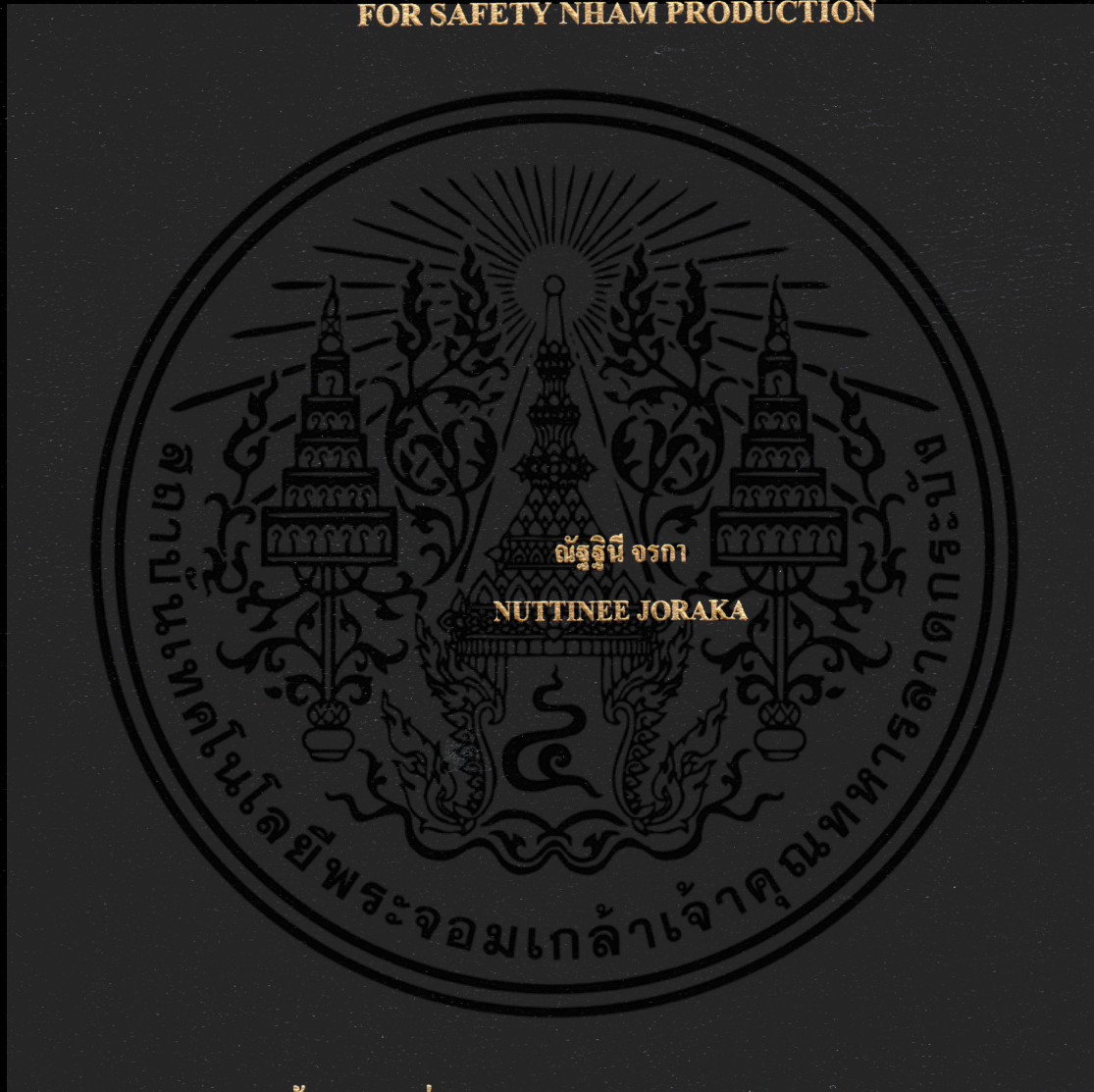


ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR536  
ต่อการผลิตแหนมปลอดภัย

EFFICIENCY OF *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 AS STARTER  
FOR SAFETY NHAM PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-289

ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR536  
ต่อการผลิตแหนมปลอดภัย

EFFICIENCY OF *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 AS STARTER  
FOR SAFETY NHAM PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-289

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**EFFICIENCY OF *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 AS STARTER  
FOR SAFETY NHAM PRODUCTION**



**NUTTINEE JORAKA**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT  
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2017**

**KMITL-2017-AI-M-054-289**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2017**

**FACULTY OF AGRO-INDUSTRY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 ต่อการผลิตหมม  
ปลอดภัย  
EFFICIENCY OF *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 AS STARTER FOR  
SAFETY NHAM PRODUCTION

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐฉิณี จรกา  
รหัสประจำตัว 57608044  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
ผศ.ดร.โสธยา เกิดพิบูลย์	
รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบุลย์	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 8 ธันวาคม 2560 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรคม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 22 เดือน ต.ค พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของกล้ำเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR536 ต่อการผลิตแทนมปลอดคภัย
นักศึกษา	นางสาวณัฐินี จรกา
รหัสประจำตัว	57608044
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่ม pediocin PA-1 เพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อในการผลิตแทนมให้โรงงานในกลุ่มผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทย โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast Peptone (GYP) และ de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) ที่สภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และแบบสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียแลคติกและการผลิตกรดแลคติกพบว่าการเจริญของเซลล์แบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว GYP มีการเจริญสูงกว่าในอาหารเหลว MRS โดยการเจริญของเซลล์ภายใต้สภาวะเขย่าและสภาวะนิ่งในอาหารเหลว MRS เท่ากับ  $6.23 \pm 0.18$  และ  $11.70 \pm 0.11$  log cfu/ml ขณะที่การเจริญในสภาวะดังกล่าวในอาหารเหลว GYP เท่ากับ  $12.00 \pm 0.00$  และ  $12.72 \pm 0.00$  log cfu/ml ตามลำดับ สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันโดยสภาวะเขย่าและสภาวะนิ่งไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ดังนั้น จากผลการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้ำเชื้อให้กับโรงงาน เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิต pediocin PA-1 ดังกล่าวมาศึกษาการผลิตไบโจีนิกเอมีนโดยศึกษาร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ อีก 6 สายพันธุ์ คือ *P. pentosaceus* M13 แยกได้จากหม่า (ผลิต pediocin PA-1), *Lactobacillus plantarum* KMITL-QU54 แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (ผลิต pediocin like bacteriocin), *Lb. plantarum* SS7 แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (ผลิต plantaricin W), *Lb. plantarum* NF38 แยกได้จากแทนมปลา (ผลิต plantaricin W), *Lactococcus lactis* N12 แยกได้จากขนมจีน (ผลิต nisin Z) และ *Weisella cibaria* KMITL-QU 21 แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (ผลิต bacteriocin-like) โดยใช้อาหาร Improved medium agar ที่เติมกรดอะมิโน ไทโรซีน ฮีสทิดีนไลซีน และ ออร์นิติน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 7 สาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ พบเชื้อที่มีแนวโน้มการสร้างไบโอจีนิกเอมีนเพียง 5 สายพันธุ์ คือ *W. cibaria* KMITL- QU21 มีการสร้างไทรามิน คาตาเวอริน ฮิสตามีน และพูทรีซิน ส่วน *Lb. plantarum* SS7, *Lb. plantalum* KMITL- QU54 และ *P. pentosaceus* M13 พบการสร้างไทรามิน ในขณะที่ *Lc. lactis* N12 สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดคาตาเวอรินได้ และ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *Lb. plantalum* NF38 ไม่มีแนวโน้มในการสร้างไบโอจีนิกเอมีน ดังนั้น จึงนำแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิตแบคทีริโอซินแต่ไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีน มาทำการศึกษา ยืนยันความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีน (*W. cibaria* KMITL QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 ) ในแบบจำลองการหมักแหมม (Nham Model Broth) เพื่อศึกษาการสร้างและยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีน พบว่า ในแบบจำลองการหมักแหมม เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536, *W. cibaria* KMITL QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดไทรามินเพียงชนิดเดียว แต่เมื่อนำเชื้อผสมมาทำการหมักในแบบจำลองการหมักแหมม พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 มีแนวโน้มที่จะลดการสร้างไทรามินของเชื้อ *Lc. bervis* BCC 26756 ได้ แต่ *P. pentosaceus* TISTR536 ไม่สามารถยับยั้งการสร้างไทรามินของเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 ได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยวิธีการวัดค่าพีเอชในแบบจำลองการหมักแหมม พบว่า แบคทีเรียแลคติกของทุกกรดอะมีโนมีแนวโน้มของค่าพีเอชลดลง เมื่อทำการหมักครบ 7 วัน และจากการตรวจสอบปริมาณการสร้างและยับยั้งสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดไทรามินเชิงปริมาณของเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 โดยใช้ค่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ปริมาณไทรามินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ลดลงจาก 2.24 mg/L หลังจากหมักรูปแบบจำลองแหมมไป 1 วัน ลงมาเหลือ เท่ากับ 1.45 mg/L หลังจากหมักรูปแบบจำลองแหมมไป 3 วัน ซึ่งปริมาณไทรามินที่ตรวจพบดังกล่าว ถือว่าน้อยมากไม่ส่งผลให้เกิดอันตรายถ้ามีการหมักในตัวอย่างแหมมจริง ในขณะที่เชื้อ *W. cibaria* KMITL-QU21 พบปริมาณไทรามินสูง เท่ากับ 573.26 mg/L หลังจากหมักรูปแบบจำลองแหมมไป 1 วัน และเหลือ 555.57 mg/L หลังจากหมักรูปแบบจำลองแหมมไป 3 วัน ส่วน *Lc. bervis* BCC 26756 พบปริมาณไทรามินของการหมักวันที่ 1 และวันที่ 2 เท่ากับ 2.05 และ 1.56 mg/L แต่เมื่อหมักครบ 3 วัน ไม่พบปริมาณของไทรามิน เมื่อนำแบบจำลองแหมมที่มีเชื้อผสมของ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 ไปทำการวิเคราะห์ พบปริมาณไทรามิน เท่ากับ 557.26 mg/L เมื่อทำการหมักครบ 3 วัน จะเห็นได้ว่าปริมาณของไทรามินในหลอดเชื้อผสมไม่สามารถยับยั้งการสร้างสารไบโอจีนิกของเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 ส่วนในแบบจำลองที่มีเชื้อผสมของ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 เมื่อทำการหมักครบ 3 วัน มีแนวโน้มปริมาณของไทรามินลดลงจนไม่พบไทรามิน เมื่อนำ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิต pediocin PA-1 ไปใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตแหมมตามสูตรของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริษัท ไทยอินโนฟูด จำกัด โดยทำการเปรียบเทียบการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกกับการหมักแหนมตามธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ระยะเวลาการหมัก 0 วัน และ 3 วัน เพื่อดูแนวโน้มการสร้างกรดแลคติก การลดลงของฟิเอช และการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งก่อนและหลังการหมักแหนม พบว่า แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก มีการสร้างกรดแลคติกและการลดลงของค่าฟิเอชมากกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการผลิตแหนมสามารถลดปริมาณของเชื้อซัลโมเนลลาได้ โดยแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกของการหมัก 0 วัน ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมดทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) ส่วนแหนมที่ทำการหมักครบ 3 วัน ที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา แต่แหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกของการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมมีผลดีต่อการหมักและทำให้ผลิตภัณฑ์แหนมมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis</b>	EFFICIENCY OF <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR536 AS STARTER FOR SAFETY NHAM PRODUCTION
<b>Student</b>	Miss. Nuttinee Joraka
<b>Student ID.</b>	57608044
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Food Safety Management
<b>Year</b>	2017
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof.Dr.Adisorn Swetwiwathana

### ABSTRACT

The optimum conditions for growth of *Pediococcus pentosaceus* TISIR 536, which was used as an active starter for traditional fermented meat product (Nham), were performed by cultivating in de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) and Glucose Yeast Peptone (GYP) media under 30°C for 24 h in the shaking condition at 100 rpm and the growth of the strain was compared to the broths incubated under the static condition. The culture supernatants were examined for cell growth and lactic acid production. It was observed that cells grew in GYP broth which demonstrated a higher growth when compared to MRS broth. Cells viability under shaking and static conditions in MRS were  $6.23 \pm 0.18$  และ  $11.70 \pm 0.11$  log cfu/ml, while growing in those conditions in GYP were  $12 \pm 0.00$  และ  $12.72 \pm 0.00$  log cfu/ml, respectively. The different cultivation conditions using shaking and static conditions did not have a significant effect on lactic acid production. However, the media formula seemed to be a more important parameter. The higher lactic acid concentrations were shown when using MRS medium in both shaking and static conditions compared to GYP medium. The less acid concentrations in GYP medium may generate a lower toxic to the cells and resulted in higher cell viability. The results indicated that *P. pentosaceus* TISIR 536 grew in GYP medium without shaking might be the optimum conditions for further process development of an active starter production for traditional Thai fermented meat product. The study of biogenic amine (BA) of this pediocin PA-1 producing lactic acid bacteria (LAB) strain isolated from traditional Thai fermented meat products was performed using the Improve medium plate contains each 0.1% amino acids (Tyrosine, Histidine, Lysine, or Ornithine), 0.005% pyridoxal-5-phosphate and 0.006% brom cresol purple under anaerobic conditions at

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

37°C for 4 days compared to others 6 strains of bacteriocin-producing LAB isolated from various traditional Thai fermented products (pediocin PA-1 producing *P. pentosaceus* M13 isolated from Mum - traditional Thai fermented beef; pediocin like bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* KMITL-QU 54 isolated from Saikrog Isan - traditional Thai fermented meat rice sausage; plantaricin producing *Lb. plantarum* SS7 isolated from Saikrog Isan; plantaricin producing *Lb. plantarum* isolated from Nham-pla – traditional Thai fermented fish; nisin Z producing *Lactococcus lactis* N10 isolated from Kanom-jeen – traditional Thai fermented rice noodle and unidentified bacteriocin producing *Weisella cibaria* KMITL-QU 21 isolated from Saikrog Isan). The results informed that among 7 studied strains of LAB, 5 strains were found to produce BA. Most BA producing strains could produce BA only from tyrosine, only *W. cibaria* KMITL-QU 21 could possible produce BA from all studied amino acids. *Lb. plantarum* SS7, *Lb. plantarum* KMITL-QU54 and *P. pentosaceus* M13 were implied to produce tyramine and *Lc. lactis* N12 were implied to produce cadaverine. *P. pentosaceus* TISTR 536 and *Lb. plantarum* NF38 were the strains that showed no BA production from all studied amino acids. Therefore, both of these strains can be further used as starter cultures to improve the quality and safety of traditional Thai fermented meat products. When pediocin PA-1 producing *P. pentosaceus* TISTR 536 which implied no BA production was studied for the trend of BA formation and inhibition of BA production from *W. cibaria* KMITL-QU 21 and *Lc. brevis* BCC 26756 during fermentation in Nham model broth (NMB), the study revealed that all studied strains including *P. pentosaceus* TISTR 536 could produce Tyramine. When compared the results of quantitative BA production by HPLC analysis. The results showed that *P. pentosaceus* TISTR536 were found to produce BA with a low amount of 2.24 mg/L after 1 day of NMB fermentation and reduced to be 1.45 mg/L after 3 day of fermentation. *W. cibaria* KMITL-QU 21 implied to produce the highest levels of tyramine (573.26 mg/L) after 1 day of NMB fermentation and reduced to 555.57 mg/L after 3 days of fermentation, while *Lc. berrvis* BCC 26756 were found to produce tyramine (2.05 and 1.56 mg / L) after NMB fermentation for 1 and 2 days respectively. But after 3 days of fermentation no BA production. When the mixed cultures of *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter with *W. cibaria* KMITL-QU21 in NMB and left to ferment for 3 days was performed and investigated for BA production, the results informed that after 3 days of NMB fermentation tyramine still available in the broth for 557.26 mg/L. The mixed cultures of *P. pentosaceus* TISTR 536 and *Lc. berrvis* BCC 26756 after 3 days of NMB fermentation were implied no tyramine production. These studied

results revealed that using *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter in NMB showed no effect on the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

growth and tyramine production of *W. cibaria* KMITL- QU21, but it was revealed to exhibit the effect on *Lc. berris* BCC 26756 in NMB. The chemical and microbiological properties of Nham, Thai traditional fermented meat, produced by using pediocin PA-1 producing *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter culture were investigated and compared to naturally fermented Nham without starter culture. The fermentation of both products duration 0 and 3 days were determined for lactic acid concentrations, pH, water activities, moisture content, growth of LAB and *Salmonella* during fermentation. The results revealed that Nham fermented with starter culture showed a higher acid content after 3 days which led to decrease the pH more rapidly than Nham produced without starter, while water activity, moisture content and the growth of total lactic acid bacteria showed no difference. After 3 days of fermentation, Nham with starter culture implied to diminish all contaminated *Salmonella* which found 100% from the mixture of Nham before leading to ferment (0 day), while Nham without starter could diminish the contaminated *Salmonella* only 50 % from the 6 batches of Nham products. Thus, this study can be concluded that the use of *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter for Nham fermentation can enhance the safety production of this product.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความช่วยเหลือคำปรึกษา และให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลในการจัดทำมาโดยตลอด ตลอดจนการแก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ที่ได้ให้คำแนะนำในการทำการทดลองจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ ผศ.ดร.โสธยา เกิดพิบูลย์ และ รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำ เสนอแนะข้อคิดดีๆ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัท ไทยอินโนฟูด จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

และสุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า พ่อ แม่ พี่น้องของข้าพเจ้า เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้กำลังใจข้าพเจ้าโดยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณัฐินี จรกา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	IV
กิตติกรรมประกาศ.....	VII
สารบัญ.....	VIII
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญภาพ.....	XIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แหนม (Nham).....	4
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแหนม.....	4
2.1.2 กระบวนการผลิตแหนม.....	5
2.1.3 เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.....	6
2.1.4 โซเดียมไนไตรท์.....	6
2.1.5 แบบจำลองการหมักแหนม.....	7
2.1.6 เกณฑ์คุณภาพของแหนม.....	8
2.2 ซัลโมเนลลา ( <i>Salmonella</i> ).....	11
2.2.1 ลักษณะของซัลโมเนลลา.....	11
2.2.2 การจัดแบ่งเชื้อซัลโมเนลลา.....	12
2.2.3 การจัดแบ่งเชื้อซัลโมเนลลาตามหลักการระบาดวิทยา.....	13
2.2.4 การเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา.....	13
2.2.5 แหล่งที่มาของซัลโมเนลลา.....	14
2.2.6 ซัลโมเนลลาที่ทำให้เกิดโรค.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.7 โรคซัลโมเนลโลซิส (Salmomellosis).....	15
2.3 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria).....	16
2.3.1 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก.....	17
2.3.2 การใช้แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....	20
2.3.3 เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก.....	22
2.3.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์หมัก.....	23
2.4 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins).....	24
2.4.1 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก.....	25
2.4.2 กระบวนการผลิตแบคเทอริโอซิน.....	26
2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน.....	26
2.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน.....	27
2.5 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines; BAs).....	31
2.5.1 อาหารหมักที่มีสารไบโอจีนิกเอมีน.....	32
2.5.2 การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก.....	33
2.5.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไบโอจีนิกเอมีน.....	34
2.5.4 พิษของไบโอจีนิกเอมีน.....	35
2.5.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไบโอเจนิคเอมีน.....	36
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง.....	41
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	41
3.2 ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์.....	41
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	41
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี.....	42
3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	42
3.4.2 สารเคมี.....	43
3.5 สถานที่ทำการทดลอง.....	44
3.6 ระยะเวลาการทดลอง.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	44
3.7.1 การเปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดอาหารเหลวและสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและแบบนิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก.....	44
3.7.2 การศึกษาการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน.....	45
3.7.3 ตรวจสอบการยับยั้งการสร้างไบโอจินิกเอมีนของ <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักแหนม .....	46
3.7.4 ตรวจสอบยืนยันการสร้างไบโอจินิกเอมีนของ <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักแหนมโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC.....	47
3.7.5 ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 ในการผลิตแหนม.....	48
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....</b>	<b>50</b>
4.1 ผลการเปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดอาหารเหลว และสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและแบบนิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก.....	50
4.1.1 การเติบโตของของแบคทีเรียแลคติก.....	50
4.1.2 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536.....	51
4.1.3 อิทธิพลของชนิดอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตแลคติกและความเป็นกรด-ด่าง ของ <i>P.pentosaceus</i> TISTR536.....	56
4.1.4 ผลการเจริญของแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536.....	57
4.1.5 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536.....	58
4.1.6 การผลิตกรดแลคติกและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536.....	59
4.2 การตรวจสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีนของเชื้อแบคทีเรียแลคติก.....	62
4.2.1 ผลการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดอะมิโนในอาหารแข็ง Improved medium.....	62
4.2.2 ผลการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดอะมิโนในอาหารเหลว Improved medium.....	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.3 ผลการเปรียบเทียบการตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกที่สร้าง ไบโอดีนิค เอมีนในอาหารแข็งและอาหารเหลว Improved Medium.....	64
4.3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่สร้างไบโอดีนิคเอมีนในแบบจำลองการหมัก แหมม (NMB).....	68
4.4 ผลการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่สร้างไบโอดีนิคเอมีนในอาหารเหลวจำลองการ หมักแหมม โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC.....	70
4.5 ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก <i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 ในระหว่างการ หมักแหมม.....	73
<b>บทที่ 5</b> สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	79
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	79
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	80
บรรณานุกรม.....	82
ภาคผนวก.....	94
ภาคผนวก ก.....	95
ภาคผนวก ข.....	101
ภาคผนวก ค.....	105
ภาคผนวก ง.....	107
ภาคผนวก จ.....	112
ประวัติผู้เขียน.....	113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารอาหารของแบบจำลองของແໜ່ນທີ່ทดแทนในส่วนประกอบของແໜ່ນ.....	7
2.2	เกณฑ์คุณภาพของແໜ່ນทางกายภาพและด้านประสาทสัมผัส.....	8
2.3	เกณฑ์คุณภาพของແໜ່ນทางเคมี.....	8
2.4	เกณฑ์คุณภาพของແໜ່ນทางจุลินทรีย์.....	9
2.5	จำนวนซีโรวาร์ในแต่ละซบปีซี่ส์.....	12
2.6	ปัจจัยด้านอุณหภูมิ พีเอช และวอเตอร์แอกทีวิตี ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา.....	14
2.7	แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มของ Homofermentation.....	18
2.8	แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentation.....	19
2.9	การจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียโอซิโนจากแบคทีเรียแลคติก.....	26
2.10	ไบโอจินิกเอมีนที่พบในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น.....	32
2.11	เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์.....	35
2.12	ไบโอจินิกเอมีนในอาหารและผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย.....	37
4.1	แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium	63
4.2	ผลเปรียบเทียบการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง และอาหารเหลว Improved medium .....	67
4.3	ผลการยับยั้งการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองการหมักແໜ່ນ (NMB).....	69
4.4	ผลการยับยั้งการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารจำลองการหมักของແໜ່ນเชิงปริมาณ โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC.....	72
4.5	ปริมาณแบคทีเรียแลคติก เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และพีเอชของແໜ່ນที่มีการใช้กล้าเชื้อ และไม่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก.....	75
4.6	ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการลดลงของซัลโมเนลลาของແໜ່ນที่มีการใช้ และไม่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก.....	76
4.7	กลุ่มเชื้อซัลโมเนลลาในແໜ່ນที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก.....	77
4.8	ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของແໜ່ນที่ผลิตจากโรงงาน โดยเปรียบเทียบการหมักระหว่างใช้และไม่ใช้กล้าเชื้อ <i>Pediococcus pentocaceus</i> TISTR 536.....	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	5
2.2	11
2.3	18
2.4	19
2.5	20
2.6	29
2.7	31
2.8	34
4.1	53
4.2	54
4.3	55
4.4	56
4.5	57
4.6	60
4.7	61
4.8	61
4.9	66
4.10	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของไทยที่พบว่ามีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา (อดิศร และนภา, 2534; อดิศร และอรุณ, 2539; อดิศร และคณะ, 2537) เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ เช่น เนื้อหมู มักพบว่ามีสารปนเปื้อนจากเชื้อดังกล่าวอยู่ในปริมาณสูงเนื่องจากการฆ่าและการผ่าซากที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (Isaacson และคณะ, 1999; Fedorka-Cray และคณะ, 1995) การทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์มักอาศัยองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์แหนม เช่น เกลือ กระเทียม วัตถุเจือปน (ไนไตรท์/ไนเตรท) จุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก ที่มีผลในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ไปเป็นกรดแลคติกมีผลยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในแหนมได้ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการหมักเพื่อให้ได้แหนมที่มีความเป็นกรดสูงและมีค่าพีเอชต่ำ ซึ่งการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนมจะมีประสิทธิภาพดีขึ้นได้โดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ (starter cultures) ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากในกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกจะได้สารที่มีผลต่อการพัฒนา กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารหมัก (วิลาวณิชย์, 2543) และช่วยให้ลดระยะเวลาในการหมัก (อดิศร, 2553; Swetwivathana และคณะ, 1999) ขณะเดียวกันแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนที่ทำให้เกิดโทษต่อมนุษย์และสัตว์ได้ (Silla, 1996; Shalaby, 1996)

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ มีคุณสมบัติเป็นเบส น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Arena และ Manca, 2001) ทนความร้อน (Shakila และคณะ, 2001) เกิดจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลสกรดอะมิโนตั้งต้นให้เป็นไบโอจีนิกเอมีน เช่น ไทโรซีนเปลี่ยนเป็นไทรามิน ฮิสทีดีนเปลี่ยนเป็นฮิสตามีน เป็นต้น พบมากในอาหารหมัก เช่น เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ไวน์ เป็นต้น (Gonzalez และคณะ, 1998) ซึ่งในเนื้อสัตว์จะพบ คาดาวาริน พิวเทรสซิน ไทรามิน ซึ่งสารนี้มีโทษกับผู้บริโภค ถ้าผู้บริโภคได้รับสารนี้เข้าไปจะทำให้เกิดอาการแพ้ทางระบบประสาท ทางผิวหนัง และระบบทางเดินอาหาร (Pereira และคณะ, 2001)

หลายปีที่ผ่านมา มีผู้ศึกษาวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย (Lotong และ Swetwivathana, 1990) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมใช้ในการผลิตเป็นกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ของไทยให้มีคุณภาพสูงขึ้น โดยมุ่งเน้นถึงการยอมรับรสชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะปรากฏ หลังการใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้ เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์หมักและที่สำคัญ คือ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน (Swetwivathana และคณะ, 2003) ซึ่งมุ่งเน้นการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในระหว่างการหมัก โดยมีวัตถุประสงค์ในการใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์หมักที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค Swetwivathana และคณะ (2003) ได้ศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติกในหมักนมพบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 14 สายพันธุ์ สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ โดย 6 สายพันธุ์ คือ *Lactococcus lactis* N10, *Lc. lactis* N3, *Lc. lactis* N60, *Lc. Lactis* N100, *Lc. lactis* N190 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 เป็นสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่เป็นอินดิเคเตอร์ได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ *Lc. lactis* N100 และ *Lc. lactis* N190 ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* ได้ดี นอกจากนี้ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* และ *E. coli*

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกจึงได้เข้ามามีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีกลิ่น และลักษณะอาหารที่ดี โดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ ได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลหรือสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรดแลคติก (ศิริพัฒน์, 2539) ในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองใช้ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม Pediocin PA-1 ซึ่งคัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์หมักนม (Swetwivathana, 2005) เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักหมักนมเพื่อควบคุมคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอรวมถึงศึกษาการลดของสารไบโอจีนิกเอมีนในอาหาร Improved medium และในแบบจำลองของการหมักหมักนม (Nham Model Broth, NMB) เพื่อที่จะได้ข้อมูลจากการศึกษาที่เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมการหมักและช่วยทำให้อาหารหมักมีความปลอดภัย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536

1.2.2 ตรวจสอบการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักไทยในแบบจำลองสภาวะการหมักหมักนม (NMB)

1.2.3 ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ในระหว่างการหมักหมักนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ในอาหารเหลวสองชนิด คือ อาหารเหลว MRS (de Man-Rogosa-Sharpe broth) และ GYP (Glucose Yeast extract Peptone broth) ทั้งในสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและแบบนิ่ง นำกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียชนิดที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ ทดสอบการสร้างและไม่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนในอาหาร Improved medium ทั้งชนิดอาหารแข็งและอาหารเหลว และทำการยืนยันการยับยั้งการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลวจำลองสภาวะการหมักแหม่มโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ High performance liquid chromatography (HPLC) จากนั้นศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ในระหว่างการหมักแหม่มที่มีและไม่มีกรดแลคติกกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยทำการตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี (ปริมาณกรดแลคติกทั้งหมด ค่าพีเอช ค่าความชื้น ค่าวอเตอร์แอกทีวิตี) และทางจุลชีววิทยา คือ ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด และเชื้อซัลโมเนลลาของตัวอย่างแหม่มในระยะเวลาการหมัก 0 และ 3 วัน และทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์แหม่ม

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536
- 1.4.2 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค
- 1.4.3 ทราบผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีการเติมในระหว่างการหมักแหม่มต่อผลิตภัณฑ์แหม่มได้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แหนม (Nham)

#### 2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแหนม

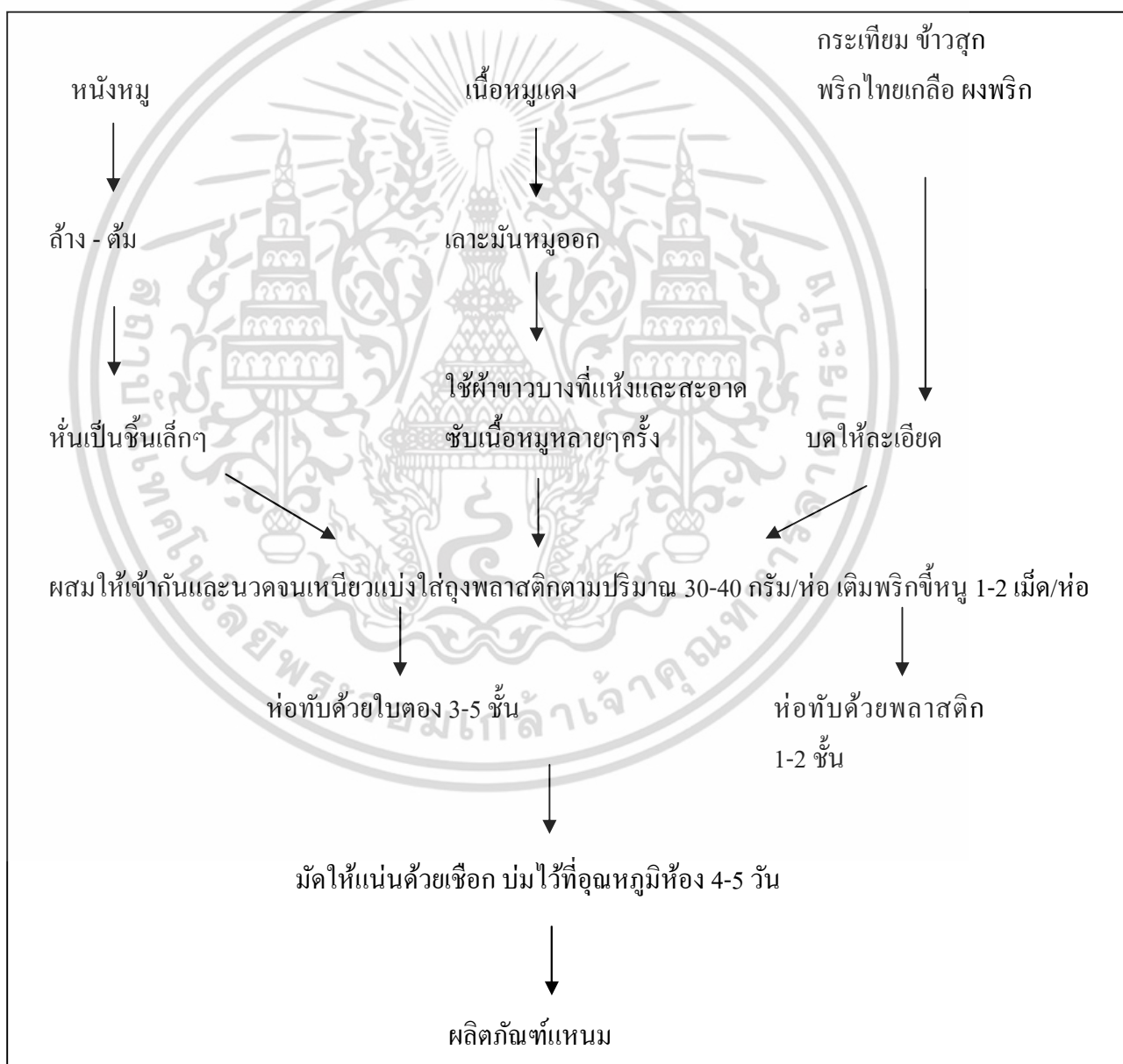
แหนม (Nham) เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพื้นบ้านของไทยที่นิยมบริโภคกันทั่วไปเป็นอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีปริมาณไขมันต่ำผลิตได้จากหมูเนื้อแดงบดละเอียดผสมกับเกลือบริโภคในเตรทและไนไตรท์ข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวสุกกระเทียมจากนั้นคลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปบรรจุโดยห่อด้วยพลาสติกหรือห่อทับด้วยใบตองขนาดของการบรรจุสุดท้ายนำไปหมักในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดสเปรี้ยว (Adams และ Moss, 1995) การหมักแหนมทำได้สองสภาวะคือ การหมักแหนมตามสภาพธรรมชาติ (natural fermentation) เป็นการหมักโดยอาศัยอุณหภูมิของสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นการหมักที่เกิดขึ้นมักไม่คงที่ และการหมักด้วยกล้าเชื้อซึ่งในระหว่างการหมักมีการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (Jay, 1996) ลงในสูตรการผลิตโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมใช้เติมในสูตรการผลิตแหนม ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* (Hammes และ Knaufl, 1994) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากการหมักไส้กรอกเปรี้ยวตามสภาพธรรมชาติแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อพบว่าช่วยในการสร้างกรดซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว และทำให้พีเอชลดลงส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (อรนุช, 2530; อิศร, 2543) ในกระบวนการหมัก นอกเหนือจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของของแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วปัจจัยที่เกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่สำคัญและมีผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักแหนม คือ อุณหภูมิ โดยอุณหภูมิเป็นตัวจำแนกกลุ่มของจุลินทรีย์ ซึ่งจำแนกได้เป็น psychrotropes (มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 2 ถึง 7 องศาเซลเซียส) mesophils (มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส) และ Thermophils (มีอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 43-66 องศาเซลเซียส) (Lawrie, 1995)

Geoffey (1987) ได้กล่าวถึงแหนมว่าเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักกึ่งแห้งที่ผลิตจากเนื้อหมูนำมาสับหรือบดผสมกับหนังหมูมีการเติมข้าวสุกและเครื่องปรุงอื่นๆ ได้แก่กระเทียมพริกไทย บางครั้งมีการเติมพริกทั้งเม็ดห่อให้แน่นด้วยใบตองหรือแผ่นพลาสติกหลังการบรรจุปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน การรับประทานแล้วแต่ความนิยมของผู้บริโภคว่าต้องการทำให้สุกหรือไม่ โดยส่วนใหญ่พบว่า นิยมบริโภคโดยไม่ทำให้สุก รูปแบบของการบริโภคแหนมที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ การปิ้ง ทอด ยำ หรือเป็นส่วนผสมในอาหารอื่นๆ แหนม

เป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้ในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศลาว ประเทศเวียดนาม และประเทศจีน เป็นต้น

### 2.1.2 การผลิตแฮม

กรรมวิธีทั่วไปในการผลิตแฮมประกอบด้วยนำเนื้อหมูมาแล้วเอามันออกให้หมด จากนั้นนำมาสับหรือบดให้ละเอียดอาจใช้ผ้าขาวบางที่แห้งและสะอาดซับหลายๆครั้งเพื่อลดความชื้น เดิมโปแตสเซียมไนเตรท หรือผงพริกลงในเนื้อบดคลุกเคล้าให้เข้ากัน เดิมพริกไทย กระเทียม ข้าวสุกที่บดละเอียด จากนั้นใส่หนังหมูที่ต้มสุกและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆบางๆลงผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนของการผลิตแฮม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการห่อแหมมปริมาณที่ใส่แล้วแต่โรงงานผู้ผลิตเช่นอาจห่อด้วยถุงพลาสติกน้ำหนักประมาณ 30-40 กรัมพร้อมทั้งใส่ฟริกซ์หนูลงไป 1-2 เม็ดเพื่อให้ดูน่ารับประทานหรือห่อให้เป็นรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ยาว 2.5-3.0 นิ้ว สุดท้ายห่อทับด้วยใบตอง 3-5 ชั้น รััดให้แน่นด้วยเชือกเพื่อกำจัดอากาศในห่อ และทำให้เชื้อจุลินทรีย์ทำงานได้ดีที่สุด ซึ่งขั้นตอนการผลิตแสดงดังภาพที่ 2.1

