and Sharp, Merck, Germany) at -20°C.

Tolerance test of LAB isolates in gastrointestinal tract model

Simulated gastric and intestinal digestion was tested essentially as modified method of Zárate et al. (2000). A 1 ml of LAB was transferred in 35 ml of MRS broth with 1% NaCl (w/v) and incubated at 37°C in anaerobic condition for 16 hr that the initial concentration of approximately 10^9 cfu/ml. After washing in 3.5 ml of sterile saline solution (0.9% NaCl) and centrifugation at 5,000 x g for 10 min, the cell suspension was added to 25 ml of gastric juice with the following composition: 125 mM of NaCl, 7 mM of KCl, 45 mM of $NaHCO_3$, and 0.3 % of pepsin (Sigma, USA). The final pH was adjusted with HCl solution to pH 2, 3, 4 and 7. The bacterial suspension was agitated to simulate peristalsis by shaking water bath (Vision scientific, Korea). Aliquots were taken for enumeration of viable at 0, 30, 60, 90 and 180 min by pour plate technique on MRS agar in anaerobic condition for 48-96 hr. Simulated intestinal fluid was prepared by suspending the cells (after 180 min of gastric digestion) in 0.1% (w/v) of pancreatin (Sigma, USA) and 0.15 % (w/v) of bile salts (Sigma, USA) in water and adjusted it to pH 8.0 with 1 N

NaOH solution. The suspension was incubated as described above and samples for total viable counts were taken for 0, 30, 60, 90 and 180 min in gastric model and 30, 60, 90 and 180 min in intestinal model exposure using pour plate technique with MRS agar in anaerobic condition. The total incubation in gastrointestinal tract model was 360 min. The experiment was performed in triplicate and mean were calculated. Then their percentages of survival of LAB were calculated as below equation.

% Survival of LAB = (Total viable count of LAB in gastric or intestinal fluid model x 100)/Total viable count of LAB at 0 min in gastric model

RESULTS AND DISCUSSION

Tolerance test of LAB isolates in gastrointestinal tract model

The study of LAB survival in gastrointestinal tract model at pH 2, 3, 4, and 7 was demonstrated. A viability of LAB isolate no. 1011C2, 1012C2, 10111C2, 2021B1, 5031A2, 601-21B1, 73-21A2 and 8031C1 tended to remain stable, in the range of 8.23 – 9.53 log cfu/ml, in gastric model at pH 3, 4 and 7 for 180 min. After simulated intestinal fluid at pH 8 for 180 min, viabilities of all isolates tended to remain stable except viability of isolate no. 2021B1 decreased in the range of 0.93 - 1.01 log cfu/ml (Table 1). On the other hand, in gastrointestinal tract model at pH 2 for 180 min, the survival percentages of LAB isolate no. 8031C1, 10111C2 and 601-21B1 were more than 95 %. Then their percentage of survival have a moderate decrease in intestinal fluid for 180 min that they were 53.11, 52.14 and 47.68%, respectively. On the contrary, the survival of other LAB isolates sharply decreased in gastric model for 180 min and slightly decreased in intestinal model for 180 min expect their LAB isolate no. 1012C2 and 73-21A2 moderately sharply decreased in gastric and intestinal model, respectively (Fig. 1). The criteria key in the selection of a probiotic are therefore considered acid and bile tolerance, also gastrointestinal conditions. (Zárate et al., 2000). Besides, Pancreatic juice inhibits growth of multiresistant bacterial strains and for some probiotic bacteria (Kruszewska et al., 2004). Most LABs were susceptible to bovine and porcine bile in vitro and were resistant to human bile which correlated with the survival in the human GIT (Dunne et al., 2001). Thus, bile secreted in the small intestine reduces the survival of bacteria by changing the composition of lipids and fatty acids in their cell membranes. In this study, both acid and bile stresses were assayed in a sequential way, also the simulating gastrointestinal movement. These results was similar to Charteris et al. (1998) found *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. have a moderate tolerance to acid pH during 90 min incubation which decreased after 2 h but individual strains vary considerably. Kawther et al. (2010) reported that the simulated gastric transit tolerance of *L. johnsonii*, *L. gasseri* and *L. salivarius* strains was pH dependent and showed lower viability at pH 2.0 after 180 min compared with pH 3.0 and pH 4.0.

