การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำและการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

SELECTION OF PROBIOTIC AND LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING LOW BIOGENIC AMINE AND THEIR APPLICATION AS STARTER CULTURE IN MU-SOM

จิรโรจน์ พิริยันตพิพัฒน์

JIRAROJ PIRIYANTAWAKUPT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเทคโนโลยี

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AG-M-031-236

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติก และผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำและการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

SELECTION OF PROBIOTIC AND LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING LOW BIOGENIC AMINE AND THEIR APPLICATION AS STARTER CULTURE IN MU-SOM

T148331

จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์

JIRAROJ NITHISANTAWAKHUPT

สาขหมู่.....
เลขทะเบียน 148331
วัน.เดือน.ปี 24 ต.ค. 2560

.b 12816429
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2560

KMITL-2017-AG-M-031-238

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SELECTION OF PROBIOTIC AND LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING LOW BIOGENIC AMINE AND THEIR APPLICATION AS STARTER CULTURE IN MU-SOM

JIRAROJ NITHISANTAWAKHUPT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE

FALCULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-AG-M-031-238

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2017

FACULTY OF AGRICULTURE TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติก และผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำและการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

Selection of probiotic and lactic acid bacteria producing low biogenic amine and their application as starter culture in Mu Som

นักศึกษา นายจิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์

รหัสประจำตัว 57604035

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.คมแข	พิลาสมบัติ	
ผศ.ดร.ศศิธร	นาคทอง	
ผศ.ดร.ผุสดี	ตังวัชรินทร์	
ผศ.ดร.ศุภลักษณ์	สรภักดี	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 31 พฤษภาคม 2560

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร 1 (ชั้น 1 ตึกบุนนาค)

คณบดีรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ ๑๔ เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกและผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำและการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม
นักศึกษา	นายจิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์
รหัสประจำตัว	57604035
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมักพบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษและมีโอกาสในการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนจากวัตถุดิบเนื้อสัตว์ ซึ่งการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อในกระบวนการผลิตจะส่งเสริมให้อาหารที่ได้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคยิ่งขึ้น โดยงานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกและผลิตไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตหมูส้ม โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ 325 ไอโซเลทจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 42 ตัวอย่าง ซึ่งมีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 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 จากนั้นเมื่อทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในแบบจำลองหมูส้ม พบว่าไอโซเลท KL1012C2 และกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 สามารถเจริญในแบบจำลองหมูส้มได้มากกว่า และทำให้ค่า pH ลดลงเร็วกว่าไอโซเลท KL1011C2 และ KL60121B1 ($P<0.05$)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Selection of probiotic and lactic acid bacteria producing low biogenic amine and their application as starter culture in Mu Som
Student	Mr. Jiraroj Nithisantawakhupt
Student ID	57604035
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2017
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Pusadee Tangwacharin
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Supaluk Sorapukdee

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 selection of lactic acid bacteria (LAB) in 42 fermented meat products was able to isolate 325 isolates of LAB, 26 isolates of lactic bacteria 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 ($P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ($pH \leq 4.6$), 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ดีโดยได้รับความกรุณาจากท่าน ผศ.ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ต่างๆ ที่ทุกท่านกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอย่างยิ่ง จึงก่อเกิดเป้าหมายที่วางไว้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใน ความอนุเคราะห์จากท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

อีกทั้งขอขอบคุณ ผศ. ดร. คมแข พิลาสมบัติ และ ผศ. ดร. ศศิธร นาคทอง กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนงบประมาณเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ที่ได้ให้งบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณณหทัย วิจิตโรทัย และคุณจรรยา คงฤทธิ์ นักวิทยาศาสตร์สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ที่คอยให้คำชี้แนะ ความช่วยเหลือต่างๆ และถ่ายทอดความรู้เรื่องการใช้เครื่องมือ High performance Liquid Chromatography (HPLC) อีกทั้งขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ นักวิทยาศาสตร์สาขาประมง และคุณสุภาพรรณ ศฤงฆาร นักวิทยาศาสตร์สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการช่วยเหลือและให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณคุณอังคณา ทุมดี และคุณเฉลิมชัย ทิพยัค ที่ให้ความช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา และรวมถึงการสนับสนุนทางด้านต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณงามความดีที่เกิดจากการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ครูอาจารย์ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน และประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบให้แด่ผู้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคต

นายจิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง IX

สารบัญภาพ XI

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มา 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

1.3 สถานที่ดำเนินการ 2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา 3

1.5 ระยะเวลาของการศึกษา 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แบคทีเรียแลคติก 4

2.1.1 ลักษณะของกระบวนการหมัก 4

2.1.2 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 5

2.2 โปรไบโอติก 6

2.2.1 ประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรไบโอติก 6

2.2.2 โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 7

2.2.3 การคัดเลือกโปรไบโอติกจากอาหารหมัก 8

2.3 ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine : BAs) 20

2.3.1 กลไกการสร้างและชนิดของไบโอเจนิกเอมีน 20

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนใน ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 22

2.3.3 ไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 23

2.3.4 พิษของไบโอเจนิกเอมีน 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

2.4 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....27
2.4.1 คุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....28
2.4.2 ความสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสัตว์และผลิตภัณฑ์.....29
2.4.3 การผลิตกรดในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....29
2.4.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....34
2.4.5 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส.....35
2.5 ผลิตภัณฑ์หมูส้ม.....36
2.6 มาตรฐานผลิตภัณฑ์หมูส้ม.....37
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....38
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....38
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....39
3.3 วิธีการทดลอง.....44
3.3.1 การทดลองที่ 1 สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก.....44
3.3.2 การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกในระดับต่ำ.....49
3.3.3 การทดลองที่ 3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพฯ.....49
3.3.4 การทดลองที่ 4 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม.....51
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....57
4.1 การทดลองที่ 1 สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก.....57
4.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....57
4.1.2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก.....59
4.1.3 ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ.....62
4.1.4 การทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก.....64
4.2 การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ.....70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น. 70
4.3 การทดลองที่ 3 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก 71
4.3.1 การบ่งชี้สายพันธ์โดยใช้16S rRNA gene ลักษณะทางอณูวิทยาด้วย partial 16S DNA sequence analysis 71
4.4 การทดลองที่ 4 การประยุกต์แบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม 73
4.4.1 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม 73
4.4.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ..74
4.4.3 ด้านคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 78
4.4.4 ผลของการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 83
4.4.5 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 92
4.4.6 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory) 97
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 99
5.1 สรุปผลการทดลอง 99
5.2 ข้อเสนอแนะ 100

บรรณานุกรม 101
ภาคผนวก 118
ภาคผนวก ก 119
ภาคผนวก ข 128
ภาคผนวก ค 132
ภาคผนวก ง 134
ภาคผนวก จ 146
ภาคผนวก ฉ 151
ภาคผนวก ช 153
ประวัติผู้วิจัย 158

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ 10

2.2 การเจริญของ *L. fermentum* จำนวน 35 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ค่า pH 3.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง 11

2.3 อัตราการรอดชีวิตของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ ในน้ำย่อยจำลองที่ pH 2.5 12

2.4 ความทนต่อเกลือน้ำดี *L. fermentum* วัดเป็นเวลาล่าช้าจากความเข้มข้น 0.3% ของเชื้อจำนวน 11 สายพันธุ์ 15

2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) 16

2.6 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลอง 19

2.7 ไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น.....21

2.8 ไบโอเจนิกเอมีนในอาหารและผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย 26

2.9 Texture profile analysis (TPA) ของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก 36

4.1 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักวางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร 57

4.2 ไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร.....58

4.3 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร.....59

4.4 ความสามารถในยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร 60

4.5 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคระบบทางเดินอาหาร...61

4.6 ความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH ต่างๆ 62

4.7 เปอร์เซ็นต์การรอดของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ 63

4.8 การจำแนกแบคทีเรียแลคติกระดับจีนัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร.....65

4.9 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วย broth microdilution method 66

4.10 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ partial 16S rDNA 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.11 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน total coliform, fecal coliform และ *E.coli* (MPN/g) ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก 79

4.12 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH $\leq$ 4.6) 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดินอาหารเทียม และในลำไส้เทียม (pH 8) 13

2.2 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* F6 ในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.0 (T1) และลำไส้เทียม pH 8.0 (T2) ความทนทานต่อการน้ำในลำไส้จำลอง (pH 8.0) 14

2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน 21

2.4 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 25

2.5 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และการลดลงของค่า pH ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน โดย ก) ไม่เติมกล้าเชื้อ ข) เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* และ ค) เติมกล้าเชื้อ *Staphylococcus* 30

2.6 การศึกษาทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติกที่เติมกล้าเชื้อ *L. casei* ATCC 393 31

2.7 ผลของการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 และ free *L. casei* ATCC 393 ต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มสุกของไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติก 32

2.8 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ค่า pH และกรดอินทรีย์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก โดยแถบแสดงค่าความแปรปรวน (n = 3) 33

2.9 SDS–PAGE pattern ของการแยกโปรตีนจากแหนมที่หมักเป็นเวลาที่ 0 และ72 ชั่วโมง 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 34

2.10 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการบ่มสุก (14 วัน) ...35

2.11 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (40 วัน) 35

4.1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในระบบทางเดินอาหารจำลอง 69

4.2 การสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมกรดอะมิโน 70

4.3 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 1492R ในการทำ PCR 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	การเจริญของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ไอโซเลท KL1011C2 KL1012C2 และ KL60121B1 ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ	73
4.5	ค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ไอโซเลท KL1011C2 KL1012C2 และ KL60121B1 ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ	74
4.6	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจพบในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม	75
4.7	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6)	76
4.8	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6)	77
4.9	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนยีสต์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก	81
4.10	ผลการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวน *S. aureus* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก	82
4.11	รูปแบบของโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของผลิตภัณฑ์หมูส้มหมักตามธรรมชาติ (ก.) หมักโดยกล้าเชื้อ *L. plantarum* TISTR 544 (ข.) หมักโดยกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (ค.) ในวันที่ 0 (D0), วันที่ 1 (D1), วันที่ 2 (D2), วันที่ 3 (D3), วันที่ 5 (D5) และวันที่ 7 (D7) ของกระบวนการหมัก	85
4.12	ปริมาณสารประกอบไบโอเจนิกในเนื้อหมูสดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	86
4.13	ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ หมูส้มกลุ่มควบคุม หมูส้มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และหมูส้มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน ของกระบวนการหมัก	88
4.14	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์หมูส้ม	93
4.15	ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.16 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ ด้านสี ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่นเปรี้ยว ด้านกลิ่นและรสชาติ ด้านเนื้อสัมผัส และด้านคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH $\leq$ 4.6).....96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ในปัจจุบันสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคถือเป็นสิ่งสำคัญ จึงนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ส่งเสริมสุขภาพและโภชนาการอาหาร หรืออาหารฟังก์ชัน (functional food) ซึ่งการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักสามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพ รักษาโรคทางเดินอาหาร ลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ตลอดจนสามารถผลิตวิตามินต่างๆ เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 และวิตามินบี 12 เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกมีประสิทธิภาพตรงความต้องการของผู้บริโภค แบคทีเรียโปรไบโอติกจึงต้องมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษและเจริญได้ดีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสามารถรอดชีวิตได้ในระบบทางเดินอาหาร เพื่อรอดชีวิตไปถึงอวัยวะเป้าหมายคือ ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่

อย่างไรก็ตาม สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยอาจก่อให้เกิดอาการไมเกรน ปวดศีรษะและความดันโลหิตสูง (Joosten. 1988) โดยเกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนอิสระในเนื้อหมัก (Kung *et al.* 2007) โดยเฉพาะ putrescine และ cadaverine เป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท์เกิดสารไนโตรซามีน ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (Silla-Santos. 1996) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของโปรไบโอติกและลักษณะของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนจึงเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพทางเคมีของอาหารที่บ่งชี้ถึงคุณภาพเนื้อที่มีกระบวนการการจัดการและการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้อง (Hernandez-Jover *et al.* 1996)

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมักพบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยแหนมที่มีค่า pH มากกว่า 4.6 มักพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *Listeria monocytogenes* (Paukatong *et al.* 1999) ทั้งนี้การเติมกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักสามารถลดการปนเปื้อนของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ (Petchsing and Woodburn. 1990) อีกทั้งการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ทางการค้า *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 ในแหนมหมูสามารถลดการสะสมสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ (Tosukhowong *et al.* 2011) ผลิตภัณฑ์แหนมหมูจัดเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีความพิเศษของเนื้อสัมผัส และกลิ่นรส อีกทั้งมีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น โดยผลิตจากเนื้อหมูบดละเอียด หนังหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่นๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก อาจมีการห่อทับด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบตอง และเกิดกระบวนการหมักขึ้นตามธรรมชาติ (Visessaguan *et al.* 2006b) โดยสามารถบริโภคได้โดยการผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน โดยผลิตภัณฑ์หมูส้มมีความใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์แหนมหมู จึงมีโอกาสในการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ และการผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ และเนื่องจากยังไม่มีการรายงานถึงการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกผลิตภัณฑ์หมูส้ม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดแยกและคัดเลือกกล้าเชื้อที่มีสมบัติโปรไบโอติกและผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ และนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อที่ปลอดภัยในผลิตภัณฑ์หมูส้ม เพื่อเร่งกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์ และเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภค

1.2 ความมุ่งหมาย และวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ

1.2.3 เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

1.2.4 เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้น และการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.4 ห้องปฏิบัติการเครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

1.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนระดับต่ำ

1.4.3 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก

1.4.4 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

1.5 ระยะเวลาการศึกษา

ใช้เวลาในการศึกษาทั้งสิ้น 2 ปี 6 เดือน เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 เสร็จสิ้นการศึกษาเดือนเมษายน พ.ศ. 2560

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ปลอดภัยและผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ เพื่อประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อต่อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและอาหารหมักต่างๆ

1.6.2 สามารถตีพิมพ์ และเผยแพร่งานวิจัยในระดับชาติ ได้แก่ งานประชุมวิชาการ 2nd International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015) และวารสารเกษตรพระจอมเกล้า และในระดับนานาชาติ ได้แก่ งานประชุมวิชาการ 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress (AAAP2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก และจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาว ท่อนสั้น หรือกลม หรือเกาะกันเป็นสายยาว รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพนโตส ได้ดี ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus brevis* และ *L. buchneri*

2.1.2 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ระดับ และชนิดของกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะในการเจริญ ซึ่งกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์กลุ่มหลักของกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก (Lindgren and Dobrogosz. 1990) การยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์แพร่เข้าไปในไซโทพลาซึม ทำให้พีเอชในไซโทพลาซึมลดลง และมีสภาพเป็นกรด ส่งผลทำให้การทำงานของเซลล์หยุดลงเนื่องจากพีเอชไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Podolak *et al.* 1996)

แบคทีเรียแลคติกผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยเอนไซม์ flavoprotein oxidase หรือ nicotinamide adenine dinuclcotide (NADH) peroxidase ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยา oxidation ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้รูที่เยื่อหุ้มเซลล์ขยายใหญ่ขึ้น จึงเกิดการสูญเสียความสามารถในการย่อยให้สารผ่านเข้าออก (Kong and Davison. 1980)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Ammor *et al.* 2006) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ ในปัจจุบันการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เช่น Belgacem *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียแลคติกจาก Gueddid ซึ่งเป็นเนื้อหมักของประเทศตูนีเซีย พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ MMZ 04, 09, 13 และ 17 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าทั้งหมดเป็น *Enterococcus faecium* และแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C 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 พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้สายพันธุ์ 31-1 เมื่อนำมาเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่า เป็น *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

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย 22 ชนิด จำนวน 179 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 327 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าว 67 สายพันธุ์ เมื่อนำทั้ง 67 สายพันธุ์ 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 *L. plantarum*

2.2 โปรไบโอติก

โปรไบโอติก คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปริมาณที่เพียงพอโดยส่งผลประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) (FAO/WHO. 2001)

2.2.1 ประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากมายหลายชนิดทั้งที่เป็นประโยชน์ และโทษ ดังนั้นหากจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีจำนวนมากขึ้นก็สามารถเกาะติดผนังลำไส้และแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคมาเกาะติดผนังลำไส้ และหลั่งสารพิษที่มีผลทำให้เยื่อบุลำไส้อักเสบ จากสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการนำเอาโปรไบโอติกมาใช้ในการรักษา และป้องกันโรคอุจจาระร่วงที่เกิดจากการได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่ดีต่อสุขภาพในลำไส้ลดลง โดยประโยชน์ของโปรไบโอติกมีหลายประการในที่นี้ขอกล่าวเป็น 4 ข้อหลักดังนี้ (สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549)

2.2.1.1 การลดภาวะไม่ทนต่อแลกโตส (lactose intolerance) เป็นผลต่อสุขภาพที่สำคัญของโปรไบโอติก พบว่า ประชากรโลกส่วนใหญ่มีปริมาณของเอนไซม์แลกเตส (lactase) ต่ำ จึงทำให้แลกโตส (lactose) ไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร ดังนั้นหลายคนที่ดื่มนมแล้ว เกิดอาการท้องอืด เฟ้อ ท้องเดิน ปวดท้อง โปรไบโอติกในอาหารประเภทนมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ตสามารถช่วยบรรเทาอาการนี้ได้ เนื่องจากโปรไบโอติกได้ช่วยย่อยแลกโตสไปแล้วในระหว่างการหมัก (fermentation) จึงทำให้มีแลกโตสเหลือในปริมาณต่ำหรือไม่พบ

2.2.1.2 การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด หลักฐานการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ยังไม่สรุปแน่ชัด แต่มีผู้เสนอกลไกที่อาจเป็นไปได้ คือ อาจเนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรด เกลือน้ำดี ดังนั้นการเพิ่มการขับออกของเกลือน้ำดีจะส่งผลให้มีการกระตุ้นให้มีการนำเอาคอเลสเตอรอลออกมาใช้ในการสังเคราะห์เกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น โดยในจุลินทรีย์จะมีเอนไซม์ที่สามารถจับกับกรด เกลือน้ำดี และทำให้กรด เกลือน้ำดีถูกขับออกทางอุจจาระเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ นอกจากนี้อาจเนื่องจากการที่จุลินทรีย์สามารถนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรง ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง

2.2.1.3 การบรรเทาอาการท้องเดิน จัดเป็นบทบาทที่สำคัญของโปรไบโอติก โดย ช่วยลดความรุนแรงของอาการท้องเดิน ลดระยะเวลาของการเกิดโรค และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน กลไกที่เป็นไปได้ ทำให้ลำไส้ใหญ่มีความเป็นกรด โดยการผลิตกรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งช่วยการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้น

2.2.1.4 การป้องกันมะเร็ง ข้อมูลทางระบาดวิทยา พบว่า อุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารไขมันสูง ซึ่งไขมันในอาหารจะกระตุ้นให้มีการหลั่งกรด เกลือน้ำดีในลำไส้ใหญ่มากขึ้น ร่วมกับกรดเกลือน้ำดีอีกส่วนหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียเอง ซึ่งทำให้มีส่วนส่งเสริมให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ นอกจากนี้เอนไซม์ของแบคทีเรียบางชนิดก็จะเปลี่ยนสารบางอย่างในลำไส้ใหญ่ไปเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นกลไกในการต้านมะเร็งของโปรไบโอติก ได้แก่ กดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ควบคุม หรือเหนี่ยวรั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ในการทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการเคลื่อนไหว หรือการบีบตัวของลำไส้ ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic) ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

2.2.2 โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารสามารถส่งเสริมคุณค่าทางโภชนาการ และก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งเนื้อสัตว์จัดเป็นแหล่งที่มีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรไบโอติก ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Leroy *et al.* 2006) ทั้งนี้จุลินทรีย์โปรไบโอติกมีความสามารถในการอยู่รอดในที่เย็น ซึ่ง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนมากมีวิธีการเก็บรักษาโดยการหมักแห้ง โดยผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ซึ่งผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักสามารถช่วยให้ *Lactobacilli* สามารถเจริญได้ (Ammor and Mayo. 2007 ; Arihara 2006)

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักได้มีการพัฒนาการใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์โปรไบโอติกในกระบวนการผลิต เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพและมีกระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดย Hammes and Hertel (1998) ได้รายงานถึงสายพันธุ์โปรไบโอติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกประกอบด้วยไอโซเลทที่คัดแยกจากลำไส้ ได้แก่ Lactobacilli และ Bifidobacteria สำหรับสายพันธุ์โปรไบโอติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อต้องมีความสามารถในการเจริญและให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ดี นอกจากนี้สายพันธุ์ของกล้าเชื้อโปรไบโอติกที่ใช้ต้องให้กระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพ เช่น ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ลดลงต่ำกว่า 5 ทั้งนี้อุณหภูมิของการหมักยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อ (De Vuyst *et al.* 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประยุกต์ใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์โปรไบโอติก *Lactobacillus gasseri* JCM1131 ในกระบวนการผลิตเนื้อหมัก สามารถเพิ่มคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ (Arihara *et al.* 1998) อีกทั้งสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120 และ *L. paracasei* subsp. paracasei FERM P-15121 เป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพในการผลิตไส้กรอกหมัก (Sameshima *et al.* 1998) โปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. casei* LC-01 หรือ *Bifidobacterium lactis* Bb-12 จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตไส้กรอกหมัก (Hammes and Hertel. 1998) ในขณะที่ *L. plantarum* และ *L. casei* จัดเป็นสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักที่สุด การใช้เป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไส้กรอกหมัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและความปลอดภัย (De Vuyst *et al.* 2008) ดังนั้นการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อจึงช่วยเสริมประสิทธิภาพในการผลิตที่ดี อีกทั้งเพิ่มความปลอดภัย รสชาติ และประโยชน์ต่อสุขภาพเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม (Ammor and Mayo. 2007)