### 2.1.3 เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

เป็นแหล่งอาหารที่มีองค์ประกอบที่สำคัญหลายอย่างได้แก่โปรตีนวิตามิน เกลือแร่ องค์ประกอบของไขมันกรดไขมันอิ่มตัวคลอโรสเตอรอลและเกลือ เนื้อสัตว์จึงเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ การบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีอิทธิพลจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ดึงดูดความสนใจลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส ความปลอดภัย ราคา ความสะดวกในการบริโภค สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง และรายได้ของผู้บริโภค เป็นต้น (Jimenez และคณะ, 2001) ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องมีขั้นตอนการบ่มในระหว่างการผลิตเพื่อให้เกิดกิจกรรมที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์และมีการสร้างสารที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่เฉพาะตัวแม้ว่าโดยทั่วไปเชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งที่ทำความเสียหายในกระบวนการผลิตเนื้อ ดังนั้น ผลิตภัณฑ์เนื้อจึงต้องมีการควบคุมกิจกรรม และปริมาณของจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อไม่ให้ผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหาย (Pearson และ Dutson, 1986) ลักษณะที่จำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกิดขึ้นจากการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกิดได้ทั้งการหมักตามสภาพธรรมชาติ (natural fermentation) ซึ่งเป็นการหมักที่เกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อที่ใช้เป็นวัตถุดิบส่วนผสมอื่นๆ และอาจติดอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต การหมักประเภทนี้พบแบคทีเรียกรดแลคติกค่อนข้างน้อย แต่จะพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อแบคทีเรียชนิดที่พบ และมีประโยชน์ ได้แก่ สกุล *Micrococcus* ส่วนในกระบวนการหมักที่เกิดการสร้างกรดพบว่า ในช่วงแรกของการหมักเกิดจากเชื้อในสกุล *Enterococcus* และในช่วงสุดท้ายของการหมักเกิดจากเชื้อในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* เมื่อมีการหมักเกิดขึ้นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีการผลิตกรดแลคติกมากขึ้น และทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคลดจำนวนลงหรือตายภายใน 2-3 วัน (Varnam และ Sutherland, 1995)

### 2.1.4 โขเทียมไนไตรท์

โขเทียมไนเตรทและไนไตรท์ ช่วยทำให้เกิดสีชมพูหรือชมพูแดง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ไนไตรท์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์ และช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายได้ถึงชีวิต การใช้เกลือไนเตรทมัก

ใช้ร่วมกับเกลือไนไตรท์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงกำหนดให้ใช้เกลือไนไตรท์ในปริมาณไม่เกิน 125 ppm โดยคำนวณปริมาณโซเดียมไนไตรท์และการใช้ในเตรทในผลิตภัณฑ์เนื้ออยู่ที่ปริมาณไม่เกิน 500 ppm. ในประเทศไทยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนแพนมหุม (2548) กำหนดโซเดียมไนไตรท์ ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หากใช้เกินกำหนดจะมีโอกาสเสี่ยงต่อปัญหาของการตกค้างในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากไนไตรท์ที่ตกค้างจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มเอมีนในเนื้อสัตว์ และเปลี่ยนเป็นสารไนโตรซามีน ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ซึ่งสารนี้มักพบในผลิตภัณฑ์เนื้อแบบใช้หมักที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงๆ เช่น การปิ้งหรือการย่าง ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อมีการใช้เกลือไนไตรท์ปริมาณเล็กน้อย (จุฑารัตน์, 2552) นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Micrococcus varians* ในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ เพื่อลดการตกค้างของสาร และเพิ่มสีของผลิตภัณฑ์แพนหม โดยในช่วงแรกของการหมักเชื้อ *M. varians* ทำการรีดิวส์ไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และแพนหมมีค่าความเป็นกรดมาก ไนไตรท์จะสลายตัวเป็นไนตริกออกไซด์ และทำการรีดิวส์รวมตัวกับเมทไมโอโกบิน จะได้ผลิตผลของการออกซิเดชันเป็นไนโตรโซไมโอโกบิน และให้สีชมพูแก่แพนหม สีดังกล่าวเป็นดัชนีวัดคุณภาพของแพนหมว่ามีกลิ่นเหม็นหรือไม่ จากรายงานวิจัยการใช้เชื้อ *Micrococcus varians* ช่วยในการลดการตกค้างได้ดีกว่าการที่ไม่มีการเติมเกลือ (ไพโรจน์ และคณะ, 2538)

#### 2.1.5 แบบจำลองการหมักแพนหม (Nham Model Broth: NMB)

แบบจำลองการหมักแพนหมสามารถทำได้โดยการใช้สารอาหารมาทดแทนส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำแพนหม (ตามตารางที่ 2.1) โดยใช้สารสกัดจากเนื้อทดแทนเนื้อหมู หนังหมูสุก ไม่เป็นปัจจัยในการเจริญของเชื้อ กลูโคสทดแทนข้าวสุก กระทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ ทดแทนกระทียมสด โซเดียมคลอไรด์ทดแทนเกลือ และไนไตรท์หรือไนเตรทต้องกรองฆ่าเชื้อแล้วปรับสภาพการหมักแพนหมให้เหมือนกับการหมักแพนหมจริง

จากตารางที่ 2.1 เติมส่วนผสมประกอบของแบบจำลอง ปรับค่าพีเอช เป็น 6.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และปรับค่าออกเตอร์แอกติวิตี เท่ากับ 0.97 โดยใช้กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น นำไปทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมนิไตรท์ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ และกระทียมสับที่ผ่านการฆ่าเชื้อเททับด้วยน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ตารางที่ 2.1 สารอาหารของแบบจำลองแพนหมที่ทดแทนในส่วนประกอบของแพนหม

ส่วนประกอบของแพนหม		ส่วนประกอบแบบจำลองแพนหม (NMB)	
เนื้อหมู	650 กรัม	เนื้อสกัด (Meat extract)	10 กรัม
หนังหมูสุก	350 กรัม	ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ	
ข้าวสุก	60 กรัม	กลูโคส	10 กรัม

ที่มา : Swetwivathana และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 2.1 สารอาหารของแบบจำลองແໜມທີ່ทดแทนในส่วนประกอบของແໜມ (ต่อ)

ส่วนประกอบของແໜມ		ส่วนประกอบแบบจำลองແໜມ (NMB)	
กระเทียม	50 กรัม	กระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	50 กรัม
เกลือ	25 กรัม	เกลือ หรือ โซเดียมคลอไรด์	25 กรัม
ไนไตรท์/ไนเตรท	125/500 ppm	กรองฆ่าเชื้อในปริมาณที่เท่าเดิม	
กรดแอสคอบิก	0.5 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม	
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต	0.3 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม	

ที่มา : Swetwivathana และคณะ (1999)

### 2.1.6 เกณฑ์คุณภาพของແໜມ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2543) ได้ศึกษาถึงการจัดทำเกณฑ์คุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ແໜມซึ่งจำแนกเป็นด้านต่างๆได้ตามตารางที่ 2.2-2.4

#### ตารางที่ 2.2 เกณฑ์คุณภาพของແໜມทางกายภาพและด้านประสาทสัมผัส

คุณภาพทางกายภาพ	คุณลักษณะที่ต้องการ
ความเปรี้ยว	มีรสเปรี้ยว
สี	มีสีออกชมพู
ความแน่นเนื้อ	มีเนื้อสัมผัสค่อนข้างแน่นเกาะตัวกันดี ไม่ร่วน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่นคาวของเนื้อหมูดิบมีกลิ่นหอมเฉพาะของແໜມ ซึ่งเกิดจากเครื่องเทศที่เติมและการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์

ที่มา: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2543)

#### ตารางที่ 2.3 เกณฑ์คุณภาพของແໜມทางเคมี

คุณภาพทางเคมี	ปริมาณ
ปริมาณน้ำอิสระ (aw)	0.80-0.95
ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.6
โปรตีน (protein)	มากกว่าหรือเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์
ไขมัน (fat)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์
เกลือ (salt)	2-3 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณของไนไตรท์	น้อยกว่า 125 ppm

ที่มา: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 เกณฑ์คุณภาพของແໜ່ນທາງຈຸລິນທຣີຍ໌

คุณภาพทางจุลินทรีย์	ปริมาณที่พบ
<i>Salmonella</i> spp.	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
<i>Escherichia coli</i> 0157 : H7	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
<i>Staphylococcus aureus</i>	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
<i>Clostridium perfringens</i>	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
Fungi	ต้องน้อยกว่า 10 โคลโลนี ต่อตัวตัวอย่าง 1 กรัม
พยาธิ <i>Trichinella spiralis</i> .	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

ที่มา: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2543)

กัลยาณี และคณะ (2553) ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง แหนมจำนวน 20 ตัวอย่าง ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง คือ เดือนกันยายน 2553 ถึง มกราคม 2554 พบว่า ความเป็นกรด-ด่างของແໜ່ນมีค่าอยู่ในช่วง 2.3-6.9 โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำกว่ามาตรฐานของແໜ່ນ (2.3-4.3) กันยายน จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5) ตุลาคม จำนวน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) ธันวาคม จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5) มกราคม จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5) กลุ่มค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้มาตรฐานของແໜ່ນ (4.4-4.6) กันยายน จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10) ตุลาคม จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) พฤศจิกายน จำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25) ธันวาคม จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5) มกราคม จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15) และกลุ่มค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงกว่ามาตรฐานของແໜ່ນ (4.7-6.9) กันยายน จำนวน 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85) ตุลาคม จำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 55) พฤศจิกายน พบจำนวน 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 75) ธันวาคม จำนวน 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) มกราคม จำนวน 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80) การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในແໜ່ນ อยู่ในช่วง 7.0-9.0 log CFU/g ซึ่งทุกตัวอย่างที่สุ่มเก็บในทุกเดือน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกว่าเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โคลิฟอร์ม และฟิคัล โคลิฟอร์มแบคทีเรียพบตัวอย่างที่มีค่าเกินมาตรฐานคิดเป็น ร้อยละในแต่ละเดือน ได้ดังนี้ โคลิฟอร์มแบคทีเรียในเดือนกันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน ธันวาคม และมกราคม คิดเป็นร้อยละ 15, 5, 15, 10 และ 15 ตามลำดับ และฟิคัล โคลิฟอร์มแบคทีเรีย ในเดือนกันยายน ตุลาคม พฤศจิกายน ธันวาคม และมกราคม คิดเป็นร้อยละ 70, 60, 65 และ 35 ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีของฟิคัล โคลิฟอร์มแบคทีเรียพบว่าเป็น *E.coli* Type II การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* sp. พบเชื้อเกินมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 10 และ 5 ในเดือนกันยายน และ ธันวาคม ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swetwivathana (2533) ได้ทำการทดลองนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมกับ *Lactobacillus* spp. (L1) และ *Pediococcus* spp. (P55) เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหมนที่มีการเติมเชื้อในกลุ่มของซัลโมเนลลา 3 สายพันธุ์ *Salmonella derby*, *S. anatum* และ *S. Newport* เปรียบเทียบกับแหมนที่หมักโดยธรรมชาติที่ไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหมนได้เร็วกว่าแหมนที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้แหมนที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังมีรสชาติ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏทางด้านสีที่เป็นที่ยอมรับ ดังนั้น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักแหมนเพื่อควบคุมคุณภาพความปลอดภัยในระหว่างการหมักจึงมีความเป็นไปได้สูง

Swetwivathana และ Lotong (1999) ได้เริ่มทำการตัดแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์กลับในการหมักแหมน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์แหมนให้หมดไปในระหว่างการหมัก และจากงานวิจัยพบว่า ได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้หลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่เป็นที่น่าสนใจคือ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่สร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1 ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการใช้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อหมักแหมนเทียบกับแหมนที่หมักโดยธรรมชาติ และแหมนที่หมักด้วย *P. pentosaceus* JCM 5890 ที่ไม่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. anatum* (Swetwivathana และคณะ, 2001a และ 2001b) จากการทดลองพบว่าการใช้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในการหมักแหมนนั้นทำให้แหมนที่ได้มีค่าพีเอชที่ลดลงเร็วกว่าแหมนที่หมักแบบธรรมชาติ แต่พีเอชเมื่อเทียบกับแหมนที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5890 ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันมาก ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. anatum* ของแหมนที่หมักด้วย TISTR 536 ให้ผลดีกว่าแหมนที่หมักด้วย *P. pentosaceus* JCM 5890 และแหมนที่หมักแบบธรรมชาติ ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวทำให้เชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 น่าจะเป็นทางเลือกที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหมน เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของแหมนให้คงที่ในด้านรสชาติ และลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์รวมถึงความปลอดภัยจากแบคทีเรียก่อโรค

อรุณวรรณ และคณะ (2554) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D4 เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์แหมนเนื้อโค แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ แหมนกลุ่มควบคุม แหมนที่เติมกล้าเชื้อเชิงการค้า (Pacovis RCI-47) แหมนที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และแหมนที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ระยะเวลาการหมักแหมน 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สุ่มตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2 และ 3 เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแลคติก สุ่มตัวอย่างวันที่ 0 และ 3 เพื่อตรวจหาเชื้อ Yeast/Mold, Coliforms, *E. coli*, *Staph.*

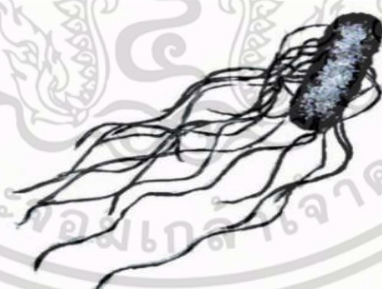
*aureus* และ *Salmonella* spp. สำหรับปริมาณกรดทั้งหมดและพีเอช สุ่มตัวอย่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาด้านจุลินทรีย์ พบว่า จำนวนของแบคทีเรียแลคติกในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก  
 แหนม ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนต่ำสุด แต่ในวันที่ 3 พบว่า จำนวนของแบคทีเรียแลคติกไม่แตกต่าง  
 กันทุกกลุ่มการทดลอง ขณะที่จำนวน Yeast/Mold ทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน ( $P>0.05$ )  
 แต่เมื่อหมักแหนมครบ 3 วัน พบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีจำนวน  
 Yeast/Mold ลดลงเหลือน้อยที่สุด ส่วนจำนวน Coliform ในวันที่ 0 และ 3 ของการหมักแหนม  
 พบทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มการทดลอง  
 มีแนวโน้มเชื้อ Coliform ลดลง อย่างไรก็ตาม จำนวนเชื้อ *Salmonella* spp., *Staph. aureus* และ  
*E. Coli* ในแหนมเนื้อโคตรวจไม่พบทุกกลุ่มการทดลองผลทางด้านคุณภาพแหนม พบกลุ่มควบคุม  
 มีปริมาณกรดทั้งหมดต่ำสุด และมีค่าพีเอชสูงสุด การเติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ทำให้ค่าพีเอช  
 ลดลงมากที่สุด

## 2.2 ซัลโมเนลลา (*Salmonella*)

### 2.2.1 คุณลักษณะของซัลโมเนลลา (Characteristic of *Salmonella*)

ซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความ  
 รุนแรง จัดอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Family Enterobacteriaceae) ติดสีแกรมลบ (gram  
 negative) ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดประมาณ 0.7–1.5 x 2–5 ไมครอน มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape)  
 (ดังภาพที่ 2.2) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิ  
 ปานกลาง



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของซัลโมเนลลา

ที่มา: Giannella, 1996

ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนความร้อนสามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศา  
 เซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการ  
 ทนความร้อนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญได้ *S. Senftenberg* เป็น  
 สายพันธุ์ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ทั่วไปถึง 10-20 เท่า  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลาในการให้ความร้อนนาน 1 ชั่วโมง ในการทำลาย จุลินทรีย์ดังกล่าว (อรุณ และคณะ, 2546)

### 2.2.2 การจัดแบ่งเชื้อซัลโมเนลลา

ซัลโมเนลลาแบ่งได้ 2 สปีชีส์ (ตารางที่ 2.5) ได้แก่ สปีชีส์ *Salmonella enterica* มี 6 ซับสปีชีส์ ประกอบด้วย Group (I) *S. enterica* subsp. *enteric* จำนวน 1,454 ซีโรวาร์ Group (II) *S. enterica* subsp. *salamae* จำนวน 489 ซีโรวาร์ Group (III a) *S. enterica* subsp. *arizonae* จำนวน 94 ซีโรวาร์ Group (III b) *S. enterica* subsp. *diarizonae* จำนวน 324 ซีโรวาร์ Group (IV) *S. enterica* subsp. *houtenae* จำนวน 70 ซีโรวาร์และ Group (VI) *S. enterica* subsp. *indica* จำนวน 12 ซีโรวาร์ และสปีชีส์ *Salmonella bongori* (Group V) จำนวน 20 ซีโรวาร์

ตารางที่ 2.5 จำนวนซีโรวาร์ในแต่ละซับสปีชีส์

<i>Salmonella enteric</i>	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1,504
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	502
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	95
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	333
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	72
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> (V)	22
Total	2,541

ที่มา: Popoff และคณะ, 2004

Kauffmann – White Scheme ทำการแบ่งย่อยออกเป็นซีโรวาร์ในแต่ละซับสปีชีส์ของ ซัลโมเนลลาโดยใช้ความแตกต่างทางคุณสมบัติของ O และ H แอนติเจนซึ่งใช้หลักการตกตะกอน (agglutination) ของโปรตีนจากแอนติเจน (antigens) บนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยแอนติบอดี (antibodies) ที่มีความสัมพันธ์กันแอนติเจนบนเซลล์ของ *Salmonella* spp. สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ประเภท (Guthrie, 1992) คือ

1. แอนติเจนที่ผิวของเชื้อซัลโมเนลลาเรียกว่า Somatic antigen (O antigen) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน (Heat stable) ทนกรดและแอลกอฮอล์ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้คือ A-I
2. แอนติเจนที่เส้นหรือหางของเชื้อซัลโมเนลลาเรียกว่า Flagella antigen (H antigen) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน (Heat labile) ไม่ทนกรด และแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แอนติเจนที่เปลือกหุ้มเซลล์หรือแคปซูล เรียกว่า Capsular antigen (VI antigen) ซึ่งมีอยู่ในเชื้อซัลโมเนลลาบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi* และ *Salmonella Dubin* ซึ่งทำให้เชื้อซัลโมเนลลาเหล่านี้ก่อโรคที่รุนแรง

### 2.2.3 การจัดแบ่งเชื้อซัลโมเนลลาตามหลักระบาดวิทยา (Epidemiology)

จำแนกออกเป็น 3 กลุ่มคือ

2.2.3.1 กลุ่มเชื้อซัลโมเนลลาที่ก่อให้เกิดโรค Enteric fever อาศัยคนเป็นโฮสต์ (host) เพียงอย่างเดียวจึงก่อโรคเฉพาะในคนเท่านั้น ประกอบด้วย *Salmonella Typhi* ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (Typhoid fever) *Salmonella Paratyphi* ทำให้เกิดโรคไข้รากสาदन้อย (Paratyphoid fever)

2.2.3.2 กลุ่มเชื้อซัลโมเนลลาที่ปรับตัวเข้ากับชนิดของโฮสต์ (Host-adapted serovars) พบจำเพาะในสัตว์แต่ละชนิด เช่น *Salmonella Pollorum* และ *Salmonella Gallinarum* พบในไก่ *Salmonella Choleraesuis* พบในสุกร *Salmonella Dubin* พบในวัว *Salmonella Abortus-equi* พบในม้า และ *Salmonella Abortus-ovis* พบในแกะ

2.2.3.3 กลุ่มเชื้อซัลโมเนลลาที่มีได้จำกัดต่อชนิดของโฮสต์ (Unadapted serovars) ก่อให้เกิดโรค Intestinal salmonellosis หรือ Gastroenteritis causing *Salmonella* spp. ได้แก่ เชื้อซัลโมเนลลาที่อยู่นอกเหนือจาก 2 กลุ่ม ที่กล่าวมาข้างต้น เช่น *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* (Popoff และคณะ, 2004)

### 2.2.4 การเจริญเติบโตของซัลโมเนลลา

2.2.4.1 อุณหภูมิ (Temperature) ซัลโมเนลลาเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าจะมีรายงานว่าเชื้อซัลโมเนลลาในบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสก็ตาม สำหรับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้เจริญได้ คือ 49.5 องศาเซลเซียส การปฏิบัติอย่างถูกต้องเพื่อเก็บรักษาอาหารร้อนหรืออุ่นอาหารเพื่อให้ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลลาตาม USDA/FSIS แนะนำ จึงใช้ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเกณฑ์ (แม้ว่าในทฤษฎีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะสามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลลาได้แล้วก็ตาม)

2.2.4.2) พีเอช (pH) ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-ด่างกับการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อซัลโมเนลลาชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่พีเอช 3.8 และพีเอชสูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วงพีเอชที่เชื้อซัลโมเนลลา ส่วนมากเจริญได้คืออยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของซัลโมเนลลาแต่ละสปีชีส์ด้วยการทดลองของ Chung และ Goepfert, 1970 พบว่ากรดที่ใช้ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อซัลโมเนลลา กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับพีเอชเชื้อซัลโมเนลลาปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้มากกว่าการใช้กรดน้ำส้มหรือ กล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อซัลโมเนลลาไวต่อกรดน้ำส้มมากกว่ากรดเกลือและกรดซิตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.3) วอเตอร์แอกติวิตี ( $A_w$ ) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา กล่าวคือ เชื้อซัลโมเนลลาเจริญได้ในช่วงที่มี  $A_w$  แคบมาก คือ  $A_w$  ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า  $A_w$  สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99–1.00 ในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา เช่น มีอาหาร ค่า  $A_w$  มีอุณหภูมิที่เหมาะสม เชื้อซัลโมเนลลาสามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอช ได้มากกว่าปกติ ฉะนั้นปัจจัยร่วม (Combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้ เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลามากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ pH และ  $A_w$  ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลลา

สภาวะ	ค่าต่ำสุด	ค่าเหมาะสม	ค่าสูงสุด
อุณหภูมิ	5.2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
$A_w$	0.94	0.99	>0.99

หมายเหตุ: เชื้อซัลโมเนลลาส่วนมากไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส  
ที่มา: ICMSF (1996)

## 2.2.5 แหล่งที่มาของซัลโมเนลลา

เชื้อซัลโมเนลลาสามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คน และสัตว์อื่นๆ เช่น หนู สัตว์ปีก แมลง วัว ควาย สุนัข แมว จิ้งจก อี๊กวนา และม้า เป็นต้น สำหรับการติดเชื้อในคนนั้น ส่วนมากจะได้รับเชื้อปะปนมากับน้ำและอาหาร และบางครั้งอาจเกิดจากสัตว์เลี้ยงที่อาศัยตามอาคารบ้านเรือน ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อหรือหากมีผู้ป่วยเป็นโรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) ทำงานที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหารแล้วมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีพอ เช่น ไข่ดิบขาว และหลังจากกลับจากห้องน้ำมิได้มีการล้างมือให้สะอาดเสียก่อน เชื้อซัลโมเนลลาก็มีโอกาสที่จะปนเปื้อนลงไปยังอาหารได้ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อซัลโมเนลลาเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการท้องร่วงประกอบกับเชื้อมีอัตราการแพร่ระบาดสูง จึงสามารถพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ในอัตราสูงด้วยอาหารที่มักจะมี การปนเปื้อนบ่อยๆ ได้แก่ เนื้อสัตว์และเครื่องใน โดยเฉพาะเนื้อไก่ ไช้ นม ผักสด ผลไม้ที่ปลูก ฉีกวบน้ำเชื่อม อาหารทะเลที่ไม่ได้ผ่านความร้อนอย่างเพียงพอ อาหารสุกๆดิบๆ ไม่ว่าจะเป็น แหนม ปลาต้ม ลาบ ยำ ปูเค็ม ปูดอง รวมไปถึงน้ำดื่มด้วย

## 2.2.6 ซัลโมเนลลาที่ทำให้เกิดโรค

2.2.6.1) ไข้เอนเทอริก หรือ Enteric fever (typhoid and paratyphoid fever) สาเหตุเกิดจาก เชื้อ *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* ในแต่ละปีประมาณว่า ทั่วโลกมีผู้ป่วยใหม่จำนวน 17 ล้านราย เสียชีวิตประมาณ 6 แสนราย มีหลายสายพันธุ์ที่ชื่อ ต่อ *chloramphenicol* ในปี พ.ศ.2533 มีสายพันธุ์ที่มี R factor plasmid ซึ่งมีพันธุกรรมการดื้อยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอน เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำ ไปใช้โดยไม่แจ้งให้ทราบก่อน หรือมีการดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะหลายชนิดที่สำคัญในการรักษา ในปี พ.ศ. 2546 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานว่ามีผู้ป่วยเป็นไข้เอนเทอริกจำนวน 9,893 ราย เสียชีวิต 3 ราย

2.2.6.2) ซัลโมเนลโลซิส หรือ Salmonellosis (Non-Typhoidal *Salmonella*) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Salmonella* serovar อื่นนอกเหนือจาก *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C มีทั้งหมด (รายงานปี พ.ศ. 2544) 2501 ซีโรวาร์ (serovar) มีเพียงส่วนน้อยที่ตรวจพบอาการทางคลินิก และในจำนวนนี้มีเพียงร้อยละ 1 ที่รายงานเข้าสู่ระบบเฝ้าระวังโรค ส่วนมากเกิดจากอาหารที่มีการปนเปื้อน

### 2.2.7 โรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis)

ในบรรดาแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและการระบาดในคน ซัลโมเนลลาเป็นตัวอย่างที่ดีของแบคทีเรียที่มีการวิวัฒนาการไปกับวิวัฒนาการของมนุษย์แต่เดิมแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสัตว์ และก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีเพียงไม่กี่ชนิดเป็น pathogen ของคนโดยตรงและอาศัยอยู่ในคน แต่ปัจจุบันนี้ซัลโมเนลลาจากสัตว์หลายชนิดทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและอาศัยเป็น carrier อยู่ในคนได้เป็นเวลานาน ทั้งนี้เพราะซัลโมเนลลาสามารถปรับตัวได้ดีทำให้สามารถอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในสังคมมนุษย์ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของเทคโนโลยีใหม่ๆ เช่น การผลิตอาหารกระป๋องอาหารแช่แข็งหรือขบวนการต่างๆ ในการเตรียมอาหารสำเร็จรูปทั้งอาหารที่ยังไม่สุกและอาหารที่สุกแล้ว ซึ่งในปัจจุบันนี้เกิดขึ้นมากมาย เพื่อสนองความต้องการของประชาชนที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในประเทศไทยที่ประจักษ์กันดีว่ามีอาหารมากมายให้ซื้อขายกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เรียกว่าประเทศไทยเป็นครัวอาหารโลกจำเป็นต้องควบคุมป้องกันพร้อมทั้งหาทางยับยั้งเชื้อ *Salmonella* มิให้แพร่กระจายไปในอาหารสิ่งแวดล้อมต่างๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การสาธารณสุข และการพัฒนาสิ่งแวดล้อมและการเพิ่มของประชากรและสังคมก็เป็นสิ่งที่เอื้ออำนวยต่อการปรับตัวของเชื้อ *Salmonella* เข้ามาสู่คนได้มากขึ้นอาการของผู้ป่วยและความเป็นพิษของเชื้อซัลโมเนลลา อาการของผู้ป่วยผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อซัลโมเนลลามีอาการจำแนกออกได้เป็น 3 แบบ (ICMSF, 1996)

2.2.7.1) อาการของระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) โดยทั่วไปเกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่เลือกโฮสต์ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษช่วงระยะเวลาฟักตัวของโรคอยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมง ถึง 5 วัน แต่ปกติสัญญาณบอกรวมอาการของโรคมักเริ่มขึ้นประมาณ 12-36 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ ในกรณีที่ได้รับเชื้อเป็นจำนวนมากอาการจะปรากฏขึ้นเร็วกว่าปกติหรือถ้าบุคคลไวต่อเชื้อมากเป็นพิเศษอาการก็จะปรากฏเร็วกว่าปกติด้วยอาการของผู้ป่วยประกอบด้วยท้องเดิน คลื่นไส้ ปวดท้อง ไข้สูงปานกลาง หนาวสั่น อาการท้องร่วงจะรุนแรงต่างกันตามลักษณะการถ่ายอุจจาระ เช่น อุจจาระอาจมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำซุปลักจนถึงการถ่ายเป็นน้ำ และเกิดอาการขาดน้ำขึ้น (dehydration) ในบางครั้งผู้ป่วยอาจมีอาการอ่อนเพลียเบื่ออาหารปวดศีรษะ กระสับกระส่าย

โดยทั่วไปอาการดังกล่าวจะปรากฏอยู่นาน 2-5 วัน ถ้านำสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยไปตรวจวิเคราะห์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงนี้มักจะพบเชื้อซัลโมเนลลาเป็นจำนวนมากเมื่อเวลาผ่านไปจำนวนของเชื้อซัลโมเนลลาจะลดลง แต่ผู้ป่วยบางรายอาจจับถ่ายเชื้อซัลโมเนลลาที่มีไซโทพอยด์หลังจากนี้ไปแล้วอีก 3 เดือนก็เป็นที่

2.2.7.2 อาการไข้ไทฟอยด์ (Enteric fever) เกิดเนื่องจากเชื้อ *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* (*S. Schottmuelleri*) และ *S. Paratyphi C* (*S. Hirschfeldii*) ส่วนเชื้อ *S. Typhimurium* นั้นมีรายงานว่า เป็นเชื้อไข้ไทฟอยด์ของหนูระยะเวลาฟักตัวของเชื้อไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ) เฉลี่ยประมาณ 14 วัน ผู้ป่วยมีอาการไม่สบาย ปวดศีรษะ ไข้ขึ้นสูงมาก และทรงอยู่หลายวันปวดท้อง และปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำถั่ว (pea-like) หรือเหลวเป็นน้ำ นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามตัวหนาวสั่น และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อนท้อบวม น้ำมูกโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้อง หรือจุกด้วย ผู้ป่วยอาจหมดความรู้สึกอาการทุเลาช้า (ประมาณ 1-8 สัปดาห์) และบางครั้งผู้ป่วยอาจเป็นพาหะของโรคไปอีกหลายเดือนหรือเป็นปีในกรณีนี้มักพบเชื้อซัลโมเนลลาในอุจจาระ

2.2.7.3 อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Bacteremia/Septicemia) เกิดจากเชื้อซัลโมเนลลาเข้าไปในกระแสโลหิต เนื่องจากเชื้อฟักตัวในลำไส้เล็กแล้วเข้าสู่กระแสโลหิตผู้ป่วยอาจจะมีไข้สูง ปวดหลังปวดท้อง และเจ็บหน้าอกหนาวสั่น เหงื่อออกตามตัว ไม่สบาย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการที่เกิดขึ้นอาจเป็นแบบสั้นๆหรือเป็นเรื้อรังก็ได้ เชื้อซัลโมเนลลาที่เป็นสาเหตุรวมถึง *S. Typhi*, *S. Choleraesuis* และ *S. Dublin* เชื้อซัลโมเนลลาจากกระแสโลหิตอาจเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่างๆของร่างกาย (Archer และ Young, 1988; Smith และคณะ, 1993)

## 2.3 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Mesophilic bacteria แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) มีรูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว (cocci หรือ rods) ไม่สร้างสปอร์ (non sporeforming) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophilic) ไม่มีไซโตโครมไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรดโดยสามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.0-4.5 บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่พีเอช 3.2 และที่พีเอชสูงถึง 9.6 แต่สามารถสลายโปรตีนและไขมันได้เพียงเล็กน้อย และแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการหมักน้ำตาลจึงต้องการสารอาหารสูงในการเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนเปปไทด์กรดนิวคลีอิกและวิตามิน (Ringo และ Gatesoupe, 1998) สามารถพบ

แบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เป็นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักชนิดต่างๆ นอกจากนี้พบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงน้ำเน่าเสียจากแหล่งต่างๆ (Pot และ คณะ, 1994; Sarkar และ Banerjee, 1996; และ Holzapfel, 1997) และกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารที่ให้ความเป็นกรด (acidulant) และสารถนอมอาหาร (Linko, 1985)

### 2.3.1 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดจากการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรต ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้น เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากกระบวนการเมแทบอลิซึมสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็นสองกลุ่ม (Collier และ คณะ, 1998) ดังนี้

#### 2.3.1.1 Homofermentation

เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติกที่เกิดขึ้น โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolytic pathway ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จากการหมักกลูโคสโดยที่กลูโคส 1 โมเลกุลเมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวท 2 โมเลกุลจากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติกซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้น พบทั้ง D-Lactic และ L-Lactic (Adams และ Moss, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักแบบ homofermentative มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (ตารางที่ 2.7) เช่น สกุล *Lactobacillus* และชนิดที่มีรูปร่างทรงกลม ได้แก่ สกุล *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

#### 2.3.1.2 Heterofermentation

เป็นการหมักให้เกิดแลคติกโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสไปเป็นเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิดได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอรั่มิก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel, 1993; Adams และ Moss, 1995) ตัวอย่างของแบคทีเรียแลคติกที่มีวิถีการหมักแบบ heterofermentative ได้แก่สกุล *Lactobacillus* บางสปีชีส์และสกุลของ *Leuconostoc* โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus* มีการหมักได้สองแบบ (ตารางที่ 2.8) และผลิตภัณฑ์จากการหมัก แสดงได้ในภาพที่ 2.5

ตารางที่ 2.7 แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มของ homofermentation

Cocci	Rods
<b>Streptococci</b>	<b>Lactobacillus</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. Lactis	Thermobacteria
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. Lactis var. <i>diacetalactis</i>	(temp. opt. 40°C, do not grow at 15°C)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. Cremoris	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. delbrueckii
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. lactis
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. salivarius	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. thermophilus	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Streptococcus pyrogenes</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	<b>Streptobacteria</b>
	(temp. opt. 30-37°C, always growth at 18°C)
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus alimentaris</i>
	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>

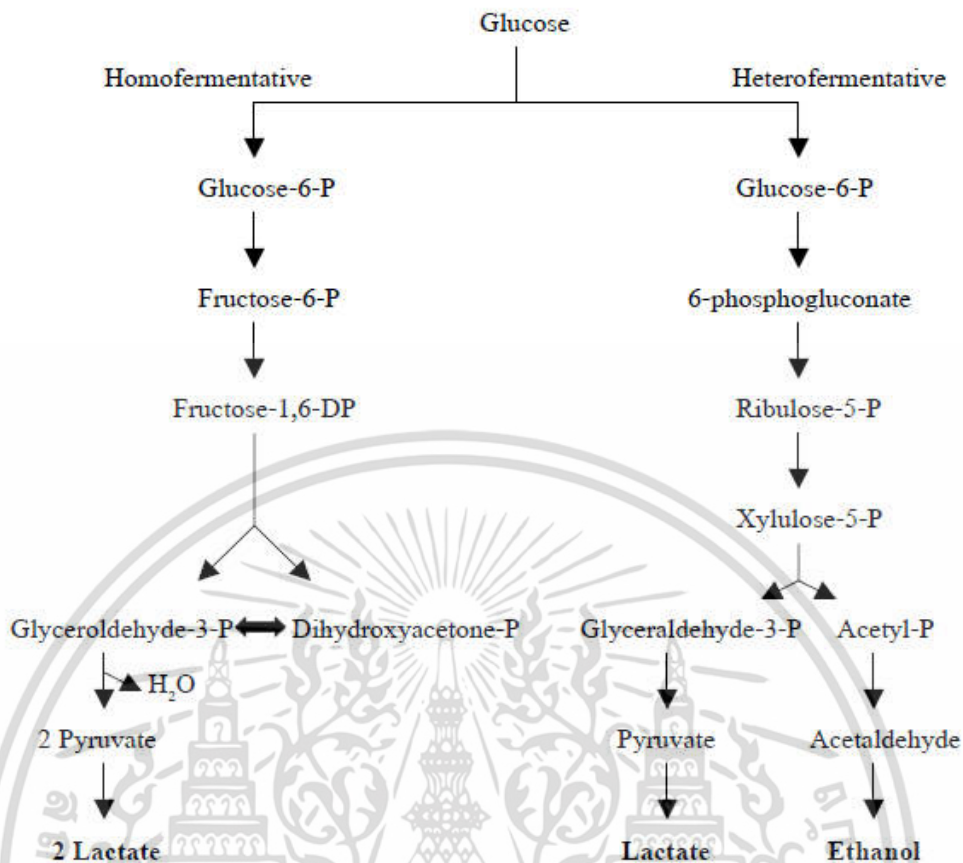
ที่มา : Schlegel (1993)