CONCLUSION

LAB isolate no. 10111C2, 601-21B1 and 8031C1 exhibited acid and bile tolerant as well as more viability and survival in gastrointestinal tract model specially in artificial gastric juice at pH 2. Thus, they tended to be probiotic and will be applied in fermented meat products in the future.

Keyword: LAB, Gastrointestinal tract model, Fermented meat product, Nham, Probiotic

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported research fund from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang in 2016.

Table 1 Survival of LABs in gastrointestinal tract model[a]

LAB isolate no.	Gastrointestinal tract condition	Incubation time (min)	Survival of LABs (log cfu/ml) at different pH condition			
			pH2	pH3	pH4	pH7
1011C2	Pepsin	0	9.15 ± 0.10	9.40 ± 0.01	9.42 ± 0.06	9.37 ± 0.02
		30	8.80 ± 0.02	9.47 ± 0.01	9.36 ± 0.06	9.29 ± 0.02
		60	7.00 ± 0.00	9.38 ± 0.01	9.33 ± 0.01	9.24 ± 0.05
		90	5.68 ± 0.07	9.37 ± 0.02	8.90 ± 0.04	9.19 ± 0.01
		180	4.88 ± 0.08	9.35 ± 0.03	9.34 ± 0.02	9.44 ± 0.01
	Bile salt + Pancreatin	180	4.88 ± 0.07	9.31 ± 0.01	9.38 ± 0.01	9.48 ± 0.00
1012C2	Pepsin	0	9.64 ± 0.01	9.55 ± 0.00	9.58 ± 0.00	9.57 ± 0.00
		30	9.15 ± 0.00	9.39 ± 0.03	9.42 ± 0.02	9.40 ± 0.01
		60	8.59 ± 0.07	9.39 ± 0.03	9.37 ± 0.01	9.38 ± 0.00
		90	8.44 ± 0.06	9.32 ± 0.01	9.32 ± 0.00	9.34 ± 0.00
		180	8.11 ± 0.03	9.30 ± 0.01	9.29 ± 0.01	9.34 ± 0.02
	Bile salt + Pancreatin	180	3.39 ± 0.09	8.91 ± 0.01	8.88 ± 0.04	9.16 ± 0.00
10111C2	Pepsin	0	9.57 ± 0.01	9.58 ± 0.00	9.59 ± 0.00	9.59 ± 0.00
		30	9.49 ± 0.05	9.56 ± 0.02	9.59 ± 0.00	9.59 ± 0.00
		60	9.53 ± 0.01	9.57 ± 0.01	9.55 ± 0.00	9.58 ± 0.00
		90	9.55 ± 0.02	9.56 ± 0.02	9.54 ± 0.01	9.58 ± 0.00
		180	9.51 ± 0.05	9.53 ± 0.03	9.53 ± 0.01	9.57 ± 0.01
	Bile salt + Pancreatin	180	4.95 ± 0.01	9.45 ± 0.02	9.49 ± 0.00	9.53 ± 0.04