2.2.3 การคัดเลือกโปรไบโอติกจากอาหารหมัก

โปรไบโอติก จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อใช้ในปริมาณที่เพียงพอมีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (Joint FAO/WHO. 2002) โปรไบโอติกได้กลายเป็นหัวข้อหลักของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (LAB) ในการวิจัยที่ผ่านมา 10 ปี ซึ่งรวมถึง *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มีการใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าของสายพันธุ์ที่แยกได้จากธรรมชาติดั้งเดิมที่ได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีผลต่อการส่งเสริมสุขภาพและโภชนาการอาหาร โดยแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกต้องมีคุณสมบัติดังนี้

2.2.3.1 การผลิตกรดแลคติก

จัดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของ *Lactobacillus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีการผลิตกรดแลคติก ซึ่งการสร้างกรดเป็นผลดีต่อความปลอดภัยและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ เช่น ในกรณีของไส้กรอกหมักที่มี pH ต่ำ ส่งผลให้ myofibrilar protein เกิดการตกตะกอน จึงเพิ่มค่า firmness และ cohesiveness ของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งการลด pH อย่างรวดเร็วในระหว่างกระบวนการหมักสามารถช่วยป้องกันการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Ammor and Mayo. 2007)

2.2.3.2 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

Lactobacilli สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียที่หลากหลายได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนั้นยังผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งโปรตีน เช่น bacteriocins ซึ่งจัดเป็นเปปไทด์มวลโมเลกุลต่ำ โดยมีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย และเชื้อรา อีกทั้งสารประกอบอื่น ๆ เช่น reuterin และ reutericyclin (Lefteris *et al.* 2006) ซึ่งจัดเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญของสมบัติโปรไบโอติก จากการวิจัยมุ่งเน้นไปที่การผลิตสารต้านจุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีพ (Servin. 2004) แบคทีเรียแลคติกที่นิยมส่วนใหญ่คือ *L. plantarum* หรือ *L. reuteri* (Delgado *et al.* 2007; Gänzle *et al.* 2000)

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2550) ทำการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทยสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 225 ไอโซเลท จากอาหารหมักจำนวน 152 ตัวอย่าง โดย 40 ไอโซเลท มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 40 สายพันธุ์มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบ 16 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S.* Typhimurium, *S.* Typhi, *S.* Enteritidis, *S.* Paratyphi และ *E. coli* O157:H7 ได้โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร และมีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดี เมื่อนำทั้ง 5 สายพันธุ์มาทดสอบกับยาปฏิชีวนะ พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท ไวต่อยา ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin, tetracycline และ vancomycin แต่ทนต่อยา ceftazidime และ norfloxacin เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* LL13, LN18, LP11, LS35 และ *Pediococcus pentosaceus* LT02

จากตารางที่ 2.1 แสดงกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่า F6 สามารถยับยั้งแกรมบวก (*L. monocytogenes* C53-3, *S. aureus* AC1.2465) และแกรมลบ (*E. coli* O157 882364, *S. flexneri* CMCC (B) 51592, *S.* Typhimurium S50333) โดย *L. fermentum* ทนต่อกรดสูง และมีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ โดยการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการต้านจุลชีพ และ IMAU60092 แสดงความสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ในระดับที่น้อยกว่า F6 ในขณะที่ IMAU60145 มีการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* สายพันธุ์อื่น ๆ ได้รับการที่ทดสอบ แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ เฉพาะสายพันธุ์ที่มีศักยภาพต้านเชื้อแบคทีเรียกับเชื้อที่ทดสอบ ตามธรรมชาติผลิตภัณฑ์นมหมักมักจะมีปลอดภัยเนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ และการผลิตสารต้านจุลชีพจากสิ่งมีชีวิตในอาหารหมัก (Svanberg *et al.* 1992) ผลของ *Lactobacillus* ในการควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในธรรมชาติที่ผลิตภัณฑ์นมหมักแบบดั้งเดิม (Batdorj *et al.* 2007 ; Heping *et al.* 2008 ; Mathara *et al.* 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของ *L. fermentum* จำนวน 11 สายพันธุ์

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

-: $\leq$ 0 mm; ±: 0-4 mm; +: 4-8 mm; + +: 8-12 mm; + + +: > 2 mm.

บริเวณการยับยั้งแบคทีเรีย = การกระจายเส้นผ่านศูนย์กลาง - เส้นผ่านศูนย์กลางพีเอชควบคุม

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

2.2.3.3 การผลิตสารแบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

แบคเทอริโอซินจัดเป็นเปบไทด์หรือโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยเข้าทำลายการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะ *Listeria monocytogenes* จึงใช้พิจารณาถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์โดยคำนึงถึงผู้บริโภค กลุ่มแบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มที่ผลิตแบคเทอริโอซินในเนื้อ ได้แก่ *L. sakei, L. curvatus, L. plantarum, L. brevis* และ *L. casei* (Leroy *et al.* 2006)

2.2.3.4 การทนต่อสภาวะความเป็นกรดด่างที่ต่ำ

การทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี จัดเป็นสมบัติที่แสดงถึงความสามารถในการอยู่รอดถึงระบบทางเดินอาหารซึ่งต้องสัมผัสกับน้ำย่อยที่มีความเป็นกรดจากกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีจากลำไส้เล็กตอนต้น ซึ่งการอยู่รอดของโปรไบโอติกในน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารขึ้นอยู่กับความสามารถในการทนกรด ซึ่ง Bao *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 90 สายพันธุ์ในแบบจำลองกระเพาะและลำไส้จำลอง พบว่า *L. fermentum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถมีเจริญที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3 (ตารางที่ 2.2) ซึ่ง *L. fermentum* จำนวน 35 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดี ($\Delta A_{600\ nm} \geq 0.500$) ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 3.0 โดยคิดเป็นร้อยละ 38.9 ของทั้งหมด

ตารางที่ 2.2 การเจริญของ *L. fermentum* จำนวน 35 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ค่า pH 3.0 เป็น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$	สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$	สายพันธุ์	$\Delta A_{600\ nm}$
F6	1.849 ± 0.003	IMAU60167	0.766 ± 0.030	IMAU60121	0.611 ± 0.029
IMAU60070	1.173 ± 0.044	IMAU60120	0.759 ± 0.035	IMAU20090	0.593 ± 0.033
IMAU60145	1.165 ± 0.017	IMAU60092	0.747 ± 0.019	IMAU20087	0.586 ± 0.035
IMAU60102	1.001 ± 0.011	IMAU60125	0.744 ± 0.020	IMAU20084	0.581 ± 0.023
IMAU60080	0.925 ± 0.037	IMAU20080	0.738 ± 0.037	IMAU20055	0.580 ± 0.018
IMAU60086	0.925 ± 0.034	IMAU60149	0.732 ± 0.036	IMAU20044	0.579 ± 0.004
IMAU60154	0.860 ± 0.031	IMAU60083	0.730 ± 0.033	IMAU20059	0.575 ± 0.012
IMAU60168	0.825 ± 0.025	IMAU20081	0.717 ± 0.018	IMAU60075	0.559 ± 0.024
IMAU60071	0.825 ± 0.013	IMAU60142	0.702 ± 0.017	IMAU60093	0.548 ± 0.007
IMAU60150	0.800 ± 0.024	IMAU60144	0.700 ± 0.029	IMAU60151	0.543 ± 0.028
IMAU60146	0.785 ± 0.041	IMAU60113	0.670 ± 0.027	IMAU60152	0.521 ± 0.031
IMAU20083	0.779 ± 0.023	IMAU60115	0.629 ± 0.009		

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

Jacobsen *et al.* (1999) พบว่า เชื้อ *L. fermentum* สามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ก่อนที่จะถึงส่วนปลายของระบบลำไส้ ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกเหล่านี้ต้องรอดชีวิตในช่วงที่ผ่านกระเพาะอาหาร และส่วนบนของระบบลำไส้ โดยมีค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหารของมนุษย์ที่ 1.5 ถึง 4.5 ในช่วงการย่อยและการดูดซึมอาหารโดยใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง อีกทั้ง Foligne *et al.* (2007) ได้ประเมินตรวจสอบจำนวนของ *L. fermentum* ซึ่งสามารถเจริญต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า จึงแสดงให้เห็นว่า *L. fermentum* ACA-DC 179 สามารถรอดชีวิตที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ 2.5 ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนั้น *L. fermentum* AD1 ยังมีความสามารถในการอยู่รอดในสารละลาย 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 ถึงร้อยละ 99.9 ในเวลา 1 ชั่วโมง ร้อยละ 94.7 ในเวลา 2 ชั่วโมง และร้อยละ 86.8 ในเวลา 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 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

[abcdefgh] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

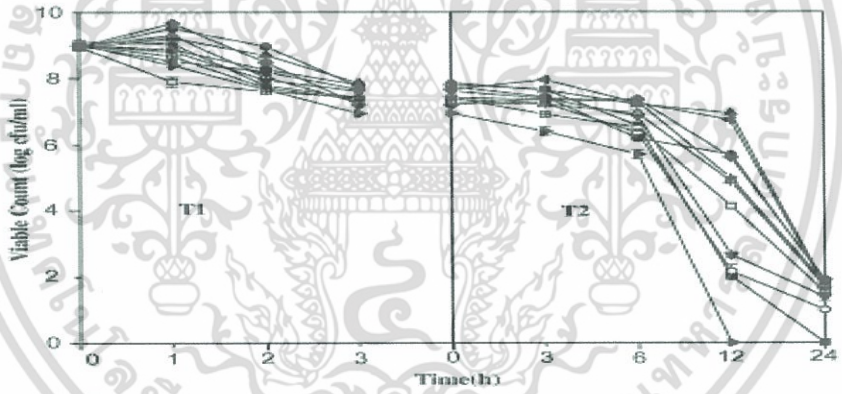
2.2.2.5 การทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี

เกลือน้ำดีมีผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์โดยทำให้มีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ ส่งผลให้เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Margolles *et al.* 2003) โดยองค์ประกอบบางส่วนของอาหารสามารถปกป้อง และส่งเสริมความต้านทานของสายพันธุ์ในเกลือน้ำดีได้ (Gänzle *et al.* 1999 ; Du Toit *et al.* 1998) ทั้งนี้เกลือน้ำดีมีความสำคัญในการป้องกันกลไกการย่อยของลำไส้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ เนื่องจากเกลือน้ำดีเข้าทำลายชั้น lipid layer และกรดไขมันภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ โดย *Lactobacillus* สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ โดยสามารถ hydrolyze เกลือน้ำดีส่งผลให้เกลือน้ำดีออกฤทธิ์ได้ลดลง ซึ่งแบคทีเรียมีชีวิตมีจำนวนลดลงจาก 10^6 – 10^7 cfu/ml เหลือ 10^5 cfu/ml ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง (Papamanoli *et al.* 2003) ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงจัดเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกสามารถรอดชีวิต และเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในระบบทางเดินอาหาร ทั้งนี้สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและย่อยอาหารในน้ำดีปกติได้จึงสามารถรอดชีวิตได้ในระหว่างการเคลื่อนย้ายในระบบทางเดินอาหาร (Sanders *et al.* 1996)

ผลของน้ำย่อยจำลอง และการรอดชีวิตของ *L. fermentum* ในลำไส้ ดังตารางที่ 2.2 และภาพที่ 2.1 ใน 35 สายพันธุ์ และอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% เป็นมาตรฐาน 11 สายพันธุ์ (6 สายพันธุ์จากทิเบต 4 จากมองโกเลีย และ 1 จากภายในมองโกเลีย) มีความทนต่อน้ำย่อยจำลองสูง (pH 2.5 บ่ม 3 ชั่งโมง) โดยสัดส่วนของสายพันธุ์ทั้งหมด 12.2% แม้ว่าสายพันธุ์ทดสอบส่วนใหญ่จะเติบโตในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด สามารถเจริญในน้ำย่อยเทียมที่ pH 2.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.1) บ่ม 90 สายพันธุ์ในน้ำย่อยจำลอง (pH 2.0) พบว่า F6 แยกได้จากผลิตภัณฑ์นมแบบดั้งเดิมในเขตมองโกเลีย แสดงความทนกรดค่อนข้างดี และสามารถรอดชีวิตได้ (อัตราการรอดชีวิต 53.7%) (ภาพที่ 2.2) และบ่มในลำไส้จำลอง 12 ชั่วโมง ไม่ได้ส่งผลต่อศักยภาพอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2.2) สายพันธุ์ F6 แสดงความต้านทานที่สูงขึ้นเมื่อน้ำย่อยเป็นกรด ต่อจากนั้นอัตราการรอดชีวิตที่มีความสำเร็จทนน้ำย่อยจำลอง 33.5% ที่ pH 8.0 ในเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 2.2) แสดงว่าความทนสูงกระตุ้นน้ำย่อยได้ดี



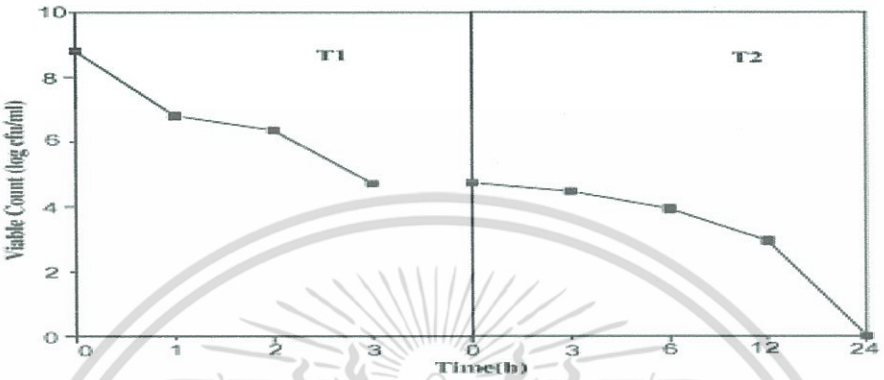
ภาพที่ 2.1 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ pH 2.5 ในระบบทางเดินอาหารเทียมและในลำไส้เทียม (pH 8) โดย T1 คือน้ำย่อยจำลอง (pH 2.5) T2 คือลำไส้เทียม (pH 8.0) ของเชื้อ (■) IMAU60083 F6(▲) IMAU60092 (▼) IMAU60151 (○) IMA-U60071 (◀) IMAU60120 (▶) IMAU60145 (□) IMAU20044 (★) IMAU20081 (◆) IMAU20084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

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

เมื่อพิจารณาทั้งหมดนี้ *L. fermentum* F6 จะดีกว่าโปรไบโอติกในเชิงการค้าในด้านการทนกรด โดยสายพันธุ์ของ *L. fermentum* เจริญได้ดีใน oxgall ที่ 0.3% ความทนต่อน้ำดีของสายพันธุ์นี้ช้าตามเวลาที่ระบุในตารางที่ 4 ในทางเดียวกัน สายพันธุ์ที่ทนต่อความเข้มข้นที่แตกต่างกันของเกลือน้ำดีแสดงในตารางที่ 5 ผลที่ได้วิเคราะห์โดยข้อเสนอที่ทำโดย Chateau *et al.* (1994) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดดเด่นในสี่กลุ่มนี้ตามความล่าช้าของการเจริญที่กระตุ้นโดย oxgall สายพันธุ์ที่ทนทาน (ความล่าช้าของการเจริญ $d \leq 15$ นาที) สายพันธุ์ที่ทน ($15 < d \leq 40$ นาที) สายพันธุ์ที่ช้า ($40 < d \leq 60$ นาที) และสายพันธุ์ที่เร็ว ($d > 60$ นาที) เวลาที่จำเป็นสำหรับ 0.3 หน่วย เพิ่มขึ้นในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร สำหรับ F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth 2.33 ชั่วโมง



ภาพที่ 2.2 จำนวนเชื้อ *L. fermentum* F6 ในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.0 (T1) และลำไส้เทียม pH 8.0 (T2) ความทนทานต่อการน้ำในลำไส้จำลอง (pH 8.0)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

ในทางตรงกันข้ามเวลาที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มขึ้น 0.3 หน่วย ในการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรโดย F6 เพาะเลี้ยงใน MRS-THIO broth ที่มีเกลือน้ำดี 2.99 ชั่วโมง ดังนั้น ความล่าช้าของการเจริญ สำหรับ F6 เป็น 0.66 ชั่วโมง ซึ่งจะได้รับการตัดสินเป็นสายพันธุ์ที่ทน (ตารางที่ 2.3) นอกจากนี้ระดับสูงสุดของ F6 เมื่อเกลือน้ำดีเป็น 1.8% (ตารางที่ 2.4) ความล่าช้าของการเจริญ สำหรับ IMAU60145, IMAU60071 และ IMAU20084 เป็น 0.86, 0.95 และ 0.96 ชั่วโมง ตามลำดับ และเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ค่อยทน (ตารางที่ 2.3) นอกจากนี้ระดับความทนสูงสุดของ IMAU60092, IMAU60071, IMAU60145 และ IMAU20084 ในเกลือน้ำดีเป็น 1.8% (ตารางที่ 2.4) การศึกษาก่อนหน้าเมื่อระดับความทนต่อน้ำดีของ *L. fermentum* ที่ระดับต่างๆ ความทนสูงสุดของ *L. fermentum* ACA-DC 179 เกลือน้ำดีเป็น 2% (Zoumpopoulou *et al.* 2007) สายพันธุ์ *L. fermentum* ADI สามารถเจริญได้ในน้ำดี 1% และยังคงทำงานได้ถึง 75.4% หลังจากบ่มที่ 24 ชั่วโมง (Strompfová *et al.* 2006) *L. fermentum* SGM3 ซึ่งคัดแยกจากไก่มีความสามารถในการทนเกลือน้ำดีทีเข้มข้น 0.3% ถึง 100 % ในขณะที่ *L. fermentum* PG3 และ PGM3 ซึ่งคัดแยกเชื้อจากสัตว์ปีก พบว่าไม่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (Lin *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 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, b, c, d] อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: Bao *et al.* (2010)

นอกจากนี้ Noriega *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือน้ำดีต่อความสามารถในการอยู่รอดและลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่แตกต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้มีค่าไม่คงโดยอยู่ในช่วงร้อยละ 1.5 ถึงร้อยละ 2 (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณร้อยละ 0.3 (w/v) จึงแสดงถึงการต่อต้านเกลือน้ำดีจากไอโซเลทที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของไฮโดรเลสเกลือน้ำดี ซึ่งสามารถย่อยสลายเกลือน้ำดีทั้งหมด และทำให้ลดผลที่เป็นพิษ และผลข้างเคียงของเกลือน้ำดี อีกทั้ง Nueno-Palop *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 70 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรียแลคติกมากกว่า 50 % สามารถรอดชีวิตได้ที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดีที่ 0.3% โดยสามารถรอดชีวิตในเกลือน้ำดีได้จำนวน 22 สายพันธุ์ และมีเพียง 7 สายพันธุ์ที่รอดชีวิตได้มากกว่า 80% (ตารางที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (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
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

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
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
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

ที่มา: Nueno-Palop *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148331

ตารางที่ 2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกให้มีความต้านทานเกลือน้ำดี (0.3%) (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)
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)

ตารางที่ 2.6 แสดงความอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลองพบว่า *L. casei* และ*Lactobacillus* sp. ทนต่อเกลือน้ำดีมากที่สุด โดยเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกมาทดสอบการรอดชีวิตในน้ำย่อยลำไส้เล็กจำลอง พบว่าแบคทีเรียแลคติกจำนวน 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการรอดชีวิตในลำไส้เล็กจำลองได้ คือ *L. casei, Lactobacillus* sp. และ *E. faecalisc* และแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยึดเกาะ $CaCO_2$ ได้โดยเชื้อ *E. faecalisc* สายพันธุ์ CP58 เป็นสายพันธุ์มากที่สุดกับค่าการยึดเกาะ 2.6×10^5 cfu / ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ความอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกที่ทนต่อเกลือน้ำดีในสภาพการย่อยอาหารจำลอง

รหัสสายพันธุ์	สายพันธุ์	อยู่รอดในเกลือน้ำดี (%)	ความอยู่รอดของการย่อยอาหาร (%)
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)

2.2.2.6 ความสามารถในการลดความเป็นพิษของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน

ในเนื้อสัตว์มี *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการขจัดพิษ (detoxification) ของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนโดยผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) จึงสามารถป้องกันการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้ ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการลดความเป็นพิษของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน และการป้องกันการเกิดสารเอมีนที่เกิดขึ้นใหม่โดยการลดค่าความเป็นกรดด่างได้อย่างรวดเร็วเพื่อยั้บยั้งการสร้างสารเอมีนจากจุลินทรีย์ อีกทั้งโปรไบโอติกยังต้องมีความสามารถในการรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์จำนวนมากในระหว่างการผลิต และการเก็บรักษา (Ljungh and Wadström. 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