ภาพที่ 2.3 สมการจากการหมักแบบ homofermentation

ที่มา: Collier และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 วิธีการหมักกลูโคสแบบ homofermentative และ heterofermentative ของแบคทีเรียกรดแลคติก

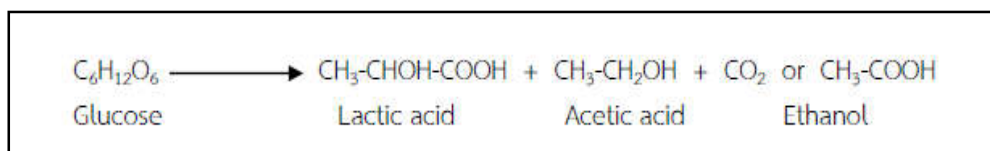
ที่มา : Caplice และ Fitzgerald (1999)

ตารางที่ 2.8 แบคทีเรียกรดแลคติกของกลุ่ม heterofermentation

Cocci	Rods
<b><i>Streptococci</i></b>	<b><i>Lactobacilli</i></b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bifermantans</i>
<i>subsp. mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	<i>Lactobacillus kandleri</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus viredescens</i>

ที่มา: Schlegel (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 สมการจากการหมักแบบ heterofermentation

ที่มา: Collier และคณะ (1998)

### 2.3.2 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดและพบว่าในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ทำให้เกิดการพัฒนาด้านรสชาติเนื้อสัมผัสนอกจากนั้นยังมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ โดยการยับยั้งเป็นผลมาจากการผลิตสารหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซีทิล และมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (Kelly และคณะ, 1996) และการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในการถนอมอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักระหว่างการหมักจะมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทั้งชนิดที่เป็น primary metabolite และ secondary metabolite และผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ ได้แก่

#### กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกคือกรดแลคติกและกรดอะซิติกมีการศึกษาที่พบว่า กรดอะซิติกมีความสามารถในการยับยั้งราีสต์และแบคทีเรียได้ดี และทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติก เมื่อทำงานร่วมกันจะมีผลในการลดการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ได้เป็นอย่างดีในอาหารหมักส่วนใหญ่ทั้งกรดแลคติก และกรดอะซิติกที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลทำให้พีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอินทรีย์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่พบว่า เป็นกรดแลคติกและมีกรดอะซิติกเพียงเล็กน้อย (Lucke, 2000)

#### ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติกบางกลุ่มโดยเฉพาะ lactobacilli สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำลายเซลล์แบคทีเรีย โดยส่วนของ sulphhydryl ของโปรตีนและลิพิดที่เมมเบรนจะถูกออกซิไดซ์อย่างรุนแรงการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในผลิตภัณฑ์จะมีผลต่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas spp.* นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังทำปฏิกิริยากับสารประกอบตัวอื่นๆเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นมา เช่น ในนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Ouweland, 2002 และ Daeschel, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิล (2, 3- butanedione) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สังเคราะห์จากสารตัวกลางในการสังเคราะห์ไพรูเวตเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นในเนย และมีคุณสมบัติในการยับยั้ง โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะยับยั้งยีสต์และความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่ในแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่ามีผลเพียงเล็กน้อยซึ่งที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลในการยับยั้ง (Daeschel, 1989)

**แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins)** แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ (proteinaceous antimicrobial substance) ชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน กลไกการทำลายมีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายที่แน่นอนแบคทีเรียโอซินบางชนิดสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจึงใช้ร่วมกับการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อนได้ แบคทีเรียโอซินจะถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก และอนุญาตให้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร ได้แก่ ไนซิน

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนับว่าเป็นอุตสาหกรรมการแปรรูปที่มีความสำคัญเนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นแหล่งอาหาร โปรตีนวิตามิน และเกลือแร่ต่างๆที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์รูปแบบของการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์จึงเป็นการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ทั้งนี้เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอมากยิ่งขึ้นเป็นการควบคุมกระบวนการหมักอีกวิธีหนึ่งซึ่ง Varnam และ Sutherland (1995) ได้กล่าวถึงมาตรฐานที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกเปรี้ยวไว้ ดังนี้ มีประสิทธิภาพในการแข่งขันกับแบคทีเรียที่เกิดขึ้นตามสภาพธรรมชาติได้ต้องผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่พอเพียงต้องมีความทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลืออย่างน้อย 6 เปอร์เซ็นต์ ต้องมีความทนต่อโซเดียมไนเตรท และสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทอย่างน้อย 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ต้องเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส ต้องมีวิธีการสร้างกรดแลคติกแบบ homofermentative ต้องไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไปควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างคะตะเลส (catalase negative) ควรมีความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในอาหารได้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมหรือทำงานร่วมกับกล้าเชื้ออื่นได้เป็นอย่างดี

การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เริ่มใช้หลังจากที่ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อเพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์นม และเริ่มใช้กล้าเชื้อของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Pediococcus cerevisiae* หมักได้ครั้งแรกเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี 1955 และในปี 1958 ได้รับการยอมรับการใช้กล้าเชื้อดังกล่าวจึงทำให้มีการใช้กล้าเชื้อชนิดนี้ในโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อย่างแพร่หลายทั้งในยุโรปและอเมริกา (Bacus, J.N. และคณะ, 1981; Niinivaara, F.P. และคณะ, 1964) และเนื่องจากไนเตรทเป็นองค์ประกอบหลักของการแปรรูปเนื้อสัตว์ซึ่งเมื่อถูกกรดแล้วไปเป็นไนไตรท์และไนตรัส ตามลำดับแล้ว ไนตรัสออกไซด์จะมีผลในการตรึงสีเนื้อสัตว์ คือ เปลี่ยนสีเนื่องจากไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงอมม่วงไปเป็นไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงและเมื่อถูกความร้อนจะเปลี่ยนไปเป็นไนโตรซิลฮีโมโกลบินซึ่งมีสีชมพูของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น สีของไส้กรอกและแฮม เป็นต้น

### 2.3.3 แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

*P. pentosaceus* TISTR536 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแฮมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้านของไทยมีคุณสมบัติในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Swetwathana, 2005) รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *L. monocytogenes* และ *Ent. faecalis* โดยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 มีแอกติวิตีของสารแบคทีเรียโอซินสูงสุด 6400 AU/ml (Swetwathana และ Lotong, 1999; Swetwathana และคณะ, 2003) ต่อมาเชื้อดังกล่าวได้รับการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์ *P. pentosaceus* และสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นเป็น Class II bacteriocin ในกลุ่ม pediocin PA-1 (Swetwathana และคณะ, 2004; Swetwathana, 2005) แบคทีเรียโอซิน pediocin PA-1 ที่ผลิตจาก *P. pentosaceus* TISTR536 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่ยับยั้ง *Staph. aureus* (Swetwathana และ Lotong, 1999; Swetwathana และคณะ, 2003)

จากการรายงานการใช้แบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียโอซินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียได้ถ้ามีปัจจัยอื่นร่วมด้วยคือ ซินเนอร์จิสติกเอฟเฟกต์ (synergistic effect) เช่น มีความเป็นกรดสูง มีไฮโดรไลติกเอนไซม์ มีสารยับยั้งไนไตรท์ Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid (EDTA) เป็นต้น (Hanlin และคณะ, 1993; Stevens และคณะ, 1991; Helander และคณะ, 1997; Swetwathana และคณะ, 2001) ในปัจจุบัน pediocin PA-1/AcH เป็นแบคทีเรียโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกที่มีการศึกษาวิจัยมากที่สุดเป็นกลุ่มแรกที่รายงานเกี่ยวกับการสกัดสารแบคทีเรียโอซินจาก *P. acidilactici* สารนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารและแบคทีเรียที่ก่อโรค *Bhunia* และคณะ (1987) พบว่า pediocin PA-1 ประกอบด้วยโปรตีนขนาดเล็กสามารถทนต่อสารเคมีหลายชนิดแต่จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนบางชนิด เช่น ทริปซิน ไคโททริปซิน ฟิซิน และปาเปน แต่สามารถทนต่อไลเปส ไรโบนิวคลีเอส ไลโซไซม์ และสารละลายอินทรีย์ ซึ่งข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่า pediocin PA-1 เป็นโปรตีนบริสุทธิ์สามารถทนต่อฟอร์มอลดีไฮด์ และความร้อนสูง pediocin PA-1 จะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับด่างที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10 หรือมากกว่า เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงให้เห็นว่ามีโครงสร้างแบบพหุคูณ ซึ่ง เป็น โครงสร้างที่สำคัญต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้น แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococci* พบว่า ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น แดงกวาดอง และไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนี้ยังใช้ในการเพิ่มกลิ่น และรสเปรี้ยวในเนยแข็ง (Thomas, 1987) แต่ยังมีรายงานว่า *Pediococci* เป็นตัวการทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Lafom-Lafourcade, 1983) และยังสามารถแยก *Pediococci* ได้จากลำไส้โค (Baumaan และ Foster, 1956) จากปลาสด (Blood, 1975) ไข่ดิบ (Teuber และ Geis, 1981) และจากอุจจาระไก่วง (Harrison และ Hanson, 1950) แบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococci* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งต่างจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pediococcus* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่กว้างโดยสามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Clostridium* โดยมีรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อสด (Motlagh และคณะ, 1992; Nielsen และคณะ, 1990; Rozben และคณะ, 1993; Schillinger Holzappel, 1990)

### 2.3.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (ปิ่นมณี, 2547)

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหารและใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารหลายประเภทเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคทีเรียโอซิน และกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้สามารถสร้างสารจำเพาะที่มีผลต่อลักษณะของกลิ่นรสของอาหาร

1. ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในกลุ่มของธัญพืช และพบคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นจากกิจกรรมที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนี้คุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืชและถั่วเพิ่มขึ้นอีกด้วย องค์ประกอบของวิตามินในอาหารบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เพราะจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

2. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนมีการเก็บรักษาให้นานขึ้น โดยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง คือ การสร้างกรด การลดลงของค่าพีเอชและกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย ทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียโอซิน เป็นต้น

3. แบคทีเรียแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเรสเตอรอลในกระแสเลือด การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยในการยับยั้งการเกิดคอเรสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนี้อาจมีผลในการลดน้ำหนักได้ภายในสัปดาห์จะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ในการทำโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเรสเตอรอล ดังนั้น การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *Lb. acidophilus* ซึ่งจะช่วยให้คอเรสเตอรอลในเลือดลดลง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งที่มีผลดีต่อสุขภาพหลายประการเพราะมีคุณค่าทางโภชนาการ และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย อีกทั้งทำให้ระบบทางเดินอาหารทำงานได้ดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโตส (Herzler และ Clancy, 2003)

4. ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะ *Lb. acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่า ทำให้ระดับของเอนไซม์เบต้า-กลูคูโรนิเดส, เอโซรีดักเตส ( $\beta$ -glucuronidase, azoreductase) และเอนไซม์ไนโตรรีดักเตส (nitroreductase) เพิ่มขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับ การเพิ่มของโพรคาร์ซิโนเจน (procarcinogen) ไปเป็นคาร์ซิโนเจน (carcinogen) ในส่วนปลายของลำไส้ โดยผลของ *Lb. acidophilus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ ซึ่งทำให้เกิดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้ป่วยลดลง (Adam และ Moss, 1995)

5. ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อไมโครฟาจ (microphage) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิตอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น anititumor โดยเฉพาะ *Lb. acidophilus* (Adam และ Moss, 1995)

## 2.4 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins)

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Proteinaceous antimicrobial substance) ชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันกลไกการทำลายมีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายที่แน่นอนแบคทีเรียโอซินบางชนิดสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจึงใช้ร่วมกับการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อนได้แบคทีเรียโอซินจะถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนเช่นทริปซินตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก และอนุญาตให้ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารได้แก่ ไนซิน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่นๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย

ในกลุ่ม Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ส่วนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อย และไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย

#### 2.4.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีจุดสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง เมื่อพิจารณาสมบัติอื่นๆ ได้แก่ โครงสร้างปฐมนิยมวลโมเลกุล และความเสถียรต่อความร้อน สามารถแบ่งแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

2.4.1.1 แลนทิไบโอติก (lantibiotic) เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดดีไฮโดรไทโออีเทอร์ (dehydrothioether) แลนไทโอนิน และ 3-เมทิลแลนไทโอนิน สร้างขึ้นโดยตัดแปลงกรดอะมิโนปกติในสายเปปไทด์หลังกระบวนการแปลรหัส แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ของแบคทีเรียแลคติกเป็นชนิด A มีโครงสร้างคล้ายเกลียวที่ขี้ออก (ชนิด B เป็นโครงสร้างก่อนกลม) ได้แก่ nisin A, nisin Z, lactocin S, lactocin, mutacin เป็นต้น

2.4.1.2 แบคทีเรียโอซินที่เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน หนักน้อยตั้งแต่ 100-121 องศาเซลเซียส แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่ม a. เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Listeria* spp. ได้ดี กรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกัน 38-55 เปอร์เซ็นต์ เรียกกลุ่มนี้ว่า Pidiocin พบในแบคทีเรียแลคติกหลายชนิด เช่น Pidiocin PA-1 ผลิตโดย *Pidiococcus acidilactici*, Sakacin A ผลิตโดย *Lactobacillus sake* 706 และ *Enterococcus*

กลุ่ม b. เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยสายเปปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพลักษณะคล้ายแบคทีเรียโอซินเป็นองค์ประกอบรวม ได้แก่ Lactococcin G, Lactacin F และ LaLactocin M

กลุ่ม c. เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยหมู่ไทออล

2.4.1.3 แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) รวมทั้งเอนไซม์ เช่น hemolysins และ muramirase แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ไม่ทนความร้อนแยกได้จากสกุล *Lactobacillus* เท่านั้น เช่น Acidophilucin A, Caseicin 80

2.4.1.4 แบคทีเรียโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วมสำหรับการออกฤทธิ์ ไม่ได้รับการยอมรับเพราะอาจเกิดจากกรณีทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ไม่ดีพอ ลักษณะโดยสรุปของแบคทีเรียโอซินทั้ง 4 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.9

#### 2.4.2 กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซิน

การสร้างแบคทีเรียโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นยีนโครงสร้างและส่วนที่เป็น repressor gene โดยปกติเมื่อนำแบคทีเรียที่มียีนควบคุมแบคทีเรียโอซินมาเพาะเลี้ยง พบว่ามีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งไม่ให้มีการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดย repressor gene ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินในขั้นตอนการสร้างแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียโอซินจะสร้างขึ้นในไซโทพลาสซึมต่อจากนั้นรวมตัวกับ immunity protein ในอัตราส่วน 1:1 โมเลกุลของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะผ่านเนื้อเยื่อชั้นในและสะสมอยู่บริเวณ periplasmic space และแผ่ขยายไปถึงบริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรียซึ่งบริเวณพื้นผิวหน้าแบคทีเรียสารเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของ outer membrane และท้ายสุด สารเชิงซ้อนนี้จะทำให้เกิด cerd bacteriocin และขับออกสู่ภายนอกเซลล์

ตารางที่ 2.9 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่ม (Class)	กลุ่มย่อย	ลักษณะ
I	แลคติกบาซิลลัส	แลคติกบาซิลลัส
II		แบคทีเรียโอซินขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนความร้อน 100-121 องศาเซลเซียส
	IIa	ออกฤทธิ์ต่อ <i>Listeria</i> ประกอบด้วย -Y-G-N-G-V-X-C- บริเวณใกล้เคียงปลายด้าน N
	IIb	การออกฤทธิ์ต้องการโปรตีนชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบร่วม
	IIc	การออกฤทธิ์ต้องการหมู่ไทออล
III		แบคทีเรียโอซินขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน
IV		แบคทีเรียโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือ/และไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

ที่มา : Ouwehand (1998)

#### 2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซินเกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลอยู่รวมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เชื่อมเซลล์เป้าหมายซึ่งจะมีลักษณะคล้ายซี่ไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้วยข้างของถังไม้ (barrel-stave) ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนสูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้น กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกแบคทีเรียโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นตอนต่อไป คือ แบคทีเรียโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น ในจีนซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก และมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายคือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียโอซินเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson และ Hoover, 1993) นอกจากนี้แบคทีเรียโอซิน class II ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่าในขั้นตอนแรกปลาย ด้าน N ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับกับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบ โดยจับเข้าคู่กัน หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออน และสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (กฤตพร, 2551)

#### 2.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติก

ในการสร้างแบคทีเรียโอซินอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วนเพื่อที่จะทำให้เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในปริมาณสูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคทีเรียโอซินออกจากเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่มีผลต่อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการทดสอบ (Tagg และคณะ, 1976) ดังนั้น มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างแบคทีเรียแลคติกดังต่อไปนี้

##### 2.4.4.1 ชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีเรียโอซินสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์ ในปี ค.ศ.1994 (Yang และ Ray, 1994) ค้นพบแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด คือ ในจีน และ Ieuconocin L ซึ่งแบคทีเรียโอซินดังกล่าวได้มาจากแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้าง pediocin AcH ต่อมา De Vuyst และ Vandamme (1992) ได้คัดแยก *Lc. lactis* พบว่ามี 21 สายพันธุ์ สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ และอีก 6 สายพันธุ์ไม่สร้างแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินได้นั้นจะมีภูมิคุ้มกันเพื่อไม่ให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตออกมาทำลายตัวเอง นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบความต้านทานของในจีน โดยนำแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lc. lactis* N8 และ *Lc. Lactis* LAC 48 มาทำให้กลายพันธุ์โดยใช้พลาสมิดที่มียีนในจีนใส่ในแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิด เมื่อทำการทดสอบพบว่า ความต้านทานของในจีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Quiao, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.4.4.2 องค์ประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตแบคทีเรียโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่ง ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณฟอสเฟต ตลอดจนปริมาณสารยับยั้ง และสารลดแรงตึงผิวต่างๆที่เป็นองค์ประกอบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยสารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแบคทีเรียโอซิน ดังนี้

##### 1. แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแบคทีเรียโอซินได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน Z ที่ผลิตจาก *L. lactis* IO-1 เมื่อทำการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลส (Matsusaki, 1996) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้แอกติวิตีของไนซิน Z สูงสุด เท่ากับ 4000 IU/MI เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลไซโลสจะให้ค่าแอกติวิตีของไนซิน Z เท่ากับ 3000 IU/mL ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ไซโลส และกาแลคโตส (Biswas, 1991)

##### 2. แหล่งไนโตรเจน

Kim และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาพบว่า ปริมาณการผลิตไนซินจะเพิ่มเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ถึงแม้ว่าการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน นอกจากนั้นยังพบว่า ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินด้วย โดย De Vuyst และ Vandamme (1992) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ cotton-seedmeal, yeast extract และ fish meal พบว่าการใช้ cotton-seedmeal จะให้แอกติวิตีของแบคทีเรียโอซิน 2,500 IU/mL และเมื่อใช้ yeast extract และ fish meal จะให้แอกติวิตีของแบคทีเรียโอซิน 2,000 IU/mL

##### 3. สารอนินทรีย์ต่างๆ

โดยพบว่า ทั้งไอออนที่มีประจุลบ เช่น สารประกอบฟอสเฟต และไอออนที่มีประจุบวก เช่น แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{+2}$ ) และแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) มีผลต่อการสร้างแบคทีเรียโอซิน โดยขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ด้วย ซึ่งมีรายงานการใช้สารอนินทรีย์ต่างๆ ดังนี้

##### 3.1 ฟอสเฟต

จากการทดลองของ De Vuyst และ Vandamme (1992) พบว่า ฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไนซินจากเชื้อ พบว่า ฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* NIZO 22186 โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.8 จะให้แอกติวิตีของไนซินสูงสุด แต่จะไม่มีผลต่อการผลิตไนซินสายพันธุ์ *Lc. lactis* IO-1 (Matsusaki และคณะ, 1996)

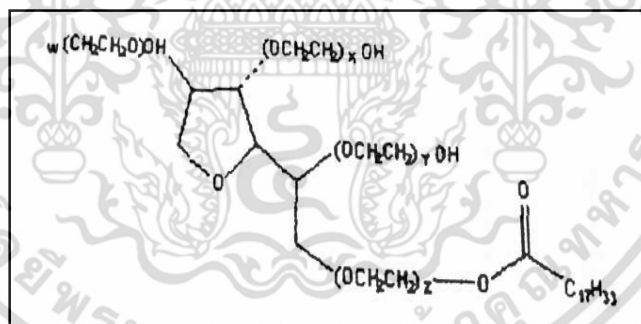
### 3.2 แมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ )

แมกนีเซียมไอออนสามารถเพิ่มการสร้างเพกติโอซิน AcH (Biswas, 1991) และการสร้างไนซินของเชื้อ *L. lactis* ATCC 11454 แต่ไม่สามารถเพิ่มการสร้างไนซินของเชื้อ *L. lactis* IO-1 ได้ (Matsusaki, 1996) นอกจากนี้การเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลต่อลิตร ยังช่วยเพิ่มปริมาณไนซิน Z แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ หรือการสร้างแลคเตทจากน้ำตาลไซโลส และกลูโคสในการเพาะเลี้ยงแบบรวดเดี่ยวที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง

### 3.3 Tween 80

Tween 80 สามารถส่งเสริมการสร้างแบคทีเรียโอซินได้ในบางสภาวะ โดย Tween 80 จะมีสมบัติในการลดแรงตึงผิวโดยจะป้องกันการดูดซับของแบคทีเรียโอซินบนผิวเซลล์ และการรวมกันของแบคทีเรียโอซิน (Biswas, 1991) พบว่า ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติม Tween 80 รวมทั้งแมกนีเซียมไอออน พบว่า แอคติวิตีของเพกติโอซิน AcH ที่สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* จะได้ปริมาณสูงสุด นอกจากนี้ tween 80 ยังช่วยเพิ่มการสร้าง lacticin S (Mortvedt, 1991) และ amylovorin L 471 (De Vuyst และคณะ, 1996)

Tween 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวแบบ non-ionic ชื่อทางเคมี: Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Polyethylene glycol sorbitan monooleate silution. Polysorbate 80 สูตรโมเลกุล:  $C_{12}H_{10}CINO_3$  สูตรโครงสร้าง : ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของ Tween 80

ส่วนประกอบของ Tween 80 มี 4 องค์ประกอบที่สำคัญ ดังนี้

1. Limonene
2. Cthanol
3. Glycerol และ
4. น้ำ (Water)

มงคล และคณะ (2544) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักได้ 56 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี พบ ไอโซเลทที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสขนาดใหญ่บนอาหารแข็ง Glucose Yeast extract Peptone (GYP) โดยเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* และเมื่อนำเชื้อทั้งหมดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแลคติก 6 ชนิด คือ *Vibrio* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* และ *Salmonella* sp. พบว่า เมื่อนำน้ำหมักของอาหารเหลว MRS มาทดสอบการยับยั้งโดยตรงมีประสิทธิภาพสูงสุด ขณะที่นำอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการกรองเซลล์ออกด้วยเซลลูโลสไตรเทรท 0.45 ไมครอน และการนำส่วนใสที่ได้ไปผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพลดลง ตามลำดับ แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งมากที่สุด คือ *B. subtilis* การประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Pediococcus* sp. ที่คัดเลือกได้เพื่อเป็นกล้าเชื้อตั้งต้นนั้นมีความเป็นไปได้ เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบหลายชนิดได้ดี

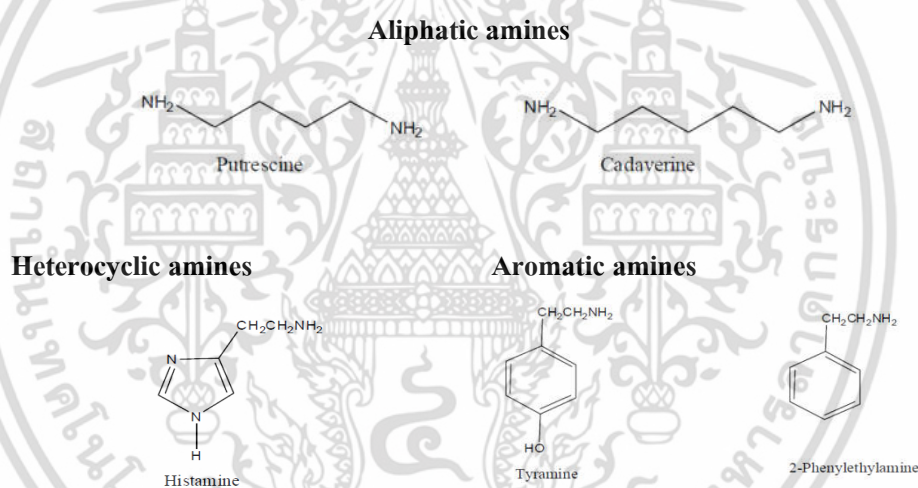
กรรมกรณ์ (2549) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 174 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี Agar spot พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้จำนวน 44 ไอโซเลท และ 12 ไอโซเลทตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้จำนวน 18 ไอโซเลท และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการศึกษาสมบัติของสารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ พบว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3, SC4 (แยกได้จากไส้กรอกปลา) และ SK2 (แยกจากแหนมปลา) มีสมบัติเป็นโปรตีน โดยสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก SC3 และ SC4 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 นาที ในขณะที่สารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และมีค่าคงตัวที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0-7.0 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งของสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Lb. sakei* 912, *B. cereus*, *Ent. aerogenes*, *Leu. Mesenteroides*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. monocytogenes* ได้ โดยยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของไนซินเชิงการค้าที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2500 IU) และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SK2 มาจัดจำแนกโดยใช้ API 20 Strep (bioMerieux) พบว่าเป็น *Lc. lactis* subsp. *lactis*

ฮาสติง และคณะ (1994) ได้รายงานว่าสามารถแยก *Lru. Gelidium* UAL 187, *Leu. paramesenteroides* La7a, *Leu. Carnosum* Ta11a และ *Leu. Carnosum* La54a จากเนื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้สามารถแบคทีเรียโอซินได้ที่อุณหภูมิต่ำในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0-7.0 แบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้นี้สามารถทนความร้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และยับยั้ง *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ ที่ทำให้เนื้อเกิดการเน่าเสีย

## 2.5 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines; BAs)

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ฟังก์ชัน มีคุณสมบัติเป็นเบสมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Arena และ Manca, 2001) ทนความร้อน (Shakila และ คณะ, 2001) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี (Silla Santos, 1996) (ภาพที่ 2.7) คือ

1. อะลิฟาติกเอมีน (Aliphatic amine) ได้แก่ พูทรีซีน (putrescine) คาดาเวอริน (cadaverine) สเปอมีดีน (spermidine) และสเปอมีน (spermine)
2. อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ได้แก่ ไทรามีน (tyramine) ฟีนีลเอธิลลามีน (phenylethylamine)
3. เฮเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) ได้แก่ ฮิสตามีน (histamine) และ ทริปตามีน (Tryptamine)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของไบโอเจนิคเอมีน

ที่มา: European Food Safety Authority. Journal, 2011

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ที่มีชีวิตพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา ไวน์ เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากนม เบียร์ เนื้อ และผัก ไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของอาหาร โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) ย่อยสลายกรดอะมิโนอิสระในอาหารเหล่านั้นได้เป็นไบโอจีนิก

ไบโอจีนิกเอมีนที่พบในอาหารมีปริมาณและชนิดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น (Leuschner และคณะ, 1998) เช่น ถ้าพบฮิสติดีน (histidine) ในอาหาร

เป็นจำนวนมากจะทำให้พบฮิสตามีนมาก ไบโอเจนิคเอมีนที่พบได้ในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นได้แสดงในตารางที่ 2.10

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของพิวเทรสซีน คาร์ดาเวอรีน สเปออร์มีน สเปออร์มิดีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน ฮิสตามีน และทริปตามีน มีการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นมและเนย ไวน์ เบียร์ ผัก ผลไม้ ช็อคโกแลต และถั่ว เป็นต้น สาเหตุการปนเปื้อนเกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เช่น การปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สร้างเอ็นไซม์ดีคาร์บอกซิเลสย่อยสลายกรดอะมิโนในอาหารเกิดเป็นสารไบโอเจนิคเอมีน (Silla, 1996 และ Shalaby, 1996)

ตารางที่ 2.10 ไบโอเจนิคเอมีนที่พบในอาหารและกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น

กรดอะมิโน	ไบโอเจนิคเอมีน
อาร์จินีน (arginine)	แอกมาทีน (agmatine)
ไลซีน (lysine)	คาดาเวอรีน (cadaverine)
ฮิสติดีน (histidine)	ฮิสตามีน (histamine)
ออร์นิทีน (ornithine)	พุทรีซีน (putrescine)
ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine)	ฟีนิลเอทิลลามีน (phenylethylamine)
ไทโรซีน (tyrosine)	ไทรามีน (tyramine)
ทริปโตเฟน (tryptophane)	ทริปตามีน (tryptamine)

ที่มา : Leuschner และคณะ (1998)

ซึ่งนอกจากปริมาณกรดอะมิโนและโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นแล้วสภาวะต่างๆ ต้องมีความเหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์และเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส เช่น น้ำ อากาศ พืชอาหาร อุณหภูมิ ออกซิเจน ประเภทของอาหาร และชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน เป็นต้น ภายใต้อาหารที่มีความเหมาะสมจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแล้วย่อยสลายกรดอะมิโนในอาหารเกิดเป็นสารไบโอเจนิคเอมีน (Silla, 1996) สารเอมีนมีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเอมีนเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการสังเคราะห์ฮอร์โมน อัลคาลอยด์ กรดนิวคลีอิก โปรตีน และเอมีนแล้วยังมีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นของอาหารเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารก่อมะเร็ง เช่น สารประกอบ N-ไนโตรโซ (Silla, 1996)

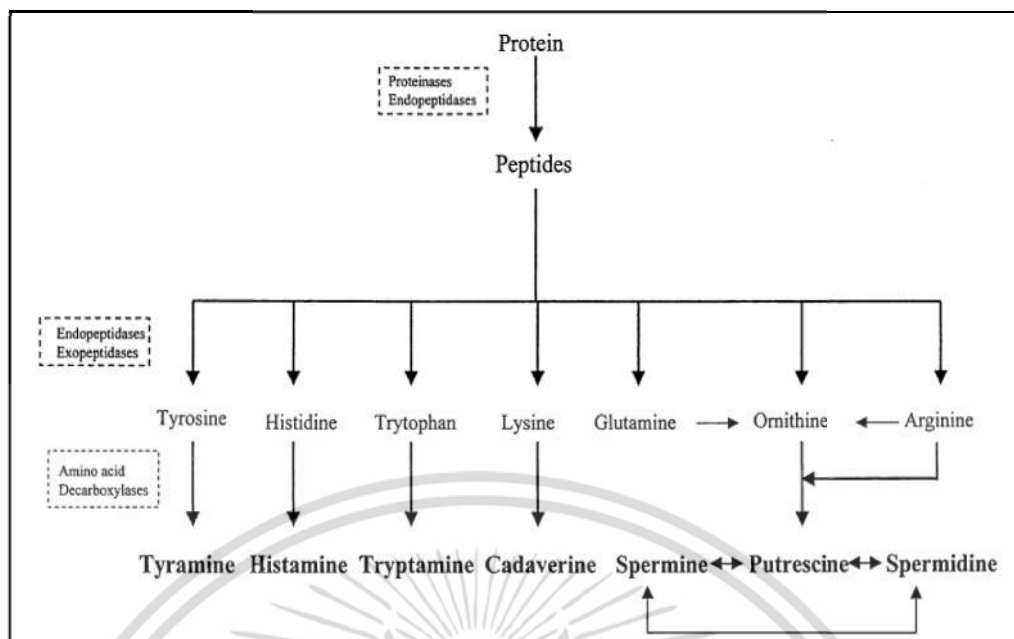
### 2.5.1 อาหารหมักที่มีสารไบโอเจนิคเอมีน

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่พบไบโอเจนิคเอมีนได้บ่อย ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์โดยเฉพาะเนื้อปลา เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูงจึงเป็นแหล่งของกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไบโอเจนิคเอมีน ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากปลาที่ผลิตในประเทศเวียดนาม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเชิงวิชาการเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เอกสารนี้โดยไม่ผ่านการแก้ไขใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และฮ่องกง จำนวน 37 ตัวอย่าง พบพิวเทรสซิน คาคาเวอริน และฮีสตามีน ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนไบโอจีนิกเอมีนที่พบเป็นส่วนใหญ่ในไส้กรอกหมักจากประเทศในทวีปยุโรป นั้นมีรายงานว่าพบไทรามินมากที่สุด รองลงมาคือ พิวเทรสซิน คาคาเวอริน และฮีสตามีน เนยแข็ง เป็นอาหารหมักอีกชนิดหนึ่งที่พบไบโอจีนิกเอมีนที่พบในเนยแข็งชนิดต่างๆ เช่น ฮีสตามีน ไทรามิน คาคาเวอริน พิวเทรสซิน ทริปตามีน และฟีนิลเอทิลามีน

### 2.5.2 การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

การเกิดไบโอจีนิกเอมีนในอาหารหมักขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร โดยมักจะพบไบโอจีนิกเอมีนในอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ปลาและเนื้อวัว ผลิตภัณฑ์นม ผัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จุลินทรีย์ในอาหารมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดไบโอจีนิกเอมีน จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส จะย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระและเกิดเป็นไบโอจีนิกเอมีน โดยจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลสเช่นดิงหมูแอลฟาคาร์บอนิล จากกรดอะมิโนอิสระเกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน เช่น การเปลี่ยนฮีสติดีนเป็นฮีสตามีน โดยเอนไซม์ฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ทำให้เกิดอาการแพ้หรือออร์นิติน สามารถเปลี่ยนเป็นสารพวกไดเอมีน (diamine) คือ พูทรีซิน จากพูทรีซินนี้สามารถเปลี่ยนเป็นสารพวกโพลีเอมีน (polyamine) คือ สเปอมีนและสเปอมีน มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์และไปเพิ่มความเป็นพิษของฮีสตามีน เป็นต้น วิธีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไปเป็นไบโอจีนิกเอมีน ชนิดต่างๆ (Halasz และคณะ 1994) แสดงในภาพที่ 2.8 ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจะมีคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียแลคติกสามารถหมักได้ เช่น น้ำตาลกลูโคส ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส และคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการหมักกรดทำให้ค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีค่าต่ำกว่า 5.0 ค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน เนื่องจากเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสมีกิจกรรมสูงที่พีเอชเป็นกรดพบว่าไบโอจีนิกเอมีนหลายชนิดในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ดังนั้น ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีพีเอชเป็นกรดจะพบไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณสูง



ภาพที่ 2.8 วิธีการเกิดไบโอเจนิคเอมีน

ที่มา: Halasz และคณะ (1994)

### 2.5.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไบโอเจนิคเอมีน

สารไบโอเจนิคเอมีนที่เกิดในอาหารนั้นเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนา เนื่องจากทำให้เกิดการสูญเสียกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย อาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสหรือเกิดจากการเติมกลูตาเมตลงในอาหารเพื่อให้เกิดการหมัก ประกอบกับสภาวะมีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสส่งผลต่อปริมาณสารไบโอเจนิคเอมีน (Custodio และคณะ, 2007) ดีคาร์บอกซิเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์นานาชนิดที่มีในอาหารหรือมาจากการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร

การเกิดไบโอเจนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารมีปัจจัยหลักมาจากจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส เอนไซม์นี้มีบทบาทในการเปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระให้เป็นไบโอเจนิคเอมีน ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถพบในอาหารทั่วไป ดังแสดงในตารางที่ 2.11 เช่น *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* และแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสได้หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด มีบทบาทต่อกระบวนการหมักเนื้อสัตว์ และการเพิ่มปริมาณของสารไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์

อาหาร	ไบโอจีนิกเอมีน	เชื้อจุลินทรีย์
เนื้อสัตว์	ฮีสตามีน	<i>Enterbacteriaceae, Staphylococcus capitis</i>
	ไทรามีน	<i>Staphy. carnosus, Staph. xylosus, Staph. epidermidis, Staphy. saprophyticus, Lb. brevis, Lb. curvatus, Lb.sakei, Lb.bavaricus, Carnobacterium divergenes, C. piscicola</i>
	พิวเทรสซีน	<i>Enterobacteriaceae, M. morgani, S. liquefaciens, Pseudomonas, Lb. curvatu, Enterococcus</i>
	คาร์ดาเวรีน	<i>Enterobacteriaceae</i>

ที่มา: Victor และคณะ (2010)

