สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดต่ำสำหรับเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

(Isolation of low lactic acid producing lactic acid bacteria as starters for isan sausage (rice-meat sausage) fermentation)

จัดทำโดย

นางสาวนฉมล กล่ำนาค รหัส 47040809

นางสาวรติกร รสฟุ้ง รหัส 47040821

นายธนารักษ์ จันทร์ประกอบ รหัส 47040843

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

ส.ม.
ท 2761
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 85384
วัน,เดือน,ปี 11 พ.ย. 2551

b 1201042x
i.....

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ผู้จัดทำ-เรียบเรียง นฤมล กล่ำนาด รติกร รสฟุ้ง ธนารักษ์ จันทร์ประกอบ

ปัญหาพิเศษเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดต่ำสำหรับเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

สาขาวิชา เทคโนโลยีการหมัก

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมากและน้อยจากไส้กรอกอีสาน โดยเริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีส่วนผสมของ 0.5% calcium carbonate ในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 ตามลำดับ ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ทำการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกจากการวัดรัศมีของโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งมีเกณฑ์กำหนดคือ โคโลนีที่มีรัศมีของโซนใส 0.1-0.2 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดน้อย และรัศมีของโซนใสมากกว่า 0.3 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมาก นำมาเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS agar ที่มี 1% calcium carbonate บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะ และการติดสีของโคโลนี ซึ่งพบ 2 รูปร่าง คือ แบบแท่ง และแบบคอคไค จากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ โดยทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกรด และปริมาณแบคทีเรียแลกติก ในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24 ตามลำดับ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกอีกครั้ง โดยจะคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีการสร้างกรดน้อยที่สุดมาทำการตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH) ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าเป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactococcus lactis*

นฤมล กล่ำนาด รติกร รสฟุ้ง ธนารักษ์ จันทร์ประกอบ	(รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)	31 ม.ค. 51
นักศึกษา	อาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอโครงงานปัญหาพิเศษ เรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดต่ำสำหรับเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวต-วิวัฒน์ ซึ่งให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานปัญหาพิเศษของกลุ่มข้าพเจ้า ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาคอยแนะนำให้คำปรึกษาและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมาก รวมทั้งแนะนำแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งช่วยให้การจัดทำโครงงานปัญหาพิเศษครั้งนี้ของกลุ่มข้าพเจ้าสำเร็จลงได้ด้วยดี กลุ่มข้าพเจ้าจักขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังทรัพย์และเอื้ออุปกรณ์ต่างๆในการทำรายงาน รวมถึงให้คำแนะนำต่างๆเวลาที่มีปัญหาเป็นกำลังใจในการทำงาน รวมทั้งสนับสนุนทางการศึกษามาตลอด และขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจโดยตลอด

นางสาวนฤมล กล่ำนาค
นางสาวรติกร รสฟุ้ง
นายธนารักษ์ จันทร์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

แบคทีเรียแลกติกตามธรรมชาติพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก จากเทคนิคการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ มีผลทำให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้มีลักษณะที่ดี

จากการใช้ประโยชน์ของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในหลายด้านทำให้มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักมากขึ้นจึงได้มีข้อกำหนดสำหรับกล้าเชื้อที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย กล้าเชื้อต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความเป็นพิษและไม่ทำให้เกิดโรค เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือสารเคมีปนเปื้อนที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ กล้าเชื้อที่ดีต้องมีกิจกรรมการหมักที่ดี เช่น กิจกรรมการสร้างกรด ซึ่งมีผลต่อกลิ่นรส มีผลต่อสีตามต้องการ มีความคงตัวของผลิตภัณฑ์สูง มีคุณสมบัติที่ทนต่อฟาจก์ (phage-resistant) กล้าเชื้อที่ดีไม่ควรสร้างสารที่มีผลในการยับยั้ง กิจกรรมการหมัก ปัญหาพิเศษนี้จึงได้สนใจทำการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติก เพื่อคัดเลือกนำมาเป็นกล้าเชื้อที่จะสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานให้มีคุณภาพเป็นมาตรฐานมากขึ้น รวมทั้งยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานขึ้นด้วย