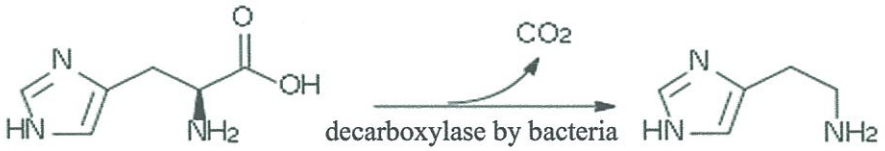
2.3 ไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amines : BAs)

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 ของกรดอะมิโนตั้งต้นหรือเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมน 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 จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ ที่เรียกว่า 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)

2.3.1 กลไกการสร้างและชนิดของไบโอเจนิกเอมีน

สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนเกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ decarboxylase โดยย่อยสลายกรดอะมิโนและดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน เช่น การเกิดสาร histamine จากกรดอะมิโน histidine (ภาพที่ 2.3) 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Histidine Histamine

ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน

ที่มา: Wikipedia (2010)

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

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

2.3.1.2 อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ได้แก่ tyramine และ phenylethylamine

2.3.1.3 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การเกิดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกิดขึ้นอาจเกิดจากปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและการสลายของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนได้แก่

2.3.2.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

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

2.3.2.2 การเกิด Redox potential ของผลิตภัณฑ์

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

2.3.2.3 อุณหภูมิและช่วงการเจริญ

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

2.3.2.4 เกลือโซเดียมคลอไรด์

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

2.3.2.5 ขนาดของผลิตภัณฑ์

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

2.3.2.6 กระบวนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ

กระบวนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะ ช่วยลดการสะสมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน โดยลดการปนเปื้อนของวัตถุดิบทุกชนิดและหน่วยการผลิต (Latorre-Moratalla *et al.* 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.7 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)

2.3.3 ไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

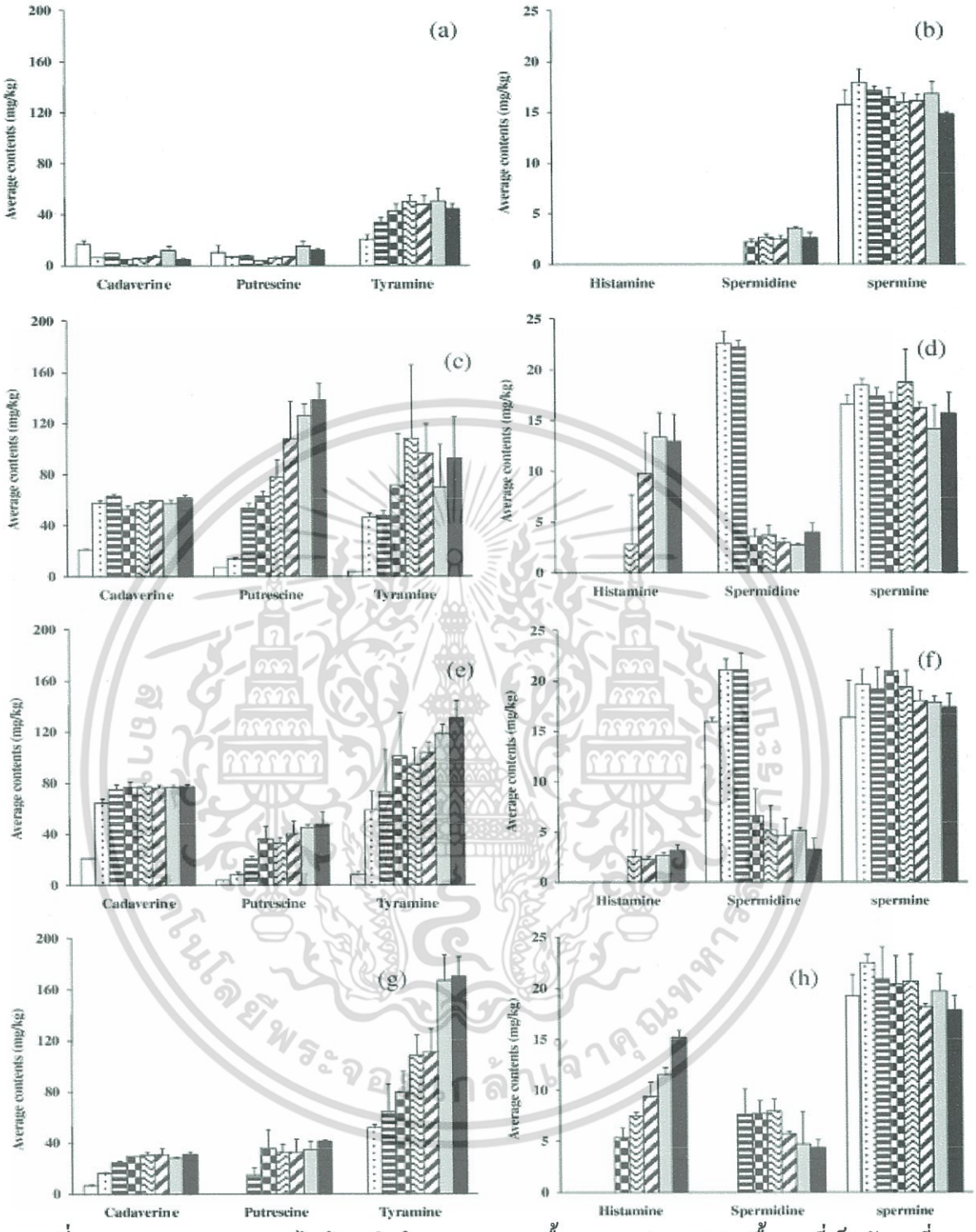
ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก สามารถพบสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในกรณีที่มีการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ ซึ่งปนเปื้อน ในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม โดยกระบวนการหมักสามารถช่วยให้เกิดสารไบโอเจนิกได้ เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ความเป็นกรด และการย่อยสลายโปรตีน ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก (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,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 4a และ b) 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 2.4c และ d) ในการสร้างสาร cadaverine ที่สูงขึ้นในระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการเริ่มต้นกระบวนการหมัก และคงที่ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการสร้าง putrescine, tyramine และ histamine ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อเริ่มต้นระดับของ spermidine เพิ่มขึ้นจากเดิมโดยไม่พบภายใน 24 ชั่วโมง และลดลงภายหลัง 2 วัน ที่มีการผลิตแหนมเนื้อหมูคุณภาพต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 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 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tyramine ปริมาณ 25 - 40 ppm ในไวน์ทำให้เกิดอาการไมเกรนและความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามี isoamylamin, putrescine และcadaverine ที่พบในไวน์สามารถทำปฏิกิริยากับ histamine ส่งผลให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น สำหรับพวก volatile aliphatic monoamines, methylamine และ ethylamine ถ้าพบในไวน์ปริมาณ 1 ppm ทำ ให้เกิดอาการแพ้ สำหรับความเป็นพิษของhistamine สามารถแบ่งระดับความเป็นพิษได้เป็น 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 ดังนั้นระดับของไบโอเจนิกเอมีนในอาหาร จึงถูกใช้เป็นดัชนีคุณภาพในการพิจารณาปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และเพื่อประเมินการจัดการการผลิตที่ดี (GMP)

2.4 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*) แบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอินทรีย์จากคาร์โบไฮเดรตส่งผลให้ค่า 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 ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายปีนี้ได้มีการศึกษาการกิจกรรมเมแทบอลิซึมและการทนต่อสภาวะเครียดของกล้าเชื้อโดยเฉพาะเชื้อ *L. sakei* ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อ *L. sakei* สามารถปรับตัวและรอดชีวิตในเนื้อสัตว์ได้ดี สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานเมื่อกลูโคสในเนื้อสัตว์ถูกใช้หมดไป และสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งเป็นการพัฒนาต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเพื่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ควรต้องมีสมบัติต่อไปนี้

2.4.1 คุณสมบัติการเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมาใช้ควรพิจารณาถึงคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (อดิศร เศวตวิวัฒน์. 2543)

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

2.4.1.2 ควบคุมการหมักและคุณภาพ รวมถึงกลิ่นรสจำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่นการเติมกล้าเชื้อ *S. carnosus* subsp. *utilis* หรือ Kocuria variance (Micrococcus varian) ในการผลิตไส้กรอกเยอรมัน (rohwurst)

2.4.1.3 ลดการสะสมของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในเนื้อสัตว์ที่ต้องใช้ไนเตรทหรือไนไตรท์เป็น curing agent จะสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วโดยส่งผลไนไตรท์ที่มีอยู่หรือรีดิวซ์จากไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนทรัสออกไซด์ อันเป็นผลทำให้มีปริมาณไนไตรท์ตกค้างลดลง

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

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

2.4.1.6 ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ทั้งนี้ อัจฉรา เพิ่ม (2550) ได้รายงานว่าคุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ดีควรมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งสามารถแข่งขันและต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหารได้ อีกทั้ง Leroy et al. (2006) กล่าวว่ากล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียจะช่วยเพิ่มรสชาติความปลอดภัย และการเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพโดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างสารให้กลิ่น (aroma compound) แบคเทอริโอซินหรือสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ช่วยพัฒนาสีของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ไม่สร้างเอมีนหรือสารประกอบที่เป็นพิษอื่นๆ เป็นต้น

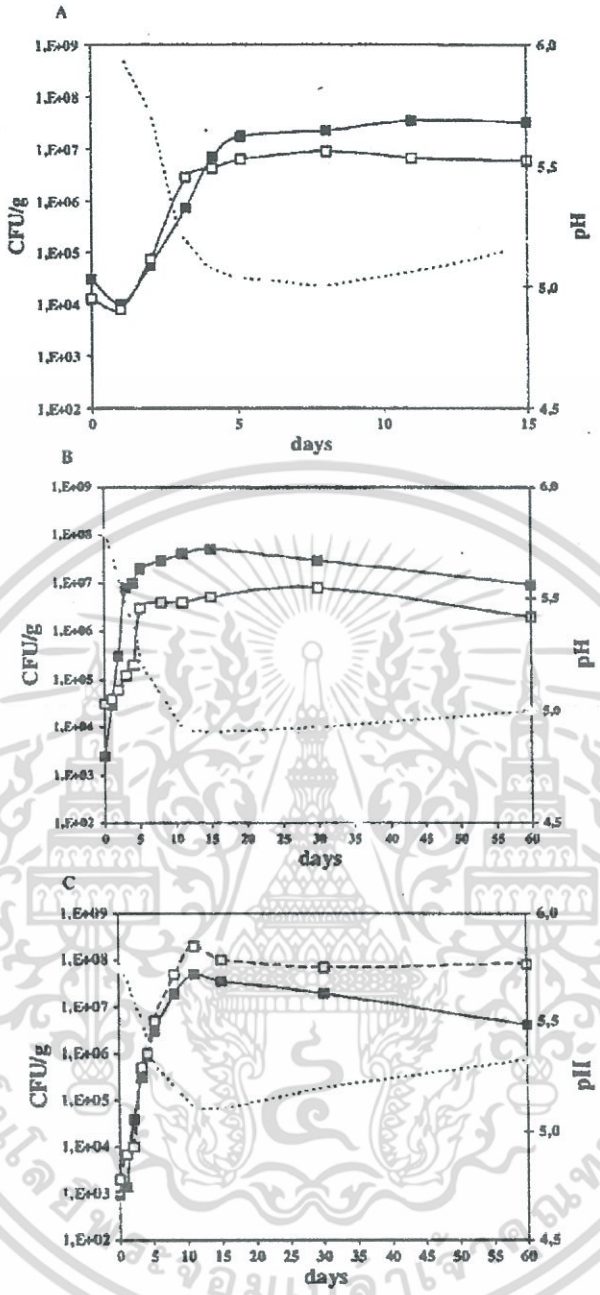
2.4.2 ความสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

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

2.4.3 การผลิตกรดในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

กลูโคสเป็นน้ำตาลที่มีความสำคัญต่อการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสามารถย่อยสลายกลูโคสเพื่อให้ได้พลังงานและกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ลดลงในระหว่างกระบวนการหมักและบ่ม ซึ่งช่วยถนอมอาหาร เนื่องจากกรดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตไม่เพียงแต่มีอิทธิพลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แต่ยังมีอิทธิพลต่อกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และปริมาณผลผลิตของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก โดยระดับความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีผลต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค โดยระดับความเป็นกรดขึ้นอยู่กับกิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักและการบ่ม โดยค่า pH ในระหว่างกระบวนการบ่มเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* จากภาพที่ 5 แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และการลดของค่า pH ของไส้กรอกหมักที่มีกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน โดยภาพที่ 4ก แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Staphylococcus* และค่า pH ของไส้กรอกหมักที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ แต่เมื่อเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* พบว่าไส้กรอกหมักมีค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว และมีค่า pH ภายหลังการบ่มต่ำกว่าไส้กรอกหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lactobacillus* มีบทบาทสำคัญต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 2.5ข) ในขณะที่การเติมกล้าเชื้อกลับพบว่า ค่า pH ของไส้กรอกหมักลดช้า และมีค่า pH ภายหลังการบ่มสูงกว่าไส้กรอกหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* (ภาพที่ 2.5ค) โดยค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่มเป็นผลมาจากการเกิดเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

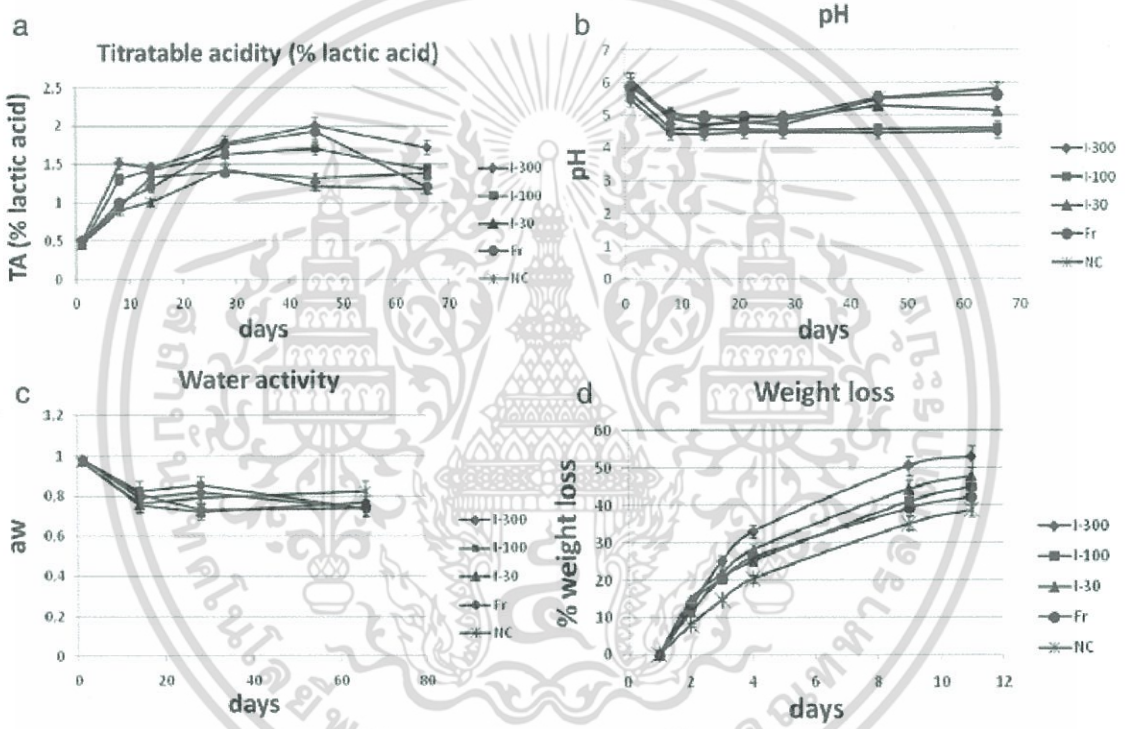


ภาพที่ 2.5 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* (■) และ *Staphylococcus* (□) และการลดลงของค่า pH ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน โดย ก) ไม่เติมกล้าเชื้อ ข) เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* และ ค) เติมกล้าเชื้อ *Staphylococcus*

ที่มา: Toldrá (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

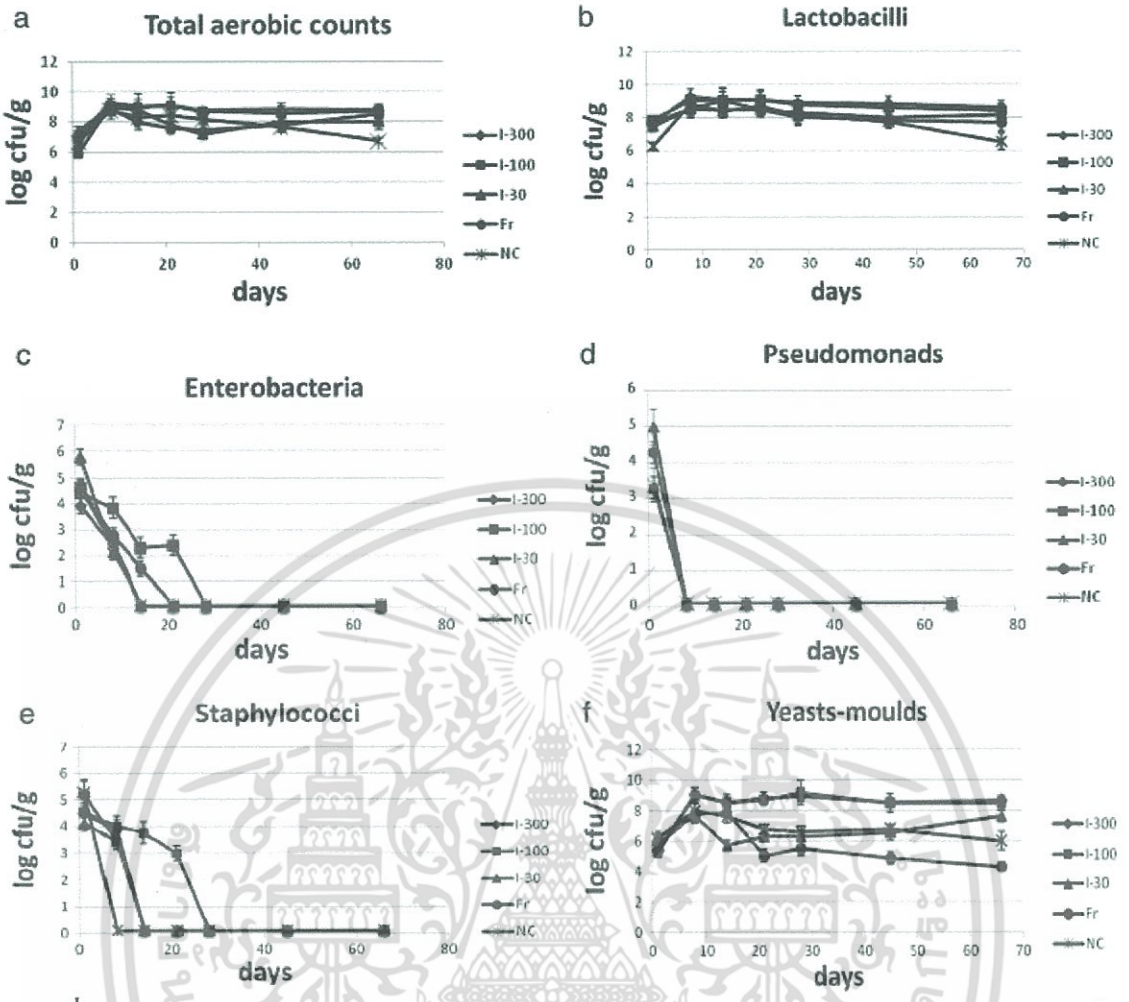
Sidira *et al.* (2014) ศึกษาการอยู่รอดของ *Lactobacillus casei* ในระหว่างการบ่มสุกและการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติกและตรวจหาจุลินทรีย์ พบว่า การวิเคราะห์เคมีกายภาพมีค่าปริมาณการไตเตรตกรด (TA) ค่า pH ค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) และน้ำหนักสูญเสียที่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งในกลุ่มที่มีการใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติกตามระยะการบ่มสุกของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้ง (ภาพที่ 2.6) ในระหว่างการบ่มสุกไส้กรอกหมักแห้งที่มีการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 พบว่า ปริมาณการไตเตรทกรดมีค่าสูงขึ้นทางสถิติ และมีค่า pH ต่ำทางสถิติ โดยสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) และค่าการสูญเสียน้ำหนักที่ลดลง