#### 2.5.4 พิษของไบโอจีนิกเอมีน

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของร่างกาย เช่น กระตุ้นการเจริญเมตาบอลิซึม ระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ ระบบประสาท ระบบเลือด การสังเคราะห์โปรตีน และความคงตัวของเยื่อเลือกผ่าน (membrane) (Silla, 1996) ไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกายต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.12

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ (Intoxication) เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนสูง (Ben-Gigirey และคณะ, 2000) อาการแพ้จะแสดงออกมาทันทีหรืออาจแสดงหลังจากบริโภคอาหารไปแล้วหลายชั่วโมง และอาการแพ้จะหายไปในช่วงเวลาประมาณ 8-12 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกัน (พรพรรณ, 2530) และกระบวนการกำจัดพิษของสารเอมีน การออกซิโดซ์เอมีนให้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกด้วยเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase, MAO) และไดเอมีนออกซิเดส (diamine oxidase, DAO) ของแต่ละบุคคล

อาการพิษหรือแพ้ที่พบสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม (Pereira และคณะ, 2001) คือ

1. แสดงอาการทางผิวหนัง ได้แก่ เกิดผื่นคัน ลมพิษ เป็นตุ่มน้ำหรือบวมแดง ปากบวมและอักเสบ
2. แสดงอาการทางระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง
3. มีผลต่อระบบประสาท อาการที่แสดง ได้แก่ ปวดศีรษะ วิงเวียน หน้าแดง และมีเหงื่อออกมาก หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตต่ำ และอาจมีอาการช็อคและเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะผู้ที่รับประทานยาโมโนเอมีนออกซิเดสอินฮิบิเตอร์ (monoamine oxidase inhibitor, MAOI) ซึ่งพบมากในผู้ป่วยที่มีอาการทางจิตแบบซิงเคร้า

นอกจากนี้ยังพบว่าสารในกลุ่มไดเอมีน ได้แก่ พูทรีซิน และคาตาเวรีน สามารถทำปฏิกิริยากับ

ไนไตรต์ (nitrite) เกิดเป็นไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Bover-Cid และ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่เชิงพาณิชย์) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Holzapfel, 1999) ความเป็นพิษของไบโอจินิกเอมีนสามารถเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากปัจจัยหลายๆ ปัจจัย เช่น แอลกอฮอล์ ความบกพร่องของกลไกการกำจัดสารพิษ โรคกระเพาะ การรับประทานยา MAOI เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดเอมีนและเพิ่มการดูดซึมสารเอมีนที่ผนังลำไส้เล็ก (Bover-Cid และคณะ, 2001b) ปริมาณความเป็นพิษของไบโอจินิกเอมีน ขนาดและปริมาณของไบโอจินิกเอมีนที่ทำให้เกิดพิษหรืออันตรายต่อร่างกาย เป็นสิ่งกำหนดได้ยาก เนื่องจากมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องโดยเฉพาะความต้านทานต่อพิษของแต่ละบุคคลและชนิดของไบโอจินิกเอมีน เช่น ไทราซีนปริมาณ 100-800 ppm ฟีนีลเอธิลลามีนปริมาณ 30 ppm (Silla Santos, 1996) และฮีสตามีนปริมาณ 100 ppm มีความเป็นพิษต่อร่างกาย (Shalaby, 1995)

### 2.5.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไบโอจินิกเอมีน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไบโอจินิกเอมีน ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ แกลือ น้ำตาล และออกซิเจน เป็นต้น (Vale และ Gloria, 1998)

#### 2.5.5.1 พีเอช

พีเอชจัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเกิดไบโอจินิกเอมีนเนื่องจากพีเอชมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสโดยเอนไซม์นี้ทำงานได้ในช่วงพีเอช 2.5-7 และทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกรดอ่อนๆ (4.0-5.5) (เขาวลักษณะ, 2543) เพื่อความอยู่รอดของเซลล์นั้นจุลินทรีย์จึงมีการสร้างไบโอจินิกเอมีนเพื่อเป็นการยับยั้งสภาวะที่เป็นกรด

#### 2.5.5.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีบทบาทต่อการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหาร โดยอุณหภูมิมิมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างไบโอจินิกเอมีน (Diaz-Cinco และคณะ, 1992) อุณหภูมิระหว่างกระบวนการหมักที่สูงขึ้นทำให้จุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่สามารถสร้างไบโอจินิกเอมีนได้มีการเจริญเพิ่มขึ้น และเหมาะสำหรับการเกิดกระบวนการสลายโปรตีนและกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันเป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของไบโอจินิกเอมีน (Majjala และคณะ, 1995)

#### 2.5.5.3 แกลือ

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำและอัตราส่วนของโซเดียมคลอไรด์ต่อน้ำระหว่างกระบวนการหมักมีผลต่อการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์และการสร้างไบโอจินิกเอมีนโดยพบว่าอัตราการสร้างไบโอจินิกเอมีนของ *Lb. bulgaricus* ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ (Chander และคณะ, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3.5-5.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการสร้างฮีสตามีน เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และรบกวนการสร้างเยื่อเลือกผ่านซึ่งเป็นที่ตั้งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Sumner และคณะ, 1990) เช่นเดียวกับการเจริญและการสร้างไทรามีนของ *Ent. faecalis* EF37 ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณของโซเดียมคลอไรด์คือ เมื่อมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจะมีการสร้างไทรามีนลดลง (Gardini และคณะ, 2001)

## ตารางที่ 2.12 ไบโอเจนิคเอมีนในอาหารและผลต่อการทำงานของอวัยวะในร่างกาย

เอมีน	ผลต่ออวัยวะในร่างกาย
ฮีสตามีน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การหลั่งอะดีนาลีน (adrenaline) และ นอร์อะดีนาลีน (noradrenaline)</li> <li>- กระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ มดลูกและระบบทางเดินหายใจ, กระตุ้นการทำงานของระบบประสาท</li> <li>- ควบคุมการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร</li> </ul>
ไทรามีน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การหดตัวของหลอดเลือด, เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจ, เพิ่มระดับน้ำตาลในกระแสเลือด</li> <li>- กระตุ้นการหลั่งของน้ำตาและน้ำลาย</li> <li>- การหลั่งนอร์อะดีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ</li> <li>- ก่อให้เกิดอาการไมเกรน (migraine)</li> </ul>
พูทริซินและคาตาเวอริน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ความดันโลหิตต่ำ หัวใจเต้นช้าากรรไกรแข็ง</li> <li>- ซาตามปลายมือปลายเท้า, เพิ่มความเป็นพิษของเอมีนอื่นๆ</li> </ul>
ฟีนิลเอธิลลามีน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- การหลั่งนอร์อะดีนาลีนจากระบบประสาทอัตโนมัติ</li> <li>- เพิ่มความดันโลหิต</li> <li>- ก่อให้เกิดอาการไมเกรน</li> </ul>
ทริปตามีน	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เพิ่มความดันโลหิต</li> </ul>

ที่มา: Shalaby (1996)

### โซเดียมซัลไฟต์ (sodium sulfite)

Bover-Cid และคณะ (2001d) ศึกษาผลของโซเดียมซัลไฟต์ต่อการเกิดไบโอเจนิคเอมีนในระหว่างการหมักไส้กรอก พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ 500 และ 1,000 ppm ไม่สามารถลดปริมาณของไทรามีนได้ แต่สามารถลดปริมาณของคาตาเวอรินได้โดยในทุกชุดการทดลองพบไทรามีน 75-140 ppm

2.5.5.4 กลูโคส จูลินทรีย์ต้องการกลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตจำนวนหนึ่งสำหรับใช้เป็นพลังงานในกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อการเจริญและยังมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของกรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) โดยเฉพาะ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ถ้าความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่าร้อยละ 3 มีผลไปยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีน (Halasz และคณะ, 1994)

2.5.5.5 ออกซิเจน จากรายงานของ Halasz และคณะ (1994) กล่าวว่า *Ent. cloaceae* มีการสร้างฟูรีซินในสภาวะไม่มีออกซิเจนน้อยกว่าในสภาวะมีออกซิเจนถึงครึ่งหนึ่ง *Klebsiella pneumonia* มีการสร้างคาตาเวอรินลดลงภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนแต่มีการสร้างฟูรีซินเพิ่มขึ้นสำหรับการสร้างฮีสตามีนพบว่า ในสภาวะที่มีออกซิเจนไม่มีการสร้างฮีสตามีนหรือมีการสร้างน้อย เนื่องจากออกซิเจนจะไปยับยั้งการทำงานของฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส

2.5.5.6 กรดอะมิโน เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดไบโอจีนิกเอมีนเนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนซึ่งถ้าในอาหารชนิดใดมีกรดอะมิโนสูงจะส่งผลให้มีการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในอาหารสูงเช่นกัน เช่น ในเนยแข็งมีกรดอะมิโนอิสระสูงถึง 478 ppm จึงทำให้พบไบโอจีนิกเอมีนสูงถึง 838 ppm (Pinho และคณะ, 2001) ในไวน์มีกรดอะมิโนอิสระเป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิดโดยมีปริมาณแตกต่างกันได้แก่ ฮีสติดีน (13.7 ppm) ไทโรซีน (10.08 ppm) ออร์นิติน (7.76 ppm) ไลซีน (24.29 ppm) เป็นต้น และพบว่ามีไบโอเจนิคเอมีนหลายชนิดเช่นกันคือ ฮีสตามีน (9.94 ppm) ไทรามีน (10.16) ฟีนิลเอธิลลามีน (0.16 ppm) เอธิลลามีน (0.08 ppm) (Soufleros และคณะ, 1998) ในเนื้อหมูที่นำมาทำไส้กรอกหมักพบไทโรซีนสูงถึง 101 ppm แต่ไม่พบไทรามีน แต่หลังจากผ่านกระบวนการหมักพบว่าการลดลงของปริมาณไทโรซีนคงเหลือ 18.1 ppm และมีการเพิ่มขึ้นของไทรามีนสูงถึง 64.4 ppm (Coisson และคณะ, 2004)

Amonlaya และคณะ (2011) ศึกษาอิทธิพลของคุณภาพเนื้อหมูและแฮมที่มีการเติมกลูต้าเชื้อที่สร้างสารเอมีนจากการศึกษาพบว่าแฮมก่อนการหมักที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบการสะสมของสารประกอบเอมีน (คาตาเวอริน, ฟูรีซิน ฮีสตามีน และไทรามีน) ในแฮมสูงอย่างมีนัยสำคัญจากเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ แต่เมื่อมีการใช้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* BCC 9546 เป็นกลูต้าเชื้อในการผลิตแฮมทำให้สารประกอบเอมีนในแฮมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และการกลูต้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการลดการสะสมของสารประกอบเอมีนในระหว่างกระบวนการหมักแฮม

Bover-Cid และคณะ (2001) ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแฮม (fermented pork sausage) จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) และนำไปวิเคราะห์การสร้างไบโอจีนิกเอมีนโดย ion-pair HPLC พบว่า *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Lb. bavaricus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. sakei* และ *Lactobacillus* sp. มีการสร้างไทรามีน

Bover-Cid และ Holzapfel (1999) ศึกษาการสร้างไบโอจีนิกเอมีนจากแบคทีเรียแลคติกในอาหาร Improved medium และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโดยใช้วิธีวิเคราะห์ HPLC พบว่าแบคทีเรีย

กรดแลคติกส่วนมากมักสร้างไทรามีนโดยสร้างอยู่ในช่วง 20-5,000 ppm โดย *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Leuconostoc carnosum* และ *Ent. faecalis* สร้างไทรามีน

Ayres และคณะ (1980) พบว่าปริมาณไบโอเจนิคเอมีนที่ต่างกันทำให้เกิดอาการต่างกัน กล่าวคือหากร่างกายได้รับฮีสตามีนในปริมาณที่มากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหารทำให้เกิดพิษต่อร่างกายไทรามีนปริมาณมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหารและฟีนิลเอธิลลามีนปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหาร ทำให้เกิดอาการไมเกรน ไทรามีนปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหารทำให้เกิดอาการบวม และที่ 6 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหารทำให้เกิดความดันโลหิตต่ำ ปวดศีรษะ หน้าแดง ปวดท้องอย่างกะทันหัน (Komprda และคณะ, 2004) และมีความเป็นพิษต่อผู้ที่รับประทานยา MAOI (Shalaby, 1996)

Soufleros และคณะ (1998) กล่าวว่าไบโอเจนิคเอมีนปริมาณ 600-1,000 ppm เป็นพิษต่อมนุษย์ และไบโอเจนิคเอมีน 100-200 ppm ทำให้เกิดอาการหน้าแดง ฟีนิลเอธิลลามีน 3 ppm และไทรามีน 25-40 ppm ในไวน์ทำให้เกิดอาการไมเกรนและความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามีไอโซเอมิทลามีน พูทรีซิน และคาตาเวอรินที่พบในไวน์สามารถทำปฏิกิริยากับฮีสตามีนส่งผลให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้นสำหรับพวก volatile aliphatic monoamines เมทิลลามีน และเอทิลลามีน ถ้าพบในไวน์ปริมาณ 1 ppm ทำให้เกิดอาการแพ้

Kalac และคณะ (2002a) กล่าวว่า ถ้าผู้ป่วยได้รับประทานเบียร์ที่มีไทรามีนปริมาณ 6 ppm ภายในเวลา 4 ชั่วโมง หรือได้รับในปริมาณมากกว่า 10 ppm ทำให้เกิดอาการแพ้ รวมทั้งมีรายงานพบว่า ผู้ที่รับประทานยาโมโนเอมีนออกซิเดสอินฮิบิเตอร์แล้วได้รับไทรามีนจากเบียร์ทำให้เกิดอาการความดันโลหิตสูง สำหรับความเป็นพิษของฮีสตามีนสามารถแบ่งระดับความเป็นพิษได้เป็น 3 ระดับ คือ พิษน้อยมีปริมาณ 8-40 ppm พิษปานกลางมีปริมาณ 70-1,000 ppm และพิษรุนแรงมีปริมาณ 1,500-4,000 ppm (Ayhan และคณะ, 1999)

ในสหรัฐอเมริกา US Food and Drug Administration (USFDA) 2011 ได้กำหนดปริมาณฮีสตามีนที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในปลาทูน่าอัลบาคอร์สคิปแจ็คเซลโลฟิลและมาฮิ-มาฮิ มีค่าเท่ากับ 500 ppm และระดับฮีสตามีนที่ทำให้อาหารเป็นพิษมีค่าเท่ากับ 200 ppm (Du และคณะ, 2002)

ในปี ค.ศ. 1993 กลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรป (EEC) กำหนดปริมาณฮีสตามีนสำหรับผลิตภัณฑ์ประมงทั่วไปว่า 100 ppm ทำให้เกิดความเป็นพิษและปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้คือ 200 ppm ประเทศเดนมาร์ก และสวีเดน กำหนดปริมาณที่ทำให้เกิดความเป็นพิษเป็น 300 และ 200 ppm ตามลำดับ (Infofish, 1987)

Food and Drug Administration (FDA) กำหนดให้มีฮีสตามีนในปลาทูน่า และปลาสายพันธุ์ต่างๆ ได้ไม่เกิน 50 ppm (FDA, 1996)

Wadu และคณะ (2011) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดฮีสตามีนและไทรามินได้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยใช้อาหารดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) และเชิงปริมาณ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ HPLC เมื่อวิเคราะห์วิธีเชิงคุณภาพ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 50 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตในอาหาร Decarboxylase นอกจากนี้ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ ทำการตรวจยืนยันการปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนโดยใช้วิธีวิเคราะห์ HPLC พบว่า แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. casei* (TISTR 389) และ *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (TISTR 895) มีการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน โดยที่ *Lb. casei* (TISTR 389) สามารถผลิตฮีสตามีน ( $1820.9 \pm 3.5$  ppm) และไทรามิน ( $5486.99 \pm 47.6$  ppm) ปริมาณสูง ขณะที่ *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (TISTR 895) มีการผลิตฮีสตามีน ( $459.1 \pm 0.63$  ppm) เพียงอย่างเดียวในอาหารดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการทดลอง

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังนี้

3.1.1.1 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ผลิต pediocin PA-1 (Swetwathana, 2005)

3.1.1.2 *Pediococcus pentosaceus* M13 ผลิต pediocin PA-1 (Swetwathana และคณะ, 2008)

3.1.1.3 *Lactobacillus plantalum* NF38 ผลิต plantaricin W (Swetwathana, 2005)

3.1.1.4 *Lactococcus lactis* N12 ผลิต nizin ผลิต nisin Z (Shea และคณะ, 2003)

3.1.1.5 *Lactobacillus plantalum* SS7 ผลิต plantaricin W (Swetwathana และคณะ, 2016)

3.1.1.6 *Lactobacillus plantalum* KMITL- QU54 ผลิต pediocin-like (Swetwathana และคณะ, 2007)

3.1.1.7 *Weisella cibaria* KMITL- QU21unknow bacteriocin (Swetwathana และคณะ, 2008)

3.1.2 เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดไตรามีน

3.1.2.1 *Lactococcus brevis* BCC 26756 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

#### 3.2 ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างเหนมจากบริษัท ไทยอินโนฟู้ด จำกัด

#### 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

3.3.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, Germany)

3.3.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30, 37 และ 41.5 องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.3.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (Bosstech, Thailand)

3.3.6 ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)

3.3.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Mettmert, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tommy, Japan)
- 3.3.9 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20-200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Gilson, France)
- 3.3.10 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific Industris, USA)
- 3.3.11 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (Inolab, Germany)
- 3.3.12 ห้องเย็น (Chill room) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.3.13 เครื่องตีปั่น (Stomacher) (IUL instruments, Spain)
- 3.3.14 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon ECLIPSE E200, China)
- 3.3.15 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 15x100 มิลลิเมตร (Kartell, Italy)
- 3.3.16 ทิป (Tips) ขนาด 20-200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Gilson, USA)
- 3.3.17 ขวดคูแรน (Laboratory bottle) (Duran, Germany) ขนาด 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิเมตร
- 3.3.18 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (Centrifuge) (Eppendorf 5804R, Germany)
- 3.3.19 เครื่องวัดวอเตอร์แอกทีวิตี (AQUALAB รุ่น 4TE, USA)
- 3.3.20 ช้อนสแตนเลส (Stainless spoon) (หัวมัลลาย, ประเทศไทย)
- 3.3.21 กระจกน้ำแข็ง (Cooler) (Everest, Thailand)
- 3.3.22 เจลความเย็น (Icepack) (Coleman, China)
- 3.3.23 หลอดทดลองขนาด (Test tube) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร
- 3.3.24 หลอดทดลองขนาด (Test tube) ขนาด 13x150 มิลลิเมตร
- 3.3.25 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 มิลลิตร
- 3.3.26 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิตร
- 3.3.27 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิตร
- 3.3.28 ปิเปตแก้ว (Pipettes) ขนาด 5 และ 10 มิลลิตร
- 3.3.29 แผ่นกระจก (Glass slide)
- 3.3.30 แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader)
- 3.3.31 ลูปและเข็มเย็บเชื้อ (Loop and needle)
- 3.3.32 ตะเกียง (Burner)

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี

#### 3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.1 Agar (Difco, USA)

3.4.1.2 Beef extract (V.S. Chem house, Thailand)

3.4.1.3 Buffer peptone water (BPW) (Difco, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.1.4 Dextrose (Merck, Germany)
- 3.4.1.5 D (+) glucose (Merck, Germany)
- 3.4.1.6 De Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS) (Difco, USA)
- 3.4.1.7 Hektoer Enteric Agar (HE) (Difco, USA)
- 3.4.1.8 Lysine-Indole-Motility (LIM) medium (Difco, USA)
- 3.4.1.9 Muller-Kauffiman Tetrathionate Brilliant Green (MKTTn) (Merck, Germany)
- 3.4.1.10 Nutrient Agar (NA) (Merck, Germany)
- 3.4.1.11 Nham Model Broth (NMB)
- 3.4.1.12 Peptone (Rajasthan, India)
- 3.4.1.13 Plate Count Agar (PCA) (Difco, USA)
- 3.4.1.14 Rappapost Vassiliadis Soya (RVS) (Difco, USA)
- 3.4.1.15 Triple Sugar Iron (TSI) agar slant (Difco, USA)
- 3.4.1.16 Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco, USA)
- 3.4.1.17 Tryptone (Merck, Germany)
- 3.4.1.18 Trypticase Soy Agar (TSA) (Difco, USA)
- 3.4.1.19 Urea Agar base (Difco, USA)
- 3.4.1.20 Xylose-Lysin-Desoxycholate (XLD) agar (Oxoid, UK)
- 3.4.1.21 Yeast extracts (Rajasthan, India)

### 3.4.2 สารเคมี

- 3.4.2.1 แอลกอฮอล์ 95% (องค์การสุราไทย, ประเทศไทย)
- 3.4.2.2 กิลีเชอรอด (Carlo Erba Reagent, Italy)
- 3.4.2.3 Agglutinating antiserum (polyvalent) A-67 และ A-I
- 3.4.2.4 Ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.5 Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) (Merck, Germany)
- 3.4.2.6 Copper Sulphatepenta-hydrate (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.7 Crystal violet (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.8 Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.9 Iodine (I<sub>2</sub>) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.10 L-Tyrosine disodium salt hydrate (Sigma, USA)
- 3.4.2.11 L- Histidine monohydrochloride monohydrate (Sigma, USA)
- 3.4.2.12 L-Lysine monohydrochloride (Sigma, USA)
- 3.4.2.13 L-Ornitine monohydrochloride (Sigma, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.2.14 Magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.15 Manganese sulfate monohydrate ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.16 Potassium di-hydrogenphosphate ( $KH_2PO_4$ ) (Merck, Germany)
- 3.4.2.17 Potassium iodide (KI) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.18 Safranin O (Scharlau Chemie S.A., Spain)
- 3.4.2.19 Sodium ascobate (Sigma, USA)
- 3.4.2.20 Sodium chloride (NaCl) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.21 Sodium hydroxide (NaOH) (Carlo Erba, Italy)
- 3.4.2.22 Sodium acetate (RCI-labscan)
- 3.4.2.23 Sodium nitrite (Merck, Germany)
- 3.4.2.24 Tri-Ammonium citrate (Sigma, USA)
- 3.4.2.25 Tween 80

### 3.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.6 ระยะเวลาทำการทดลอง

เดือน มกราคม 2558 ถึง เดือนมิถุนายน 2560

### 3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.7.1 การเปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดอาหารเหลวและสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและแบบนิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก

ศึกษาอิทธิพลของชนิดอาหารเหลว GYP (Glucose Yeast extract Peptone broth) และอาหารเหลว MRS (de Man-Rogosa-Sharpe broth) รวมถึงสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่าหรือแบบนิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 นำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารบรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตรทำการหมักที่สภาวะเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเขย่า 100 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับการหมักในตู้บ่มอุณหภูมิที่สภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างน้ำหมัก ทุก 2 ชั่วโมงจนถึง 12 ชั่วโมง (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก (ภาคผนวก ข) ค่าพีเอช ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ค)

จากการศึกษาข้างต้นเมื่อได้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ดีที่สุดแล้ว นำชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่ได้มาทำการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งเปรียบเทียบกับสภาวะนิ่งแบบเขย่ามือทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายยีสต์เชื้อที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร ทำการหมักที่สภาวะนิ่งเปรียบเทียบกับสภาวะนิ่งแบบเขย่า (เขย่าโดยใช้มือเขย่า) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเขย่าพลาสติกโดยใช้มือเขย่าทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง เขย่านาน 10 วินาที และทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึง 12 ชั่วโมง (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ชั่วโมง) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก (ภาคผนวก ข) ค่าพีเอช ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคส ของแบคทีเรียแลคติก (ภาคผนวก ค)

### 3.7.2 การศึกษาการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาในขั้นตอนนี้ นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักไทย ชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ *P. pentosaceus* TISTR 536 (Swetwathana, 2005), *P. pentosaceus* M13 (Swetwathana และคณะ, 2008), *Lb. plantalum* NF38 (Swetwathana, 2005), *Lc. lactis* N12 (Shea S และคณะ, 2003), *Lb. plantalum* SS7 (Swetwathana และคณะ, 2016), *Lb. plantalum* KMITL RS-54 (Swetwathana และคณะ, 2007) และ *W. cibaria* KMITL-QU2 (Swetwathana และคณะ, 2008) มาทำการตรวจสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีน

#### 3.7.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมา cross streak ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ  $\text{CaCO}_3$  0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยมา 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ทำการปั่นเหวี่ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ 6,000 รอบต่อนาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีก 1 รอบด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) เมื่อได้ตะกอนเซลล์แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วยสารละลาย PBS และนำไปทำการวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่อง McFarland standard ให้มีค่าเอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานาน นีไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 0.5 McF. หรือเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml จากนั้นปรับความเข้มข้นเซลล์ด้วยน้ำยาเจือจาง buttlefield's phosphate buffered เป็น  $10^6$  cfu/ml และ  $10^4$  cfu/ml

### 3.7.2.2 ตรวจสอบการสร้างและไม่สร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร Improved medium (Bover-Cid และ Holzappel, 1999)

#### ก) การศึกษาผลการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.2.1 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Improved medium ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ  $10^6$  cfu/ml ที่มีกรดอะมิโน ไทโรซีน ไลซีน ฮิสติดีน และออร์นิทีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โบรโมครีซอลเพอเฟิล (bromocresol purple) 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต (pyridoxal-5-phosphate) 0.005 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำเชื้อจากการเพาะเลี้ยงมาเจือลงบนอาหารแข็ง Improved medium ที่มีการเติมกรดอะมิโน ไทโรซีน (tyrosine) ไลซีน (lysine) ฮิสติดีน (histidine) และออร์นิทีน (ornitine) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โบรโมครีซอลเพอเฟิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเหลว Improved medium ที่ไม่เติมกรดอะมิโน จากนั้นนำไปบ่มภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีนโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์รอบๆของโคโลนีของแบคทีเรียแลคติก และสีของอาหาร Improved medium

#### ข) การศึกษาผลของพีเอชในอาหารเหลว Improved medium ต่อการสร้างไบโอจินิกเอมีน

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.7.2.1 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Improved medium ที่เติมกรดอะมิโน ไทโรซีน ไลซีน ฮิสติดีน และออร์นิทีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โบรโมครีซอลเพอเฟิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ บ่มในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง (0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง) โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของพีเอชต่อการสร้างไบโอจินิกเอมีนด้วยเครื่องวัดพีเอช เพื่อดูแนวโน้มในการสร้างไบโอจินิกเอมีน (ศิริรัตน์, 2547)

### 3.7.3 ตรวจสอบการยับยั้งการสร้างไบโอจินิกเอมีนของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักแหมม

เตรียมอาหารจำลองการหมักแหมม (Nham Model Broth, NMB) ตามวิธีการของ Swetwathana และคณะ (1999) ปรับค่าวอเตอร์แอกทีวิตี (water activity, Aw) ของอาหารจำลองดังกล่าวด้วยกลีเซอรอลโดยเตรียมอาหาร NMB ปริมาตร 200 มิลลิลิตรลงในขวดทนร้อนฝาเกลียวนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.2.1 ถ่ายลงในอาหารเหลวจำลองของແໜມທີ່เติม อินดิเคเตอร์ โบรโมครีซอลเฟอเฟล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไฟริโคซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะมิโน (ไทโรซีน ไลซีน ฮีสติดีน และออร์นิติน) 0.1 เปอร์เซ็นต์

โดยแบ่งอาหารเหลว NMB ออกเป็น 6 กลุ่มการทดสอบ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 อาหารเหลว NMB เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก)

กลุ่มที่ 2 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536  $10^6$  cfu/ml

กลุ่มที่ 3 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อที่สร้างไบโอจินิกเอมีน *W. cibaria* KMITL-QU21  $10^4$  cfu/ml

กลุ่มที่ 4 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อที่สร้างไบโอจินิกเอมีน *Lc. brevis* BCC26756  $10^4$  cfu/ml

กลุ่มที่ 5 อาหารเหลว NMB ที่เติมกล้าเชื้อกล้าเชื้อผสม *P. pentosaceus* TISTR 536  $10^6$  cfu/ml + *W. cibaria* KMITL QU21  $10^4$  cfu/ml

กลุ่มที่ 6 อาหารเหลว NMB ที่เติมกล้าเชื้อกล้าเชื้อผสม *P. pentosaceus* TISTR 536  $10^6$  cfu/ml + *Lc. brevis* BCC 26756  $10^4$  cfu/ml

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่าง ที่ 0, 3, 5 และ 7 วัน มาทำตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (ศิริรัตน์, 2547) และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง Improved medium (Bover-Cid และ Holzapfel, 1999) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจากชั่วโมงที่ 72 มาเขี่ยลงบนอาหารแข็ง Improved medium ที่มีกรดอะมิโน (ไทโรซีน ไลซีน ฮีสติดีน และออร์นิติน) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โบรโมครีซอลเฟอเฟล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไฟริโคซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ และอาหารแข็งที่ไม่เติมกรดอะมิโน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีน โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์รอบๆ โคลโลนิ ของแบคทีเรียแลคติกเพื่อทำการเปรียบเทียบและยืนยันผลของการสร้างไบโอจินิกเอมีนในแบบจำลองการหมักของແໜມในอาหารแข็งและอาหารเหลว Improved medium

**3.7.4 ตรวจสอบยืนยันการสร้างไบโอเจนิคเอมีนของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักແໜມ โดยใช้เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (ดัดแปลงมาจาก Yongsawatdigul และ Udomporn, 2004)**

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.7.2.1 ถ่ายลงในอาหารจำลองของແໜມ (NMB) ที่เติม อินดิเคเตอร์โบรโมครีซอลเฟอเฟล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไฟริโคซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ และเติมกรดอะมิโนไทโรซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมตัวอย่างແໜມโดยใช้สภาวะจำลองการหมักແໜມ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม

ดั่งนี้  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 อาหารเหลว NMB เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก)

กลุ่มที่ 2 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536  $10^6$  cfu/ml

กลุ่มที่ 3 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อที่สร้างไบโอจินิกเอมีน *W. cibaria* KMITL-QU21  $10^4$ cfu/ml

กลุ่มที่ 4 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อที่สร้างไบโอจินิกเอมีน *Lc. brevis* BCC 26756  $10^4$ cfu/ml

กลุ่มที่ 5 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อผสม *P. pentosaceus* TISTR 536  $10^6$  cfu/ml + *W. cibaria* KMITL - QU21  $10^4$ cfu/ml

กลุ่มที่ 6 อาหารเหลว NMB ที่เติมเชื้อกล้าเชื้อผสม *P. pentosaceus* TISTR536  $10^6$  cfu/ml + *Lc. brevis* BCC26756  $10^4$ cfu/ml

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 1, 2 และ 3 วัน นำไปทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารไบโอจินิกเอมีนชนิดไทรามินโดยใช้เทคนิค HPLC (ภาคผนวก ง.) โดยทำการส่งตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของไบโอจินิกเอมีนชนิดไทรามิน ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

### 3.7.5 ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการผลิตแฮม

#### 3.7.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ลงจาก stock culture ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหารเหลว GYP ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการซลฟาวด์กล้าเชื้อ และนำขวดกล้าเชื้อใส่กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งส่งให้กับทางโรงงาน เพื่อนำไปใช้ในการหมักแฮม กล้าเชื้อที่ได้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก  $10^6$  cfu/g จะใส่ลงในแฮม โดยใส่กล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อแฮม 1 กิโลกรัม

#### 3.7.5.2 การผลิตแฮม

ทางบริษัท ไทยอินโนฟู้ด จำกัด ทำการผลิตแฮมแห้งขนาด 250 กรัม นำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากข้อ 3.7.5.1 ไปใช้ในการหมักของแฮม โดยจะแบ่งการผลิตแฮมออกเป็น 2 สูตร ดังนี้

**สูตรที่ 1** แฮมที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536

**สูตรที่ 2** แฮมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536

จากนั้นทางบริษัทจะนำแฮมอัดแห้งที่เดิมและไม่เดิมกล้าเชื้อของการบ่มวันที่ 0 และวันที่ 3 ของการหมัก จำนวนอย่างละ 20 แท่ง บรรจุลงกล่องโฟมและอัดน้ำแข็งเพื่อควบคุม อุณหภูมิการแช่เย็นส่งมาที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพของแฮม ณ ห้องปฏิบัติการสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.7.5.3 การสุ่มตัวอย่าง

ทำการสุ่มตัวอย่างแฮมอย่างน้อย 3-4 แท่ง ทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 3 ของกระบวนการหมัก มาทำการตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ผสมรวมกัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างไปทำการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

1. ด้านจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และเชื้อซัลโมเนลลา (ISO 6579, 2002) (ภาคผนวก ข)
2. ด้านเคมี โดยวิเคราะห์ค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช, ปริมาณกรดแลคติกทั้งหมด (AOAC, 1990), ค่าความชื้น (AOAC, 2000) และค่าออสโมเตอร์แอคทีวิตี โดยใช้เครื่องวัด water activity (ภาคผนวก ค)
3. คุณสมบัติทางประสาทสัมผัส ของแฮมที่เดิมกล้าเชื้อและไม่เดิมกล้าเชื้อ นำแฮมที่มีการเดิมกล้าเชื้อและไม่เดิมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ทำการหมักแฮมที่ผลิตจนครบ 3 วัน นำไปทดสอบประเมินความชอบของแฮมในด้านต่างๆ (ภาคผนวก จ) โดยใช้ผู้ชิมจำนวน 50 คน ดำเนินการทดสอบโดยการทดสอบผู้ชิมประเมินผลในด้าน สี กลิ่น รส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ซึ่งแบ่งออกเป็น 9 ระดับ คือ 9= ชอบมากที่สุด และ 1= ไม่ชอบมากที่สุด (9-point hedonic scale) นำคะแนนที่ได้ทำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนในด้านต่างๆ

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการเปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดอาหารเหลว และสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่า และแบบนิ่งต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก

ในงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ได้รับทุนของบริษัท ไทยอินโนฟู้ด จำกัด ซึ่งมีความสนใจที่จะใช้ กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักเหนม เนื่องจากก่อนหน้านี้ Swetwivathana, 2005 ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการหมักหรือยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในสภาวะการหมักเหนมจริง และเหนมจำลอง (Nham Model Broth) ต่อมา Swetwivathana และคณะ, 2007 ศึกษาการเป็นเชื้อโปรไบโอติก พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 มีคุณสมบัติอีกอย่างคือการเป็นเชื้อโปรไบโอติก เนื่องจากเป็นเชื้อที่ทนความร้อนได้สูงและกรดต่ำได้ แต่คุณสมบัติอีกอย่างคือแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อต้องไม่สร้างสารไบโอจินิกเอมีน ดังนั้น จึงนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกมา ทำการศึกษา เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันว่ากล้าเชื้อที่ใช้มีความปลอดภัยสามารถใช้เป็นกล้าเชื้อใน ผลิตภัณฑ์เหนมได้

##### 4.1.1 การเติบโตของของแบคทีเรียแลคติก

ในการทดลองเลือกศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 สองปัจจัย คือ ปัจจัยเนื่องจากชนิดของอาหาร (อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP (Glucose Yeast extract Peptone broth) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (De Man-Rogosa-Sharpe broth) และ ปัจจัยเนื่องจากสภาวะการเพาะเลี้ยง (เพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง)

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (ภาพที่ 4.1) พบว่าทุกหน่วยทดลอง การเติบโตของเซลล์แบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่การเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และ GYP มีการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก เริ่มต้นเท่ากับ  $6.35 \pm 0.06 \log \text{ cfu/ml}$  และ  $6.26 \pm 0.00 \log \text{ cfu/ml}$  และเพิ่มขึ้นเป็น  $11.90 \pm 0.18$  และ  $12.00 \pm 0.00 \log \text{ cfu/ml}$  ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง และมีค่าความขุ่นของเซลล์ ( $\text{OD}_{600}$ ) เท่ากับ  $7.2 \pm 0.64$  และ  $5.99 \pm 0.45$  ตามลำดับ โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $1.75 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร และ  $1.77 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าน้ำหนักเซลล์แห้งให้ค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่เมื่อพิจารณาในรูปของค่าความขุ่นเซลล์ในอาหารเหลว MRS ให้ค่าความขุ่นของเซลล์สูงกว่าอาหารเหลว GYP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (ภาพที่ 4.2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP พบว่าการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ  $6.77 \pm 0.01$  และ  $5.75 \pm 0.04$  log cfu/ml ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น  $11.70 \pm 0.11$  และ  $12.72 \pm 0.00$  log cfu/ml ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง และมีค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ  $7.74 \pm 0.18$  และ  $11.79 \pm 0.73$  ตามลำดับ โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $1.71 \pm 0.30$  และ  $1.61 \pm 0.09$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสองชนิดมีความแตกต่างกันโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS มีค่าความขุ่นของเซลล์ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP

จากผลการดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งมีการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าในอาหารเหลว MRS ที่ใช้เชิงการค้า โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่สูงสุดกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ เมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า อาหารเหลว MRS มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนกว่าอาหาร GYP โดยเฉพาะส่วนประกอบจำพวกเกลือแร่ ได้แก่ ammonium citrate และ sodium acetate ซึ่ง Evan และ Niven (1951) และ Tittler และคณะ (1952) พบว่า เกลือ acetate และ citrate มีผลช่วยในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียแลคติกได้ดี สอดคล้องกับสายซด (2520) กล่าวว่าอัตราการเจริญสูงสุดของเชื้อจะลดลงหากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่มีการเติม ammonium citrate และ sodium acetate ลงไป นอกจากนี้ Tween 80 เป็นสารอาหารที่สำคัญ คือเป็นสารอาหารจำพวกกรดไขมัน ซึ่ง Gilliland และคณะ (1974) กล่าวว่า Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกรดโอเลอิกผสมอยู่ซึ่งมีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อมีความแข็งแรงมากขึ้น ส่งผลที่เสริมการเจริญเติบโตของเชื้อได้

#### 4.1.2 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 (ภาพที่ 4.3ก) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และ GYP มีค่าเท่ากับ  $8.40 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร และ  $8.12 \pm 0.16$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ  $7.96 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร และ  $6.27 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลทดลองการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP มีการใช้น้ำตาลในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลคติกมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

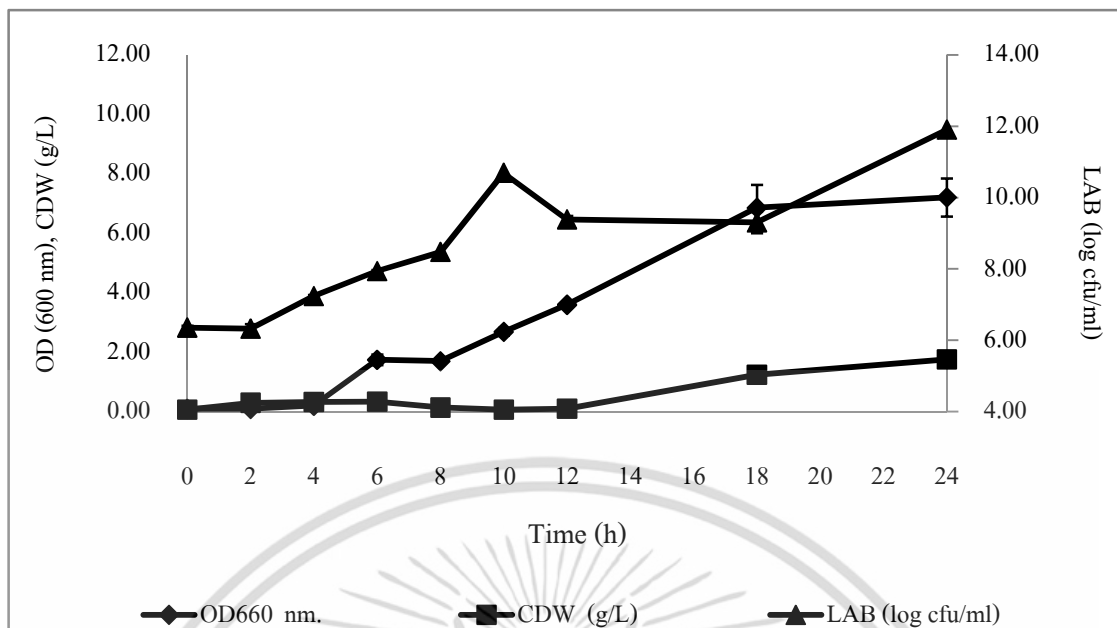
เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 แบบนิ่ง (ภาพที่ 4.3) มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ  $8.24 \pm 0.04$  กรัมต่อลิตร และ  $7.98 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ  $6.59 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตร และ  $2.94 \pm 0.04$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

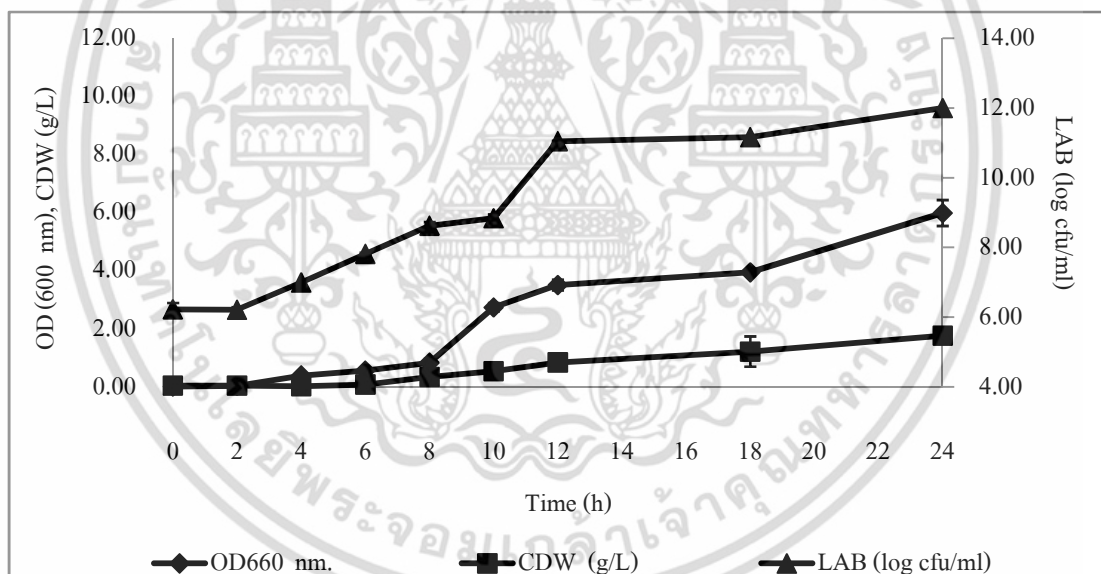
จากผลทดลองการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อเลี้ยงเหลว GYP มีการใช้น้ำตาลในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลคติกมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยจากผลการทดลองการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสภาวะ (แบบเขย่าและแบบนิ่ง) ในอาหารเหลว GYP เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการใช้น้ำตาลที่เร็วกว่าในอาหารเหลว MRS เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเจริญและผลิตกรดแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ซึ่งเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Collins-Thomson และคณะ (1983) รายงานว่าปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการลดลงของระดับพีเอช



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



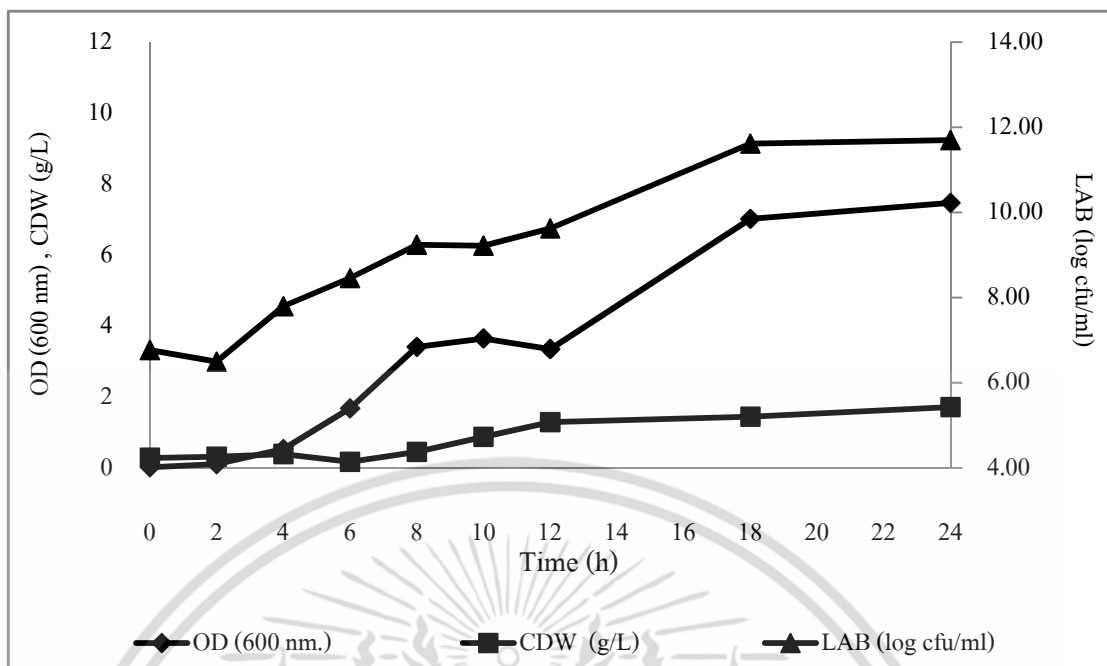
(ก)



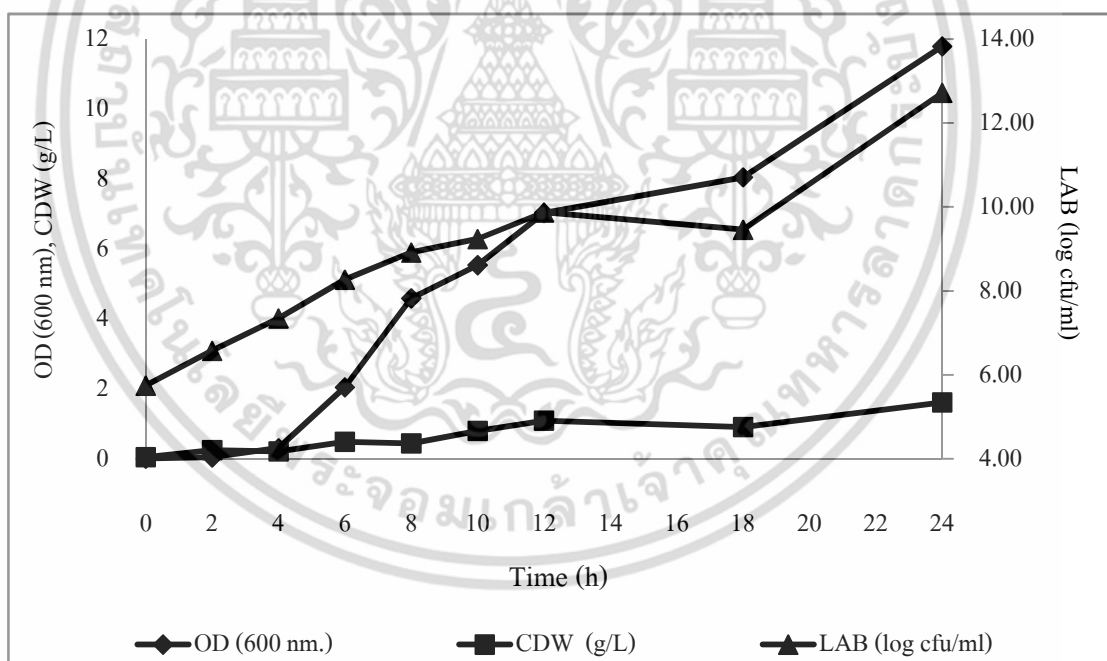
(ข)

ภาพที่ 4.1 การเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว MRS (ก) และอาหารเหลว GYP (ข)

หมายเหตุ: LAB คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียแลคติก,  $OD_{600}$  คือ ความขุ่นของเซลล์ และ CDW คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง



(ก)

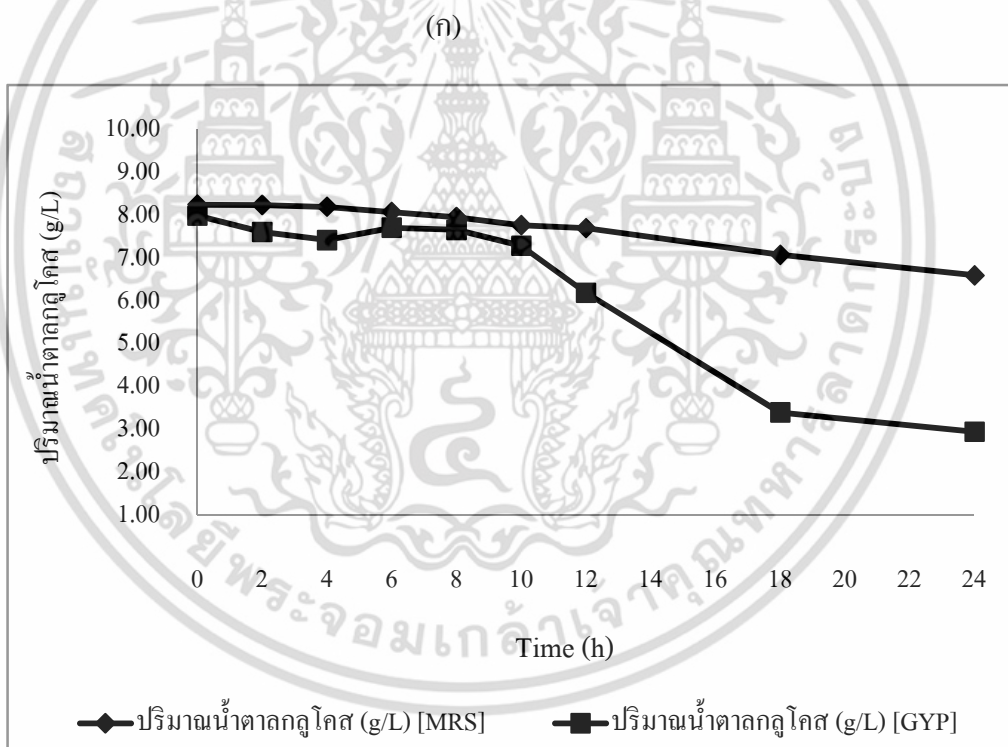
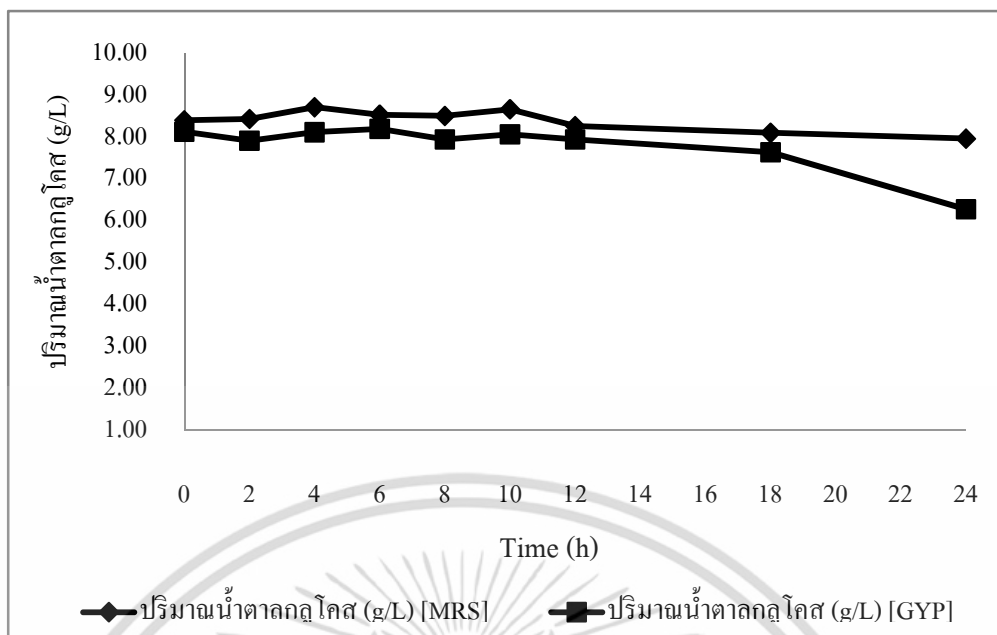


(ข)

ภาพที่ 4.2 การเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เพาะเลี้ยงแบบนิ่ง ในอาหารเหลว MRS (ก) และอาหารเหลว GYP (ข)

หมายเหตุ: LAB คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียแลคติก, OD<sub>600</sub> คือ ความขุ่นของเซลล์ และ CDW คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



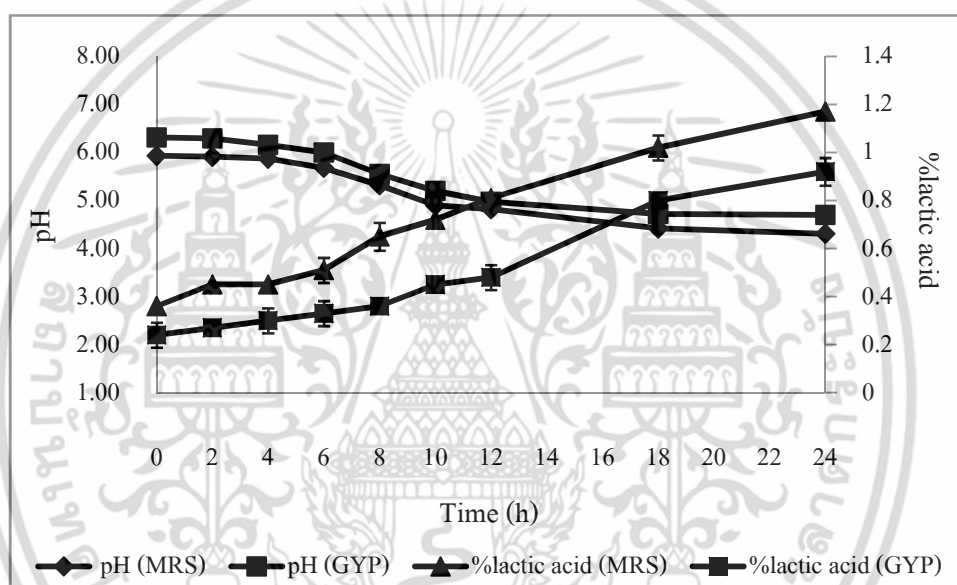
(ข)

ภาพที่ 4.3 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ก) และเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (ข) ในอาหารเหลว MRS และ GYP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

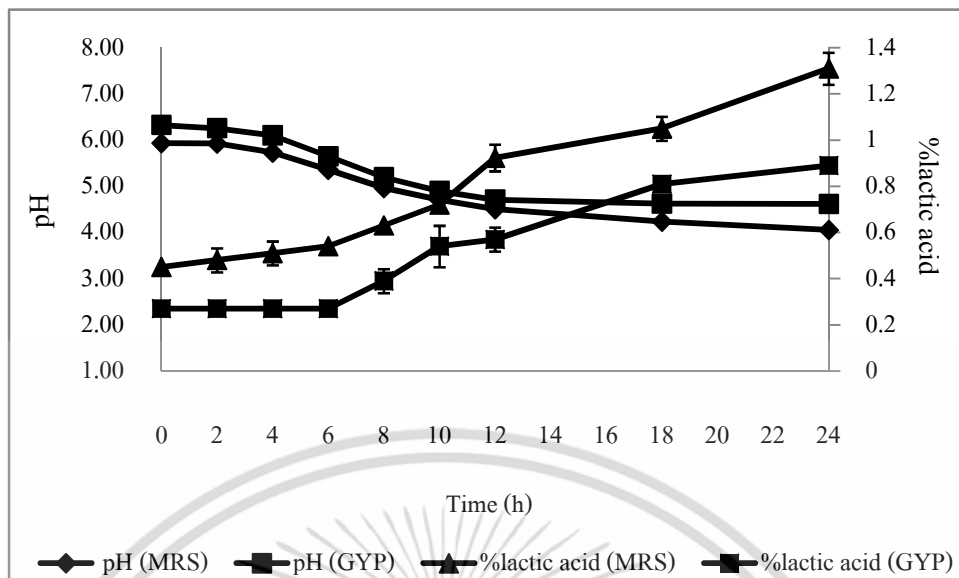
#### 4.1.3 อิทธิพลของชนิดอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตกรดแลคติก และความเป็นกรดต่าง ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

การเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้ปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตขึ้นระหว่างการเติบโตเพิ่มขึ้นต่อเนื่องอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.4) โดยการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.36 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.17 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.24 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.92 เปอร์เซ็นต์ และส่งผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลง โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มีค่าพีเอชลดลงจาก 5.93 เป็น 4.31 และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP มีค่าพีเอชลดลงจาก 6.31 เป็น 4.70



ภาพที่ 4.4 อิทธิพลของชนิดอาหารต่อการผลิตกรดแลคติก และความเป็นกรดต่าง ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในอาหารเหลว MRS และอาหารเหลว GYP

เมื่อพิจารณาผลภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (ภาพที่ 4.5) ปริมาณกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.45 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1.31 เปอร์เซ็นต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจาก 0.27 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.89 เปอร์เซ็นต์ และส่งผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลงโดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มีค่าพีเอชลดลงจาก 5.93 เป็น 4.05 และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP มีค่าพีเอชลดลงจาก 6.33 เป็น 4.62 ซึ่งอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นทำให้มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นและส่งผลให้ระดับของพีเอชลดลง (อรนุช, 2530) ซึ่งเป็นไปตามแนวโน้มของการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก



ภาพที่ 4.5 อิทธิพลของชนิดอาหารต่อการผลิตกรดแลคติกและความเป็นกรด-ด่างในการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งในอาหารเหลว MRS และ GYP

จากการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยง คือ สภาวะนิ่ง และสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP และ MRS ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก พบว่า สภาวะการเพาะเลี้ยงและชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีผลต่อการเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติกซึ่งผลที่ได้จากการทดลอง คือ ที่สภาวะนิ่งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากอาหารเหลว GYP มีปริมาณการเจริญของเชื้อที่ใกล้เคียงกับอาหาร MRS และอีกอย่างคือเมื่อกีดกันทุนของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำมาใช้สำหรับเตรียมกล้าเชื้อจึงต้องการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ และให้ผลการเจริญของเชื้อได้ดี ใกล้เคียงกันกับอาหาร MRS ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ดี และเป็นที่ยอมรับในหลายงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้นำสภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้มาทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งเปรียบเทียบกับสภาวะนิ่งแบบเขย่า (ใช้มือเขย่า นาน 10 วินาที) ทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

#### 4.1.4 ผลการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

จากการศึกษาการเจริญโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ความขุ่นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ภายใต้สภาวะนิ่งและสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุกๆ 1, 2 และ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.6) พบว่า อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 18 จากนั้นการเจริญเติบโตจะเริ่มช้าลงและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกที่ชั่วโมง 24 ให้ค่าการเจริญสูงสุด เท่ากับ  $10.21 \pm 0.08$ ,  $10.90 \pm 0.02$ ,  $10.50 \pm 0.03$  และ  $10.19 \pm 0.07$  log cfu/ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.6 เมื่อพิจารณาถึงค่าความขุ่นของเซลล์ ( $OD_{660}$ ) พบว่า เริ่มมีการเจริญของเซลล์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์จะเริ่มเจริญช้าลง โดยชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียแลคติกมีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ  $6.99 \pm 0.21$ ,  $6.93 \pm 0.41$ ,  $6.71 \pm 0.20$  และ  $6.57 \pm 0.17$  ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับปริมาณของเซลล์แห้งที่เริ่มมีการเจริญของเซลล์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 โดยที่ชั่วโมงที่ 24 ของสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ  $1.75 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ดังนั้น ที่สภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1 ชั่วโมง เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เนื่องจากสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1 ชั่วโมง อาจช่วยทำให้เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมีการกระจายตัวของเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มากกว่าสภาวะนิ่งและสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 2 และ 3 ชั่วโมง จึงทำให้มีการใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์แบคทีเรียแลคติกสูงกว่า จากผลการทดลองการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 4.1.1

#### 4.1.5 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

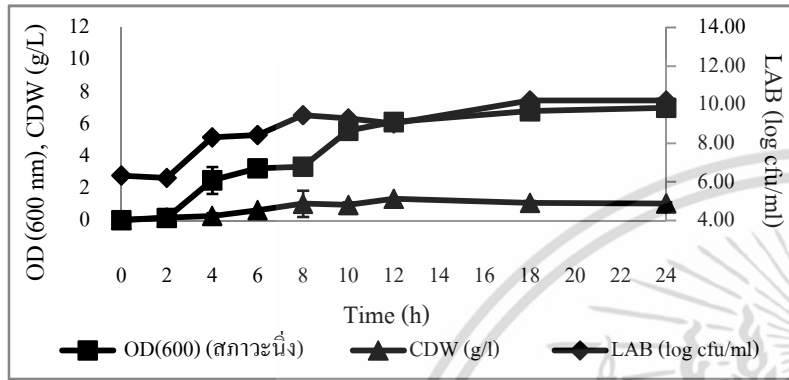
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่สภาวะนิ่งและสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทุกสภาวะของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 0 - 8) เชื้อมีการใช้น้ำตาลอย่างช้าๆ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วและหลังจากนั้นจะค่อยๆ คงที่ที่ชั่วโมงที่ 18 (ภาพที่ 4.7) ทั้งนี้ พบว่าที่สภาวะนิ่งแล้วมีการเขย่าทุก 1 ชั่วโมง เชื้อมีแนวโน้มของการใช้น้ำตาลกลูโคสรวดเร็วที่สุดในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นปริมาณน้ำตาลเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่น้อยที่สุดคือ  $3.77 \pm 0.04$ ,  $2.20 \pm 0.01$ ,  $2.26 \pm 0.03$  และ  $3.54 \pm 0.04$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้น การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1 ชั่วโมง เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีการใช้น้ำตาลได้ดีที่สุด เนื่องจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโตมากที่สุด ทั้งนี้ ในช่วงแรกน้ำตาลถูกใช้น้อยมากอาจเป็นผลมาจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเติบโตเป็นหลัก หลังจากนั้นเมื่อปริมาณเซลล์มากค่ามากขึ้นน้ำตาลที่มีอยู่จะถูกใช้ในการผลิตกรดแลคติกอย่างรวดเร็วซึ่งสัมพันธ์กับภาพที่ 4.8 จากผลการทดลองมีแนวโน้มของการใช้น้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกสอดคล้องกับการทดลองข้อ 4.1.2 เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ต่างกัน การศึกษาถึงการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆในการผลิตหมม

ของเชื้อแบคทีเรีย แลคติกและแบคทีเรียที่รีดิคซ์ในเตรท พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

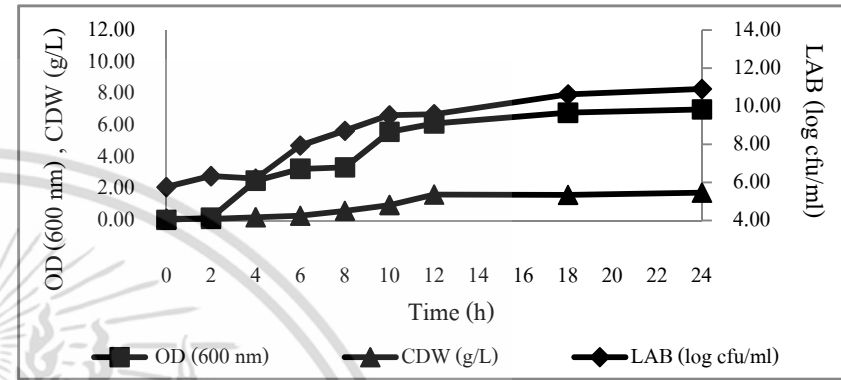
ที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก (ไพโรจน์ และคณะ, 2537) และจากผลการทดลองของสภาวะการเจริญของแบคทีเรียแลคติกพบว่าที่สภาวะนิ่งกับสภาวะนิ่งแบบเขย่ามีอนั้น มีการเจริญของเชื้อที่ใกล้เคียงกันทุกสภาวะ ดังนั้น จึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

#### 4.1.6 การผลิตกรดแลคติก และค่าพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติก TISTR 536

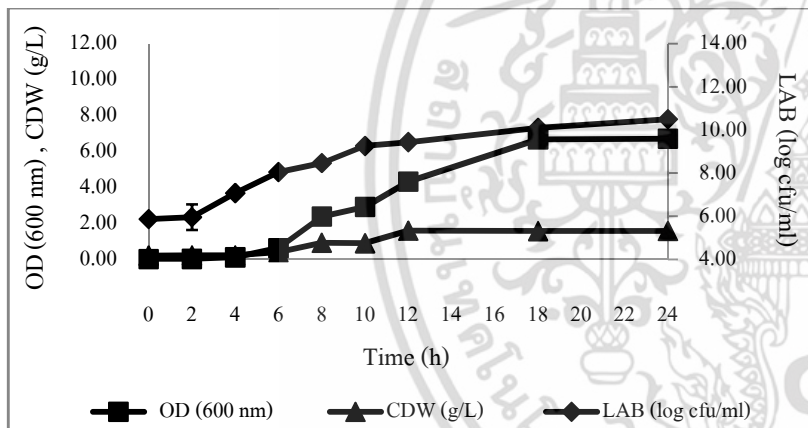
การสร้างกรดในรูปกรดแลคติกและค่าพีเอชของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง และสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP แสดงในภาพที่ 4.8 พบว่า ปริมาณกรดแลคติกและ ค่าพีเอชของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก คือ ปริมาณกรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นในขณะที่ค่าพีเอชลดลง โดยที่ชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ  $0.89 \pm 0.00$ ,  $0.99 \pm 0.00$ ,  $0.96 \pm 0.06$  และ  $0.81 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และส่งผลให้ค่าพีเอชของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ลดต่ำลงจาก  $6.31 \pm 0.00$  เป็น  $4.28 \pm 0.01$  เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีการใช้น้ำตาลในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก จึงส่งผลให้มีการลดลงของพีเอชและการเพิ่มขึ้นของกรดแลคติก สอดคล้องกับการศึกษาของปราโมทย์ และคณะ (2534) พบว่าปริมาณของกรดแลคติกและพีเอชมีความสัมพันธ์กันกับจำนวนของการเจริญของแบคทีเรียแลคติก



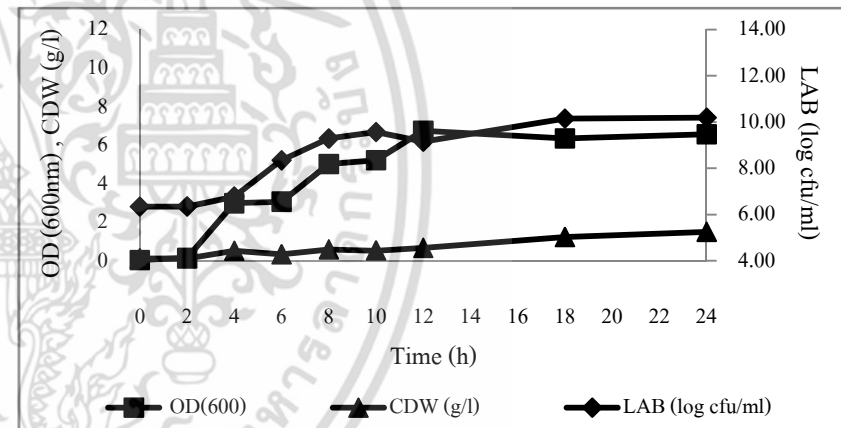
(ก)



(ข)



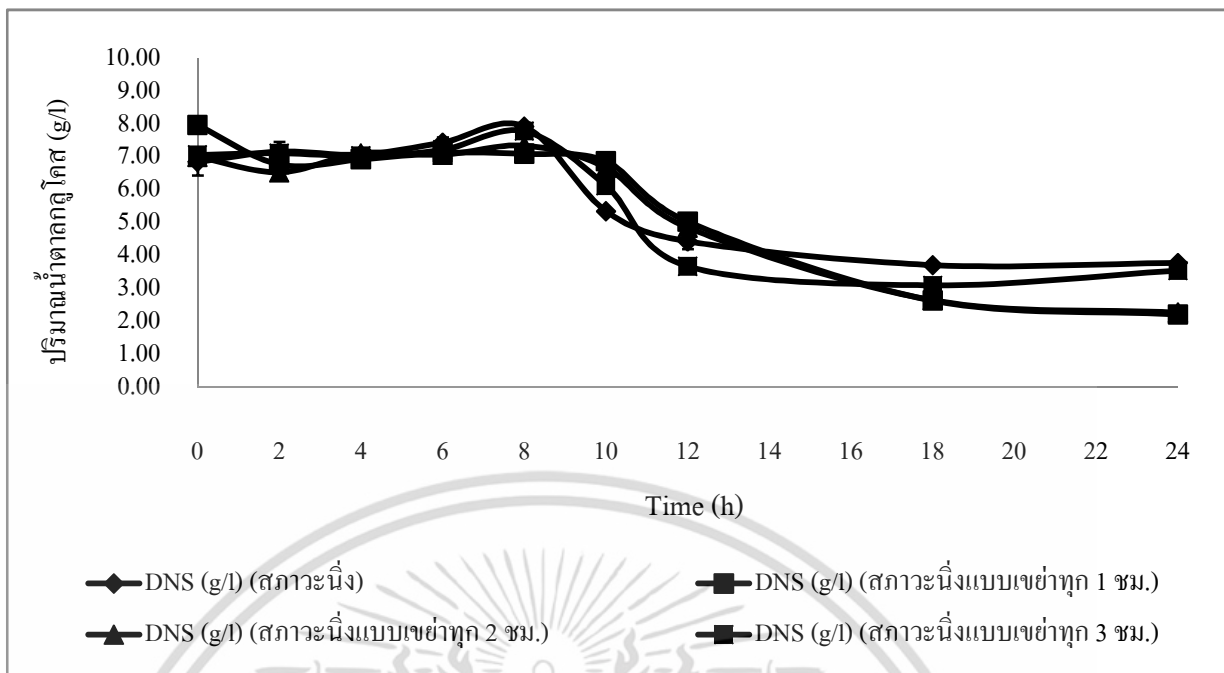
(ค)



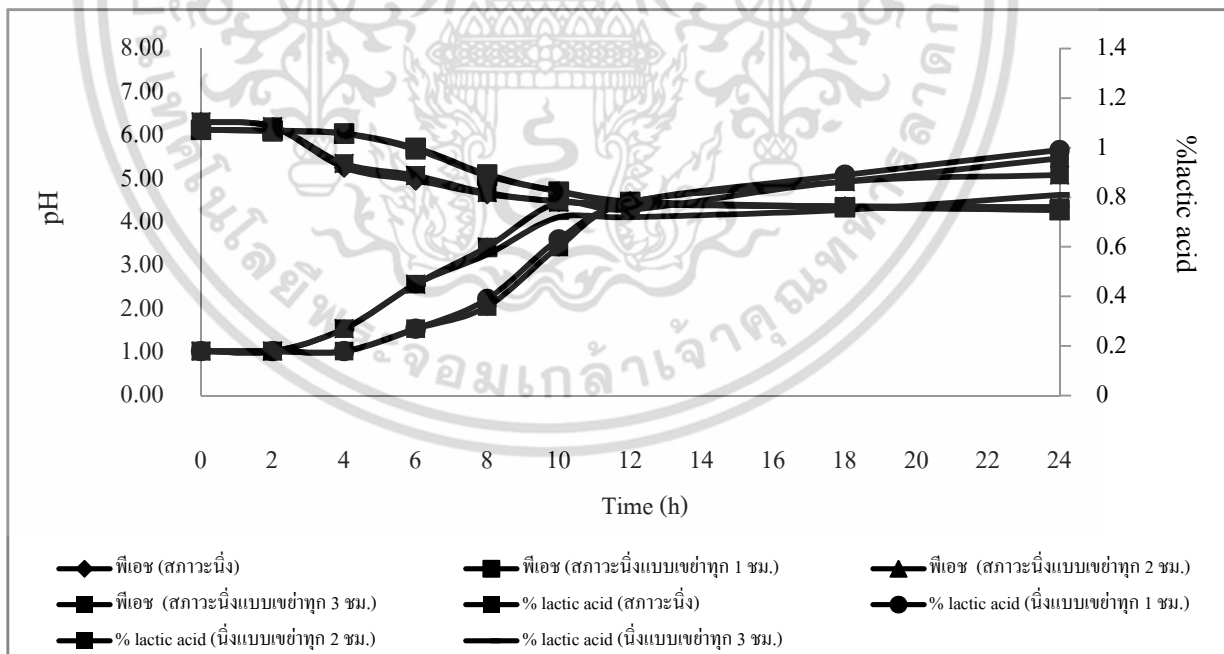
(ง)

ภาพที่ 4.6 การเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่สภาวะนิ่ง (ก) และสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1(ข), 2 (ค) และ 3 (ง) ชั่วโมง

หมายเหตุ: LAB คือ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียแลคติก, OD<sub>600</sub> คือ ความขุ่นของเซลล์ และ CDW คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง



ภาพที่ 4.7 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 เพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่งและสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP



ภาพที่ 4.8 อิทธิพลของชนิดอาหารต่อการผลิตกรดแลคติก และพีเอช ในการเพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่งและสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในอาหารเหลว GYP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การตรวจสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติก

จากการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักไทยชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน pediocin PA-1 ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์หมัก และนอกจากนี้ ยังมีแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่น *Lb. plantarum* SS7 และ *W. cibaria* KMITL-QU21 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน เป็นต้น ดังนั้น จึงนำมาทำการตรวจสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน เพื่อเป็นตัวเลือกในการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมักชนิดต่างๆ โดยการสร้างไบโอจีนิกเอมีนมีโอกาสพบมากในเนื้อหมู คือ ไทราซีน ฮีสตามีน พูทรีซิน และคาตาเวอริน ในการทดลองครั้งนี้จึงได้ใช้กรดอะมิโน ไทโรซีน ไลซีน ฮีสทิดีน และ ออร์นิติน มาใช้เป็นกรดอะมิโนตั้งต้นในอาหาร Improved medium

### 4.2.1 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved Medium

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักไทยมาทำการทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยทำการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารแข็ง Improved Medium ตามรายงานการวิจัยของ Bover-Cid และ Holzapfel (1999) ซึ่งมีการดัดแปลงสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยลดปริมาณของสารอาหาร คือ กลูโคสและโซเดียมคลอไรด์ และเพิ่มปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนต

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. pentosaceus* M13, *Lb. plantalum* NF3, *Lb. plantalum* SS7, *Lb. plantalum* KMITL-QU54, *Lc.lactis* N12 และ *W. cibaria* KMITL-QU21 มาทำการทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนบนอาหารแข็ง Improved medium ที่มีกรดอะมิโน (ไทโรซีน, ฮีสทิดีน, ไลซีน, และ ออร์นิติน) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และบริเวณโซนใสรอบๆของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกพบแบคทีเรียแลคติกจำนวน 5 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 7 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน (ตารางที่ 4.1) ดังนี้

แบคทีเรียสายพันธุ์ *W. cibaria* KMITL-QU21 มีแนวโน้มในการสร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยมีแนวโน้มการสร้างไทราซีน ฮีสตามีน คาตาเวอริน และพูทรีซิน โดยมีการเปลี่ยนสีของอาหารที่เติมกรดอะมิโนไทโรซีน อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนเป็นสีม่วงเข้มหรือม่วงอมเทาและอาหารที่เติมกรดอะมิโนไลซีน ฮีสทิดีน และออร์นิติน มีการเปลี่ยนสีของอาหารเปลี่ยนสีจากเหลืองเป็นสีม่วงเพียงเล็กน้อย

*P. pentosaceus* M13, *Lb. plantarum* SS7 และ *Lb. plantalum*, KMITL-QU54 พบว่ามีแนวโน้มที่จะสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดไทราซีน เนื่องจากมีการเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง Improved medium จากสีม่วงอ่อนเป็นสีม่วงอมเทา และเมื่อสังเกตรอบๆโคโลนีของเชื้อมีโซนใส

สีม่วงเกิดขึ้นรอบๆโคโลนี เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Lc. lactis* N12 สามารถสร้างไบโอจินิกเอมีนชนิดคาตาเวอริน โดยกรดอะมิโนไลซีน ส่วนเชื้อ *Lb. plantalum* NF38 และ *P. pentosaceus* TISTR536 ไม่มีแนวโน้มต่อการผลิตกรดอะมิโน เนื่องจากไม่มีเกิดเปลี่ยนแปลงสีของอาหารที่เติมกรดอะมิโน แสดงว่าไม่พบการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium

ดังนั้น จากผลการทดสอบเพื่อดูแนวโน้มของการสร้างสารไบโอจินิกเอมีน ซึ่งการเกิดไบโอจินิกเอมีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น โดยการเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง Improved medium ที่เติมกรดอะมิโนฮิสติดีน ไลซีน และออร์นิทีน เกิดจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

จากผลทดลองพบว่าอาหารแข็ง Improved medium เริ่มต้นอาหารเป็นสีม่วงเกิดจากการเติมอินดิเคเตอร์ bromocresol purple เดิมลงในปริมาตร 0.006 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรของอาหารดัดแปลงของ Bover-Cid และ Holzapfel (1999) จากนั้นเมื่อนำไปฆ่าเชื้อ (autoclave) อาหารจะมีสีเหลืองอมเขียว จากนั้นเมื่อเติมกรดอะมิโน ไลซีน ฮิสติดีน และออร์นิทีนลงในอาหารแข็ง Improved medium ยังคงมีสีเหลืองอมเขียวเหมือนเดิม แต่เมื่อเติมกรดอะมิโนไทโรซีนอาหารเปลี่ยนสีจะเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง

ตารางที่ 4.1 แบคทีเรียแลคติกที่สร้างสาร ไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved Medium

แบคทีเรียแลคติก (LAB)	กรดอะมิโน			
	Tyrosine	Lysine	Histidine	Ornithine
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> M13	+	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> NF3	-	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> SS7	+	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> KMITL- QU54	+	-	-	-
<i>Lc. Lactis</i> N12	-	+	-	-
<i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = เพลทอาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วง - = ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของเพลทอาหาร

และจากการศึกษาของ Leuschner และ Hammes (1998) ได้ศึกษาการใช้กลูต้ามิโนของ Lactococci และ Lactobacilli ในเนยแข็งสามารถย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส โปรติเอสไดเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญทำให้เกิดกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันทำให้มีการสะสมของไบโอจินิกเอมีนเพิ่มขึ้น และ Bover-Cid และคณะ (2001c) ได้รายงานว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างไบโอจินิกเอมีนในไส้กรอกหมักที่มีการใช้ proteolytic Staphylococci เป็นกล้าเชื้อ โดยในระหว่างการหมักมีปริมาณของ non-protein nitrogen และกรดอะมิโนอิสระสูง และหลังการหมักพบไทราซีนสูงเช่นกัน

#### 4.2.2 ผลการตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างไบโอจินิกเอมีน ในอาหารเหลว

##### Improve medium

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว Improve medium (Bover-Cid และ Holzapfel, 1999) ที่มีการเติมกรดอะมิโนไทโรซีน ฮีสทิดีน ออร์นิติน และไลซีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *W. cibaria* KMITL-QU21 มีแนวโน้มในการสร้างไบโอจินิกเอมีนชนิดไทราซีน ฮีสตามีน พูทรีซิน และคาตาเวอริน เนื่องจากค่าพีเอชในอาหารเหลวที่มีกรดอะมิโนมีพีเอช เท่ากับ 7.06, 6.58, 6.26 และ 6.57 ตามลำดับ

*P. pentosaceus* M13 และ *Lb. plantalum* KMITL-QU54 มีแนวโน้มต่อการสร้างไบโอจินิกเอมีนชนิดไทราซีนโดยมีค่าพีเอช เท่ากับ 7.52 และ 7.70 ตามลำดับ และเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lb. plantalum* NF38, *Lb. plantalum* SS7 และ *Lc. lactis* N12 มีพีเอชในอาหารเหลวของทุกกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งไม่พบแนวโน้มในการสร้างไบโอจินิกเอมีนจากกรดอะมิโนตั้งต้น โดยค่าพีเอชที่สูงขึ้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสซึ่งทำให้เกิดการผลิตสารไบโอจินิกเอมีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริรัตน์ (2547) ที่พบว่า พีเอชของกรดอะมิโนไทโรซีนที่อยู่ในช่วงพีเอช 6-7 สามารถเปลี่ยนเป็นไบโอจินิกเอมีนชนิดไทราซีนได้ ดังนั้น จากผลการทดลองพบเชื้อที่มีแนวโน้มในการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 7 ไอโซเลท พบแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการสร้างไบโอจินิกเอมีนเพียง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *P. pentosaceus* M13, *Lb. plantalum* KMITL-QU54 และ *W. cibaria* KMITL-QU21 (ดังภาพที่ 4.9)

#### 4.2.3 ผลการเปรียบเทียบการตรวจสอบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็งและอาหารเหลว Improve medium

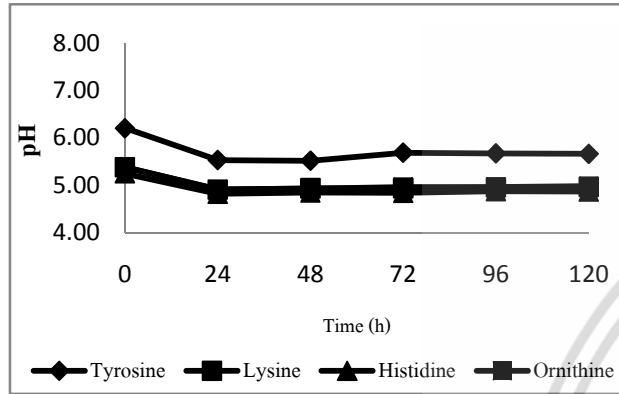
จากตารางผลเปรียบเทียบแนวโน้มการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารแข็ง และอาหารเหลว Improved medium ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย (ตารางที่ 4.2) พบว่าทั้งสองวิธี (อาหารแข็งและอาหารเหลว) ให้ผลตรวจสอบการสร้างไบโอจินิกเอมีนที่ใกล้เคียงกัน คือ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *W. cibaria* KMITL-QU21 สามารถสร้างไบโอจินิกเอมีนจากกรดอะมิโนทุกตัว คือ ไทราซีน ฮีสตามีน พูทรีซิน และคาตาเวอริน ส่วนเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* M13, *Lb. plantalum* KMITL-QU54 และ *W. cibaria* KMITL-QU21 พบการสร้างไบโอจินิกเอมีนชนิดไทราซีน และเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lb. plantalum* NF38 และ *Lc. lactis* N12 ไม่พบการสร้างไบโอจินิกเอมีนของทุกกรดอะมิโน ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ *Lb. plantalum* SS7 พบการสร้างไทราซีนในอาหารแข็ง Improved medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

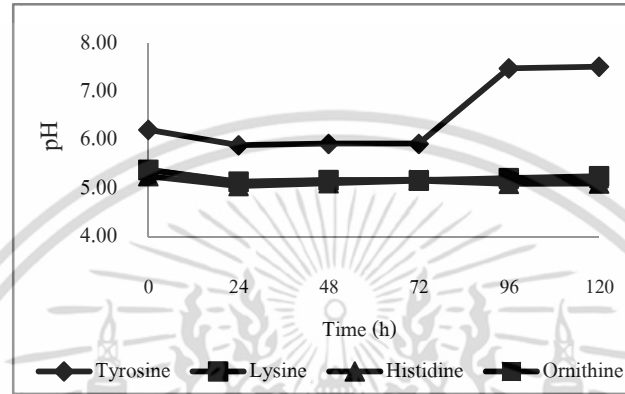
แต่ไม่พบการสร้างในอาหารเหลว Improved medium โดยสอดคล้องกับรายงานของ Wadu และคณะ (2011) ทำการศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดฮีสตามีนและไทรามีนได้ โดยทำการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้อาหารดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) เมื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก 6 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 50 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตในอาหารดีคาร์บอกซิเลส และทำการตรวจยืนยันเชิงปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีน โดยวิธีวิเคราะห์ HPLC พบว่า แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. casei* TISTR 389 และ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895 มีการสร้างสารไบโอ เจนิคเอมีน โดยที่ *Lb. casei* TISTR 389 สามารถผลิตฮีสตามีน ( $1820.9 \pm 3.5$  mg/L) และไทรามีน ( $5486.99 \pm 47.6$  mg/L) ปริมาณสูง ขณะที่ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 895 มีการผลิตฮีสตามีน ( $459.1 \pm 0.63$  mg/L) เพียงอย่างเดียวในอาหารดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase)



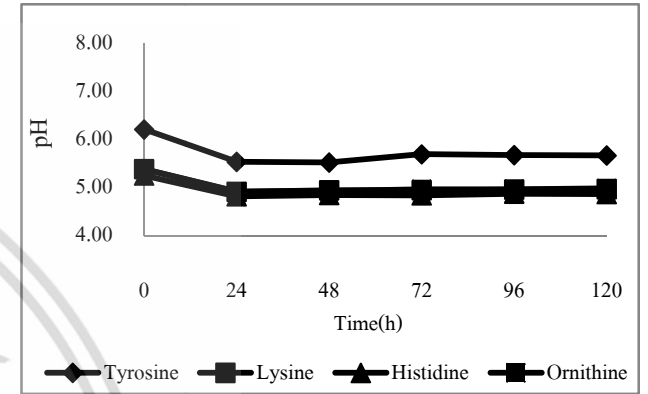
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



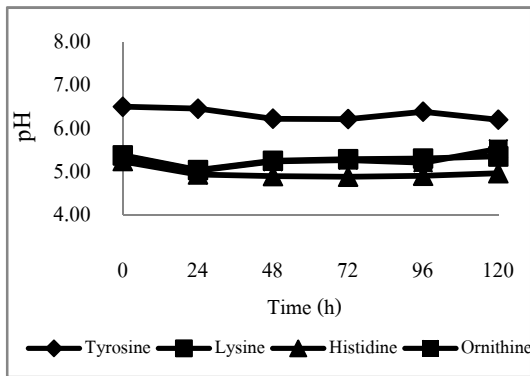
(ก)



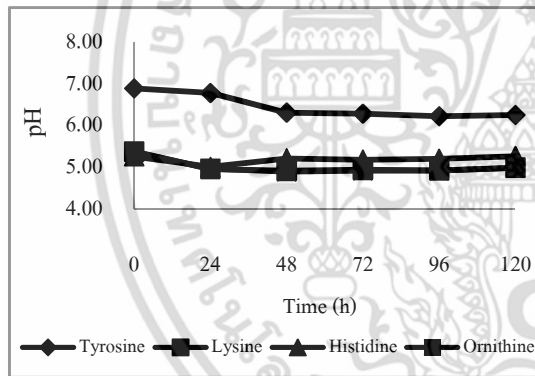
(ข)



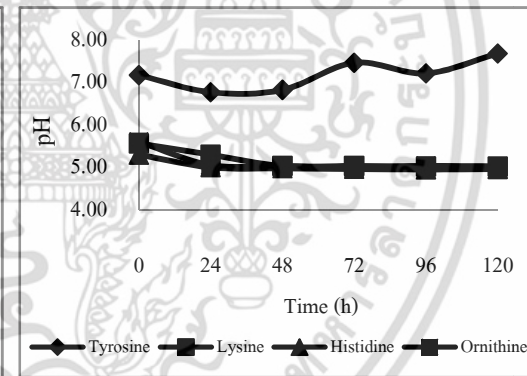
(ค)



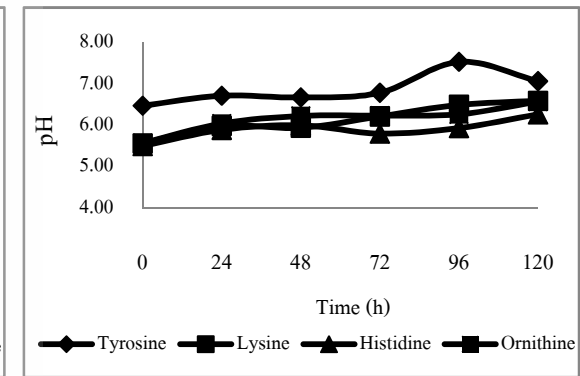
(ง)



(จ)



(ฉ)



(ช)

ภาพที่ 4.9 ผลของพีเอชในการสร้างไบโอจินิกเอมีนในอาหารเหลว Improved medium (ต่อ) ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (ก), *P. pentosaceus* M13 (ข), *Lb. plantalum* NF3 (ค), *Lc. lactis* N12 (ง), *Lb. plantalum* SS7 (จ), *Lb. plantalum* KMITL- QU54 (ฉ), และ *W. cibaria* KMITL- QU21 (ช)

ตารางที่ 4.2 ผลเปรียบเทียบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแข็ง และอาหารเหลว Improved medium

แบคทีเรียแลคติก (LAB)	อาหารแข็ง Improved medium					อาหารเหลว Improved medium				
	กรดอะมิโน					กรดอะมิโน				
	Control	Tyrosine	Lysine	Histidine	Ornithine	Control	Tyrosine	Lysine	Histidine	Ornithine
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> M13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> NF38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> SS7	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
<i>Lb. plantalum</i> KMITL- QU54	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Lc. Lactis</i> N12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

### 4.3 ผลการยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักແນມ (NMB)

จากผลการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในแบบจำลองการหมักແນມ (NMB) เบื้องต้นจากข้อ 4.2 พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lb. plantalum* NF38 และ *Lc. lactis* N12 เป็นเชื้อที่ไม่มีการสร้างไบโอจีนิกเอมีน และพบเชื้อที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนหลายชนิด คือ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *W. cibaria* KMITL- QU21

ในการศึกษานี้จึงเลือกเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งผลิตสารยับยั้ง pediocin PA-1 และเป็นกลิ่นหลักในແນມ มาทำการทดสอบยืนยันว่าสามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อได้ เช่น *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *Lc. bervis* BCC26756 ได้ จึงได้ทำการทดสอบการยับยั้งหรือควบคุมการสร้างไบโอจีนิกของเชื้อดังกล่าวในแบบจำลองการหมักແນມ ที่มีกรดอะมิโน (ไทโรซีน ไลซีน ฮีสติดีน และออร์นิติน) 0.1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแบบจำลองของແນມที่ไม่เติมกรดอะมิโน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นเวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.3) พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 มีการเปลี่ยนแปลงสีของเพลทอาหารแข็ง Improved medium ที่เติมไทโรซีน มีการเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีม่วงอมเทา แต่ในเพลทอาหารแข็ง Improved medium ที่เติมกรดอะมิโนไลซีน ฮีสติดีน และออร์นิตินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารแข็ง (อาหารยังคงมีสีเดิม) และเมื่อนำเชื้อผสมระหว่างเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 มาทำการหมักในอาหาร NMB พบว่า สีของอาหารแข็ง Improved medium ที่เติมกรดอะมิโนไทโรซีน พบว่าอาหารมีสีม่วงที่จางลงเมื่อเทียบกับอาหารของเชื้อที่ไม่ผสม *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756

ดังนั้น อาจสรุปได้ว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 สามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนชนิดไทรามิน เมื่อนำเชื้อผสมระหว่าง *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 ไปทำการหมักในอาหาร NMB พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถยับยั้งสารไบโอจีนิกชนิดไทรามินของเชื้อ *W. cibaria* KMITL- QU21 ได้ เนื่องจากการเปลี่ยนสีของอาหารแข็ง Improved medium (Bover-Cid และ Holzappel, 1999) และในอาหารเหลว Improved medium เป็นการศึกษาแนวโน้มในการสร้างไบโอจีนิกเอมีนเป็นการทดสอบขั้นพื้นฐานเป็นผลมาจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลต (decarboxylation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนสี

ของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วงหรือสีม่วงอมเทา ซึ่งจากการทดลองพบว่าอาหาร Improved medium เดิมอาหารสีม่วงเกิดจากการเติมอินดิเคเตอร์ bromocresol purple เดิมลงในปริมาตร 0.006 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเข้าหม้อนึ่งความดัน เพื่อฆ่าเชื้อ (autoclave) อาหารที่ได้มีสีเหลืองอมเขียวจากนั้นเติมกรดอะมิโนไลซีน ฮีสทิดีน และออร์นิติน อาหารมีสีคงเดิม แต่เมื่อเติมกรดอะมิโนไทโรซีน อาหารมีสีเข้มขึ้นเป็นสีม่วงอ่อน ซึ่งคล้อยสอดคล้องกับการรายงานของ Jackie Reynolds (2011) ที่รายงานว่าถ้าเชื้อที่ทดสอบมีการสร้างไทโรซีนดีคาร์บอกซิเลส การเปลี่ยนแปลงสีในส่วนของไทโรซีนอาจอ่านค่าได้ค่อนข้างยาก เมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดจากกรดอะมิโนตัวอื่นๆ

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งการสร้างไบโอจินิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองของการหมักแหม่ม (NMB)

แบคทีเรียแลคติก (LAB)	กรดอะมิโน				
	Control	Tyrosine	Lysine	Histidine	Ornithine
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	-	+	-	-	-
<i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	-	+	-	-	-
<i>Lc. bervis</i> BCC 26756	-	+	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 +	-	+	-	-	-
<i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	-	+	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 +	-	+	-	-	-
<i>Lc. bervis</i> BCC 26756	-	+	-	-	-

เมื่อเปรียบเทียบผลการสร้างไบโอจินิกเอมีนในแบบจำลองการหมักแหม่ม (NMB) ที่มีกรดอะมิโน (ไทโรซีน, ฮีสทิดีน, ไลซีน และ ออร์นิติน) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีทดสอบในอาหารแข็งกับอาหารเหลว Improved medium โดยการเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไปเป็นไบโอจินิกเอมีนเกิดจากปฏิกิริยาโดยเอนไซม์อะมิโนแอกซิเดสดีคาร์บอกซิเลสที่อยู่ในแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสจะย่อยสลายกรดอะมิโนเปลี่ยนไปเป็นสารไบโอจินิกเอมีน (วีรชัย, 2526) จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4.10) พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* KMITL- QU21, *Lc. bervis* BCC 26756 และเชื้อผสมระหว่าง *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 ของทุกกรดอะมิโนมีแนวโน้มของพีเอชลดลงเมื่อทำการหมักครบ 7 วัน เมื่อค่าพีเอชลดลงเป็นกรดมากอาจจะไม่เกิดการสร้างไบโอจินิกเอมีน ตามทฤษฎีมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของวีรชัย (2526) พบว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

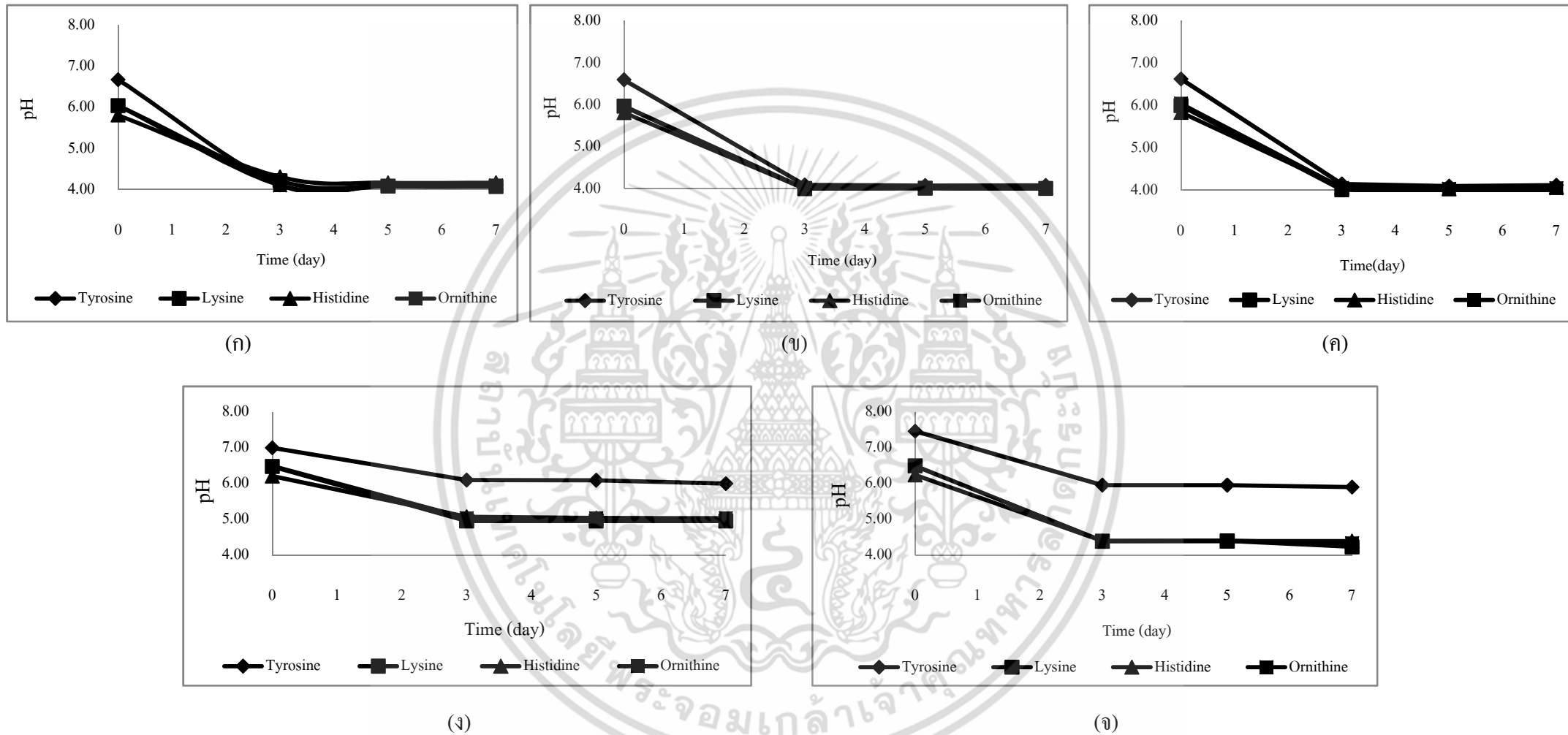
ความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์อะมิโนแอสิดคาร์บอกซิเลสโดยจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากพีเอชที่มีค่าเป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งส่งผลต่อการสร้างการทำงานของเอนไซม์และไบโอจีนิกเอมีนขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์คาร์บอกซิเลส

จากผลการทดลองดังกล่าวของการวิเคราะห์ไบโอเจนิคเอมีนในแบบจำลองการหมักหมนมพบว่าวิธีดังกล่าวเป็นเพียงวิธีการศึกษาเบื้องต้นในการตรวจสอบแนวโน้มการสร้างและยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีนของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างการสร้างไบโอเจนิคเอมีนของแบคทีเรียกรดแลคติกในแบบจำลองการหมักหมนมกับอาหาร Improved medium พบว่า การสร้างเอมีนในแบบจำลองการหมักหมนม โดยวิธีการวัดพีเอชไม่สอดคล้องกันกับในอาหาร Improved medium อาจเนื่องมาจากอาหารเหลว NMB ตามสูตรจะมีการใช้กลูโคสมากกว่าในอาหาร Improved medium จึงทำให้ระหว่างการหมักมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วทำให้ค่าพีเอชมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อทำการหมักครบ 3 วัน และค่าพีเอชในอาหาร NMB มีค่าพีเอชคงที่จนครบ 7 วัน ดังนั้น การทดสอบการสร้างไบโอเจนิคเอมีนในแบบจำลองการหมักหมนมโดยวิธีการวัดพีเอชอาจเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ไม่เหมาะสมต่อการทดสอบการยับยั้งหรือลดสารไบโอเจนิคเอมีน เพราะฉะนั้นจึงต้องทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของไบโอเจนิคเอมีนโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC เพื่อยืนยันความสามารถในการยับยั้งของกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีน

#### 4.4 ผลการตรวจสอบยืนยันการยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีนของ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในแบบจำลองการหมักหมนม โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC

จากผลการทดลองข้อ 4.3 เป็นการทดสอบการสร้างไบโอเจนิคเอมีนในอาหารเหลวจำลองของหมนมโดยใช้วิธีเชิงคุณภาพ พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่จะสร้างไบโอเจนิคเอมีนชนิดไทรามินเป็นหลัก

จากการยืนยันการยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีนชนิดไทรามินของเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 และ *Lc. bervis* BCC 26756 โดยใช้กลูตาเมต *P. pentosaceus* TISTR 536 มาทำการทดสอบการยับยั้งการสร้างไบโอเจนิคเอมีนในเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC (Yongsawatdigul และคณะ, 2002) เมื่อนำกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแลคติก *pentosaceus* TISTR 536 มาทำการทดสอบการยับยั้งการผลิตสารไบโอเจนิคเอมีนของเชื้อ *Lc. bervis* BCC26756 กับ *W. cibaria* KMITL-QU21 เปรียบเทียบโดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.4) (ภาคผนวก ง)



ภาพที่ 4.10 ผลของพีเอชในอาหารเหลวจำลองของการหมักเนนม NMB ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (ก), *W. cibaria* KMITL-QU21 (ข) *P. pentosaceus* TISTR536 กับ *W. cibaria* KMITL-QU21 (ค), *Lc. bervis* BCC26756 (ง) และ *P. pentosaceus* TISTR536 กับ *Lc. bervis* BCC26756

พบว่าเมื่อทำการหมักครบ 3 วัน ในแบบจำลองการหมักของແນມແບคที่เรียลแลคติกสายพันธุ์ *W. cibaria* KMITL- QU21 พบปริมาณของไทรามินสูง มีค่าเท่ากับ 573.26 mg/L ส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่หมักครบ 1 วัน พบปริมาณของไทรามิน เท่ากับ 2.24 mg/L แต่เมื่อทำการหมักครบ 3 วัน พบปริมาณไทรามินลดลง เท่ากับ 1.45 mg/L ในขณะที่เชื้อ *Lc. bervis* BCC 26756 พบปริมาณไทรามินของการหมักวันที่ 1 และวันที่ 2 มีค่าเท่ากับ 2.05 และ 1.56 mg/L แต่เมื่อหมักครบ 3 วัน ไม่พบปริมาณของไทรามินแสดงว่าระยะเวลาของการหมักมีผลต่อการยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้

#### ตารางที่ 4.4 ผลการยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารจำลองการหมักของແນມແບค โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ HPLC

ตัวอย่าง	ปริมาณ Tyramine (mg/L)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
<i>P. pentosaceus</i> TISTR536	2.24	2.14	1.45
<i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	573.26	533.56	555.57
<i>Lc. bervis</i> BCC26756	2.05	1.56	0
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 + <i>W. cibaria</i> KMITL- QU21	576.22	583.32	557.26
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536 + <i>Lc. bervis</i> BCC26756	2.29	1.92	0

เมื่อนำเชื้อผสมระหว่าง *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 ไปทำการวิเคราะห์เพื่อดูประสิทธิภาพของการยับยั้งสารไบโอจีนิกเอมีนของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกพบว่า เชื้อผสมระหว่าง *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 มีปริมาณของไทรามิน เท่ากับ 557.26 เมื่อทำการหมักครบ 3 วัน เมื่อสังเกตปริมาณของไทรามินของการหมักวันที่ 1 ถึงวันที่ 3 จะเห็นได้ว่า ปริมาณไทรามินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL- QU21 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่ากล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 อาจไม่สามารถยับยั้งไทรามินของเชื้อ *W. cibaria* KMITL- QU21 ได้ ส่วนเชื้อผสมระหว่าง *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *Lc. bervis* BCC 26756 จะเห็นได้ว่าระยะเวลาการหมักเมื่อทำการหมักครบ 3 วัน มีแนวโน้มปริมาณของไทรามินลดลงจนไม่พบไทรามิน ดังนั้น จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถยับยั้งการสร้างไทรามินของเชื้อ *Lc. bervis* BCC 26756 ได้ แต่ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งการสร้างไทรามีนของเชื้อ *W. cibaria* KMITL- QU21 เนื่องจากกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lc. bervis* BCC 26756 เป็นเชื้อที่แยกได้จากอาหารหมัก (ผลิตภัณฑ์แฮม) เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงสามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อได้ แต่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 นั้นไม่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกของ *W. cibaria* KMITL QU21 ได้ อาจเพราะเชื้อ *W. cibaria* KMITL- QU21 นั้นเป็นเชื้อที่แยกได้มาจากไส้กรอกอีสาน จากผลการทดลองการลดหรือยับยั้งสารไบโอจีนิกเอมีน สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Tosukhowong และคณะ (2011) ศึกษาคุณภาพของเนื้อหมูและแฮมที่เติมกล้ำเชื้อที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีน จากการศึกษาพบว่าแฮมก่อนการหมักที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบการสะสมของสารประกอบเอมีน (คาตาเวอริน, พิวเทรสซิน, ฮีสทีดีน และไทรามีน) ในแฮมสูงจากเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ แต่เมื่อมีการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* BCC 9546 เป็นกล้ำเชื้อในการผลิตแฮม พบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* BCC 9546 สามารถยับยั้งการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ *Lc. bervis* BCC 26756 ในระหว่างการหมักแฮมได้

#### 4.5 ผลการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ในระหว่างการหมักแฮม

##### 4.5.1 ผลการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและทางเคมีของแฮม

###### 4.5.1.1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกของผลิตภัณฑ์แฮม

จากผลการศึกษาทางด้านจุลินทรีย์ เมื่อใช้กล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้ำเชื้อในการผลิตแฮม โดยทำการเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงไปประมาณ  $10^6$  cell/g เปรียบเทียบกับแฮมที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ตารางที่ 4.5) พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกในวันแรกของการหมัก (วันที่ 0) ของกลุ่มที่มีการเติมกล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ  $6.58 \pm 0.345 \log \text{ cfu/g}$  ส่วนแฮมที่ไม่เติมกล้ำเชื้อ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีค่าเท่ากับ  $6.42 \pm 0.489 \log \text{ cfu/g}$  ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ในทางสถิติ และวันที่ 3 ของการหมัก พบว่า กลุ่มที่มีการเติมกล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก มีค่าเท่ากับ  $7.79 \pm 0.317 \log \text{ cfu/g}$  ส่วนแฮมที่ไม่เติมกล้ำเชื้อ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยเฉลี่ยอยู่ที่  $7.60 \pm 0.190 \log \text{ cfu/g}$  ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างแฮมในวันที่ 0 และ วันที่ 3 ที่มีการเติมกล้ำเชื้อและไม่เติมกล้ำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ในทางสถิติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แฮมกลุ่มที่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกกลุ่มมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงกว่ากลุ่มควบคุม อาจเนื่องมาจากกลุ่มที่เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นมากกว่ากลุ่มควบคุมทำให้อัตราการเติบโตและเพิ่มจำนวนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งในกลุ่มควบคุมแบคทีเรียแลคติกมาจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตหมกทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการเจริญได้น้อยกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้การศึกษาค้นสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *P. pentosaceus* TISIR 536 พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะพีเอชต่ำ ดังรายงานของ Swetwivathana และคณะ (2005)

#### 4.5.1.2 ผลของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก พีเอช วอเตอร์แอกติวิตีและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของผลิตภัณฑ์หมก

กระบวนการหมกหมกโดยธรรมชาติเกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ มีทั้งจุลินทรีย์ที่สร้างกรดและทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งจุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้ดีมักเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นตัวกลางของการสร้างกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่จึงทำให้ค่าพีเอชของหมกหมกลดลง (บุญกร, 2545) และจากผลการทดลอง พบว่า เมื่อทำการหมกครบ 3 วัน (ตารางที่ 4.5) หมกหมกที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 0.08 เป็น 0.47 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้พีเอชของผลิตภัณฑ์หมกหมกลดลง โดยวันที่ 3 ของการหมกหมกที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีค่าพีเอชลดลงจาก 6.67 เป็น 4.50 ส่วนหมกหมกที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีค่าพีเอชลดลงจาก 6.76 เป็น 4.63 เนื่องมาจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่งผลให้ปริมาณเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตขึ้นระหว่างการหมกเพิ่มขึ้น และการลดลงของค่าพีเอชสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งบ่งบอกถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค และส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา (อดิสร, 2533) และผลของการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น และวอเตอร์แอกติวิตี (ตารางที่ 4.6) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น และวอเตอร์แอกติวิตีของหมกหมกที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระยะเวลาการหมกครบ 3 วัน เนื่องจากไส้ที่ใช้บรรจุหมกเป็นแบบพลาสติกแล้วทำการดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ ทำให้เกิดการหมก เมื่อเกิดกระบวนการหมกเกิดขึ้นทำให้ส่วนผสมเกาะตัวผสมกันจึงอาจทำให้มีน้ำที่เกิดจากกระบวนการหมกซึมผ่านไส้บรรจุออกมา ดังนั้น จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นของหมกหมกที่หมกครบ 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงขึ้นเล็กน้อย (69.21 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (67.09 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแบคทีเรียแลคติก เพอร์เซ็นต์กรดแลคติก และพีเอชของแฮมที่มีการใช้กล้าเชื้อและไม่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	การวิเคราะห์				
	LAB (log cfu/g)	pH	ปริมาณกรด ทั้งหมด(%)	ความชื้น (%) (NS)	A <sub>w</sub>
0	แฮมเติมกล้าเชื้อ				
	<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	6.58 <sup>a</sup> ±0.345	6.67 <sup>b</sup> ±0.124	0.089 <sup>a</sup> ±0.078	66.18±0.937
0	แฮมไม่เติมกล้าเชื้อ				
	<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	6.42 <sup>a</sup> ±0.489	6.76 <sup>b</sup> ±0.091	0.085 <sup>a</sup> ±0.082	65.97±2.282
3	แฮมเติมกล้าเชื้อ				
	<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	7.79 <sup>b</sup> ±0.317	4.50 <sup>a</sup> ±0.090	0.47 <sup>b</sup> ±0.176	67.59±2.557
3	แฮมไม่เติมกล้าเชื้อ				
	<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536	7.60 <sup>b</sup> ±0.190	4.63 <sup>a</sup> ±0.100	0.41 <sup>b</sup> ±0.135	66.18±2.018

หมายเหตุ : NS หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05)

a, b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถว มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05)