นางสาวนฤมล กล่ำนาค
นางสาวรติกร รสฟุ้ง
นายธนารักษ์ จันทร์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	I
กิตติกรรมประกาศ	II
คำนำ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 ไส้กรอกอีสานหรือไส้กรอกเปรี้ยว	2
2.2 แบคทีเรียแลกติก	
2.2.1 ลักษณะของแบคทีเรียแลกติก	3
2.2.2 แบคทีเรียกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง	3
2.2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก	5
2.2.4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติก	7
2.2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักดอง	8
2.2.6 การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียแลกติกตามการใช้อาหารและการสร้างอาหาร	9
2.2.7 สกุลของแบคทีเรียแลกติก	9
2.2.8 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียแลกติก	10
2.2.9 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีต่ออาหารหมัก	13
2.2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก	17
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	19
3.1 สถานที่ทำการทดลอง	19
3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	19
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ขั้นตอน และวิธีการทดลอง 21
บทที่ 4 ผลการทดลอง 24
4.1 ปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่ชั่วโมงต่าง ๆ 24
4.2 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมากและน้อย 25
4.3 การย้อมสีแบบแกรมเพื่อตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะ และการติดสี 25
4.4 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก 27
4.5 การตรวจด้วยวิธี API 50 CH 37
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 42
บรรณานุกรม 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 อาหารหมักชนิดต่าง ๆ วัตถุดิบ และกล้าเชื้อที่ใช้	4
ตารางที่ 2.2 ปริมาณโปรตีนในส่วนผสมของถั่ว และธัญพืช	14
ตารางที่ 2.3 สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก	15
ตารางที่ 2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละสกุล	17
ตารางที่ 4.1 ปริมาณของแบคทีเรียแลกติกของไส้กรอกอีสานที่ชั่วโมงต่าง ๆ	25
ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	28
ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	29
ตารางที่ 4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	30
ตารางที่ 4.5 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	33
ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	34
ตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	35
ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกของหลอดหมายเลข 1 (ครั้งที่ 2)	38
ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกของหลอดหมายเลข 6 (ครั้งที่ 2)	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไดอะซิทิล	6
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของอะซีทัลดีไฮด์	6
ภาพที่ 2.3 แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลกติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ	11
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของแบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างแบบกลม	26
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของแบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างแบบแท่ง	26
ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณแบคทีเรียแลกติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	31
ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	31
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียแลคติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)	32
ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณแบคทีเรียแลกติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	36
ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	36
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียแลกติก ที่ชั่วโมงต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)	37
ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจหาสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกของหลอดหมายเลข 1 (ครั้งที่ 2)	39
ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจหาสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกของหลอดหมายเลข 6 (ครั้งที่ 2)	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

แบคทีเรียแลกติกตามธรรมชาติพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก จากเทคนิคการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ มีผลทำให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้มีลักษณะที่ดี

จากการใช้ประโยชน์ของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในหลายด้านทำให้มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักมากขึ้นจึงได้มีข้อกำหนดสำหรับกล้าเชื้อที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย กล้าเชื้อต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความเป็นพิษและไม่ทำให้เกิดโรค เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือสารเคมีปนเปื้อนที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ กล้าเชื้อที่ดีต้องมีกิจกรรมการหมักที่ดี เช่นกิจกรรมการสร้างกรด ซึ่งมีผลต่อกลิ่นรส มีผลต่อสีตามต้องการ มีความคงตัวของผลิตภัณฑ์สูง มีคุณสมบัติที่ทนต่อฟาจก์ (phage-resistant) กล้าเชื้อที่ดีไม่ควรสร้างสารที่มีผลในการยับยั้ง กิจกรรมการหมัก ปัญหาพิเศษนี้จึงได้สนใจทำการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลกติกเพื่อทำการหากล้าเชื้อที่จะสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ไส้กรอกให้มีคุณภาพเป็นมาตรฐานเดียวกันมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1. ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสานของบริษัทสุทธิลักษณ์อินโนฟู้ด จำกัด เพื่อคัดแยกหาแบคทีเรียแลกติก กลุ่มที่สร้างกรดมากและกรดน้อย โดยดูโซนการผลิตกรดแลกติกในอาหาร MRS ที่ผสม calcium carbonate เป็นเกณฑ์ในการคัดแยก

2. ยืนยันการผลิตกรดแลกติกใน MRS broth ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในขั้นต้น ว่าจะสร้างกรดน้อยกรดมากได้ตรงตามเกณฑ์ของเชื้อที่ขึ้นใน MRS ที่ผสม calcium carbonate จริงหรือไม่

3. นำเชื้อที่สร้างกรดน้อยอย่างน้อย 2 สายพันธุ์มาทดสอบหาชนิดสายพันธุ์ โดยใช้ Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ไส้กรอกอีสานหรือไส้กรอกเปรี้ยว (Fermented pork sausage)