ภาพที่ 2.6 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



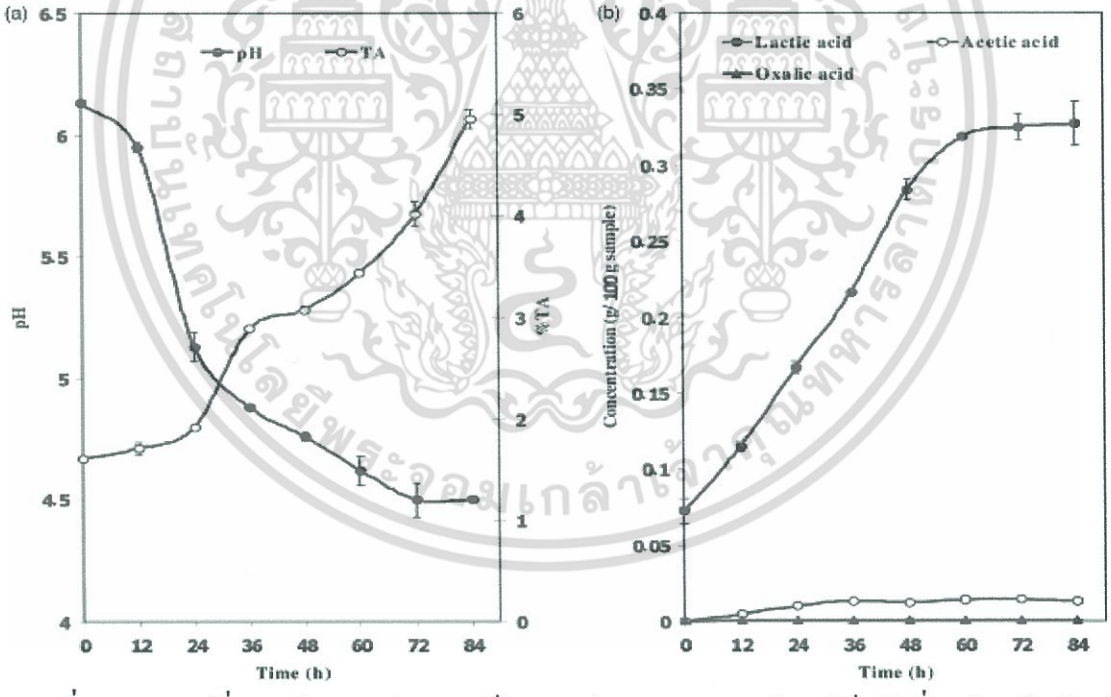
ภาพที่ 2.7 ผลของการเติม immobilized *L. casei* ATCC 393 และ free *L. casei* ATCC 393 ต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการบ่มสุกของไส้กรอกหมักแห้งโปรไบโอติก: a) ปริมาณจุลินทรีย์ใช้อากาศทั้งหมด, b) ปริมาณของlactobacilli, c) ปริมาณของ enterobacteria, d) ปริมาณของ *Pseudomonas*, e) ปริมาณของ staphylococci และ f) ปริมาณของยีสต์หรือรา 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 2.7) 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 2.8a) เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นโดยส่วนมากเป็นกรดแลคติก (ภาพที่ 2.8b)



ภาพที่ 2.8 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด ค่า pH และกรดอินทรีย์หลักที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก โดยแถบแสดงค่าความแปรปรวน (n = 3)

ที่มา: Visessanguan *et al.* (2004)

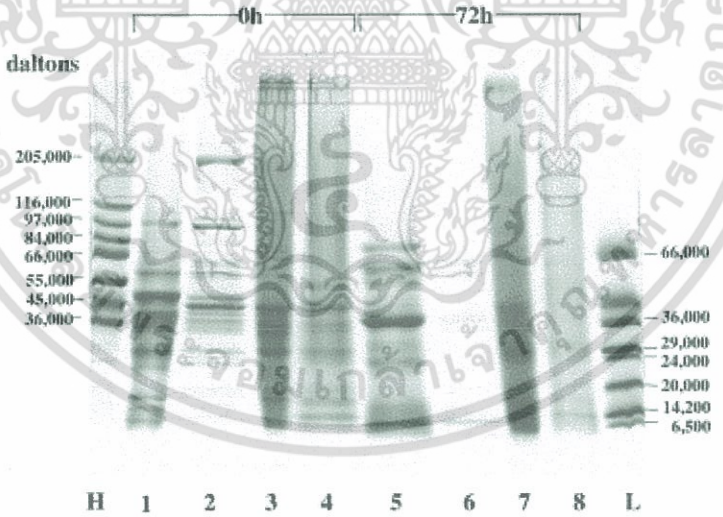
สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยภายหลัง 60 ชั่วโมง พบว่า กรดแลคติกและกรดอะซิติกมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรดและกรดอินทรีย์ส่งผลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์แหนมทำให้ลดต่ำถึง 4.6 ภายในระยะเวลา 60 – 72 ชั่วโมง โดยส่วนมาก lactobacilli จะผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก และรองลงมาคือกรดอะซิติกและกรดออกซาลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดบิวทิริก กรดซัคซินิก และกรดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์แหนมแต่มีค่าน้อย ซึ่งกรดแลคติกและกรดอะซิติกมีบทบาทต่อลักษณะกลิ่นกรดเปรี้ยว (tangy acidic) และส่งผลต่อการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสเพิ่มขึ้น และให้ผิวสัมผัสความไวสัมผัส (tactile) และลักษณะ mouthfeel เนื่องจากกรดเหนี่ยวนำให้โปรตีนไมโอซินและคอลลาเจนเกิดการเปลี่ยนแปลงไป

2.4.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมักจากการทำอิเลคโตโฟรเลซิส (ภาพที่ 2.9) 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



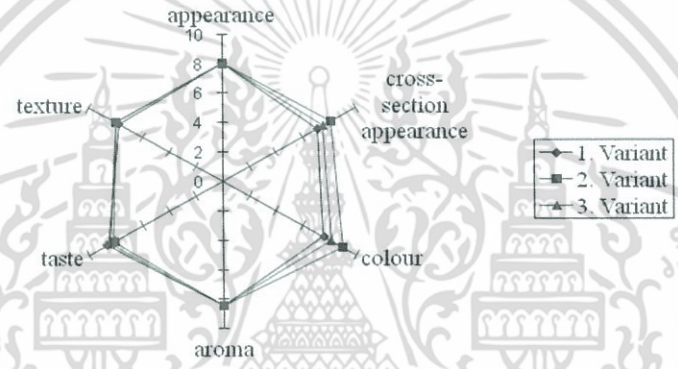
ภาพที่ 2.9 รูปแบบของการแยกโปรตีนจากแหนมที่หมักเป็นเวลาที่ 0 และ72 ชั่วโมงด้วยวิธี SDS–PAGE โดย (H) และ (L) น้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานต่ำและสูง (1) และ (5) sarcoplasmic fraction; (2) และ (6) myofibrillar fraction; (3) และ (7) alkaline-soluble fraction; (4) และ (8) alkaline-insoluble fraction

ที่มา: Visessanguan *et al.* (2004)

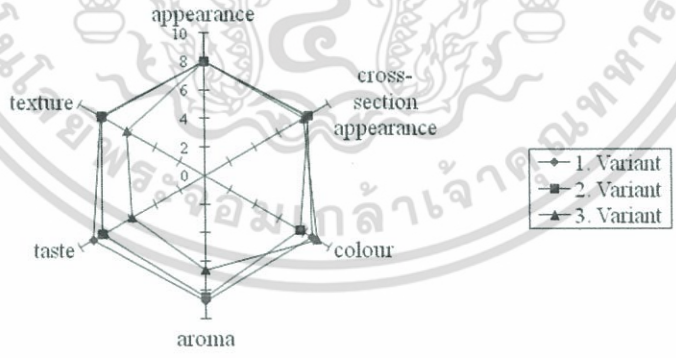
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

Radulović *et al.* (2011) ศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี โดยประเมินผลไส้กรอกหมักที่บ่มสุกในวันที่ 14 (ภาพที่ 2.10) และ 40 พบว่า ตัวแปรทางด้านคุณภาพทุกด้านมีแนวโน้มสูงขึ้นภายหลัง 14 วัน โดยมีคะแนนมากกว่า 7 ไม่แตกต่างทางสถิติ และภายหลัง 40 วัน (ภาพที่ 2.11) 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 2.10 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการบ่มสุก (14 วัน)



ภาพที่ 2.11 การประเมินทางด้านประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักแห้งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (40 วัน)

ตัวแปรที่ 1 กลุ่มไส้กรอกควบคุมใช้กล้าเชื้อ Bactoferm T-SPX (Chr-Hansen)

ตัวแปรที่ 2 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus helveticus* RO52 (Lallemand, France)

ตัวแปรที่ 3 กลุ่มไส้กรอกใช้กล้าเชื้อ *Bifidobacterium longum* RO175 (Lallemand, France)

ที่มา : Radulović *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Visessaguan *et al.* (2004) วิเคราะห์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนมโดย texture profile analysis ภายหลังการบ่ม 36 ชั่วโมง ($P>0.05$) พบว่า แหนมมีคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ยังไม่ผ่านการหมัก โดยแหนมมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็ง (rigid) แต่มีความยืดหยุ่น (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[c]	7134.2 ± 58.9[c]	17.1 ± 4.1c[d]	-15.2 ± 2.6[c]	0.81 ± 0.01[c]	0.57 ± 0.01[d]

[a] ค่าเฉลี่ย ± S.D. (n = 3) อักษรในคอลัมม์เดียวกันมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ที่มา : Visessaguan *et al.* (2004)

2.5 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 เนื้อสัมผัส และสี กระบวนการหมักหมูส้มใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 30 °C (ประเทศไทยมีอุณหภูมิประมาณ 30-35 °C) โดยไม่ต้องทำการบ่มเพิ่มเติม ซึ่งโดยมีค่า pH ประมาณ 4.4-4.8 และมีค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 0.77- 1.60 % กระบวนการหมักเกิดขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีอยู่จากวัตถุดิบเนื้อสด (Visessanguan *et al.* 2003)

2.6 มาตรฐานผลิตภัณฑ์หมูส้ม

หมูส้ม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อหมู หมูสามชั้น หรือเอ็นหมู อย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมกันมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นหรือชิ้นบาง ผสมกับเกลือ (ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก) เติมข้าวเจ้าสุกหรือข้าวเหนียวสุกและกระเทียมบด ผสมให้เข้ากัน บรรจุในภาชนะบรรจุที่ปิดเพื่อให้เกิดการหมักในระยะเวลาที่เหมาะสมจนมีรสเปรี้ยว โดยมีค่าความเป็นกรดด่างไม่เกิน 4.6 และก่อนบริโภคต้องทำให้สุก (มผช. 876-2548)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนได้กำหนดมาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.6.1 ซาโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

2.6.2 สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.6.3 ยีสต์และรา ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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, pore size 3 ไมครอน) (Phenominex, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
<u>การทดลองที่ 1</u> สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก	แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ **1.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก** 1.1.1 การสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร 1.1.2 การคัดแยกและทดสอบสมบัติแบคทีเรียแลคติก 1.1.2.1 ย้อมสีแกรมของแบคทีเรีย (gram stain) 1.1.2.2 ตรวจรูปร่างเซลล์และการจัดเรียงตัว 1.1.2.3 ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลคติก โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส 1.1.2.4 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase 1.1.2.5 ทดสอบการเจริญในช่วงอุณหภูมิ 15, 30, 45 และ 50 °C 1.1.2.6 ทดสอบการเจริญในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4% และ 6.5% 1.1.2.7 ทดสอบการผลิตแอมโมเนียจากกรดอะมิโนอาร์จินีน **1.2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก** 1.2.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก 1.2.2 การทดสอบสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes, S. aureus, Salmonella* Rissen และ *E. coli* โดยวิธี agar spot 1.2.3 ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วงพีเอชต่างๆ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวน 7 ทรีเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่ทำการปรับค่า pH 2, 3, 4 , 5, 6, 7 และ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	1.2.4 ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ทรีทเมนต์ ได้แก่ MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1.0% 1.2.9 การศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติก โดยวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (minimum inhibition concentration, MIC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี broth microdilution method 1.2.10 การทดสอบความสามารถการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง
การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนระดับต่ำ	แบ่งเป็น 1 การทดลองย่อย ดังนี้ 2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้น ด้วยวิธี actual screening test ดัดแปลงจากวิธีการของ Bover-Cid and Holzapfel (1999) โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ
การทดลองที่ 3 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก	แบ่งเป็น 1 การทดลองย่อย ดังนี้ 3.1 การบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้ 16S rRNA gene ลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis
การทดลองที่ 4 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม	แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ 4.1 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	4.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ส่วนผสมของหมูส้มทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (control) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติโปรไบโอติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ จำนวน 1 ไอโซเลท (จากการทดลองที่ 4.1) โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10^6 cfu/g เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่าแบคทีเรียทางการค้าด้วยการทดสอบดังต่อไปนี้ 4.2.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก 4.2.3.1 วัดค่า pH ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม 4.2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) สุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 เพื่อทำการตรวจนับแบคทีเรียแลคติก 4.2.2 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) 4.2.3 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก สำหรับการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนด้วยวิธี HPLC ให้เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 °C 4.2.3.1 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE 4.2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนด้วยวิธี HPLC 4.2.4 ด้านคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ทำการสุ่มตัวอย่างหมูส้มแต่ละกลุ่มในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และ 7 ของกระบวนการหมัก เพื่อทำการวิเคราะห์ 4.2.4.1 การหาค่าการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างกระบวนการหมัก (weight loss) 4.2.4.2 วัดค่าสี (CIE L*a*b*) 4.2.4.3 Texture profile analysis (TPA) 4.2.5 วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory) ทำการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH $\leq$ 4.6) เพื่อวิเคราะห์คุณภาพด้านประสาทสัมผัสโดยศึกษาความชอบโดยรวมของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว และลักษณะโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.3.1.1 การทดลองย่อยที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

1) การสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลคติกมีทั้งผลิตภัณฑ์เนื้อหมักท้องถิ่นที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร เช่น แหนมหมู แหนมเนื้อ ไส้กรอกอีสานหมูและไส้กรอกอีสานเนื้อ จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายในกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ตลาดสด และซูเปอร์มาร์เก็ต

2) การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เตรียมตัวอย่างโดยการชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 25 กรัม ลงใน normal saline dilution 0.85% (0.85% NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่า ทำการเจือจางส่วนผสมจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นมาทำการ pour plate หรือ streak บนอาหาร de man Rogosa and Sharp (MRS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีอากาศส่วนอาหารที่เป็นของเหลว นำมา streak บนอาหาร MRS agar คัดเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบ ๆ โคโลนี คัดเลือกโคโลนีที่มีขนาด รูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Gram stain) เพื่อทดสอบสมบัติของแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้น

3) การทดสอบสมบัติของแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นโดยทดสอบการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกติดสีแกรมบวก และการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Harrigan and McCance. 1976) ถ้าเป็นแบคทีเรียแลคติก catalase test จะให้ผลลบ (Harrigan and McCance. 1976) เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้โดยแทงลงไปในอาหาร MRS agar และเก็บในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุกสัปดาห์ และเก็บเชื้อไว้ในสารละลายกลีเซลรอลที่มีความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

4) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase ใช้วิธีการของ Kovacs (1956) โดยวางกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 0.5% tetramethyl-p-phenylenediamine HCl ลงในจานเลี้ยงเชื้อ และเขี่ยโคโลนีออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษผลบวกเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที

5) ทดสอบการเจริญในช่วงอุณหภูมิ 15, 30, 45 และ 50 °C ตามวิธีการของ Axelssons (1993) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และบันทึกผลทุกๆวัน ในหนึ่งสัปดาห์

6) ทดสอบการเจริญในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 4% และ 6.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นข้างต้น บ่ม 3 วัน และทำการประเมินผลตามวิธีการของ Axelssons (1993)

7) ทดสอบการผลิตแอมโมเนียจากกรดอะมิโนอาร์จินีน ใช้วิธีการของ Moeller (1955) โดยอาหาร Moeller decarboxylase broth base แล้วเติม 1% L-arginine monohydrochloride ขณะเดียวกันเตรียม Moeller decarboxylase broth base โดยไม่เติม 1% L-arginine เพื่อการเปรียบเทียบ และเพาะเชื้อลงในอาหารที่เติม arginine และไม่เติม จากนั้นเท mineral oil ทับหนาประมาณ 4-5 มม. ลงในแต่ละหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ตรวจผลภายใน 4 วัน โดยผลบวก เกิดสีม่วงหรือม่วงแดง และผลลบเกิดสีเหลืองทั้ง 2 หลอด

3.3.1.2 การทดลองย่อยที่ 2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

1) การศึกษาอัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1 loop จากอาหาร MRS agar ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เชื้อละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยการวัดปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างที่เป็นของเหลวที่มีความยาวคลื่น 660_{nm} ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีการเจริญได้ดีมากโดยมีค่า OD 660_{nm} > 1.5 และแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีมีค่า OD 660_{nm} ตั้งแต่ 1 ถึง 1.5 และแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ต่ำมีค่า OD 660_{nm} มากกว่า 1 เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป

2) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยนำแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 1 loop ถ่ายลงใน MRS broth แล้วนำไปทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ลงในจานเพาะเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในข้อที่ 2 แบ่งเป็นช่อง ๆ 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 ถ้าเชื้อที่เป็นอินดิเคเตอร์ใดถูกยับยั้งการเจริญจนเห็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่ทำการทดสอบ 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 โดยทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยมีค่าประสิทธิภาพยับยั้งที่มากกว่า 1 ขึ้นไป ทั้งนี้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วง pH และเกลือน้ำดีต่างๆ ต่อไป

3) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในช่วงค่า pH ต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Erkkilä and Petäjä, 2000) นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมาศึกษาการทนกรดและการเจริญที่ระดับค่า pH ต่างๆ ในอาหารเหลว MRS broth ที่ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย กรดไฮโดรคลอริก (8M HCI) 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

4) การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ดัดแปลงจาก Gilliland and Speck. 1984 ; Erkkilä and Petäjä. 2000) การวางแผนการทดลองแบบ 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 ตรวจนับปริมาณโคโลนีและสุ่มตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการบันทึกจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่รอดชีวิตในเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ โดยทุกความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ต้องมีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^6 cfu/ml ขึ้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) การศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติก

ในการศึกษาสมบัติการทนต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติก โดยทำการจัดเก็บ 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)

ทำการศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด (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 + แบคทีเรียแลคติก
- sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

6) 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 นำแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเครื่องเขย่า 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

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

3.3.2 การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ

3.3.2.1 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

3.3.3 การทดลองที่ 3 การบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

3.3.3.1 การบ่งชี้สายพันธุ์โดยใช้ 16S rRNA gene และลักษณะทางอณูวิทยาด้วยวิธี partial 16S rRNA sequence analysis โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ของแบคทีเรียแลคติกมีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดจำนวน 3 สายพันธุ์ ส่งตรวจที่สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการสกัดโคโมโซมจากแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2% ลงในอาหารเหลว MRS หลอดใหม่แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมปีนเวลา 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-HCI 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 โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์พีเอช 8.8 (1X) (10 mM KCI, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM Tris-HCI, 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 (ในที่นี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนยีน 16S rRNA) โดยเข้าไปที่เวปไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.3.4 การทดลองที่ 4 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

3.3.4.1 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) 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 นำเชื้อใส่ลงแบบจำลองหมูส้ม ปริมาณ 10^5 cfu/ml

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 เสร็จแล้วบรรจุลงขวดที่มีฝาปิด ปริมาตรขวดละ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

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

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

3.3.4.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

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

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) การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

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

3) การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 และแสดงข้อมูลตามตารางภาคผนวกที่ 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

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* ตามตารางภาคผนวกที่ จ1 และคำนวนค่า MPN ตามตารางภาคผนวกที่ จ2, Yeast/Mold (Malt agar, Merck, Germany, AOAC, 2005) , *S. aureus* (Baird-parker, Merck, Germany, BAM, 2001) โดยแสดงข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ จ3, *Salmonella* spp. (Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn), Hektoen enteric agar, Merck, Germany, ISO 6579)

3.3.4.3 วิเคราะห์คุณภาพด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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%

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 10 มิลลิลิตร) 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 หลังจากนั้นเติมสารละลาย 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) ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 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 นาทีโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนเริ่ม run ใหม่ ตรวจวัดสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยใช้ UV detector (Shimadzu, Japan)โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในหมูส้ม เปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

3.3.4.4 วิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพของหมูส้ม

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

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

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

A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนกระบวนการหมัก

B = น้ำหนักตัวอย่าง ณ กระบวนการหมัก

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* ในตารางภาคผนวกที่ จ 7, จ 8 และ จ 9 ตามลำดับ

3) วัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม (Texture profile analysis)

ทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 5 และวันที่ 7 เพื่อการประเมินคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้มทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง โดยประเมินคุณภาพทางด้านเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัมผัส ดัดแปลงวิธีการของ 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)

3.3.4.5 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 อาชีพอาจารย์บุคลากรและนักศึกษาสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยใช้แบบประเมินจากภาคผนวก ฉ

3.3.4.6 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.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 สมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

4.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดสดกรุงเทพมหานคร (ตารางที่ 4.1) โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์แหนมและไส้กรอกอีสานทั้งหมด 42 ตัวอย่าง โดยพบจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกมากที่สุดในผลิตภัณฑ์แหนมซี่โครงหมู รองลงมาคือ แหนมหมู ไส้กรอกอีสานหมู แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้เป็น 10.0, 7.6, 8.0, 6.5 และ 6.0 ไอโซเลทต่อตัวอย่างตามลำดับ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมูหมักที่ทำการศึกษา ได้แก่ แหนมหมู แหนมซี่โครงหมูและไส้กรอกหมัก พบว่ามีค่า pH อยู่ในช่วง 4.1 – 4.7 อาจแสดงได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมัก และจำนวนของแบคทีเรียแลคติกมากจึงส่งผลให้ผลิตกรดมาก อีกทั้งทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วงค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อวัว และแหนมเอ็นไก่ มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5 – 4.9 แสดงได้ว่าผลิตภัณฑ์มีกิจกรรมกระบวนการหมักและจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่น้อยกว่า จึงส่งผลให้พบแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่าแหนมหมูและไส้กรอกหมัก