2021B1	Pepsin	0	8.86 ± 0.04	9.41 ± 0.01	9.39 ± 0.00	9.43 ± 0.00
		30	7.92 ± 0.13	9.27 ± 0.01	9.22 ± 0.04	9.26 ± 0.01
		60	7.07 ± 0.02	9.07 ± 0.02	9.11 ± 0.02	9.12 ± 0.04
		90	7.01 ± 0.02	8.99 ± 0.01	9.03 ± 0.02	9.05 ± 0.06
		180	5.99 ± 0.02	8.23 ± 0.03	8.77 ± 0.06	9.02 ± 0.05
	Bile salt + Pancreatin	180	3.39 ± 0.09	7.30 ± 0.00	7.76 ± 0.15	9.11 ± 0.01
5031A2	Pepsin	0	9.51 ± 0.01	9.55 ± 0.01	9.51 ± 0.01	9.51 ± 0.00
		30	9.35 ± 0.02	9.40 ± 0.01	9.44 ± 0.05	9.46 ± 0.01
		60	8.61 ± 0.10	9.20 ± 0.01	9.31 ± 0.05	9.13 ± 0.03
		90	5.76 ± 0.03	9.45 ± 0.06	9.22 ± 0.06	9.41 ± 0.03
		180	5.57 ± 0.13	9.45 ± 0.01	9.42 ± 0.09	9.44 ± 0.01
	Bile salt + Pancreatin	180	4.90 ± 0.05	8.77 ± 0.06	8.96 ± 0.18	9.21 ± 0.07
601-21B1	Pepsin	0	9.61 ± 0.00	9.61 ± 0.00	9.64 ± 0.04	9.71 ± 0.00
		30	9.59 ± 0.01	9.50 ± 0.05	9.60 ± 0.01	9.70 ± 0.00
		60	9.56 ± 0.02	9.52 ± 0.01	9.56 ± 0.00	9.66 ± 0.01
		90	9.55 ± 0.02	9.60 ± 0.00	9.54 ± 0.00	9.64 ± 0.00
		180	9.56 ± 0.00	9.46 ± 0.00	9.53 ± 0.00	9.63 ± 0.00
	Bile salt + Pancreatin	180	4.58 ± 0.05	8.70 ± 0.06	8.92 ± 0.01	9.45 ± 0.00
73-21A2	Pepsin	0	9.45 ± 0.01	9.48 ± 0.02	9.52 ± 0.01	9.54 ± 0.00
		30	8.40 ± 0.06	9.46 ± 0.01	9.48 ± 0.02	9.53 ± 0.01
		60	8.18 ± 0.17	9.44 ± 0.01	9.43 ± 0.09	9.43 ± 0.03
		90	7.64 ± 0.15	9.44 ± 0.02	9.48 ± 0.00	9.41 ± 0.01
		180	7.64 ± 0.15	9.38 ± 0.03	9.46 ± 0.00	9.44 ± 0.02
	Bile salt + Pancreatin	180	4.09 ± 0.05	9.24 ± 0.01	9.38 ± 0.02	9.45 ± 0.02
8031C1	Pepsin	0	9.53 ± 0.01	9.54 ± 0.01	9.55 ± 0.01	9.57 ± 0.00
		30	9.49 ± 0.01	9.43 ± 0.01	9.42 ± 0.00	9.57 ± 0.01
		60	9.48 ± 0.01	9.38 ± 0.01	9.49 ± 0.01	9.41 ± 0.01
		90	9.12 ± 0.03	9.42 ± 0.01	9.46 ± 0.02	9.58 ± 0.01
		180	9.14 ± 0.02	9.41 ± 0.05	9.48 ± 0.01	9.47 ± 0.01
	Bile salt + Pancreatin	180	5.06 ± 0.04	9.26 ± 0.04	9.32 ± 0.03	9.40 ± 0.01