#### 4.5.1.3 ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณสมบัติทางชีววิทยาของแฮม

จากการทดลองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการหมักแฮม เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนมากับเนื้อหมู โดยเปรียบเทียบการหมักแฮมที่เติมกล้าเชื้อกับการหมักแฮมที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก จากรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์แฮมและผลของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ต่อการทำลายเชื้อ *Salmonella* Anatum ระหว่างการหมักของแฮม (Swetwivathana และคณะ, 2007) จึงได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแฮมโดยนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้ในการผลิตแฮมเปรียบเทียบกับแฮมที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาของแฮมที่ผลิตโดย บริษัท ไทยอินโนฟู้ด จำกัด จำนวนทั้งหมด 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.6) พบว่าแฮมที่มีการเติมกล้ำเชื้อและไม่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ของการหมักวันที่ 0 ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 6 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์) หลังจากหมักครบ 3 วัน พบว่าแฮมที่มีการเติมกล้ำเชื้อตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา และไม่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่าง 25 กรัม แต่แฮมที่ไม่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลของการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แฮม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Swetwivathana และคณะ (2007) มีรายงานการยับยั้งของเชื้อ *S. Anatum* ในแบบจำลองของการหมักแฮม (NMB) และตัวอย่างแฮม เนื่องจากปริมาณของกรดแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้น และส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงจึงมีผลในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ จึงทำให้ตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา เมื่อทำการหมักแฮมที่เติมกล้ำเชื้อครบ 3 วัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Swetwivathana (2533) ศึกษาทดลองการนำกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสมของ *Lb. spp. (L1) Pediococcus spp. (P55)* เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแฮมที่มีการเติมเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลา 3 สายพันธุ์ *Salmonella* Derby, *S. Anatum* และ *S. Newport* เปรียบเทียบกับแฮมที่ทำการหมักโดยธรรมชาติที่ไม่มีเติมกล้ำเชื้อ พบว่าการใช้กล้ำเชื้อของแบคทีเรียแลคติกผสมมีผลในการยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อซัลโมเนลลาให้หมดไปในระหว่างการหมักแฮมได้เร็วกว่าแฮมที่หมักแบบธรรมชาติที่ไม่มีเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก ดังนั้น กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกจึงเข้ามามีบทบาทกับอาหารหมักทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับในด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏทางด้านสี และสามารถควบคุมคุณภาพ ความปลอดภัยในระหว่างการหมักได้

ตารางที่ 4.6 ผลการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการลดลงของซัลโมเนลลาของแฮมที่มีการใช้และไม่ใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ระยะเวลา การหมัก (วัน)	จำนวน ตัวอย่าง	เชื้อซัลโมเนลลา			
		แฮมที่เติมกล้ำเชื้อ		แฮมที่ไม่เติมกล้ำเชื้อ	
		TISTR 536		TISTR 536	
		จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์	จำนวนที่พบ	เปอร์เซ็นต์
0	6	6	100	6	100
3	6	0	0	3	50

และจากการศึกษาการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อซัลโมเนลลาทางเซรัมวิทยาเป็นวิธีการทดสอบเพื่อยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อซัลโมเนลลาโดยใช้วิธีการทดสอบ agglutination test ทำบนแผ่นกระจก (slide) เรียกว่า slide agglutination test ทำการหยด polyvalent-O-antiserum ลงบนแผ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจุกที่สะอาดปราศจากไขมัน 1 หยด ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อที่ได้ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีมาแล้วที่อาจเป็นเชื้อซัลโมเนลลาและเพียงเล็กน้อย นำมาคนเบาๆ ผสมเชื้อกับแอนติซีรัม ถ้าให้ผลบวกก็จะเกิดการจับกลุ่มกันของเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วตกตะกอนเป็นจุด และมองเห็นด้วยตาเปล่า แต่ถ้าให้ผลลบกับแอนติซีรัมจะ ไม่มีการตกตะกอน แสดงว่าไม่ได้เป็นเชื้อซัลโมเนลลา (ดำรง, 2530) จากผลการทดสอบ พบว่า เชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่พบในผลิตภัณฑ์หมักก่อนการหมัก (ตารางที่ 4.7) เมื่อทำการหมักหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ครบ 3 วัน สามารถ ลดค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลงเหลือ 4.74 (ตารางที่ 4.4) ซึ่งพีเอชอาจไม่ต่ำพอที่จะทำให้เชื้อซัลโมเนลลาบางกรู๊ปลดลงหรือหมดไปได้ ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตหมัก โดยการใส่กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน Pediocin PA-1 มีผลทำให้พีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงได้อย่างรวดเร็ว (จาก 6.76 เป็น 4.63) และสามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์หมักได้ (Swetwivathana และคณะ, 2007)

ตารางที่ 4.7 กรู๊ปเชื้อซัลโมเนลลาในหมักที่เติม และไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนตัวอย่าง					
	1	2	3	4	5	6
หมักที่เติม กล้าเชื้อ TISTR 536	C	C	C	C	C	C
หมักที่ไม่เติมกล้า เชื้อ TISTR 536	C, E	C	C	C, E	C, B	C
หมักที่เติมกล้าเชื้อ TISTR 536	ND	ND	ND	ND	ND	ND
หมักที่ไม่เติมกล้า เชื้อ TISTR 536	C	C	ND	C	ND	ND

#### 4.6.1.4 ศึกษาคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของหมักที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

จากการทดลองการผลิตหมักที่เติมกล้าเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผ่านการหมักครบ 3 วัน มาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยให้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (ตารางที่ 4.8) พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับหมักที่เติมกล้าเชื้อมากที่สุดในทุกด้าน คือ สี เนื้อสัมผัส กลิ่น ความเปรี้ยว รสชาติ และ

ความชอบโดยรวม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหมัก  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่เติมกล้าเชื้อ แสดงว่าผู้ทดสอบมีความพึงพอใจสูตรของหม่อมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มากกว่าหม่อมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ดังนั้น จากผลการทดสอบจึงสรุปได้ว่าหม่อมที่มีการเติมกล้าเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคให้การยอมรับ

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของหม่อมที่ผลิตจากโรงงาน โดยเปรียบเทียบการหมักระหว่างใช้และไม่ใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

การทดสอบ	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์หม่อม	
	ไม่เติมกล้าเชื้อ	เติมกล้าเชื้อ
	<i>P. pentosaceus</i> TISTR536	<i>P. pentosaceus</i> TISTR536
สี	<sup>a</sup> 6.65 ± 1.043	<sup>b</sup> 7.15 ± 0.910
เนื้อสัมผัส	<sup>a</sup> 6.69 ± 1.062	<sup>b</sup> 7.18 ± 0.956
กลิ่น	<sup>a</sup> 6.52 ± 1.157	<sup>b</sup> 7.15 ± 1.021
ความเปรี้ยว	<sup>a</sup> 6.56 ± 1.065	<sup>b</sup> 7.37 ± 0.901
รสชาติ	<sup>a</sup> 6.70 ± 1.128	<sup>b</sup> 7.35 ± 0.976
ความชอบโดยรวม	<sup>a</sup> 6.81 ± 0.944	<sup>b</sup> 7.49 ± 0.925

หมายเหตุ: a และ b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ต่างกัน ในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 การศึกษาอิทธิพลของอาหารเหลว GYP หรืออาหารเหลว MRS และสภาวะเพาะเลี้ยงแบบเขย่า หรือแบบนิ่ง ต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบนิ่งเหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเปรียบเทียบการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS และอาหารเหลว GYP พบว่าอาหารเหลว GYP มีการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกสูงกว่าอาหารเหลว MRS อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการผลิตกรดแลคติก พบว่าอาหารเหลว MRS ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงกว่าอาหารเหลว GYP ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาถึงการใช้กลูโคส พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP มีการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงกว่าอาหารเหลว MRS จึงอาจสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYP เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการใช้กลูโคสเพื่อผลิตเซลล์ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS

5.1.2 จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่สภาวะนิ่งเปรียบเทียบกับสภาวะนิ่งแบบเขย่าทุกๆ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP พบว่าการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกในทุกสภาวะการทดลองมีค่าของการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกใกล้เคียงกันแต่ที่สภาวะนิ่งแบบเขย่าทุกๆ 1 ชั่วโมง มีการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกสูงสุด เท่ากับ  $10.90 \pm 0.02 \log \text{ cfu/mL}$  โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่สภาวะนิ่งแบบเขย่าทุกๆ 1 ชั่วโมง มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมากที่สุด จึงทำให้ในสภาวะนี้มีการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกสูงและเมื่อพิจารณาถึงการผลิตกรดแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้นและพีเอชมีค่าลดลงที่สัมพันธ์กัน จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่งแบบเขย่าทุก 1 ชั่วโมงในอาหารเหลว GYP เหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นกลูต้าเชื้อแลคติกในผลิตภัณฑ์หมัก

5.1.3 จากการศึกษาการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนบนอาหารแข็ง Improved medium ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ 7 สายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่มีแนวโน้มมีการสร้างไบโอเจนิกเอมีน คือ *W. cibaria* KMITL- QU21, *P. pentosaceus* M13, *Lb. plantalum* SS7 และ *Lb. plantalum* KMITL KMITL- QU54 มีแนวโน้มที่จะมีการสร้างไทรามีน เมื่อทำการวิเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีนในอาหารเหลว Nham Model Broth (NMB) พบว่าวิธีดังกล่าวเป็นเพียงวิธีการศึกษาเบื้องต้นในการตรวจสอบหาแนวโน้มการสร้างและยับยั้งการสร้างไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ พบว่า กลูต้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 พบการ

สร้างไบโอเจนิกเอมีนชนิดไทรามีนแต่พบปริมาณต่ำไม่เกินเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งไม่ก่อให้เกิดความ  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสี่ยงต่อร่างกาย และเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังสามารถยับยั้งไทรามีนของเชื้อ *Lc. berris* BCC 26756 ได้อีก

5.1.4 จากการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการผลิตแฮมเปรียบเทียบกับแฮมที่ไม่มีการหมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่าแฮมที่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีเมื่อหมักครบ 3 วัน ปริมาณของแบคทีเรียแลคติกและกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นกว่าแฮมที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อ คือ 8.39 log cfu/g และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และยังส่งผลให้พีเอชของแฮมลดต่ำลงถึง 4.58 เมื่อทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาของแฮมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่าแฮมที่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่หมักครบ 3 วัน ตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา แต่แฮมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีจำนวนซัลโมเนลลาลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จากที่ตรวจพบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักวันที่ 0 จึงสรุปได้ว่าแฮมที่มีการใช้กล้าเชื้อในการหมักให้ผลที่ดีกว่า ปลอดภัยกว่าแฮมที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อในการหมัก เนื่องจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญต่อการหมักหรือผลิตแฮม ส่งผลให้มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญเพิ่มขึ้น ลดระยะเวลาการหมักให้น้อยลง มีปริมาณกรดที่สูงขึ้น ค่าพีเอชลดลง และสามารถลดหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการผลิตแฮมได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย พบว่าแฮมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ดังนั้น ควรบริโภคแฮมที่มีอายุการหมักอย่างน้อย 3-5 วัน เพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และการใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินมาเป็นกล้าเชื้อในการหมักแฮมเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแลคติกให้สูงขึ้น และควบคุมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร นอกจากนี้เป็นการควบคุมวัตถุดิบและสุขลักษณะส่วนบุคคลในโรงงานผลิตที่ดี ซึ่งจากการศึกษากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักของไทยที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้มาใช้เป็นกล้าเชื้อหมักในผลิตภัณฑ์แฮมแล้ว นอกจากแบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติในการผลิตแบคทีเรียโอซินจากการศึกษา ยังพบว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดไทรามีนได้อีก แต่พบอยู่ในปริมาณที่ต่ำที่ไม่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อร่างกาย โดยการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนที่พบเป็นข้อมูลที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมการเกิดไบโอจีนิกเอมีนในอาหารได้ โดยเฉพาะอาหารหมักประเภทโปรตีน ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีอาจก่อให้เกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งกรดอะมิโนอิสระเป็นสารตั้งต้นของการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารได้

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปต้องมีการศึกษาการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของกล้าเชื้ออาหารหมักชนิดอื่นๆเพิ่ม เพื่อเป็นการยืนยันว่ากล้าเชื้อที่ใช้เป็นกล้าเชื้อที่เหมาะสม ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กัลยาณี โรจรสติตโสภณ ทิพย์สุดา ทรัพย์น้อย และ พรพิมล เอื้อสันเทียะ. 2553. ศึกษาคุณภาพและการยอมรับไส้กรอกอีสานที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Weissella cilbaria* SI21 ที่ผลิตแบบเทอริโอซิน. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กุลธิดา กุลสิงห์. 2547. สารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารจากแบคทีเรียแลคติก. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 12-24.
- กฤตพร รำจวนเกียรติ. 2551. การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลา. ปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. หน้า 24.
- กฤษฎา ตู้อินดา. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Salmonella* ด้วยวิธี dot-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- คมแห พิลาสสมบัติ, นवलพรรณ งามยี่สุน และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. ปีที่ 28. ฉบับที่ 2. หน้า 19-28.
- จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณีภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. อมรินทร์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ
- ชลลดา ศิริเสตสุวรรณ. 2551. การผลิตกรดแลคติกด้วยเซลล์ตรึง *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- นันทินี พันดุง และอรวรรณ วะชังเงิน. 2547. ผลของกระเทียมต่อการเจริญและผลิตสารแบคเทอริโอซิน จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ N190 และ TISTR 536 ในอาหารเหลวที่จำลองสภาวะการหมักเหวม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปราโมทย์ ศิริโรจน์, ลาวัญย์ ไกรเดช, อรอนงค์ นัยวิกุล, สุภรัตน์ ชวนะ, พัชรี โสธนาสมบูรณ์, พรเทพ พัฒนารักษ์, มาลี สวรรณอัทธา. 2534. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์และความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและกรดในกระบวนการหมักขนมจีน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หน้า 365-373. ในรายงานผลงานวิจัยสาขาสิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร วิศวกรรมศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ เศรษฐศาสตร์ สังคมศาสตร์ มนุษย์ศาสตร์ ศึกษาศาสตร์, การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 29, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พรพรรณ รพี. 2530. ชีวิตสัตว์ทะเลและพืชจากอาหารทะเล. อักษรวัฒนา, กรุงเทพฯ.
- ไพโรจน์ วิริยาริ. 2534. การพัฒนาอาหารหมักพื้นบ้านโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น. อุตสาหกรรมเกษตร 2 (1): 36-40.
- ไพโรจน์ วิริยาริ, ลักขณา รุจนะ ไกรกานต์ และปานจิตต์ คุณชะวลิ. 2536. การผลิตหมักโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม: ผลของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวต่อการผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์. วารสารเกษตร. 9(1): 61-74.
- ไพโรจน์ วิริยาริ, ลักขณา รุจนะ ไกรกานต์, อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, วิวรรธน์ นัจฉริยา และสุชยา บุญถนอม. 2537. น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. วารสารเกษตร. 10(1): 90 -102.
- ไพโรจน์ วิริยาริ, ลักขณา รุจนะ ไกรกานต์ และสุชชาดา อนุตรกุล. 2538. การพัฒนาผลิตภัณฑ์หมักโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. ผลของโซเดียมไนเตรด โซเดียมไนไตรท์ และเชื้อ *Micrococcus varians* ต่อสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์. วารสารเกษตร 11(1): 60-61
- เยาวลักษณ์ จิตต์ภักดี. 2543. แบคทีเรียที่ทำให้เกิดฮิสตามีนในปลาอินทรีเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาวณีย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. สงขลานครินทร์ วทท. 22(2), 177-89.
- วิเชียร ติลาวัชรมาศ. 2539. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียนานาชาติ (ตอนที่ 3) วารสารจารย์พาร์. 3(33): 29-31.
- วีระชัย สิงห์ทอง. 2556. การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนมีผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักคอง. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม. 3 (1): 62-69 .
- ศิพัตน์ รักษ์เผ่า. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักหมักหมักต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สายชล ศิริโชค. 2534. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อสารกรุงเทพ.
- สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2518. การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำแหมม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์แหมม (มอก. 1219-2547). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2543. คำรับอาหารแหมม: เอกถักษณ์ไทย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์ และนภา โล่ห์ทอง. 2534. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับพรีเอนริชชัลโมเนลลา ในแหมมและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 33(1):1-12.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์, ปรีชา จึงสมานกุล และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2537. ซัลโมเนลลาในอาหารพร้อมบริโภค. บทคัดย่อการประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ครั้งที่ 6. 10-11 สิงหาคม.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. ศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์แหมมที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน. รายงานวิจัยโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.1-5.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2543. ประโยชน์ของงานวิจัยกับการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักดองประเภทเนื้อของไทย. เอกสารประกอบการประชุมระดมความคิดเรื่อง “การยกระดับคุณภาพแหมมด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ”. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
- อดิศร เสวตวิวัฒน์ และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ salmosyst และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซัลโมเนลลาในแหมม. ในการประชุมวิชาการครั้งที่ 34 สาขาสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272-279.
- อรนุช อุดรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซัลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหมม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรุณวรรณ อินทร์ช่วย, คมแข พิลาสมบัติ, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, รุจริน ลิ่มสุกวานิช และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. การใช้กล้าเชื้อโพรไบโอติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 ในแหมมเนื้อโค.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3 เล่ม 2 (37-45)
- อรุณ บ่างตระกูลนนท์, สุมาลี บุญมา, นพรัตน์ หมานริม, สุพล เลื่องยศสิทธิ์ชากุล, จตุรงค์ สุตตันทวิบุรย์ และมยุรา กุสมภ์. 2537. การศึกษาโรค Salmonellosis จากสุกรในประเทศไทย. การประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 10-11 สิงหาคม 2537.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรุณ บำรุงตระกูลนนท์, สุเมธชา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. 2547. โรคซัลโมเนลโลซิส การประชุมเชิงปฏิบัติการหลักสูตร การพัฒนาศักยภาพและเครือข่ายการเฝ้าระวังโรค Salmonellosis ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม. วันที่ 12- 13 กุมภาพันธ์ 2547 หน้า 34.

Adam, M.R. and Moss, O.M. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 232-248.

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.

Angkitittrakul, S., Tangkawattana, P., Polpakdee, A. and Sithigon, D. 2554. Prevalence and antimicrobial resistance of salmonella isolated from beef in KhonKaen Municipality. KRU Research J. 16(2) February 2011: 106

Archer, D.L. and Young, F. 1988. Contemporary Issues. Disease with a food vector. Clin Microbiol Rev 1, 337-398.

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

Amtzen, C.J. and Ritter, E.M. 1994. Encyclopedia of Agricultural Science. Academic Press, New York. pp. 17-23.

Ayres, G.I., Mund, T.I. and Sondin, E.W. 1980. Microbiology of food spices and condiments. A Series of books in food and nutrition. edn. schmeigert, 249pp.

Bacus, J.N. and Brown, W.L. 1981. Use of Microbial cultures: meat products. Food Technol. 35(1): 74-83.

Ben-Gigirey, B., Vieites, J.M. Baptista de Sousa, Villa T.G. and J. Barros-Velazques. 2000. Characterization of biogenic amine producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. Int. J. Food Microbiol. 57: 19-31.

Bhunja, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Direct Detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel Electrophoresis. J. Ind Microbiol 2. 319– 322.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray B. 1991. Influence of growth Conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57(4): 1265-1267.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Blood, R.M. 1975. Lactic acid bacteria in marinated herring. In: Carr, J.G.; Cutting, C.V. and Whiting, G.C. editors. lactic acid bacteria in beverages and food. NewYork: Academic Press. pp. 195-208.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C.. 2001a. Amino aciddecarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausage. Int. J. Food Microbiol. 66: 185-189.
- Bover-Cid, S., M. Izquierdo- Pulido and M.C. Vidal-Carou. 2001b. Changes in biogenic amine and polyamine content in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. Meat Sci. 57: 215-221.
- Bover-Cid, S., M.J. Miguelez-Arrizado and M.C. Vidal-Carou. 2001d. Biogenic amine cumulation in repned sausages affected by the addition of sodium sulphite. Meat Sci. 59: 391-396.
- Bover-Cid, S. and W.H. Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 53: 33-41.
- Caplice, E and F. Fitzgerald.1999. Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50: 131-149.
- Cassen, R. G. 1997. Residual nitrite cured meat. Food Technol, 51(2): 53-55.
- Chander, H., V.H. Batish, S. Babu and R.S. Singh. 1989. Factors affecting amine production by a selected strain *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Sci. 54: 940-942.
- Chung, K. C. and J. M. Goepfert. 1970. Growth of Salmonella at low pH. J. Food. Sci. 35(3):326-328.
- Coisson, J.D., C. Cerutti, F. Travaglia and M. Arlorio. 2004. Production of biogenic amines in Salamini italiani alla Cacciatora POD. Meat Sci. 67: 343-349.
- Collier, L., A. Balows and M. Sussman. 1998. Microbiology and Microbial Infections : Systematics Bacteriology. Vol. 2 10th ed. oxford university press, Inc., London. pp. 99-105
- Custo´dio, S., M. T. Page, K. Larson, and R. J. Archuleta. 2007. Combining different datasets to obtain a rupture model: The 2004 M6.0 Parkfield, California, earthquake, Seismol. Res. Lett., 78. pp. 303.
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservative. Food Technol. 3(1): 164-167.
- Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial Components from lactic acid bacteria, In: Salminen, S.; & von Wright, A., Eds. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 127-160.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16(9): 1058-1071
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1992. Influence of the carbon source on Nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. General. Microbiol.* 138: 571-578.
- De Vuyst, L. Callewaert, R. and Crabbe, K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. *Microbiol.* 142: 817-827.
- Diaz-Cinco, M.E., G. Fraijo, P. Grajeda, J. Lozano-Taylor and E. Gonzalez de Meja. 1992. Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationships to histamine. *J. Food Sci.* 57: 355-365.
- European Food Safety Authority. 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9(10): 2393.
- Evan, J.B. and C.F. Niven Jr. 1951. Nutrition of hetero-fermentive lactobacilli that cause greening of cured meat product. *J. of Bacteriology.* 62: 599-603.
- Fedoraka-Cray, P. J., Kelley, L. C., Stabel, T. J., Gray, J. T. and Laufer, J. A. 1995. Alternate Routes of Invasion may Affect Pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in Swine. *Infect. and Immunity*, vol. 63, p. 2658- 2664
- Francis. F. J. 2000. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 3 John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 1556-1617.
- Frank, H. K. 1992. Bacteriocin. *Dictionary of food microbiology*. Technomic Publishing. Co Inc., USA. p. 43.
- Gardini, F., M. Martuscelli, M.C. Cruso, F. Galgano, M.A. Crudele, F. Favati, M.E. Guerzoni and G. Suzzi. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 105-117.
- Geoffrey, C. P. 1987. *Fermentation Foods of the world: A dictionary and guide*. Butterworth, London. pp. 9 –13, 141.
- Gilliland, S.E., R.B. Smittle, M.L. Speck and W.M. Walter. 1974. Relation of fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *J. Appl. Microbiol.* 27: 738.

- Giannella, R.A. 1996. Socio-demographic, host and clinical characteristics of people with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis in urban Bangladesh. *J. Biomedical Sci. and Engineering*, Vol.6.
- Gonzalez de Llano, D., P. Cuesta and A. Rodriguez. 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 270-274.
- Guthrie R.K. 1992. *Salmonella*. CRC Press, Inc. USA. pp. 220.
- Halasz, A., A. Barath, L.S. Sakardi and W.H. Holzapfel. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trend Food Sci. Technol.* 5: 42-49.
- Hammes, W.P. and H. J. Knauf. 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.* 36:155-168.
- Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P., and Ray, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56, 252 – 255.
- Harrison, A. P., JUN. and Hansen, A. P. 1950. A Motile *Lactobacillus* from the Cecal Feces of Turkeys. *J. Bacteriology.* 59, 444-446.
- Helander, I.M., Wright, A.V. and Wattial-sandholm, T.M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*8: 146-150.
- Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose mal-digestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103: 582-587.
- Holzapfel, W.H. 1997. Uses of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control.* 8: 241-258.
- Isaacson, R. E., Firkins, L. D., Weigel, R. M., Zuckerman, F. A. and Dipietro, J. A. 1999b. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella Typhimurium* among experimentally infected pigs. *American J.* Vol. 60, pp.1155-1158.
- ISO 6579. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* . pp. 1-25.
- Jay, M. T. 1996. *Modern Food Microbiology*. 5<sup>th</sup> ed. International Thomson Publishing, New York. pp. 110-113
- Jimenez, C. F., J. Carballo and S. Cofrades. 2001. Healthier meat and meat product: their role as functional food: Review. *Meat Sci.* 57: 5-13.
- Kelly. W. J., R. V. Asmunson and C. M. Huang. 1996. Characterization of plantaricin KW30, A bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 657-662.

- Koupal, L. R., and R. H. Deibel. 1975. Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 11:14-22.
- Lafom-Lafourcade S., 1983. Wine and brandy. *Biotechnology*: 81-163.
- Lawrie, R. 1995. The structure, composition and preservation of meat. In Campcell-Platt, A. and P. E. Cook (eds). *Fermentation meats*. Blackie Academic & Professional, New York. pp.1-38.
- Leuschner, R.G., M. Heidel and W.P. Hammes. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 1-10.
- Linko, F. K. 1985. Immobilized lactic acid bacteria. *Enzyme and Immobilized Cells in Biotechnology*. Benjamin Cummings. London. pp. 25-26.
- Lotong, N., and Swetwiwathana, A. 1990. Production of *Salmonella* free Nham. annual report, ASEAN food techniligy and research development Project.
- Lucke, F. K. 1998. Fermented sausage, pp. 441-447. In B. J. B. Wood (ed). *Microbiology of Fermented Foods*. 2<sup>nd</sup> ed. Blackie Academic & Profesional. London.
- Lucke, F. K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56: 101-115.
- Matsusaki, H. 1996. Lantibiotic Nisin Z Fermentative Production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between Production of the Lantibiotic and Lactate and Cell Growth. *Appl. Microbiol. and Biotech.* 45: 36-40.
- Maijala, R., S. Eerola, S. Lievonen, P. Hill and T. Hirvi. 1995. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw material. *J. Food Sci.* 60: 1187-1190.
- Mortvedt, C.I. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactocacillus sake* L45. *Appl. and Enviromental Microbiol.* 57: 1829-1834.
- Motlagh, A. M., Bhunia, A. K., Szostek, F., Hansen, T. R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Nucleotide and aminoacid sequence of PAPgene pediocin AcH production in *Pediococctls acidilactici* H. *Lett Appl Microbiol.* 15(2), 45-48.
- Nielsen, W.J., Dickson, J. S., and Crouse, J.D. 1990. Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Euviron. Microbiol.* 56: 2142-2145.
- Niinivaara, F.P., M.S. Pohja and S.E. Komulainen.1964. Some aspects about using bacterial pure culturesin the manufacture of fermented sausages. *Food Technol.* 18: 147-153.

- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition. eds. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 139-159. Marcel Dekker Inc., New York
- Ouwehand, A. C., S, Salminen and E. Isalauri. 2002. Probiotic: an overview of beneficial effects. lactic acid bacteria: Genetic, Metabolism and Application. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 279-289.
- Pearson, M. A. and R. T. Dutson. 1986. Advanced in meat research: Meat and Poultry Microbiology. Vol. 2. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut. pp. 123-143.
- Pereira, C.I., M.T. Barreto Crespo and M.V. San Romao. 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. Int. J. Food. Microbiol. 68: 211-216.
- Popoff, M.Y, Bockemuhl J and Gheesling L.L. 2002. Supplement to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2004; 155 (7): 568-70.
- Pot, B., Vandamme, P. and Kersters, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. In Modern Microbial Methods (Chemical Methods Prokaryotic Systematics Series), pp. 493– 521. Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. Chichester: Wiley
- Quiao, M. 1997. Isolation of a Lactococcus lactis Strain with High Resistance to Nisin and Increased Nisin Production. Biotechnology Letter. 19: 199-202.
- Rezaei, M., Jafari, H., Sahari, M. A., Hosseini, H., Montazeri, N., Parviz M. and Nazarinia, A. 2007. Relation of biogenic amines and bacterial changes in ice-stored southern caspian kutum (*Rutilus frisikutum*). J. Food Biochem. 31(4): 541–550.
- Ringø, E. and Gatesoupe, F.-J. 1998 Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160, 177–203.
- Rozben, M., Kalchayanand, N., Field, R.A., Johnson, M.C., and Ray. B., 1993. The influence of Biopreservatives on bacteria level of refrigerated vacuum packaged beef. J. Food. Safety. 13: 99-111.
- Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. Int. J. Food Microbiol. 29(2-3): 213-231.
- Sarkar, P. K. and Banerjee, S. 1996. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates Obtained from Natural Habitats. Journal of Food Science Technology 33: 231-233.
- Schlegel, H. G. 1993. General Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press, New York. pp. 300-305.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schillinger, U. and Holzapfel W.H. 1990. Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol* 7:305–310
- Selgas, M. P., B. Sanz and J. A. Ordoñez. 1998. Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry sausage. *Food Microbiol.* 5: 185-193.
- Shalaby, A.R. 1995. Multidetector and semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.* 52: 367-372.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research. Int.* 29(7): 675–690.
- Shakila, R. J., T. S. Vasundhara and K.V. Kumudaually. 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.
- Silla Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.
- Smith, L., Plumbo, A. and Walls. 1993. Relationships between foodborne bacterial pathogens and reactive arthritis. *J. Food Sci.* 13: 209-236.
- Soufleros, E., Barrios, M. L. and Bertrand, A. 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 266-278.
- Sumner, S.S., H.W. Speckhard, E.B. Somers and S.L. Taylor. 1990. Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 73: 3050-3058.
- Swetwathana, A., U. Leutz., N. Lotong., and A. Fischer. 1999. Controlling the Growth of *Salmonella anatum* in Nham. Effect of Meat Starter Culture, Nitrate, Nitrite and Garlic. *Fleischwirtsch.* 79(9): 124-128.
- Swetwathana, A., U. Leutz., N. Lotong., and A. Fischer. 1999. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. *Fleischwirtsch Int.* 1/99: 26-29
- Swetwathana, A., Lotong, N., Fischer, A. and Sonomoto, K. 2001. Potential for use of isolated bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from Nham (Thai Fermented Meat) to Control the Growth of *Salmonella anatum* [An In-vitro Study]. The 47<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) Proceedings. Volume II: P: 18-19. August 26-31, 2001. Krakow, Poland.
- Swetwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J. and Somoto, K. 2003. Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in Nham (Traditional Thai Fermented Meat). 49<sup>th</sup>

- International Congress of Meat Science and Technology. 2<sup>nd</sup> Brazilian Congress of Meat Science and Technology: Sao Paulo, Brazil, 31<sup>st</sup> August 5<sup>th</sup> September
- Swetwathana, A. 2005. Microbiological Quality Enhancement of Thai Fermented Meat Product (Nham) using Nham associated pediocin-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536). Ph.D, Thesis of Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, Japan.
- Swetwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. Maturation of Nham a Thai Fermented Meat Product: Effect of Pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella* Anatum during Nham fermentation. *Fleischwirtsch Int.* 22(3): 46–49.
- Swetwathana A, Surapantapisit Y, Zendo T, Nakayama J and Sonomoto K. 2008. Identification and partial characterization of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus pentosaceus* associated in traditional Thai fermented beef (mum). *Proceeding of 53<sup>rd</sup> International Congress of Meat Science and Technology.* Edited by Zhou and Zhang. China Agricultural University Press pp 61-62.
- Swetwathana, A., N. Sawa, T. Zendo, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2008. A novel pediocin-like produced by *Lactobacillus plantarum* KMITL-QU54 from traditional Thai fermented meat-rice sausage (Sai-krog Isan). *The 54<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) Proceedings (in CD).* August 10-15, 2008 Capetown, South Africa.
- Swetwathana, A., Sawa, N., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2008. Newly Discovered Bacteriocin from 1 (*Weissella cibaria* KMITL-QU21 Associated in Traditional Thai Fermented Meat-rice Sausage (Sai-krog Isan). *The 54<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) Proceedings (in CD)-* August 10-15, 2008 Capetown, South Africa.
- Swetwathana, A., Jindaprasert, A., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2016. Plantaricin W producer: *Lactobacillus plantarum* SS7 isolated from Isan-sausage. *62<sup>nd</sup> International Congress of Meat Science and Technology.* Thailand.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* specie and other gram-negative bacteria. *Appl and Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Reviews.* 40: 722-756.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Teuber, M. and Geis, A. 1981. The family *Streptococcaceae* (nonmedical aspects). In Starr, M.P.; *et al.* editors. The Prokaryotes. Vol. II. Berlin. pp. 1614-1630.
- Thomas, T.D. 1987. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy. Sci. Technol.* 22: 25-38.
- Tittsler, R.P., P.S. Pederson, E.E Snell, D. Hendlin and C.F. Niven Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. *Bacteriological Reviews.* 16: 227-260.
- Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A and Valyasevi. 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.
- U.S. Food and Drug Administration. 2011. Fish and fisheries products hazards and controls guidance. 4th. office of seafood. washington, D.C. 20204. 468 pp.
- Victor, L., Marina, C.E. , Maria, F., and Alvarez, A., Miguel. 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, Vol. 6, Number 2, pp. 145-156 (12)
- Vale, S. and M.B.A. Gloria. 1998. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chem.* 63: 343-348.
- Varnam, H. A. and P. J. Sutberland. 1995. *Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology.* Chapman and Hall, New York. pp. 315-332.
- William H. Ewing.1986. *Edwards and E wing's Identification of Enterobacteriaceae.* Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11: 281-291.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S. and Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci*, 69(4), FCT312-FCT319.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffer Peptone Water (Difco, USA)

Petone	10	g	Phosphate	1.5	g
Chlorure de sodium	5	g	Phosphate disodique	3.5	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตรถ่ายใส่ในหลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดจุกฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric Agar (Difco, USA)

Proteose peptone	12	g	Sodium chloride	5	g
Yeast extracts	3	g	Sodium thiosulfate	5	g
Bile salts No. 3	9	g	Ferric ammonium citrate	1.5	g
Lactose	12	g	Bromthymol blue	0.036	g
Saccharose	12	g	Acid Fuchsin	0.1	g
Salicin	2	g	Agar	14	g

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดให้วุ้นละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตรไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อไม่ควรใส่ฟลอสก์ไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชั่วโมง (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วันหลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

#### ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine-Indole-Motility (LIM) Medium (Difco, USA)

Polypeptone	10.0	g	Bromcresol purple	0.02	g
Dextrose	1.0.0	g	Agar	3.0	g
L-Lysine	10.0	g	น้ำกลั่น	1.0	L
L-Tryptophan	0.5	g	Final pH6.7		
Yeast extracts	3.0	g			

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเดือดดูดส่วนผสมที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ให้ได้ปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ของหลอดปิดจุกนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ก.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Kauffman Tetrathionate Brilliant Green (MKTTn) (Merek, Germany)**

ซังสาร MKTTn 89.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร ต้มให้เดือดเล็กน้อย ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave

Iodine-potassium iodine (I-KI) solution

Potassium iodide (KI)	5.0	g
Iodine (I)	4.0	g

ละลาย KI ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติม I เพื่อให้ละลายในสารละลาย KI จนหมด จากนั้นเติมน้ำให้ปริมาตรครบ 20 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดปิดสนิทสีน้ำตาลหรือขวดที่กันแสง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในวันที่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในการทดลอง ให้เติม I-KI 20 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MKTTn ที่ต้มละลาย และรอให้เย็นผสมให้เข้ากันและให้ตะกอนของ  $\text{CaCO}_3$  กระจายให้ทั่ว ก่อนที่จะถ่ายอาหารลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อในปริมาณ 10 มิลลิลิตร

**ก.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vassiliadis Soya (RVS) (Difco, USA)**

Magnesium Chloride, anhydrous	13.5	g	Potassium Dihydrogen	1.45	g
Sodium Chloride	9.0	g	Malachite Green	0.036	g
Dipotassium Phosphate	0.03	g			

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ่ายใส่ในหลอดทดลองในปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ก.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron (TSI) agar slant (Difco, USA)**

Beef extract	3.0	g	Proteose peptone	5.0	g
Peptone	15	g	Lactose	10.0	g
Glucose	1.0	g	$\text{FeSO}_4$	0.2	g
Sucrose	10	g	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.3	g
NaCl	5.0	g	น้ำกลั่น	1000	ml
Phenol red	0.024	g	Agar	12.0	g
Yeast extracts	3.0	g	Final pH	7.4 ± 0.2	

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 76.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน กวนตลอดเวลาถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวหลอดปิดจุกฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งโดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร และมี Butt ยาวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

#### ก.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSA) (Difco,USA)

Trypticase peptone (Tryptone)	15	g	Agar	15	g
Phytone peptone (Soytone)	5.0	g	น้ำกลั่น	1000	ml
NaCl	5.0	g	Final pH	7.3 ± 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้ามาเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase (Tryptic) Soy Broth (Bacto,USA)