เป็นอาหารที่นิยมมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไส้กรอกอีสานหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมู มันหมู ข้าวสุก เครื่องปรุงแต่งกลิ่นและรส บรรจุในไส้หมูหรือไส้ชนิดอื่นที่บริโภคได้และต้องทำให้สุกก่อนรับประทาน (มอก.1266-2537)ในระยะแรกของการหมักพบ *Pediococcus cerevisiae* ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส pH อยู่ในช่วง 4.5-5.6 การหมักระยะต่อมาเนื่องจากอยู่ในสภาพปราศจากอากาศ ทำให้จุลินทรีย์สร้างกรดเพิ่มขึ้น จนเหลือจุลินทรีย์ที่ทนกรดได้ไม่กี่ชนิด เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจสอบพบเชื้อ *Lactobacillus* sp. มากในช่วงที่มี pH ประมาณ 5 หรือต่ำกว่านี้ ความชื้นเฉลี่ยร้อยละ 51-74 ไส้กรอกอีสานที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไปนั้น ผู้ผลิตหมักและผึ่งแดดทิ้งไว้เพียง 1-2 วันเท่านั้น จึงมีรสเปรี้ยวน้อยกว่าแหนม แต่ก็ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่อาจสร้างสารพิษได้ เนื่องจากไส้กรอกอีสานต้องนำมาทำให้สุก โดยการปิ้ง ย่างหรืออบก่อนรับประทาน

ส่วนประกอบของไส้กรอกอีสานคล้ายคลึงกับแหนม แต่มีข้อแตกต่างเล็กน้อยดังนี้คือ

1. เนื้อที่ใช้ไม่จำเป็นต้องเอาไขมันออก การผสมเนื้อแดงและไขมันขึ้นอยู่กับราคา ถ้าใช้ไขมันต่ำราคาจะสูงขึ้น อัตราส่วนของเนื้อแดง:ไขมัน ตั้งแต่ 80:20 จนถึง 50:50 อาจใช้หมูสามชั้นผสมหนังหมูต้มบดหยาบ ช่วยให้เกาะตัวและลดต้นทุน หรือหมูสามชั้นผสมเนื้อแดงก็ได้
2. ข้าวที่ผสม ใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้าที่สุกแล้ว ข้าวเหนียวก่อนมามาผสม ล้างน้ำให้แยกตัวจากกัน เพื่อให้การกระจายตัวดีขึ้น และเพิ่มความชื้น อาจผสมในปริมาณสูงถึงร้อยละ 20-50 ตามเหตุผลที่กล่าวแล้ว
3. สารปรุงรสอื่น ๆ ได้แก่ ไนไตรท์ หรือสารผสม เกลือ น้ำตาล ผงชูรส กระเทียมพริกไทย อาจผสมลูกผักชีป่นด้วยเพื่อให้มีกลิ่นหอม
4. ไส้ที่ใช้บรรจุ นิยมใช้ไส้เล็กของหมู ขูดเมือก ล้างสิ่งสกปรก หมักเกลือหรือกำจัดกลิ่น ล้างน้ำจนกว่าจะหมดกลิ่นเหม็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แบคทีเรียแลกติก

2.2.1 ลักษณะของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การผลิตกรดแลกติก เจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติกได้แก่ Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostos (Wood และ Holzapfel, 1997)

2.2.2 แบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง (Lactic Acid Bacteria in Fermented Food Products)

แบคทีเรียแลกติกตามธรรมชาติพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร ปัจจุบันได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก จากเทคนิคการผลิตกล้าเชื้อจุลินทรีย์ มีผลทำให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้มีลักษณะที่ดี ตัวอย่างของอาหารหมักหลายชนิดที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก ดังแสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 อาหารหมักชนิดต่าง ๆ วัตถุดิบ และกล้าเชื้อที่ใช้

Products	**Raw materials**	**Starter cultures**
Beer	Cereals	Yeast
Wine	Grape juice	Yeast
Bread	Grains	Yeast, lactic acid bacteria
Soy sauce	Soybean	Mould (*Aspergillus*)
		Lactic acid bacteria
Sauerkraut, Kim chi	Cabbages	Lactic acid bacteria
Fermented sausage	Meat	Lactic acid bacteria
Pickled vegetable	Cucumber, olive	Lactic acid bacteria
Fermented milk	Milk	Lactic acid bacteria
Cheese	Milk	Lactic acid bacteria

ที่มา : Hansen (2002)