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักวางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	ค่า pH ของตัวอย่าง[a]	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติก	จำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกต่อตัวอย่าง
แหนม (เนื้อหมู)	4.1 – 4.7	27	206	7.6
แหนม (ซี่โครงหมู)	4.2 – 4.6	2	20	10.0
แหนม (เนื้อวัว)	4.7 – 4.9	2	13	6.5
แหนม (เอ็นไก่)	4.5 – 4.6	1	6	6.0
ไส้กรอกอีสาน (เนื้อหมู)	4.3 – 4.7	10	80	8.0
รวม		42	325	

[a] คือ ผลิตภัณฑ์ที่ทำการทดสอบผ่านตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ($pH \leq 4.6$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังตารางที่ 4.2 แสดงไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร พบว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar มีจำนวนทั้งหมด 375 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกด้วยการย้อมสีแกรม และการสร้างเอนไซม์ catalase พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สร้างเอนไซม์ catalase จำนวน 354 ไอโซเลท และจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 325 ไอโซเลท โดยเซลล์มีรูปทรงท่อนจำนวน 259 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 66 ไอโซเลท ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	ตัวอย่าง (จำนวน)	โคโลนีที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก			จำนวนไอโซเลท	
		MRS agar	Catalase test (-)[a]	Gram stain (+)[b]	รูปร่างท่อน	ทรงกลม
แหนม (เนื้อหมู)	27	220	216	206	160	46
แหนม (ซี่โครงหมู)	2	24	22	20	19	1
แหนม (เนื้อวัว)	1	20	15	13	11	2
แหนม (เอ็นไก่)	1	10	6	6	6	-
ไส้กรอกอีสานหมู	10	101	95	80	63	17
รวม	42	375	354	325	259	66

[a] คือ ไม่มีเอนไซม์ catalase

[b] คือ แบคทีเรียแกรมบวกติดสีน้ำม่วงของ crystal violet

จากผลการศึกษาข้างต้นมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ สมใจ ศิริโภค และคณะ (2550) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างเอนไซม์ catalase จำนวน 131 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน 110 ไอโซเลท และทรงกลมจำนวน 21 ไอโซเลท เช่นเดียวกับ ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ (2557) ทำการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผัก และอาหารหมักรวมจำนวน 32 ตัวอย่าง โดยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ 10 ไอโซเลท และจากผลิตภัณฑ์อื่นๆจำนวน 99 ไอโซเลท ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง หรือกลม และไม่สร้างเอนไซม์ catalase นอกจากนี้ Ruiz-Moyano *et al.* (2008) ยังได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแห้งไอบีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวนทั้งหมด 363 ไอโซเลท และจัดเป็น *Lactobacillus* spp., *Lactococci* spp. และ *Enterococci* spp. จำนวน 263, 44 และ 56 ไอโซเลท ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การทดสอบสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

4.1.2.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

การวิเคราะห์ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกดังตารางที่ 4.3 แสดงค่าความขุ่น (turbidity) ของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 237 (72.92 %), 17 (5.23 %) และ 71 (21.85 %) สามารถเจริญได้ดีเยี่ยม เจริญได้ดี และเจริญได้ต่ำ ตามลำดับ และเพื่อให้ได้แบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการเป็นกล้าเชื้อที่ดีจึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 254 ไอโซเลท ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าตั้งแต่ 1.0 ถึง 1.5 และมากกว่า 1.5 เนื่องจากมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญได้มากกว่า 8 log cfu/ml เมื่อทำการตรวจจำนวนแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อMRS agar ดังนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคต่อไป

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร

ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600nm})	ระดับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก	จำนวนไอโซเลท	ค่าเฉลี่ย (%)
> 1.5	ระดับดีเยี่ยม	237	72.92
1.0 – 1.5	ระดับดี	17	5.23
< 1.0	ระดับต่ำ	71	21.85
รวม		325	100.00

4.1.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยเทคนิค agar spot assay ตามมีวิธีการของ Schillinger and Lucke (1989) ดังตารางที่ 4.4 พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมดจำนวน 254 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *E. coli* โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางการยับยั้งตั้งแต่ 1 ถึงมากกว่า 12 มิลลิเมตร จำนวน 53, 57, 45 และ 57 ไอโซเลท ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (*L. monocytogenes* และ *S. aureus*) มีผนังเซลล์ชนิด peptidoglycan ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ (*S.* Typhimurium และ*E. coli*) โดยคิดเป็น 50 - 90% ของผนังเซลล์ จึงส่งผลการยับยั้งแบคทีเรียลบได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีผนังเซลล์บางกว่า คิดเป็น 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของผนังเซลล์ และมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเป็นลิพิด และมีช่องว่างที่แยกออกจากผนังเซลล์ โดยอยู่ระหว่างชั้น peptidoglycan และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

ตารางที่ 4.4 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

(-) : $\leq$ 0 มม. ; (+) : 1 - 8 มม. ; (++) : 8 - 12 มม. ; (++) : > 12 มม.

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* ได้โดยมีค่าความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญอยู่ที่ 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 4.5) โดยพบว่า แบคทีเรียแลคติกจำนวน 26 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษแกรมบวกและแกรมลบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นจำนวน 42 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lima *et al.* (2007) ที่ทำการคัดแยกเชื้อ Lactobacilli จากกระเพาะพักและไส้ตั่งของลูกไก่ 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 4.5 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

4.1.2.3 การศึกษาผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะค่า pH ต่าง ๆ

จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ช่วง pH ต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกใน MRS broth ที่มีการปรับค่า pH ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 (ตารางที่ 4.6) พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 26 ไอโซเลท มีแบคทีเรียแลคติกเพียง 3 ไอโซเลท ที่สามารถในการรอดชีวิตได้ในสภาวะค่า pH 2 โดยมีจำนวนอยู่ในช่วง 10^1 ถึง 10^2 cfu/ml ในขณะที่สภาวะค่า pH 3 มีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 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 เป็นกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเป็นด่างมากขึ้น (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 4.6 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

4.1.3 ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 4.7 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 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		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 อีกทั้งการศึกษานี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกบางไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ค่อนข้างต่ำ โดย Sanders *et al.* (1996) ได้กล่าวว่าเกลือน้ำดีส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้มีการจัดเรียงเซลล์ที่ไม่เป็นระเบียบ จึงส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงถือเป็นลักษณะสำคัญของ *Lactobacillus* ซึ่งช่วยให้รอดชีวิตได้ในการย่อยและการดูดซึมของระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ Noriega *et al.* (2004) ได้รายงานถึงความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย และความเข้มข้นของเกลือน้ำดี ทั้งนี้ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้มีแปรปรวนตั้งแต่ 1.5 % ถึง 2.0 % (w/v) ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร และหลังจากนั้นลดลงประมาณ 0.3 % (w/v) โดยการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับความสามารถในการไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อลดความเป็นพิษเกลือน้ำดีต่อเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก

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

4.1.4 การทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางกายภาพ ทดสอบทางชีวเคมีเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (Axelsson. 1998) และตรวจสอบชนิดของเชื้อตามหลักเกณฑ์การพิจารณาใน Bergey's Manaul of Determinative Bacteriology พบว่า ไอโซเลทแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดไม่ผลิตเอนไซม์ oxidase โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15, 30, 45 และ 50 °C มีจำนวนเป็น 23, 30, 7 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ KL1011C2, KL1011-1C2, KL1012C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และ KL8031C1 มีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลือความเข้มข้น 4% และ 6.5% อีกทั้งไม่ผลิตสารแอมโมเนียจากกรดอะมิโนอาร์จินีน (ตารางที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 การจำแนกแบคทีเรียแลคติกระดับจีนัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่วางจำหน่ายในตลาดกรุงเทพมหานคร

ไอโซเลท	Oxidase test[a]	การเจริญในช่วงอุณหภูมิ (°C)				การเจริญในสารละลาย NaCl		ผลิตสาร NH_3 จาก Arginine
		15 °C	30 °C	45 °C	50 °C	NaCl 4%	NaCl 6.5%	
KL1012C2	-	+	+	-	-	+	+	-
KL60121B1	-	+	+	-	-	+	+	-
KL7321A2	-	+	+	+	+	+	+	-
KL5031A2	-	+	+	-	-	+	+	-
KL8031C1	-	+	+	-	-	+	+	-
KL10111C2	-	+	+	+	-	+	+	-
KL1011C2	-	+	+	+	-	+	+	-
KL2021B1	-	+	+	-	-	+	+	-

[a] คุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากขาด cytochrome C ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

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

ดังตารางที่ 4.9 แสดงการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้วิธี broth microdilution procedure ที่มียาปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาในความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 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 ได้แก่ยากลุ่มยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม penicillin และไวต่อการตอบสนองยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้แก่ ยาปฏิชีวนะ tetracycline, chloramphenicol และ erythromycin เป็นต้น

ตารางที่ 4.9 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] ประเมินระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตารางภาคผนวกที่ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration, MBC) ของยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

Antibiotic	Isolate	Antibiotic resistant (μg/ml) [a]			Antibiotic susceptibility [b]
		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] ประเมินระดับความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตารางภาคผนวกที่ 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

4.1.2.10 การทดสอบความสามารถการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

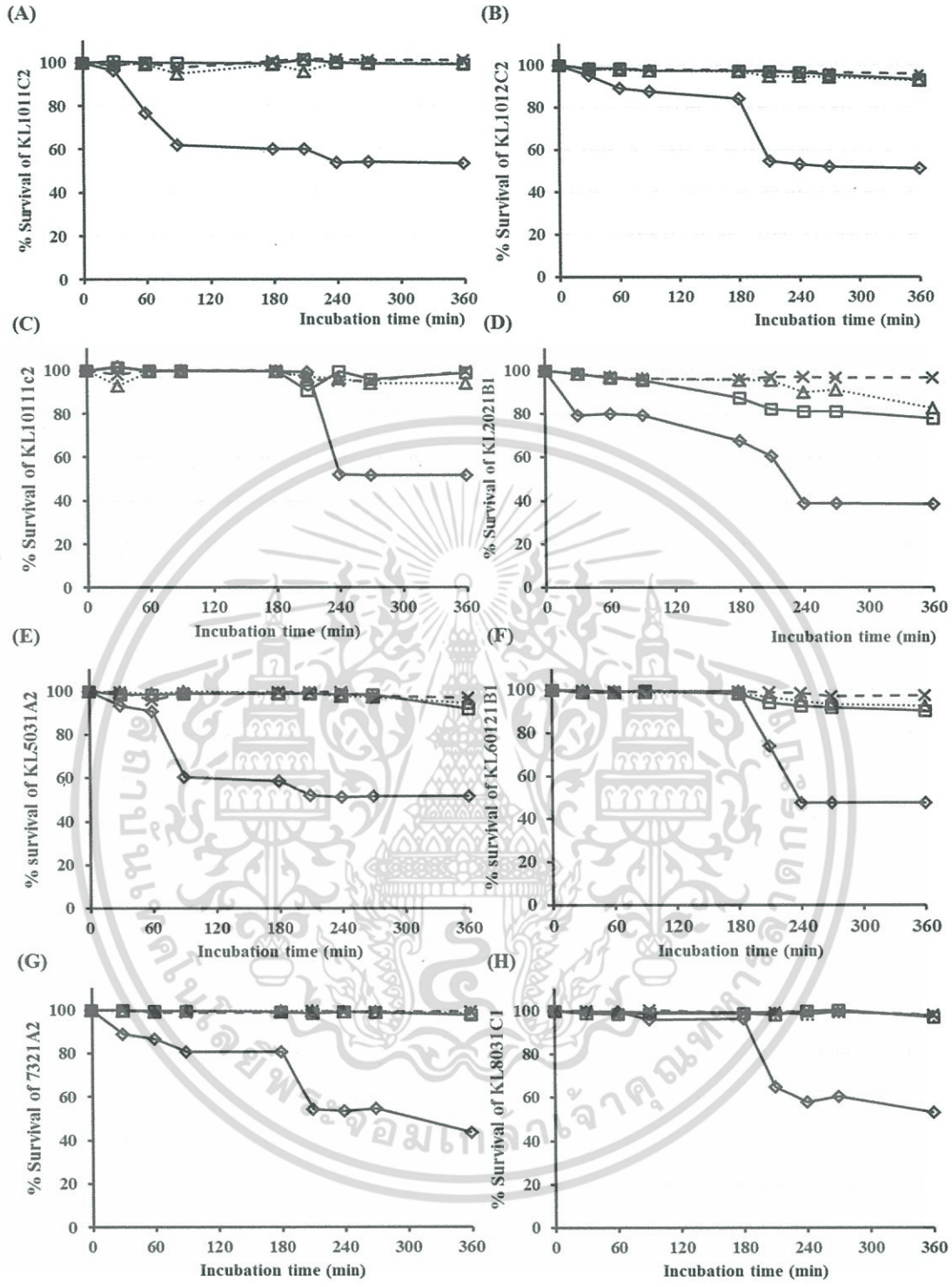
การศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียแลคติกในระบบกระเพาะและลำไส้จำลองที่ pH 2, 3, 4, และ 7 โดยวิธี standard plate count (ภาพที่ 4.1) พบว่าความสามารถในการรอดชีวิตของไอโซเลท KL1011C2, KL1012C2, KL10111C2, KL2021B1, KL5031A2, KL601-21B1, KL73-21A2 และไอโซเลท KL8031C1 ในระบบกระเพาะจำลองที่ pH 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 (ภาพที่ 4.12) 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

ทั้งนี้ Zárate *et al.* (2000) ได้กล่าวว่าปัจจัยที่สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกได้แก่ ความสามารถในการอยู่รอดที่สภาวะกรด เกลือน้ำดี และความสามารถในการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งน้ำย่อยจากตับอ่อน (pancreatic juice) ซึ่งมีความสำคัญต่อการยับยั้งต่อสายพันธุ์โปรไบโอติก นอกจากนั้น Dunne *et al.* (2001) ได้รายงานว่าแบคทีเรียแลคติกในหลอดทดลองส่วนมากมีความอ่อนไหวต่อเกลือน้ำดีของโคและสุกร ซึ่งการทนต่อเกลือน้ำดีของมนุษย์แปรผันตามความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลอง ดังนั้นน้ำดีที่หลั่งภายในลำไส้เล็กจึงส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของลิพิด และกรดไขมันภายในผนังเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารจำลองในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการ Charteris *et al.* (1998) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

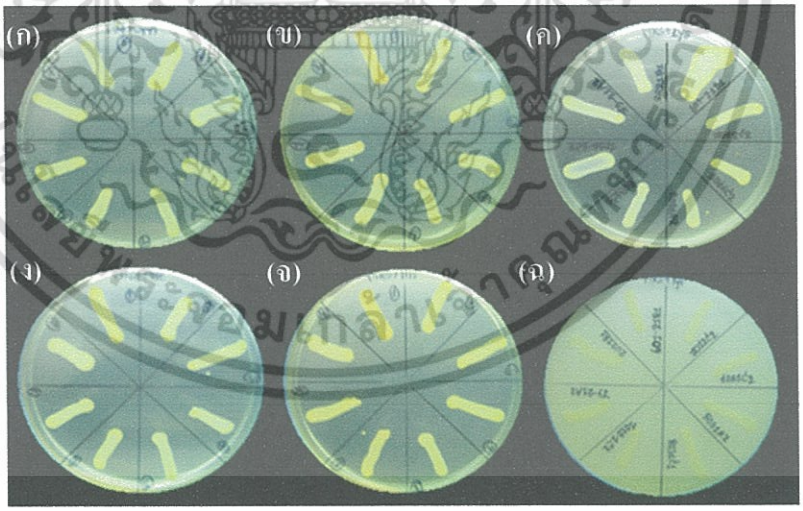
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดลองที่ 2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนระดับต่ำ

4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำแบบเบื้องต้นด้วยวิธี actual screening test

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำ โดยดัดแปลงวิธีการของ 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

จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในระดับต่ำทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ KL1012C2, KL1011C2 และ KL60121B1 ไม่พบการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน



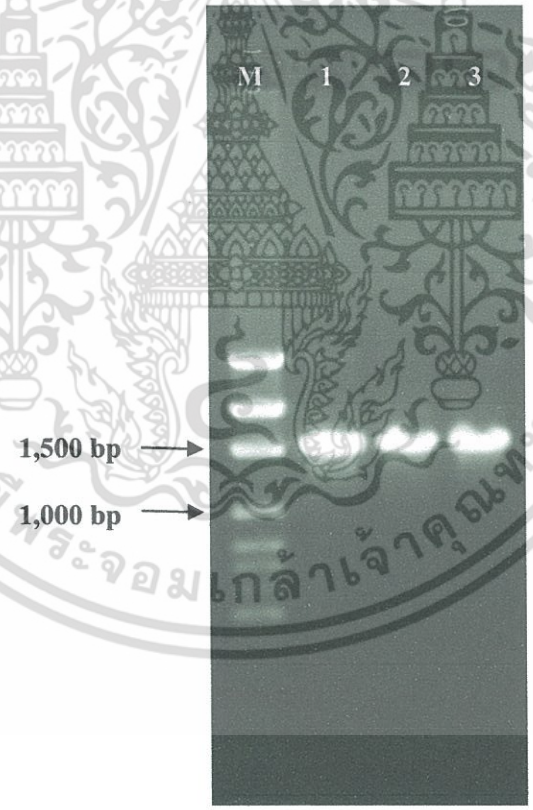
ภาพที่ 4.2 การสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ทำการเติมกรดอะมิโน ornithine (ก) , tryptophan (ข), lysine (ค), phenylalanine (ง), histidine (จ) และ tyrosine (ฉ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดลองที่ 3 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก

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

เมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกด้วยการหาลำดับเบสของ 16s rDNA (ตารางที่ 4.10)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 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4.3) โดยใช้ 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 โดยมีความเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* strain LY-78 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)โดยมี Accession no. คือ CP015308



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 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)

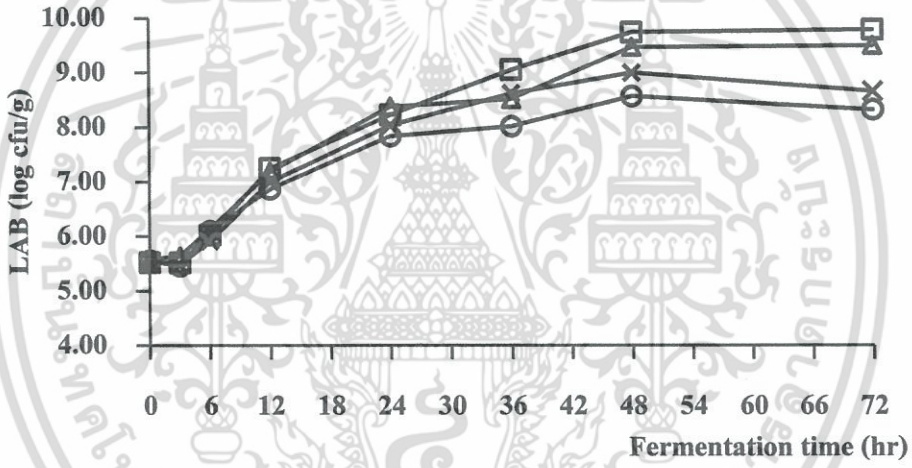
เช่นเดียวกับ Luxananil *et al.* (2009) ที่ตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* BCC9546 (LpBCC9546) ที่คัดแยกจากได้ผลิตภัณฑ์แหนม โดยพบว่าแบคทีเรีย-แลคติกสายพันธุ์ LpBCC9546 มีลักษณะทางกายภาพ และความต้องการของสารอาหารที่มีความคล้ายคลึงกับ *L. plantarum* สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในวัตถุดิบเนื้อสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดลองที่ 4 การประยุกต์แบคทีเรียแลคติกเป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.4.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม

จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองหมูส้ม ดังภาพที่ 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