[a] LAB isolates were incubated in gastric model at pH2, pH3, pH4 and pH7 for 180 min and in intestinal model at pH 8 for 180 min.

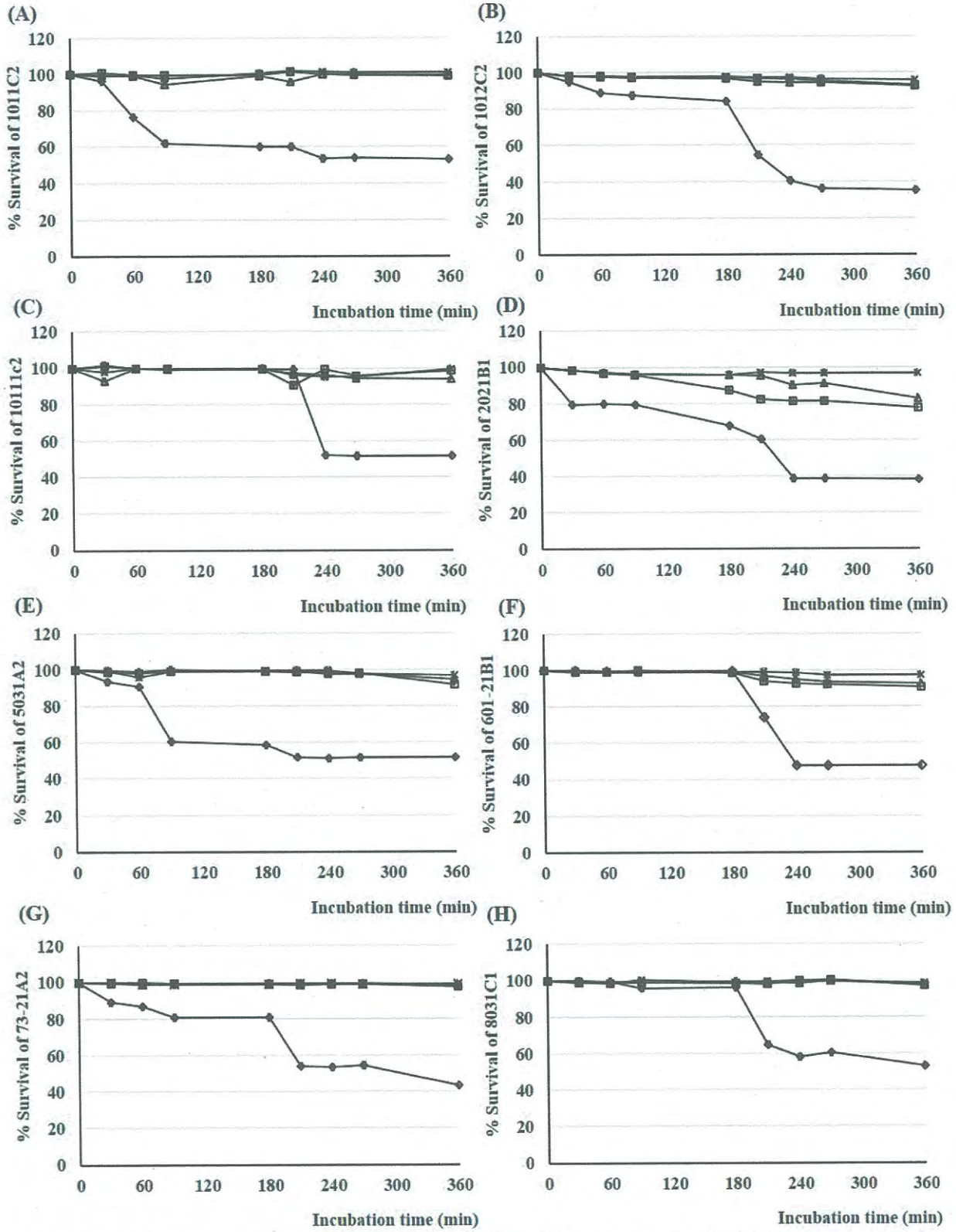


Fig. 1 Survival percentage of LABs (A) isolate no. 1011C2, (B) isolate no. 1012C2, (C) isolate no. 10111C2, (D) isolate no. 2021B1, (E) isolate no. 5031A2, (F) isolate no. 601-21B1, (G) isolate no. 73-21A2 and (H) isolate no. 8031C1 in gastrointestinal tract model for 360 min; in gastric model at (-◆-) pH2, (-■-) pH3, (-▲-) pH4 and (-✕-) pH7 for 180 min and in intestinal model at pH 8 for 180 min.

REFERENCES

Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli and J. K. Collins. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 84: 759–768.

Chou, L. and B. Weimer. 1999. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 82: 23-31.

Collin, J. K., G. Thornton and G. O. Sullivan. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. Int. Dairy J. 8: 487-490.

Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan and J. K. Collins. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am. J. Clin. Nutr. 73: 386-392.

Guarner, F. and G. J. Schaafsma. 1998. Probiotics. Int.J. Food Microbiol. 39: 237–238.

Kawther, EL-Shafei, N. F. Tawfik, Nadia, M. A. Dabiza, O. M. Sharaf and B. A. Effat. 2010. In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli. J. Ame. Sci. 6: 357-367.

Kruszewska, D., J. Lan, G. Lorca, N. Yanagisawa, I. Marklinder and Å. Ljungh. 2002. Selection of Lactic Acid Bacteria as probiotic strains by *in vitro* tests. Microb. Ecol. Health Dis. 29: 37–49.

Kruszewska, D., Å. Ljungh, S. O. Hynes and S. G. Pierzynowski. 2004. Effect of the antibacterial activity of pig pancreatic juice on human multi-resistant bacteria. Pancreas 128: 191–199.

Mottet, C. and P. Michetti. 2005. Probiotics: wanted dead or alive. Dig. Liver Dis.37: 3–6.

Narakaew, T., K. Pilasombut, N. Ngamyeesoon and A. Swetwiwathana, 2010. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. KKU Res. J. 15: 878-888.

Nithisantawakhupt, J., P. Tangwatcharin and K. Suksupath. 2015. Screening of lactic acid bacteria from traditional fermented products. In: Proceedings of the 2nd International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015). 1-3 July. A-One Royal Cruise hotel Pattaya, Thailand.

Zarate, G., A. Perez-Chaia, S. Gonzales and G. Oliver. 2000. Viability and B-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. J. Food Prot. 63: 1214-1221.

T147853