Trypticase peptone	17.0	g	Glucose	2.5	g
Phytone peptone	3.0	g	น้ำกลั่น	1000	ml
NaCl	5.0	g	Final pH	7.3 ± 0.2	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	g			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกหรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar base (BBL, USA)

Pancreatic digest of gelatin	1.0	g	Potassium phosphate	2.0	g
Dextrose	1.0	g	Urea	20	g
Sodium chloride	5.0	g	Phenol red	0.012	g

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นมาเชื้อแล้วกรองปลอดเชื้อใส่ขวดเอ็มที่ปลอดเชื้อ Agar

ต้มละลาย Agar ในน้ำกลั่น ปิดจุกนำไปมาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในวันที่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในการทดลองผสม Urea และ Agar จากนั้นถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวหลอดปิดจุกเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งโดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร และมี Butt

ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ก.10** อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysin Desoxycholate (XLD) Agar (Oxoid, UK)

Yeast extracts	3.0	g	Lactose	7.5	g
Sucrose	7.5	g	Ferric ammonium citrate	0.8	g
Phenol red	0.08	g	L-Lysine	5.0	g
Sodium thiosulfate	6.8	g	Sodium desoxycholate	2.5	g
น้ำกลั่น	1000	ml	Agar	15.0	g
Xylose	3.75	g	Final pH	7.4 ± 0.2	
NaCl	5.0	g			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือดให้วุ้นละลายระวัง Overheat จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือได้ ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อไม่ควรใส่ฟลasksไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชั่วโมง (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

**ก.11** น้ำยาเจือจาง Buttfield's Phosphate Buffered (BAM R11, 2001)

11.1) การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล และปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บในตู้เย็น

11.2) การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นตวงใส่ขวดปริมาตร 450 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 กรัม) หรือ ตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) และดูด 9 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**ก.12** อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Merck, Germany)

Proteose peptone	10.0	g	Triammonium citrate	2.0	g
Meat extract	8.0	g	Yeast extract	4.0	g
D(+) glucose	20.0	g	Dipotassium phosphate	2.0	g
Polysobate 80	1.0	g	Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.2	g	Manganese sulfate	0.05	g
น้ำกลั่น	1,000	ml			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนประกอบ 55.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยการต้มให้เดือด จากนั้นนำไปนึ่งเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ก.13 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Merck, Germany)**

Proteose peptone	10.0	g	Triammonium citrate	2.0	g
Meat extract	8.0	g	Yeast extract	4.0	g
D(+) glucose	20.0	g	Dipotassium phosphate	2.0	g
Polysorbate 80	1.0	g	Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.2	g	Manganese sulfate	0.05	g
CaCO <sub>3</sub>	7.5	g	Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	1000	ml			

ละลายส่วนประกอบ 55.15 กรัม เติม Agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ CaCO<sub>3</sub> 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยการต้มให้เดือดจากนั้นนำไปนึ่งเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ก.14 อาหารเหลวจำลองการหมักแฮม (Nham Model Broth, NMB) (Swetwivathana และคณะ, 1999)**

Meat extracts	10.0	g	D(+) glucose	10.0	g
Tryptone	10.0	g	Sodium chloride	25.0	g
Sodium ascobate	0.5	g	Sodium nitrite	0.1000	g
Sodium-tri-polyphosphate	3.0	g			

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ใช้กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวปรับค่าออสโมลิตี (Aw) ให้มีค่าเท่ากับ 0.97 ในขวดปรับปริมาตร ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าเท่ากับ 6.5

**ก.15 อาหารเลี้ยงเชื้อ Improve medium**

Glucose	0.5	g	Magnesium Chloride, anhydrous	0.2	g
Tryptone	5.0	g	Thiamine (B <sub>1</sub> ) C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> .HCl	0.01	g
Yeast extract	5.0	g	Pyridoxal-5-phosphate	0.05	g
Beef extract	5.0	g	MnSO <sub>4</sub>	0.05	g
Sodium chloride	2.5	g	FeSO <sub>4</sub>	0.04	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ammonium citrate dibasic	2.0	g	$K_2HPO_4$	2.0	g
$CaCO_3$	0.1	g	Bromocresol purple	0.06	g
Amino acid	10.0	g	Tween 80	1.0	ml
Agar	20.0	g	น้ำกลั่น	1000	ml

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ  $5.3 \pm 0.05$  จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### ก.16 สารละลาย Normal saline (0.85% NaCl)

Sodium chloride	8.5	g
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายให้เข้ากันนำเข้ามาเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.17 kovac indole reagent

Pure amyl หรือ Isoamyl alcohol	150.0	ml	HCl (conc.)	50.0	ml
p-Dimethylaminobenzaldehyde	10.0	g			

ละลาย aldehyde ใน alcohol แล้วค่อยๆเติม HCl เก็บไว้ในขวดสีชา 4-10 องศาเซลเซียส

#### ก.18 Glucose Yeast extracts Peptone (GYP)

Phytone peptone	10.0	g	D(+) glucose	20.0	g
Yeast extracts	10.0	g	Sodium acetate	10.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml			

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ  $6.80 \pm 0.02$  จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ก.18.1 การเตรียม salt solution ของอาหาร GYP

Magnesium sulfate	4.00	g	Sodium chloride	0.20	g
Manganese sulfate	0.20	g	$FeSO_4$	0.20	g

ทำสต็อก salt solution โดยละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คึงสารละลาย 10 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

#### ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด (AOAC, 2006)

คุ่มตัวอย่างແໜ່ມ ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุง Stomacher เติมน้ำยาเจือจาง Butterfield's Phosphate-Buffered ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher เวลา 1 นาที จากนั้นทำการเจือจางแบบ Serial Dilution ให้มีความเจือจางที่เหมาะสม นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS โดยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวน โคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่ได้ในแต่ละอัตราการเจือจาง และคำนวณโคโลนีที่ได้ต่อกรัมของตัวอย่างที่ใช้

#### ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี agar spot (สุพรรณิการ์, 2548)

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ให้มีค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม นำตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วปริมาตร 10<sup>0</sup> ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO<sub>3</sub> 0.5 เปอร์เซ็นต์ รอให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียแลคติก และคำนวณผลที่ได้ (cfu/ml)

$$\text{สูตรการคำนวณ (cfu/ml)} = \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{อัตราการเจือจาง} / 0.01$$

#### ข.3 วิธีการวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) (ISO 6579, 2002) (ภาพที่ ข1)

**ขั้นตอนที่ 1** คุ่มซั้งตัวอย่างແໜ່ມ ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุง stomacher

**ขั้นตอนที่ 2** เติม buffered peptone water ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้กระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered peptone water ด้วยเครื่อง Stomacher

**ขั้นตอนที่ 3** นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะได้ Pre-enrichment ซึ่งจะช่วยให้เชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยหรือบาดเจ็บที่มีอยู่ในอาหารฟื้นตัว และเพิ่มปริมาณมากขึ้นทำให้โอกาสตรวจพบเชื้อมากขึ้น

**ขั้นตอนที่ 4** เขย่า Pre-enrichment medium ให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้อาหาร 2 ชนิด คือ

1) Rappapost Vassiliadis Soya (RVS) broth ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน Pre-enrichment ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง vortex แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Muller-kauffman tetrathionate brilliant green (MKTTn) broth ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้น Pre-enrichment ในปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้เรียกว่า Selective enrichment สารยับยั้งที่มีใน selective enrichment จะช่วยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แข่งขันอื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อซัลโมเนลลาขณะเดียวกันเชื้อซัลโมเนลลาที่แข็งแรงจะทนต่อสารยับยั้งต่างๆ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง

**ขั้นตอนที่ 5** นำเชื้อในขั้นตอน Selective enrichment มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Xyloce Lysine Deoxycholate (XLD agar) และ Hektoen Enteric Agar เนื่องจากการใช้อาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อซัลโมเนลลา และเชื้อแบคทีเรียลำไส้อื่นๆ ได้ โดยอาศัยหลักการของการหมักย่อยน้ำตาล เช่น น้ำตาลแลคโตส ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลได้

**ขั้นตอนที่ 6** เลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลาเก็บลงในหลอดอาหาร TSA ซึ่งโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะดังนี้

- XLD agar: ลักษณะโคโลนีจะกลมใส มีหรือไม่มีจุดสีดำของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในโคโลนี

- Hektoen Enteric Agar ลักษณะโคโลนีจะมีหรือไม่มีจุดดำของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ในโคโลนี

ทำการถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีลักษณะดังกล่าวมา 3-5 โคโลนี ถ่ายลงในหลอดอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

**ขั้นตอนที่ 7** ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียลำไส้บางชนิดสามารถสร้างโคโลนีลักษณะคล้ายซัลโมเนลลามากในอาหาร อาจทำให้เลือกโคโลนีผิด ซึ่งในขั้นตอนนี้จะตรวจสอบเพื่อหาแนวโน้มที่จะพบเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่าง โดยนำเชื้อจากหลอดอาหาร TSA ถ่ายลงใน Triple sugar iron (TSI) agar, Lysine-Indole-Medium (LIM) และยูเรีย (Urea) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 1) TSI agar

- นำเชื้อจากข้างต้นมา Streak และ Stab ลงในอาหาร TSI แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียสนาน 24±3 ชั่วโมง

- การอ่านผล :

- K/A - Slant เป็นสีแดง, Butt เป็นสีเหลือง

- A/A - Slant เป็นสีเหลือง, Butt เป็นสีเหลือง

- H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> - บริเวณ Butt เป็นสีดำ (สร้าง Hydrogen sulfide)

- H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> - บริเวณ Butt ไม่เปลี่ยนสี (ไม่มีการสร้าง Hydrogen sulfide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- g<sup>+</sup> -มีการสร้างก๊าซ
- g<sup>-</sup> -ไม่มีการสร้างก๊าซ

- *Salmonella* spp. จะให้ผลเป็น K/A, H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>, g<sup>+</sup> หรือ g<sup>-</sup>

## 2) Urea agar

- นำเชื้อจากข้างต้นมา Streak ลงบน Urea Slant แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส นาน 24±3 ชั่วโมง

- การอ่านผล :

- ผลบวก อาหารจะเปลี่ยนสีจากชมพูอ่อนเป็นชมพูเข้มขึ้น (rosepink)
- ผลลบ อาหารจะเปลี่ยนสีจากชมพูอ่อนเป็นเหลือง

- *Salmonella* spp. จะให้ผลเป็นลบ

## 3) LIM ดู ปฏิกิริยา Indole

- นำเชื้อข้างต้นใส่ลงในหลอดที่บรรจุ แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส นาน 24±3 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม Kovacs reagent 3 หยด

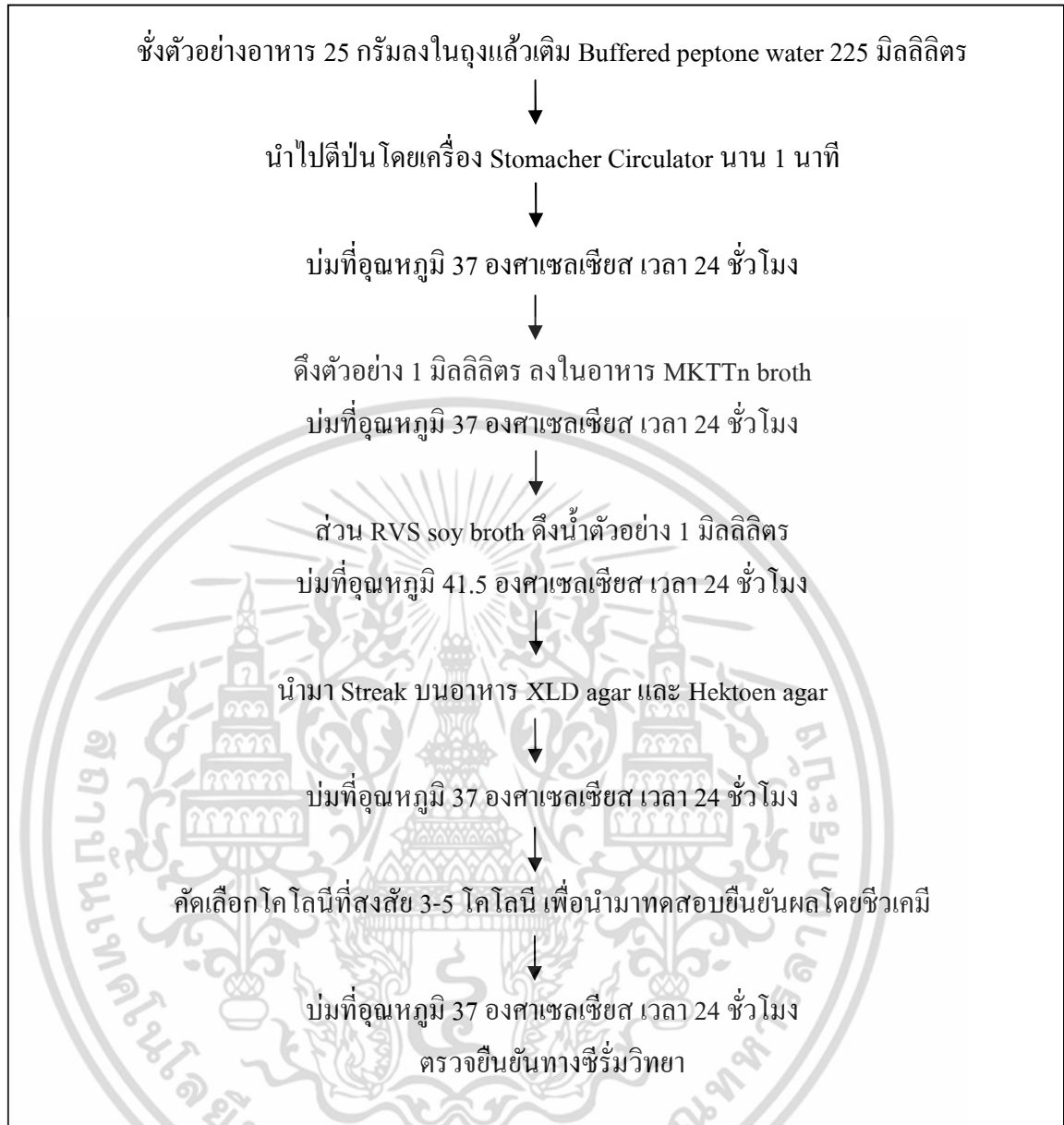
- การอ่านผล:

- ผลบวก จะเกิดวงแหวนสีแดง
- ผลลบ ไม่เปลี่ยนสี และไม่เกิดวงแหวนสีแดง

- *Salmonella* spp. จะให้ผลเป็นลบ

**ขั้นตอนที่ 8** การทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางเซรัมวิทยาเพื่อตรวจ group ของเชื้อซัลโมเนลลา โดยหยด agglutinating antiserum ชนิด A-I ลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วใช้รูปเขี่ยเชื้อจาก TSA หรือ NA slant เคลี่ยเชื้อให้ทั่วหยดของ antiserum บนสไลด์สังเกตการตกตะกอนของเชื้อในหยด antiserum ถ้าเป็นเชื้อซัลโมเนลลาจะเกิดการตกตะกอนของเชื้อขึ้น ถ้าไม่ใช่เชื้อจะละลายอยู่ในหยดของ antiserum ขาวขุ่นเหมือนน้ำนมทั้งหยด

**ขั้นตอนที่ 9** ส่งตรวจวิเคราะห์ยืนยัน เพื่อหาเซโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ WHO Salmonella – Shigella center กรมพยาธิชีววิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



ภาพที่ ข1: ขั้นตอนของวิธีการตรวจสอบแบบมาตรฐานของ *Salmonella* spp. (ISO 6579)

## ภาคผนวก ค

### วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

#### ค.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก โดยวิธี titratable acidity (AOAC, 1990)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดจากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล กำหนดหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times 100}{1,000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้}}$$

หมายเหตุ: น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก ( $C_3H_5O_3$ ) = 90.8 กรัมต่อโมล

#### ค.2 การวัดค่าพีเอช (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

นำตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) (Inolab, Germany)

#### ค.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

อบด้วยอุณหภูมิในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน desiccators นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนจากนั้นนำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำเอามาใส่ใน desiccators ที่ไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก อบครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ซึ่งค่าที่ได้จะแตกต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดของถ้วยอลูมิเนียม และน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

#### ค.4 การวัดค่าแอกติวิตี (Water Activity; Aw) (AOAC, 2000) โดยใช้เครื่องวัด Water Activity (Aw) ยี่ห้อ AQUALAB รุ่น 4TE

บรรจุตัวอย่างไม่น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของลงในภาชนะวัด ปิดฝาเครื่อง หมุนปุมวัดเพื่ออ่านค่า รอจนเครื่องทำงานเสร็จจะมีเสียงเตือน จากนั้นทำการบันทึกค่า Aw ที่ได้

### ค.5 การวัดค่าความขุ่นของเซลล์

โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงนำตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์มาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้มีค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม นำไปวัดค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.05-0.5

### ค.6 นำหนักเซลล์แห้งโดยวิธีการอบแห้ง

นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วใส่ในเคชเคเตอร์ครึ่งชั่วโมง ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง โดยคำนวณหาน้ำหนักแห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดสอบและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดสอบ (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

### ค.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959)

นำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (เจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) แล้วดูดตัวอย่างน้ำหมักที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตัวอย่างละ 2 หลอด เติมสารละลายดีเอ็นเอส (3,5-dinitrosalicylic acid; DNS) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสม จากนั้นหุ้มปากหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียมนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำเย็นทันที 5 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{As} \times \text{D}}{\text{Slope}}$$

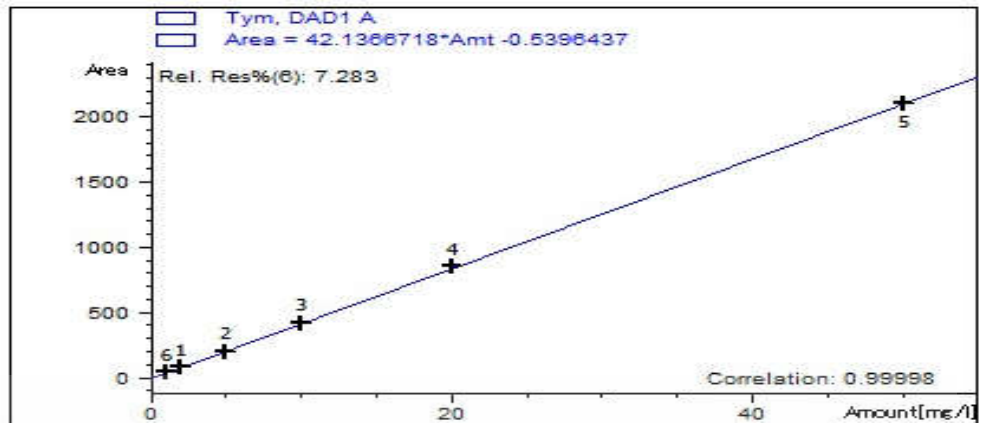
หมายเหตุ: As = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง, D = ค่าเจือจาง, Slope = ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

## ภาคผนวก ง

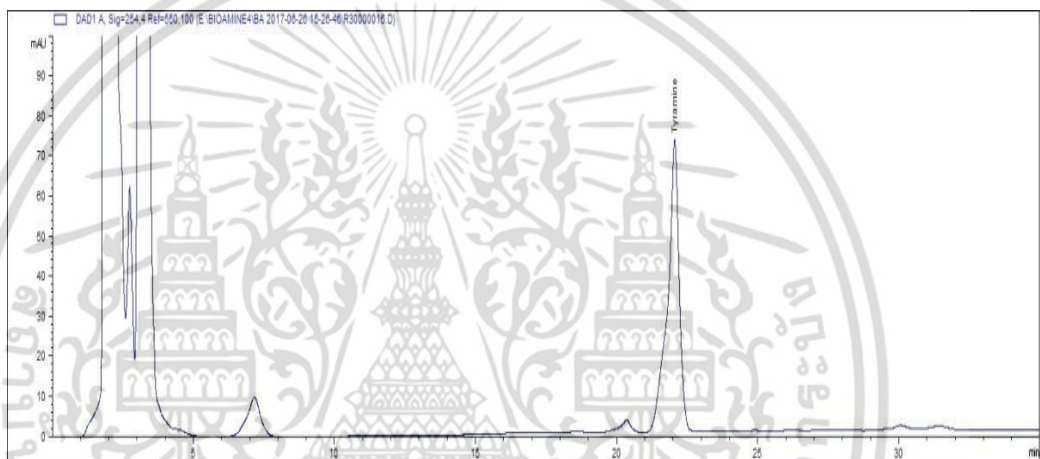
### การวิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีน

#### ง.1 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนโดยเทคนิค HPLC (Yongsawatdigul และ Udornporn, 2004)

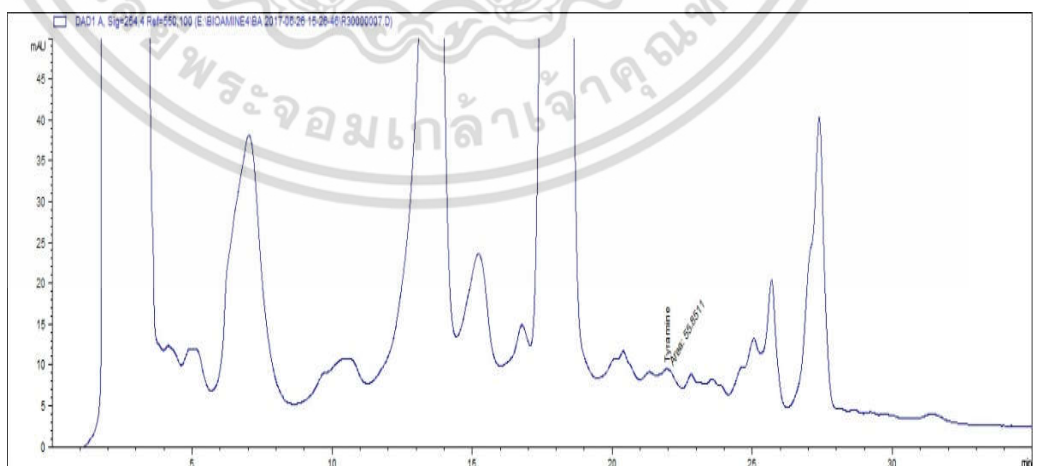
1. การวิเคราะห์ไบโอเจนิคเอมีนโดยใช้ Internal standard ทำการสกัดไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร Nham Model Broth, (NMB) ทำการเก็บตัวอย่างโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที
2. นำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์เติมสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์เป็นเวลา 7 นาที ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
3. นำส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม internal standard (ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ เติมสารละลายอิมตัวของโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์
5. เติมสารละลาย dansyl chloride ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
6. เติมสารละลายแอมโมเนียมความเข้มข้น 28 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์เป็นเวลา 30 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที
7. ทำการกรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 5 ไมโครลิตร ทำการตรวจวัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เวลาในการวิเคราะห์ 55 นาที จากนั้นนำพีค (peak area) ของตัวอย่างต่อพื้นที่พีค internal standard ไปอ่านค่าไบโอเจนิคเอมีนจากกราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของไทรามีน

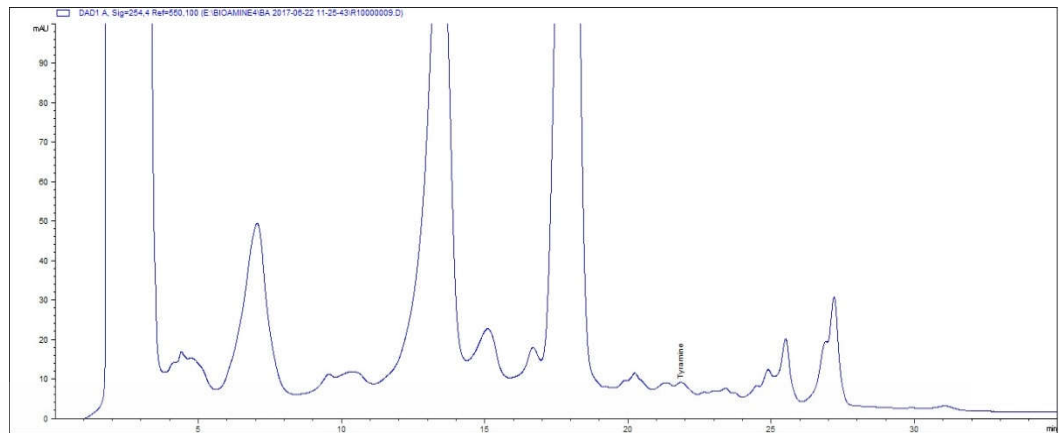


ภาพภาคผนวกที่ 2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานของไทรามีนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

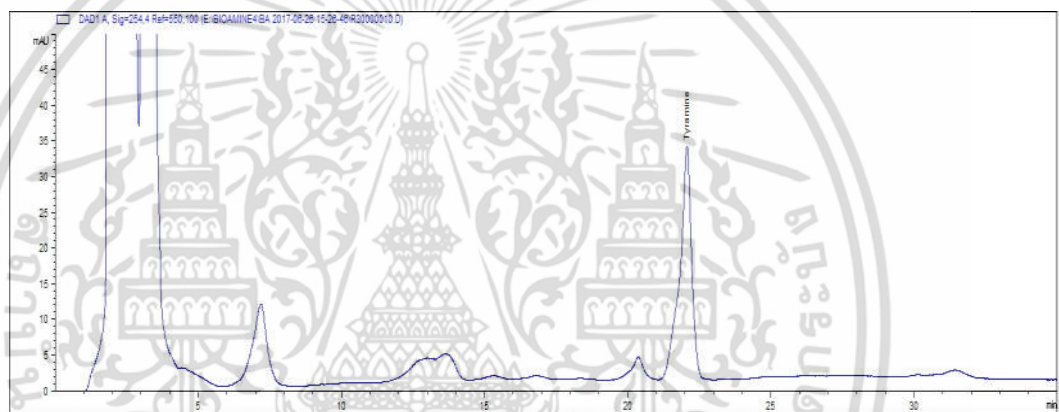


ภาพภาคผนวกที่ 3 โครมาโตแกรมของตัวอย่างควบคุมที่มีกรดอะมิโนไทโรโรซีน

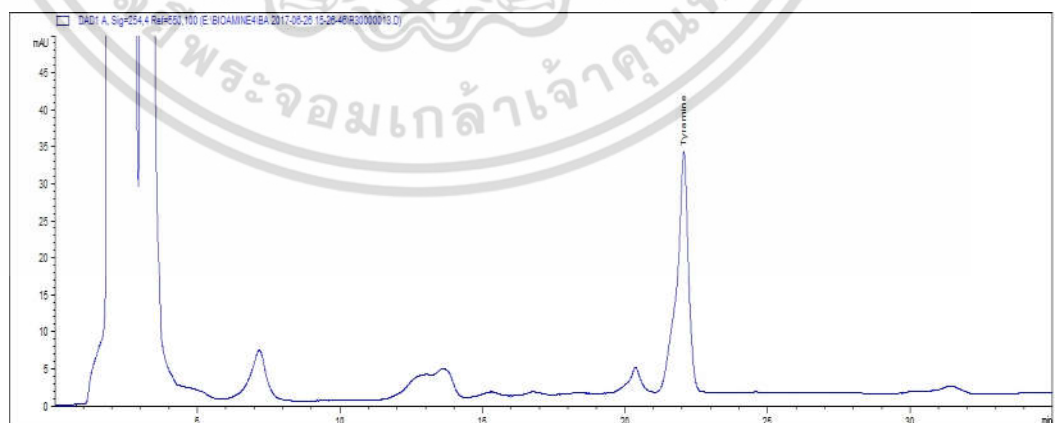
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ ๔ โครมาโตแกรมของตัวอย่างเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ของการหมักวันที่ 1

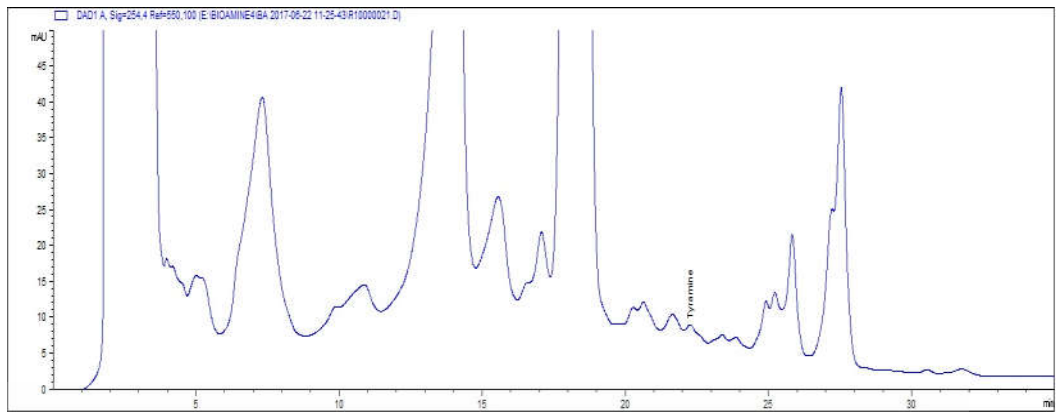


ภาพภาคผนวกที่ ๕ โครมาโตแกรมของตัวอย่างเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 ของการหมักวันที่ 1



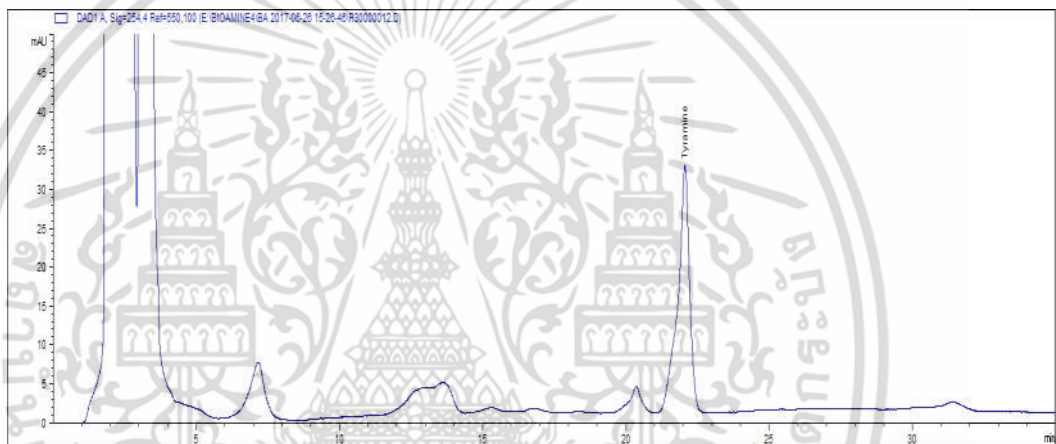
ภาพภาคผนวกที่ ๖ โครมาโตแกรมของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL-QU21 ของการหมักวันที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

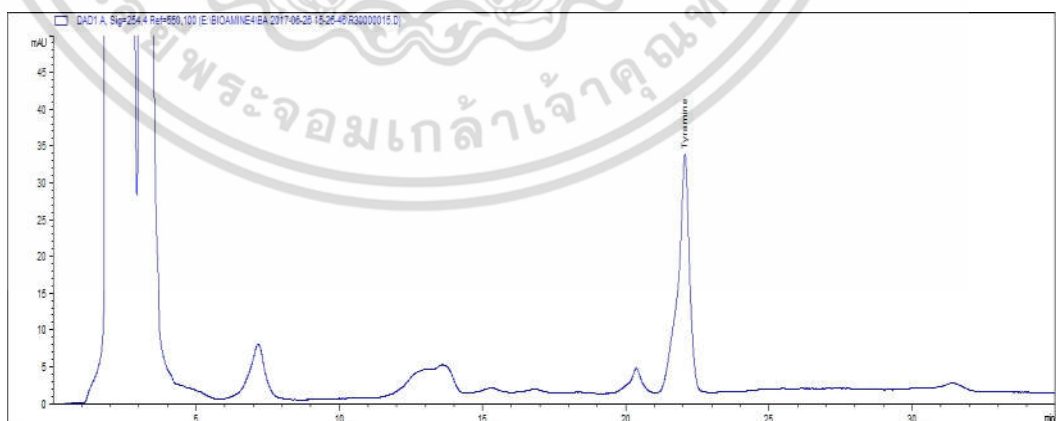


ภาพภาคผนวกที่ ๗ โครมาโตแกรมของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ของการหมักวันที่ 3

ของ



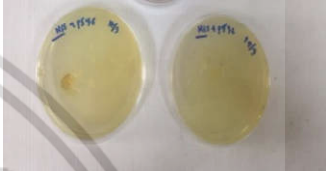



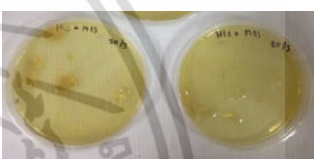
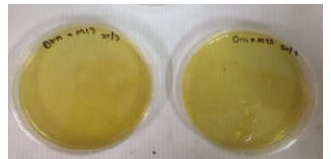



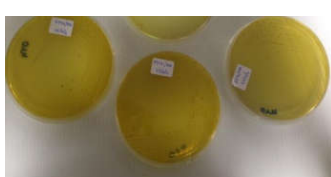



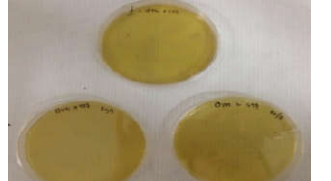


ภาพภาคผนวกที่ ๘ โครมาโตแกรมของเชื้อ *W. cibaria* KMITL QU21 ของการหมักวันที่ 3



ภาพภาคผนวกที่ ๖ โครมาโตแกรมของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 กับ *W. cibaria* KMITL-QU21 ของการหมักวันที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลคติก (LAB)	Amino Acid			
	Tyrosine	Lysine	Histidine	Ornithine
<i>P. pentosaceus</i> TISTR 536				
<i>P. pentosaceus</i> M13				
<i>L. plantalum</i> NF38				
<i>L. plantalum</i> SS7				

ภาพภาคผนวกที่ ๗ ผลการสร้างไบโอเจนิกเอมีนบนอาหารแข็ง Improved medium โดยแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTRP536, *P. pentosaceus* M13, *Lb. plantarum* NF38, *Lb. plantalum* SS7

**ภาคผนวก จ**  
**แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส**  
**ผลิตภัณฑ์เหนมสุทริลักษณ์**

วันที่ทำการทดสอบ.....

ชื่อผู้ทดสอบ.....

เพศ ...ชาย      ...หญิง

อายุ    ๐ ต่ำกว่า 15 ปี    ๐ 15-30 ปี    ๐ 31-45 ปี    ๐ 45-60 ปี    ๐ มากกว่า 60 ปี

โปรดให้คะแนนระดับความชอบต่อผลิตภัณฑ์เหนมที่ท่านกำลังทดสอบชิม โดยให้คะแนนระดับความชอบดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด    2 = ไม่ชอบมาก    3 = ไม่ชอบปานกลาง    4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

5 = เฉยๆ    6 = ชอบเล็กน้อย    7 = ชอบปานกลาง    8 = ชอบมาก    9 = ชอบมากที่สุด

คุณสมบัติทางกายภาพ	รหัสตัวอย่าง	
	839	410
สีของเหนม		
เนื้อสัมผัสของเหนม		
กลิ่นของเหนม		
ความเปรี้ยวของเหนม		
รสชาติของเหนม		
ความชอบโดยรวม		

ข้อเสนอแนะ.....

ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ณัฐฉิณี จรกา
วัน เดือน ปีเกิด	19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2535
ที่อยู่	58 ซอยอ่อนนุช 41 แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง ถนนอ่อนนุช จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10250
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2556 จบการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง - พ.ศ. 2557 ศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประวัติการทำงาน	- พ.ศ. 2557 ผู้ช่วยนักวิจัย เรื่องการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ตามสัญลักษณ์ที่ดีของร้านอาหารกิจกรรมที่ 5 การวิจัยและประเมินความเสี่ยงด้านอาหารปลอดภัย ภายใต้โครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารของไทยให้เป็นครัวอาหารคุณภาพของโลก” ปีงบประมาณ 2557 (Thailand Food Quality to the World)
การนำเสนอผลงาน	1. Joraka N., Swetwivathana A., and Pornpukdeewattana S. 2015. Production of lactic acid bacterial starter for traditional Thai fermented meat (Nham). 8 <sup>th</sup> Asian Conference on Lactic Acid Bacteria, 8 -10 <sup>th</sup> July 2015, Bangkok, Thailand.  2. Joraka N., Kerdpi boon S., Jindaprasert A. and Swetwivathana A. 2016. Chemical and microbiological quality of traditional Thai fermented meat (Nham) using pediocin PA-1 producer ( <i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR 536) as starter culture. 62 <sup>nd</sup> International Congress of Meat Science and Technology, 14-19 <sup>th</sup> August 2016, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้