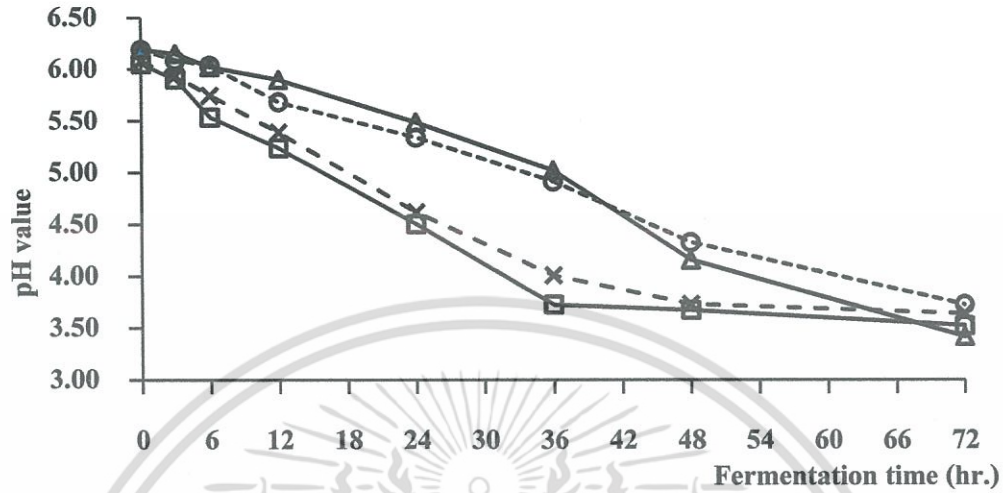


ภาพที่ 4.4 การเจริญของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-▲-) ไอโซเลท KL1011C2 (-✖-) KL1012C2 (-⊟-) และไอโซเลท KL60121B1 (-●-) ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะคงที่ (stationary phase) โดยแบคทีเรียแลคติกจะเข้าสู่ระยะคงที่เมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.5 (Liao *et al.* 2010)



ภาพที่ 4.5 ค่าความเป็นกรดด่างของกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-▲-) ไอโซเลท KL1011C2 (-✕-) KL1012C2 (-⊟-) และไอโซเลท KL60121B1 (-●-) ในแบบจำลองหมูส้มที่ระยะการหมักต่างๆ

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

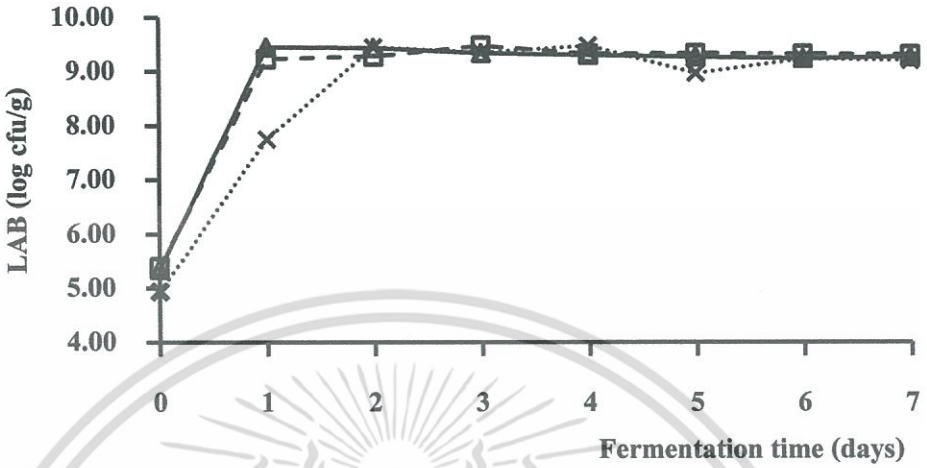
4.4.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.4.2.1 การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

จากการศึกษาจำนวนแบคทีเรียติกในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.6) และตารางภาคผนวกที่ จ 3 พบว่า กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 4.94, 5.40 และ 5.35 log cfu/g ตามลำดับ และภายหลังกระบวนการหมัก 1 วัน พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ TISTR543 และ KL1012C2 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และภายหลังกระบวนการหมักวันที่ 2 พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกคงที่ในช่วง 8.97 - 9.48 log cfu/g ซึ่งเนื้อสัตว์ในกลุ่มควบคุมอาจมีการปนเปื้อนแบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกจะย่อยสลายคาร์ไฮเดรตและสารอาหารต่างๆ เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งพลังงาน อีกทั้งสร้างสารต่างๆที่ใช้ในการเจริญที่มีในผลิตภัณฑ์ทำให้มีจำนวนแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีการเติมกล้าเชื้อ



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

Fontana *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* และ *Weissella* เป็นต้น ในขณะที่ Federici *et al.* (2014) และ Wanangkarn *et al.* (2014) ได้รายงานถึงสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่พบมากในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักแบบแห้งได้แก่ *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*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.2 ผลการเติมกล้าเชื้อต่อค่าความเป็นกรดด่างในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์

จากการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อในกระบวนการผลิต (ภาพที่ 4.7) และตารางภาคผนวกที่ จ 4 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

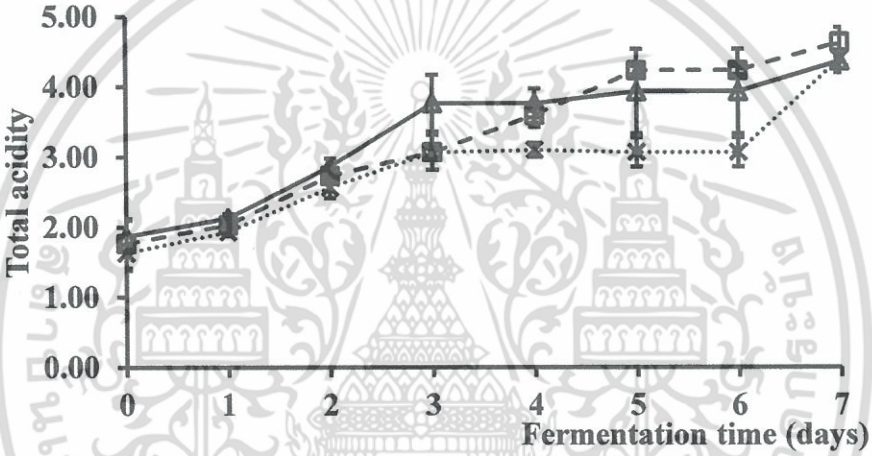
ภาพที่ 4.7 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH < 4.6) ของกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-△-)

นอกจากจำนวนแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักจะส่งผลต่อค่าความเป็นกรดด่าง และยังส่งต่อค่าปริมาณกรดทั้งหมดของผลิตภัณฑ์หมูส้ม (ภาพที่ 4.8) ทั้งนี้ Visessanguan *et al.* (2004) ได้กล่าวว่า แบคทีเรียแลคติกโดยส่วนมากมีการสร้างกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมัก จึงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ ซึ่งช่วยลดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งทำให้เกิดกลิ่นเปรี้ยว (acid aromas) และรสชาติเปรี้ยว (acid tastes) และยังให้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ได้หลังการหมักเป็นลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

การศึกษาปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หมูส้มดังภาพที่ 4.8 และตารางภาคผนวกที่ จ 3 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 ($pH \leq 4.6$) ในกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-△-)

ทั้งนี้สอดคล้องกับผลเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อค่า pH ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม โดยเมื่อมีระยะการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลให้แบคทีเรียแลคติกเกิดการหมักน้ำตาลได้กรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่นๆ ที่เพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำ อีกทั้ง พรรณี ศิริโฉม (2551) ได้รายงานถึง ปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักแหนมที่เพิ่มขึ้นเป็น 1.47 โดยคิดเป็นปริมาณ 4 เท่าของปริมาณกรดในวันแรกของกระบวนการหมัก นอกจากนี้งานวิจัยของ Visessanguan *et al.* (2004) ได้รายงานถึงปริมาณกรดทั้งหมดของผลิตภัณฑ์แหนม โดยพบว่าเมื่อมีระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นและมีค่าคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 60 ของกระบวนการหมัก โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีค่าอยู่ที่ร้อยละ 0.77 - 1.60 ซึ่งค่าความเป็นกรด และกรดอินทรีย์ส่งผลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์แหนมทำให้ลดต่ำถึง 4.6 ภายในระยะเวลา 60 – 72 ชั่วโมง โดยส่วนมาก lactobacilli จะผลิตกรดแลคติกเป็นหลัก และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รองลงมาคือ กรดอะซิติกและกรดออกซาลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดบิวทีริก 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 ($P<0.05$)

4.4.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

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

จากการศึกษาจำนวนเชื้อ total coliform ในผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ (ตารางที่ 4.11) พบว่า การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการผลิตหมูส้มสามารถลดจำนวนของเชื้อ total coliform ได้เร็วกว่าการผลิตหมูส้มด้วยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม โดยในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า (TISTR543) และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 และต่ำกว่า 3 MPN/g ตามลำดับ และภายหลังกระบวนการหมัก 2 วันพบว่า ทุกกลุ่มมีจำนวน *E. coli* ที่ต่ำกว่า 3 MPN/g ทั้งนี้ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนแบคทีเรียแลคติกที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นภายหลังกระบวนการหมัก ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติก และสารยับยั้งชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้น อีกทั้งส่งผลให้มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (pH $\leq$ 4.6) จึงมีความเหมาะสมในการควบคุมจำนวนเชื้อ coliform และ *E. coli* จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค (< 3 MPN/g) ซึ่งการเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 ผลิตภัณฑ์หมูส้มสามารถยับยั้ง Total coliform, Fecal coliform และ *E. coli* ได้ดีสุด เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ ต่ำสุด ($P<0.05$) อีกทั้งมีค่าปริมาณกรดทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่มากสุด ($P<0.05$) ณ วันที่ 2 ของกระบวนการหมัก

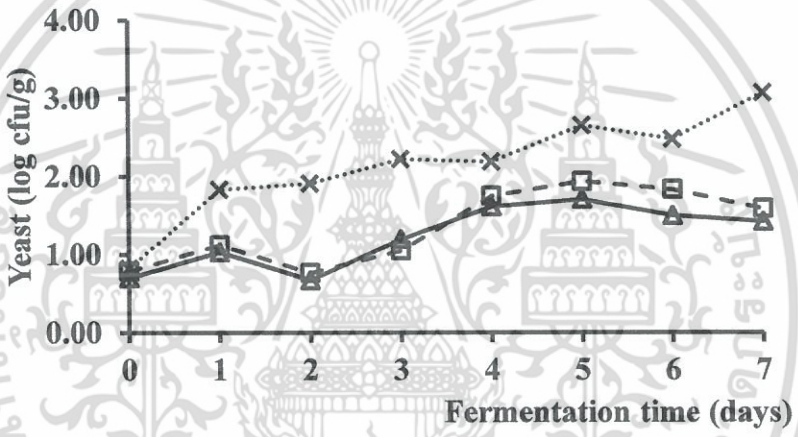
Tosukhowong *et al.* (2011) พบว่า ณ วันที่ 2 ของกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์แหนมมีจำนวนของ Enterococci ที่ลดลง และภายหลังเพิ่มขึ้นและคงที่ ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก เนื่องจากมีค่า pH ลดลงในขณะที่แบคทีเรียแลคติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงถึง 10^8 cfu/g ในวันที่ 1 และคงที่ในวันที่ 3 และปริมาณของ Enterobacteriaceae 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

4.4.3.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวนยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวนยีสต์และราในระหว่างกระบวนการหมักดังภาพที่ 4.9 และตารางภาคผนวกที่ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

($P<0.05$) 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 arginine โดยเกิดจากการเมตาบอลิซึมของ citrate (Jay. 1982) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีจำนวนยีสต์ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เนื่องจากอาจผลิตกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่ำจึงส่งผลให้ยีสต์สามารถใช้กรดอะซิติกเป็นอาหารสำหรับการเจริญ (Mumine and Mihriban. 2013)



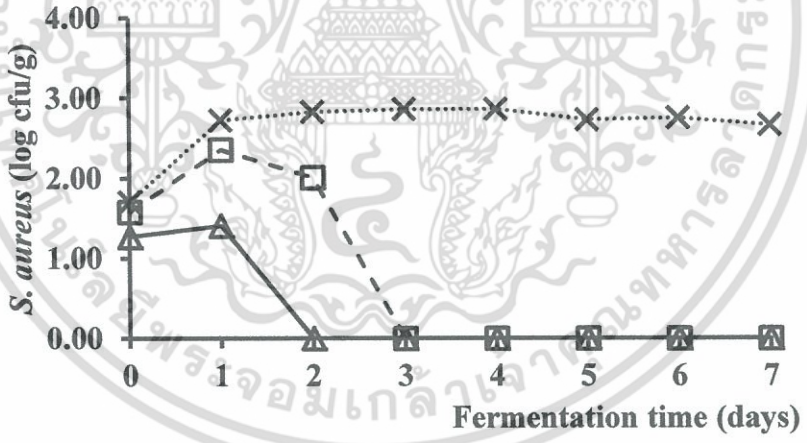
ภาพที่ 4.9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มในกลุ่มควบคุม (-✖-) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 (-⊟-) และเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 (-△-)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน *S. aureus* ในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาจำนวนเชื้อ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์หมูส้มในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.10) และตารางภาคผนวกที่ 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 ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า 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 (-△-)

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสร้างกรดอินทรีย์ต่างๆในระหว่างกระบวนการหมักอาทิเช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งมีการออกฤทธิ์ของกรดที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อน และกรดอินทรีย์ ส่วนที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้เกิดการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้กรดอินทรีย์ภายในเซลล์แตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน และมีความเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดด่างที่สูงกว่าภายนอกจึงรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย 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)

4.4.3.4 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อจำนวน *Salmonella* spp. ในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ในระหว่างกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมูส้ม พบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มทุกกลุ่มทดลองได้แก่ หมูส้มกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ในระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากเนื้อหมูที่ใช้เป็นวัตถุดิบตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. เริ่มต้น อีกทั้งผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ผลิตในครั้งนี้มีค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่า 4.6 จึงส่งผลให้ ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ และทั้งกระบวนการผลิตหมูส้มตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ซึ่ง Zottola and Smith (1990) ได้รายงานถึงปัจจัยการปนเปื้อนที่สำคัญของเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสัตว์ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ การจัดการก่อนฆ่าสัตว์ และการจัดการระหว่างกระบวนการฆ่าสัตว์ เป็นต้น

4.4.4 ผลของการประยุกต์ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

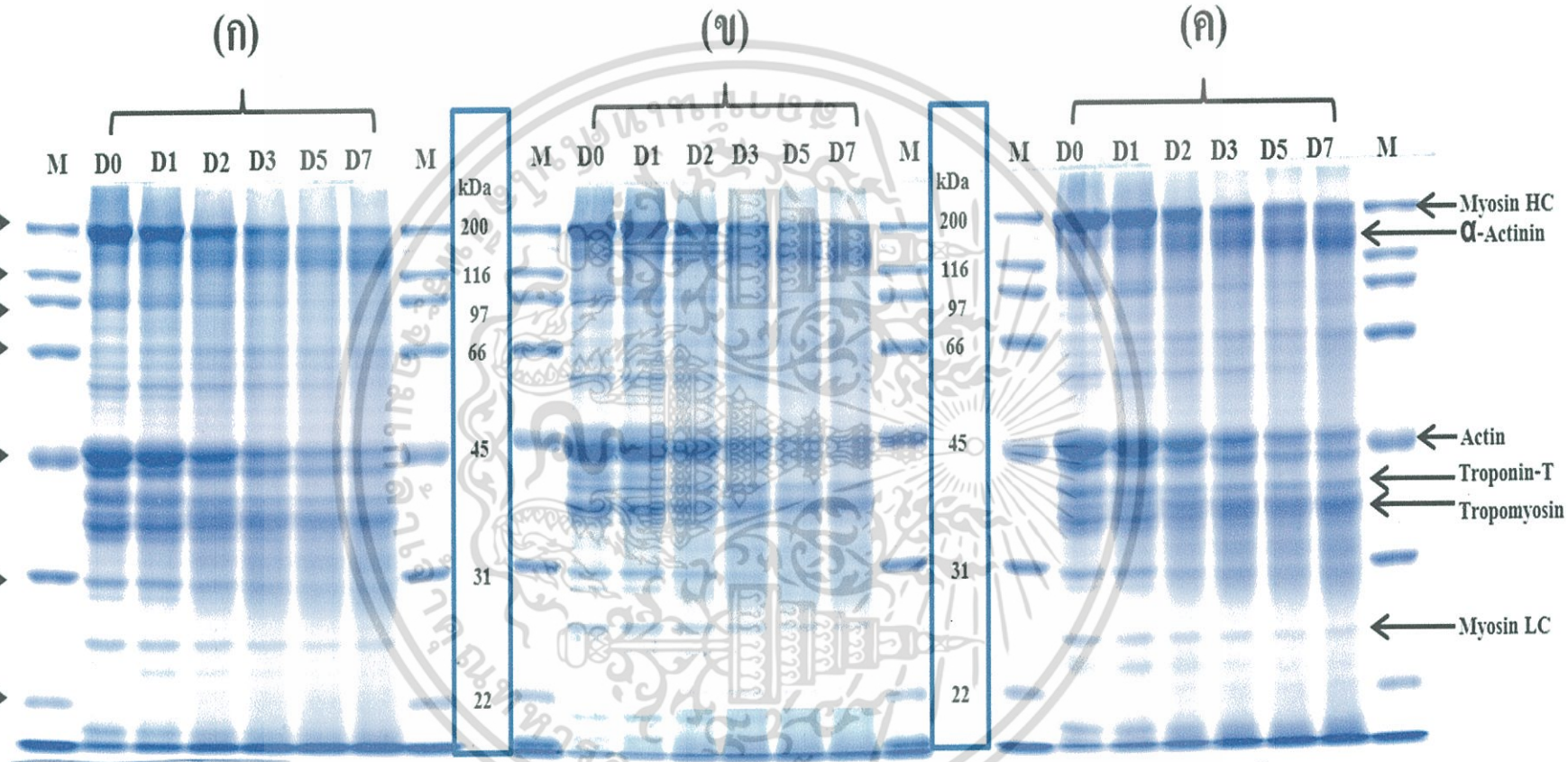
4.4.4.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อต่อรูปแบบของโปรตีนในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

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 ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักพบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar proteins) ซึ่งมีโปรตีน myosin heavy chain (Myosin HC) มีขนาดประมาณ 200 kDa และมีการเสียสภาพของโปรตีนแอคติน (actin) โดยผลิตภัณฑ์หมูส้มที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติหรือกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 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)

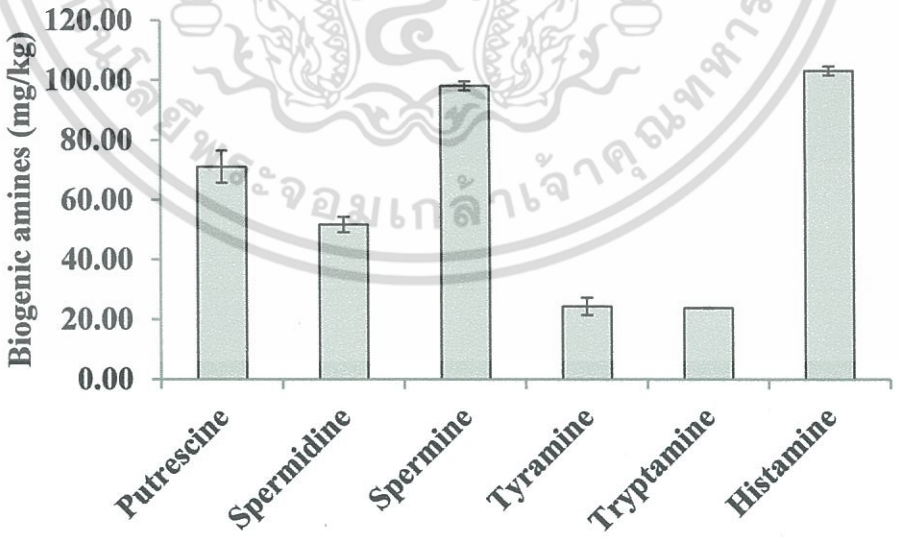
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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)

4.4.4.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์หมูส้ม

จากการวิเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในเนื้อหมูสด ได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine, tryptamine และ histamine ดังภาพที่ 4.12 พบว่า เนื้อหมูที่ทำการศึกษาตรวจพบ 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 Hernández-Jover *et al.* (1997) ทำการศึกษาสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนและสารพอลิเอมีนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ โดยพบว่า spermine และ spermidine พบมากในเนื้อโดยตรวจพบตั้งแต่ 6.4 - 62.1 และ 0.7 - 13.8 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่มีการตรวจพบ tyramine, putrescine และ cadaverine ในเนื้อหมูในปริมาณต่ำกว่า 3.5 mg/kg และพบ putrescine และ histamine ในเนื้อโคในปริมาณต่ำกว่า 2.0 mg/kg เช่นเดียวกับ อนุสรา รัตนบุรี (2553) ที่ตรวจพบสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนในหมูบด โดยพบสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนทั้งหมด 7 ชนิดได้แก่ putrescine, spermidine, spermine, tyramine, histamine, cadaverine และ β- phenylethylamine โดยมีค่าเท่ากับ 1.85, 1.12, 2.23, 5.06, 32.92, 2.45 และ 4.48 mg/kg ของตัวอย่างสด ตามลำดับ



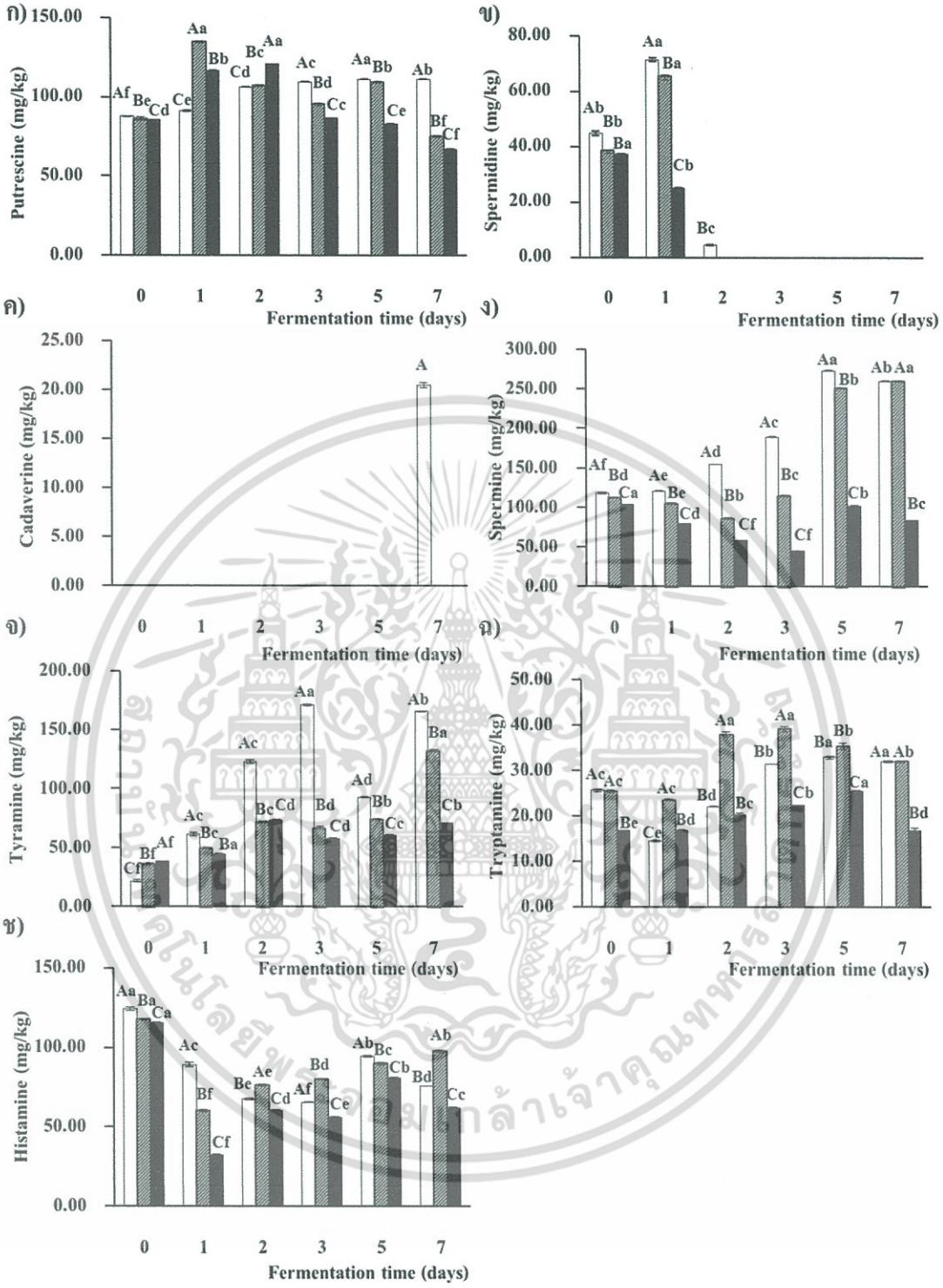
ภาพที่ 4.12 ปริมาณสารประกอบไบโอเจนิกในเนื้อหมูสดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tosukhowong *et al.* (2011) ศึกษาอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการเกิดสารไบโอเจนิกเอมีนในเนื้อหมู โดยทำการเก็บรักษากลุ่มตัวอย่างเนื้อหมูที่ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน และกลุ่มตัวอย่างเนื้อหมูที่ -20 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตแหนม ซึ่งพบว่า Spermidine จัดเป็นสารไบโอเจนิกเอมีนหลักที่พบมากในเนื้อสด (27.22 $\pm$ 4.61 mg/kg) โดย cadavarine และ tyramine จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อมีการเก็บรักษาที่ 30 องศาเซลเซียล 6 ชั่วโมง ($P < 0.05$) ในขณะที่เนื้อที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน ตรวจพบ cadavarine, tyramine และ spermine ส่วนเนื้อที่เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วันมีการพบ cadavarine และ spermine ทั้งนี้การเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียลส่งผลให้ spermine มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียล พบ cadavarine ในปริมาณต่ำกว่ากลุ่มที่เก็บรักษา 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน จึงแสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาเนื้อที่ -20 องศาเซลเซียล ส่งผลต่อการสะสม cadavarine ในปริมาณต่ำ และไม่พบการสะสมของ putrescine, histamine phenylethylamine และ tryptamine อย่างไรก็ตาม 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 ของกระบวนการหมักหมูส้ม พบว่าหมูส้มกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ผลิตสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนทั้ง 7 ชนิดได้แก่ putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine, tryptamine และ histamine ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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 ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจพบ putrescine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.13ก) โดยพบว่า 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 putrescine ในอาหารส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโน arginine เกิดเป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน ornithine ในจุลินทรีย์ อีกทั้งสามารถเปลี่ยนรูปเป็น agmatine ด้วยกระบวนการขจัดหมู่อะมิโน (Bover-Cid *et al.* 2001) จากการศึกษาการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิด spermidine ในผลิตภัณฑ์หมูส้ม 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 ทั้งนี้หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 กลุ่มตรวจไม่พบ spermidine ในกลุ่มทดลอง (ภาพที่ 4.13ข) ซึ่ง halász *et al.* (1994) ได้รายงานว่าการลดของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนสามารถเกิดจากการใช้สารประกอบไบโอเจนิกเอมีนเป็นแหล่งไนโตรเจนหรือเกิดปฏิกิริยา deamination

ดังภาพที่ 4.13ค แสดงผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร cadaverine ในผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยพบว่า cadaverine ไม่พบในหมูส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทางการค้า TISTR 543 และ KL1012C2 ซึ่งเป็นผลจากแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอินทรีย์และสารยับยั้งต่างๆ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกรดทั้งหมดของผลิตภัณฑ์มีความเหมาะสมต่อการยับยั้ง Enterobactericeae ซึ่งกลุ่มควบคุมมีการตรวจพบ cadaverine ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 20.47 ± 0.25 mg/kg ทั้งนี้ Bover-Cid *et al.* (2000) ได้พบว่า cadaverine เป็นสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนหลักที่พบทั้งในเนื้อสัตว์ และในผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษายาวนาน โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการผลิต cadaverine ก่อนกระบวนการหมักคือ Enterobactericeae ซึ่งอาศัยกระบวนการ decarboxylation ของกรดอะมิโนภายในเนื้อสัตว์ ซึ่ง Zhang *et al.* (2013) ได้ศึกษาถึงผลการเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ต่อการลดการสะสมของสารไบโอเจนิกเอมีนโดยพบว่า การเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* ZY-40 ในกระบวนการผลิตไส้กรอกหมักปลาสามารถลดการสะสมของสาร putrescine และ cadaverine ได้มากกว่า 70% จึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถควบคุมการเจริญของ Enterobacteriaceae ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้กรดอะมิโน lysine และ ornithine ในกระบวนการ decarboxylation เพื่อผลิตสาร cadaverine และ putrescine (Bover-Cid *et al.* 2001)

ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการสร้างสาร 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 ($P<0.05$) ในขณะที่หมูส้มกลุ่มควบคุม และกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 มีค่าปริมาณของสาร spermine เพิ่มขึ้นภายหลังกระบวนการหมัก 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 ($P>0.05$) ทั้งนี้ spermine และ spermidine ที่พบอาจมีปริมาณที่ลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งไนโตรเจน (Bardöcz. 1995) ทั้งนี้อะมิโนอาร์จินีนอาจเปลี่ยนรูปเป็น putrescine ในระหว่าง arginine deiminase pathway (ADI) ซึ่งทำให้เกิดสาร ornithine (Motel and Champomier. 1987) และเกิดการสังเคราะห์ putrescine และ agmatine โดยกระบวนการ decarboxylation และกำจัดยูเรียออกมา (Moreno-Arribas *et al.* 2003) และเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอาร์จินีนสะสมในปริมาณมากจึงสังเคราะห์สารประกอบไบโอเจนิกเอมีน putrescine และอาจเปลี่ยนโครงสร้างสารเคมีใหม่เป็น spermine และspermidine ด้วยปฏิกิริยา transamination ของกรดอะมิโนอาร์จินีน (Lehninger *et al.* 1999)

การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการเกิดสาร 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1997) พบว่า แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* สามารถเร่งการผลิตกรดภายในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก ซึ่งมีข้อกำหนดการปนเปื้อนของ tyramine ในอาหารอยู่ที่ 100-800 mg/kg และมีความเป็นพิษที่ 1,080 mg/kg (Shalaby. 1996) 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 4.13 ช พบว่าหมูส้มทุกกลุ่มก่อนกระบวนการหมักมีปริมาณของ 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

Tosukhowong *et al.* (2011) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อต่อความสามารถในการย่อยสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน tyramine ในระหว่างกระบวนการหมักแหนมโดยทำการตรวจติดตามในวันที่ 0, 3 และวันที่ 7 โดยพบว่า กระบวนการหมักแหนมที่เติมกล้าเชื้อทางแหนมทางการค้า *L. plantarum* BCC 9546 สามารถลดการสะสมของ tyramine, putrescine, cadaverine, histamine และ spermidine ได้ เนื่องจากแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อมีค่า pH ที่ลดลงเร็วกว่าแหนมกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยมีค่า pH สุดท้ายอยู่ที่ 4.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

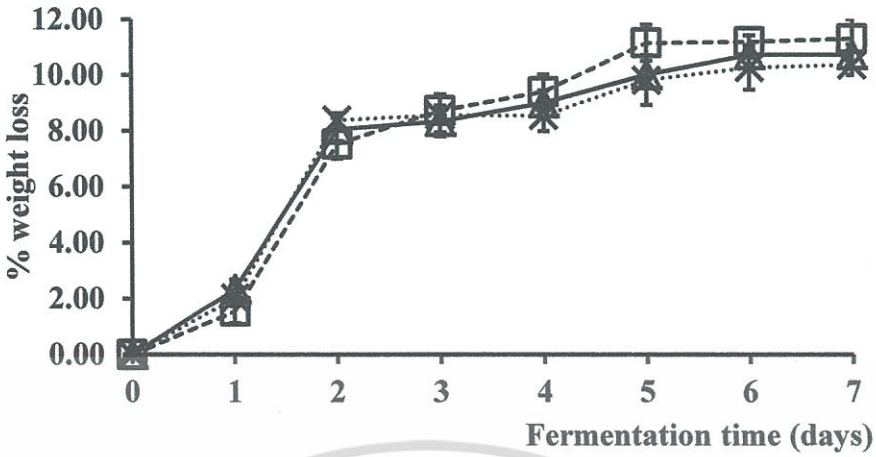
ดังนั้นหมูส้มที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 พบว่ามีปริมาณของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (putrescine, spermidine, cadaverine, spermine, tyramine, tryptamine และ histamine) ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543($P<0.05$) เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 ($P<0.05$) จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่พึงประสงค์ได้มากกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เติมมีความสามารถในการสร้างสารเอมีนในปริมาณต่ำ จึงส่งผลให้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้เอมีนมีการเจริญลดลง จึงพบการสร้างสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.5 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม

4.4.5.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อต่อการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ดังภาพที่ 4.14 แสดงกลุ่มหมูส้มที่หมักโดยธรรมชาติ (ควบคุม) กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ทางการค้า TISTR 543 และสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ KL1012C2 โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มทดลองมีแนวโน้มมีค่าการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยทุกกลุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 ของกระบวนการหมักโดยมีค่าในช่วง 1.54 - 2.35 โดยกลุ่มเติมกล้าเชื้อ KL1012C2 มีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) ในขณะที่กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 มีค่าการสูญเสียน้ำหนักที่ต่ำสุด ($P<0.05$) และ ณ วันที่ 2 ของกระบวนการหมักพบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักระหว่างกระบวนการหมักที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8.39, 7.53 และ 8.06 ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ และทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติในวันที่ 3, 4, 6 และ 7 ของกระบวนการหมัก ($P>0.05$) โดยแสดงข้อมูลในตารางภาคผนวกที่ จ6 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติโดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดและค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ที่ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น อันส่งผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน ด้วยเหตุนี้จึงเกิดการสูญเสียปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก (Visessanguan *et al.* 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

4.4.5.2 การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อค่าสีในระหว่างกระบวนการหมัก

ดังภาพที่ 4.15 แสดงการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อค่าสีในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยหมักแบบธรรมชาติ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 โดยพบว่า ผลิตภัณฑ์หมูส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 มีค่าความสว่าง (L*) สูงสุดในวันที่ 1 และ 2 ของกระบวนการหมัก ($P<0.05$) และ ณ วันที่ 3 ของกระบวนการหมักพบว่าหมูส้มทุกกลุ่มมีค่าความสว่างไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 58.50, 58.04 และ 58.58 ในกลุ่มควบคุม กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543 และกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก จ 7) ทั้งนี้สอดคล้องกับ Swetwiwathana *et al.* (2005) ได้รายงานถึง อัตราการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *Pacovis* RCI-47 และกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ *L. salivarius* D4 ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมในขณะที่ค่าความสว่างของแหนมกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงทำให้มีค่าความสว่างที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

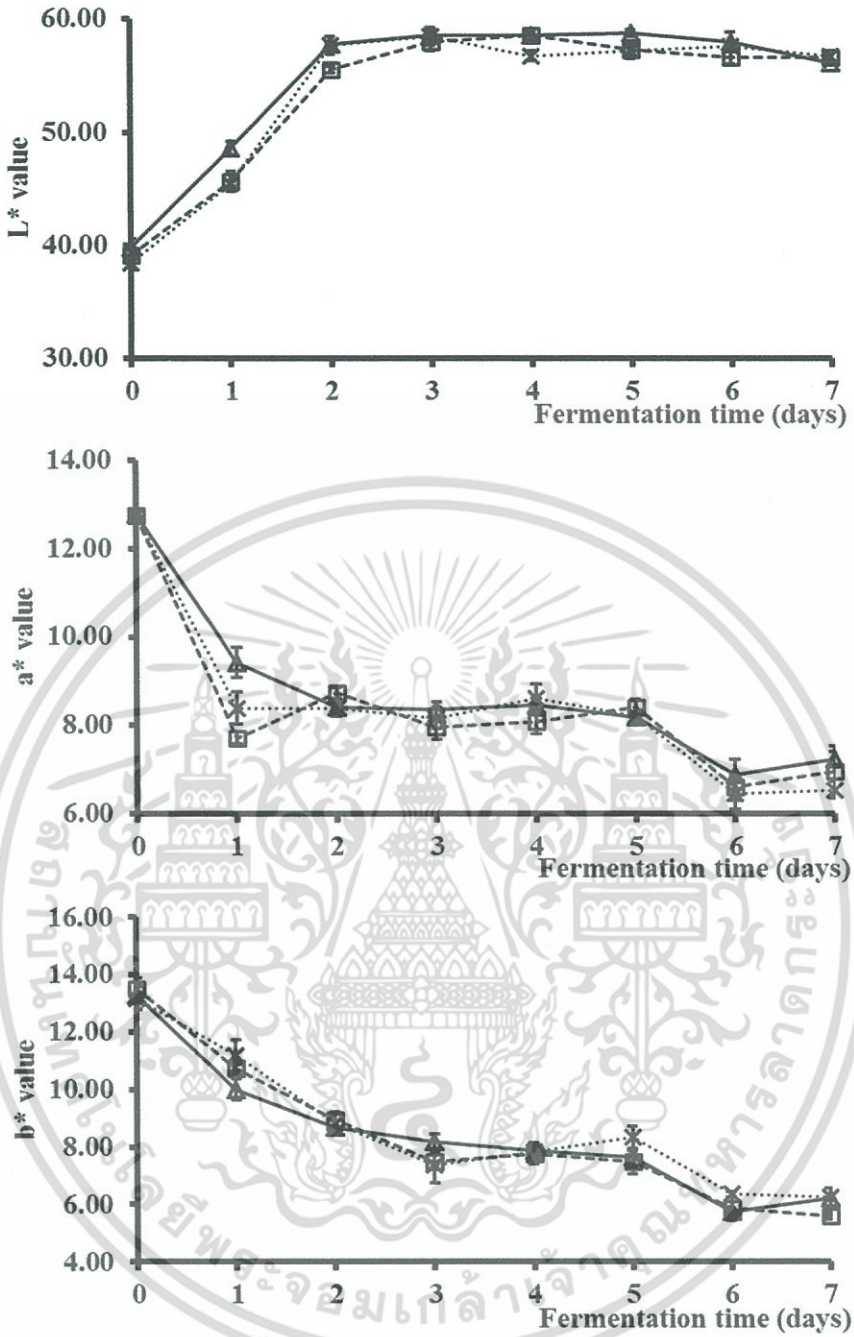
ผลการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*) ดังภาพที่ 4.26ข แสดงให้เห็นว่า ณ วันที่ทำการผลิตผลิตภัณฑ์หมูส้มมีค่าสีแดงในช่วง 12.64 ถึง 12.89 ในขณะที่ภายหลังวันที่ 1 ของกระบวนการหมักทุกกลุ่มทดลองมีค่าสีแดงที่ต่ำ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีค่าสีแดงที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR 543 (ค่าสีแดงของหมูสดเท่ากับ 12.43 ± 0.99) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 9.42, 8.40 และ7.72 ตามลำดับ และภายหลังวันที่ 2 ถึง วันที่ 5 ของกระบวนการหมักพบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 มีแนวโน้มของค่าสีแดงที่คงที่ ในขณะที่กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้าพบว่ามีค่าสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แดงที่ลดลงจาก 8.74 เป็น 7.95 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Visessanguan *et al.* (2004) โดยพบว่าค่าความสว่าง (L*) จะลดลงในระหว่างกระบวนการหมักในช่วง 12 ชั่วโมง และหลังจากนั้นค่าความสว่างจะเพิ่มสูงสุดในช่วง 36 ชั่วโมงของการหมัก (ตารางภาคผนวก จ 8)

การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b*) ดังตารางที่ 4.26ค พบว่า ก่อนกระบวนการหมักหมูส้มทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีเหลืองอยู่ในช่วง 13.18 -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 (ตารางภาคผนวก จ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

4.4.5.3 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH $\leq$ 4.6ในวันที่สองของกระบวนการหมัก)

ดังตารางที่ 4.12 แสดงผลการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ ซึ่งจำแนกกลุ่มทดลองหมูส้ม 3 กลุ่มได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ($P<0.05$) ทั้งนี้ Visessanguan et al. (2004) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมโดยพบว่า เมื่อมีกระบวนการหมักแหนมที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะแข็ง ยืดหยุ่น และเกาะรวมตัวกันเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเหนี่ยวนำของค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงอย่างช้าๆ ส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนกล้ามเนื้อ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งกรดที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกจะเหนี่ยวนำทำให้โปรตีนเกิดเจล (gelation) โดยมีลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นแหนม

ตารางที่ 4.12 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (ค่า pH $\leq$ 4.6)

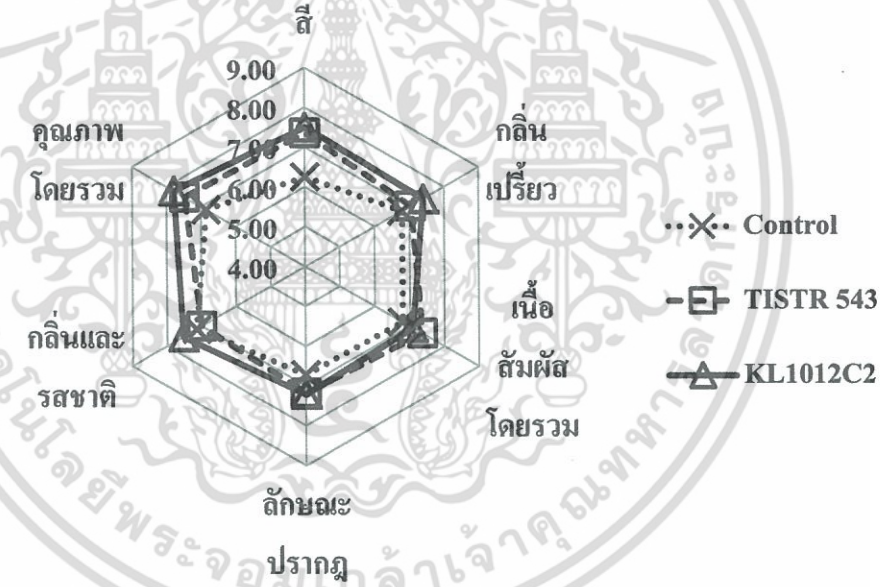
คุณภาพหมูส้ม	กลุ่มควบคุม	กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า TISTR543	กลุ่มเติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2
ลักษณะเนื้อสัมผัส			
- ความแข็ง (N)	27.63 ± 1.62^{c}	34.91 ± 1.46^{b}	37.64 ± 1.79^{a}
- ความเหนียวคล้ายยาง (N)	15.79 ± 0.86^{c}	19.57 ± 1.51^{b}	22.31 ± 1.03^{a}
- ความเคี้ยวได้ (N)	15.77 ± 0.87^{c}	19.58 ± 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 ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.6 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

จากผลการศึกษาผลการเติมกล้าเชื้อต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH $\leq$ 4.6) ดังภาพที่ 4.16 แสดงผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสแบบวิเคราะห์รายละเอียดเชิงปริมาณ ด้านสี ด้านกลิ่นเปรี้ยว ด้านเนื้อสัมผัสโดยรวม ด้านลักษณะปรากฏ ด้านกลิ่นและรสชาติ และด้านคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์หมูส้ม ณ วันที่กระบวนการหมักสมบูรณ์ (pH $\leq$ 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 มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่แข็งและมีเนื้อสัมผัสแน่นกว่า กลุ่มเติมกล้าเชื้อทางการค้า ($P<0.05$) ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะเนื้อสัมผัสที่กล่าวมาข้างต้น โดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่งผลต่อค่าการยอมรับของผู้บริโภคทางด้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสาทสัมผัสเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) 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 ซึ่งแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดอะมิโนอิสระ เป็นผลจากการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อ และกลิ่นเกิดจากอนุพันธ์ของสารประกอบระเหยได้ อีกทั้ง Hierro *et al.* (1999) พบว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จัดเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเนื้อสัตว์โดยมีบทบาทอย่างมากต่อการสร้างกลิ่น (flavor)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 และ *E. coli* *S. aureus* และยีสต์รา และคุณภาพทางเคมีระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มทดลองมีแนวโน้มมีค่าเปอร์เซ็นต์ของน้ำที่ออกมาระหว่างกระบวนการหมักที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งส่งผลต่อค่าสีของผลิตภัณฑ์หมูส้ม โดยการเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b*) ลดลง ($P<0.05$) 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เพื่อให้ทราบถึงอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์หมูส้มที่แน่ชัด จึงควรทดสอบความสามารถในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

5.2.2 แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท KL1012C2 ที่คัดเลือกได้จัดเป็นสายพันธุ์ *L. plantarum* strain LY-78 ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์แหนมที่ไม่มีฉลาก

5.2.3 แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาสามารถประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก และรวมถึงอาหารหมักต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 แบคทีริออลโจ.** 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมใจ ศิริโภค ประวัติ อังประภาพรชัย ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. "การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้." **ว. วิทยาศาสตร์ 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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/ucm071429.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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. "Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **J. Biochem.** 84 : 577-592.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	2.00 กรัม
	sodium thiosulfate	5.00 กรัม
	ammonium iron(III) citrate	1.50 กรัม
	bile salt mixture	2.00 กรัม
	bromothymol blue	0.05 กรัม
	acidic fuchsin	0.08 กรัม
	agar-agar	13.50 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.70 ± 0.20 จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 จากนั้นต้มหรือให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความร้อนจนเดือดเพื่อการละลายที่สมบูรณ์ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 องศากับแนวนอน (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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 จากนั้นต้มหรือให้ความร้อนจนเดือด เพื่อการละลายที่สมบูรณ์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.40 ± 0.20 จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

1.2 สารละลายเอทานอล 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ในน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน โดยใช้ 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 มิลลิลิตร โดยใช้ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สาร Sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้น 10%

SDS	10.00	กรัม
Deionized water	90.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 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 มิลลิลิตร โดยใช้ 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 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 สาร Destaining solution

ethanol	300	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 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, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 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}

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 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}

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

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

ตารางภาคผนวกที่ 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}

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 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}

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

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

ตารางภาคผนวกที่ 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}

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ จ8 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าสีแดง (a*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม 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}

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

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

ตารางภาคผนวกที่ จ9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่าสีเหลือง (b*) ในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์หมูส้มโดยกลุ่มควบคุม 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}

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

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

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

แบบประเมินความพึงพอใจต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์หมูส้ม

วันที่.....

ลำดับที่.....

ตอนที่ 1 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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			

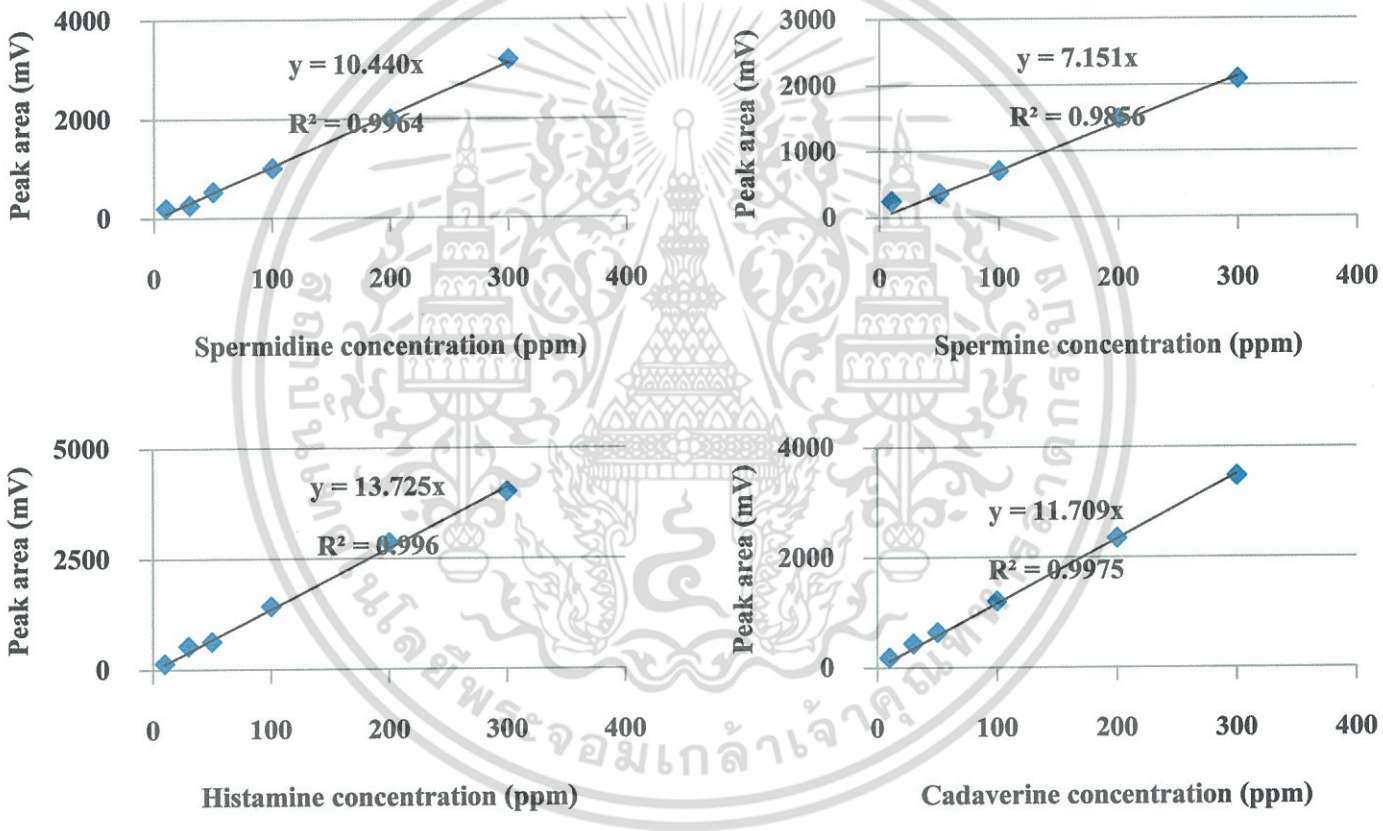
ความคิดเห็นเพิ่มเติม.....

.....

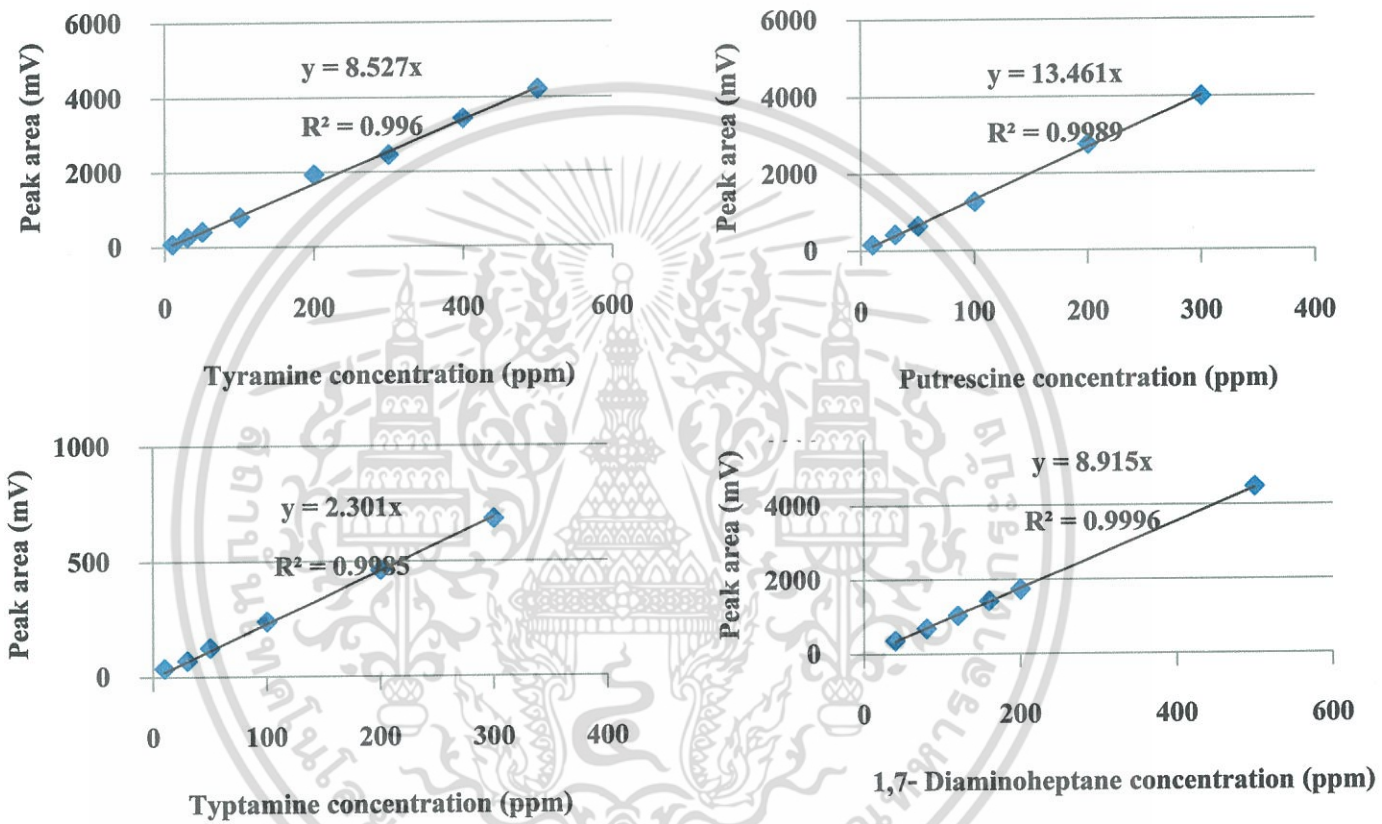
.....ขอบคุณที่กรุณาสละเวลาอันมีค่า ☺

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

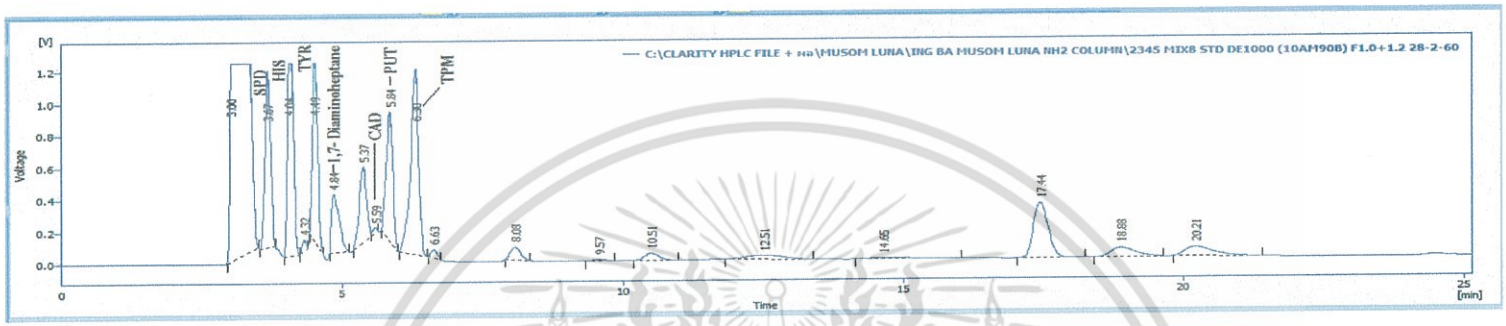
ภาคผนวก ช



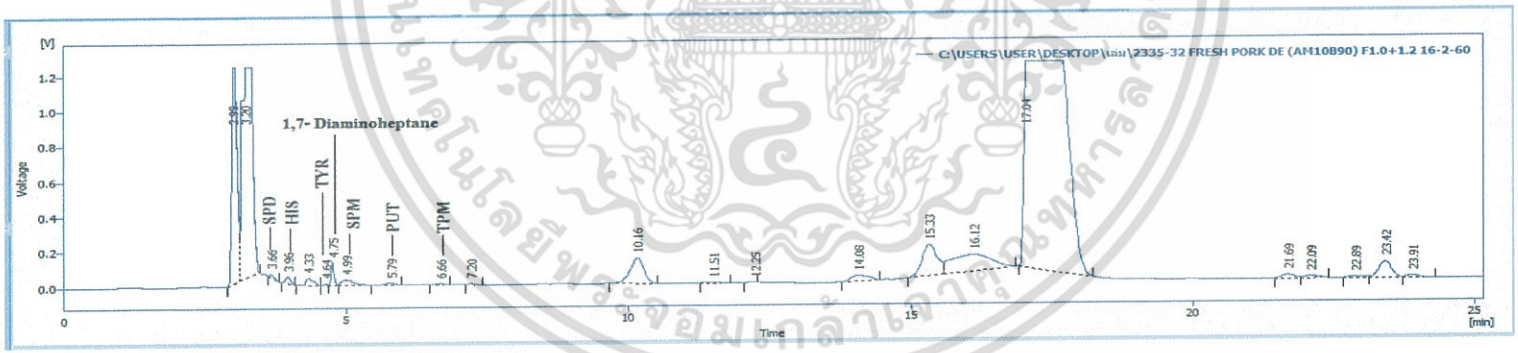
ภาคผนวกที่ ช1 กราฟมาตรฐานของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (spermidine, spermine, histamine และ cadaverine)



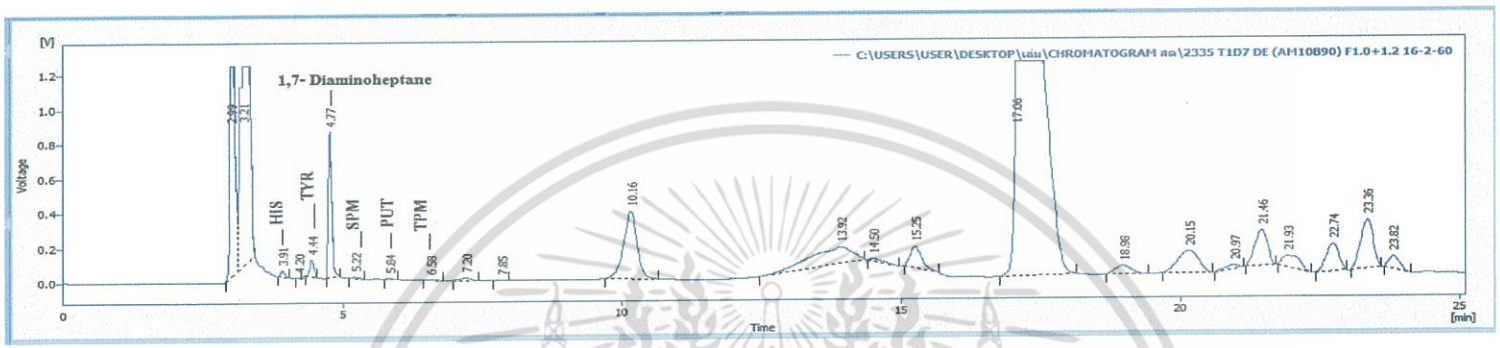
ภาคผนวกที่ ช2 กราฟมาตรฐานของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (Tyramine, Putrescine, Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



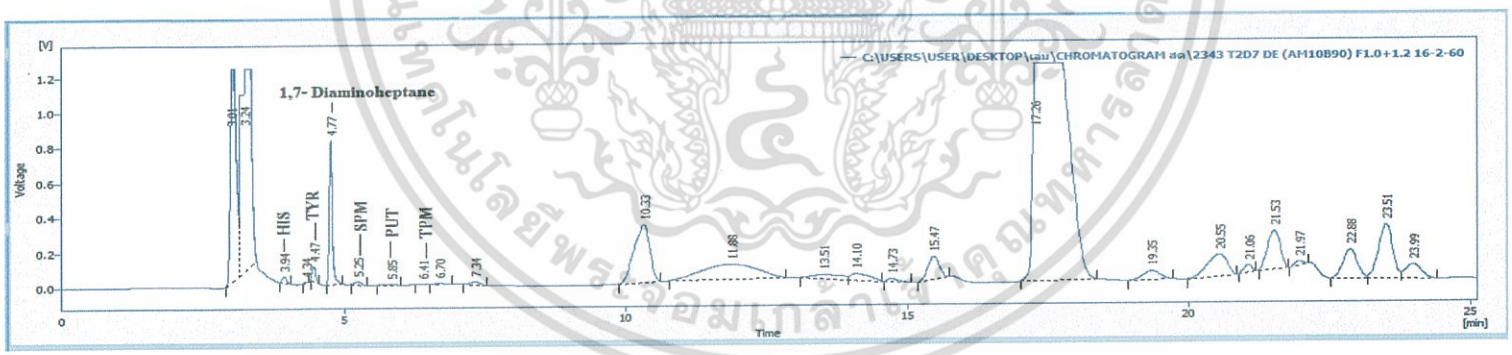
ภาพที่ ช3 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนมาตรฐาน 7 ชนิด (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, CAD-Cadaverine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



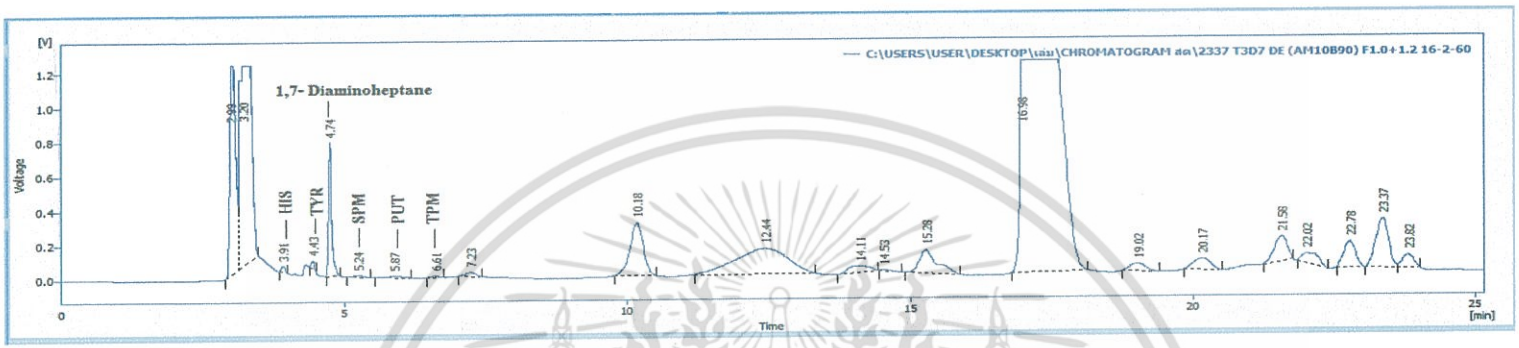
ภาพที่ ช4 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีนที่พบในเนื้อหมูสด (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane)



ภาพที่ ช3 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane) ที่พบในผลิตภัณฑ์หมูส้ม (หมักธรรมชาติ) ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมัก



ภาพที่ ช4 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 ช5 โครมาโตแกรมของสารประกอบไบโอเจนิกเอมีน (SPM-Spermidine, HIS-Histamine, TYR-Tyramine, PUT-Putrescine และ TPM-Tryptamine) และสาร Internal standard (1,7- diaminoheptane) ที่พบในผลิตภัณฑ์หมูสับที่เติมกล้าเชื้อไอโซเลท KL1012C2 ณ วันที่ 7 ของกระบวนการหมัก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายจิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์
วัน เดือน ปีเกิด	27 มีนาคม 2535
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 1/8 -9 ซ.2 โรงเรียนเทศบาล 4 ถ. จักกะพาก ต. ปากน้ำ อ. เมืองสมุทรปราการ จ. สมุทรปราการ 10270
ประวัติการศึกษา	2553 โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สวนกุหลาบวิทยาลัย สมุทรปราการ 2556 หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับสอง) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Nithisantawakhupt, J., TANGWATCHARIN, P. and SUKSUPATH, K. 2015. "Screening of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Meat Products." 357-360. *In* Proceedings of the 2th International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015). Chonburi : Thailand. 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. ผุสดี ตังวัชรินทร์, จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์ และกานต์ สุขสุแพทย์. 2559. "การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก." วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 34 (2) : 67-76.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (รหัสโครงการ 2559-01-04-006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้