จากตารางจะเห็นได้ว่า การผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ แบคทีเรียแลกติกเข้าไปมีบทบาทเป็นอย่างมาก ปัจจุบันแบคทีเรียแลกติกถูกนำมาใช้ในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง โดยกิจกรรมหลักของแบคทีเรียแลกติกต่อผลิตภัณฑ์อาหาร คือ เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสมของอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดแลกติก กรดแอซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเฉพาะ นอกจากนั้นยังได้ผลิตภัณฑ์บางอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคเทอริโอซิน

จากการใช้ประโยชน์ของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในหลายด้าน ทำให้มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักมากขึ้นจึงได้มีข้อกำหนดสำหรับกล้าเชื้อที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย กล้าเชื้อต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความเป็นพิษและไม่ทำให้เกิดโรค เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือสารเคมีปนเปื้อนที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ กล้าเชื้อที่ดีต้องมีกิจกรรมการหมักที่ดี เช่นกิจกรรมการสร้างกรด ซึ่งมีผลต่อกลิ่นรส มีผลต่อสีตามต้องการ มีความคงตัวของผลิตภัณฑ์สูง มีคุณสมบัติที่ทนต่อฟาจก์ (phage-resistant) กล้าเชื้อที่ดีไม่ควรสร้างสารที่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมการหมัก (Hammers,1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลกติก

2.2.3.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ กรดแลกติกเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เกิดจากการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลกติก โดยใช้เอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลกติกจะสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อสภาพภายในเซลล์มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลกติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็น ไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการ metabolism ต่างๆ ภายในเซลล์

2.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียแลกติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ และยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถรวมตัวกับสารอื่นๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนต โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

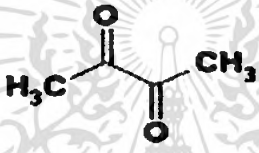
2.2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการการหมักน้ำตาลแบบ Heterofermentative โดยแบคทีเรียแลกติก ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบ ๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ยังจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ และรอบ ๆ เซลล์ลดลง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.4 ไดอะซิทิล

ไดอะซิทิล หรือ 2 ,3 butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการ metabolism ของไพรูเวต โดยแบคทีเรียแลกติกในสภาวะที่มี หรือ ไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียแลกติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วย จะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetone โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจาก diacetyl จะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein

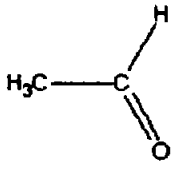


diacetyl
2,3-butanedione

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไดอะซิทิล
ที่มา : www.answers.com

2.2.3.5 อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

สารดังกล่าวเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ metabolism ของคาร์โบไฮเดรตแบบ Heterofermentation ของแบคทีเรียแลกติกในสภาวะที่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde ออกมานอกเซลล์ โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ต่างๆนั้นยังไม่มีการรายงานการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง10-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli* , *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของอะซีทัลดีไฮด์
ที่มา : www.chemistrydaily.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมี เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล สมบัติทางพันธุกรรมและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1988; Hiller and Davision, 1991; Stiles and Hastings, 1991) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน เช่น โปรติเอส, ทริปซิน เป็นต้น

2.2.4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ประมาณ 1000 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria innoca*, *Pseudomonas fragi* และ *Lactobacillus bulgaricus* ผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 1 ชนิด มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้มากกว่า 1 ชนิด จึงได้ทำการทดลองเชื้อ *Lactobacillus lactis* 280 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 16 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน เช่น สายพันธุ์ *L. lactis* ssp. *lactis* var. diacetylactis สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 1 สายพันธุ์ *L. lactis* ssp. *cremoris* ผลิตได้ร้อยละ 5 และสายพันธุ์ *L. lactis* ssp. *lactis* ผลิตได้ร้อยละ 9 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและทำให้ตกตะกอนได้ โดยนำมาใช้ในการถนอมอาหารและใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวาน เนยแข็ง นม โยเกิร์ต เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เนื้อต่าง ๆ รวมถึงผักผลไม้ ซึ่งไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum*, *Clostridium tyrobutyricum* และ *Bacillus* sp. แยกเชื้อจากแป้งหมัก (sour dough)ได้ 335 ไอโซเลต พบว่า มีเพียง 145 ไอโซเลต มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น และ 18 ไอโซเลต ที่ผลิตสารประกอบโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียซึ่งมีทั้ง 18 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักดอง

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลกติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์ นมหมัก เนย ผักดอง ไส้กรอก อาหารหมักพื้นเมือง เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า แหนม เป็นต้น แบคทีเรียที่จัดในกลุ่มนี้ได้แก่ Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc และ Streptococcus

แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria, LAB) ถูกใช้ในการเตรียมและถนอมอาหารประเภทเนื้อ นม และผัก มาเป็นเวลานาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (generally recognized as safe; GPAS) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะผลิตสารต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์, protease, flavor compound และสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นโดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ที่รู้จักดีก็คือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็น bactericidal protein นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Yang และคณะ (1997) พบว่า Lactobacillus 13 สายพันธุ์ และ Pediococcus 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง เป็น 2-pyrrodone-5-carboxylic acid (PCA) ซึ่ง PCA จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Enterobactor cloaoae* 1575, *Pseudomonas fluorescens* KJLG. และ *P. putida* 1560-2 ผลการยับยั้งของ PCA ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้น แต่จะถูกทำลายเมื่อเติม ammonium hydroxide และ PCA จะมีผลการยับยั้งน้อยกว่ากรดแลกติกเล็กน้อย

แบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญ ในการถนอมอาหาร และผลิตอาหารที่ดีต่อสุขภาพอนามัย ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารหมักดองของพืช เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง และประเภทสัตว์ เช่น ปลา กุ้ง เนื้อ การหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย ในการเตรียมอาหารเหล่านี้เพื่อบริโภคอาจผ่านความร้อนเล็กน้อยหรือไม่ก็ได้ถือเป็นการประหยัดพลังงาน และมีข้อดี สามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือสร้างสารพิษได้ การสร้างกรดยังทำให้อาหารรสชาติที่จำเพาะและเพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้องจึงเป็นอาหารของประชากรโลกที่พบในทุก ๆ ทวีป

แบคทีเรียแลกติก เป็นแบคทีเรียชนิดที่เติบโตในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารมาก แต่ก็สามารถเติบโตได้ในแหล่งอาหารทั่ว ๆไป และจะทำให้ pH ของอาหารต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ พบว่า Leuconostoc และ Streptococcus ที่สร้างกรดแลกติกจะทำให้ pH ต่ำสุดที่ 4-4.5 ส่วน Lactobacillus และ Pediococcus บางสายพันธุ์ จะทำให้ pH ต่ำประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเองได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากกะหล่ำปลี และผักกาดดอง แล้วคัดเลือกเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ตามลักษณะการหมักแบบ Homo- และ Hetero-fermentative การทนเกลือ อัตราการสร้างกรดและใช้เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อตั้งต้นในการดองผักต่าง ๆ พบว่า น้ำดองผักมีความเป็นกรดสูงร้อยละ 0.6-0.7 เมื่อดองผักได้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และเมื่อดองผักด้วยแบคทีเรียแลกติกดังกล่าว โดยใส่เกลือร้อยละ 4 , $CaCl_2$ ร้อยละ0.1 และกรดซอร์บิก ร้อยละ 0.1 พบว่าหลังดองผักไว้ 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 28- 30 องศาเซลเซียส ผักที่ดองก็ไม่มีการเน่าเสีย ยังคงสีสดเหมือนธรรมชาติและมีรสชาติเป็นที่ถูกปากอีกด้วย

2.2.6 แบคทีเรียแลกติกสามารถแบ่งตามการใช้อาหารและการสร้างอาหารได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่

2.2.6.1 โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย

เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณ ร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยไม่ต้องการไธมีนในการเจริญเติบโต เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์อัลโดเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ได้แก่ *Lactobacillus sake*, *L. acidilactici*, *L. casei* เป็นต้น

2.2.6.2 เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ

เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ต้องการใช้ไธมีนในการเจริญเติบโต เจริญและสร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโดเลส ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* เป็นต้น (Axelsson, 1993; Kandler และ Weiss, 1989)

2.2.7 การผลิตกรดแลกติกสามารถแบ่งออกเป็น 4 สกุล

2.2.7.1 สกุล Streptococcus จัดอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) รูปร่างกลมจับกันเป็นคู่หรือต่อเป็นโซ่

2.2.7.2 สกุล Leuconostoc จัดอยู่ในกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (hetrofermentative) รูปร่างกลมจับกันเป็นคู่หรือต่อเป็นโซ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7.3 สกุล Pediococcus จัดอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) มีรูปร่างเป็นเม็ดกลม เซลล์จับอยู่เป็นคู่มี 2 ระนาบ

2.2.7.4 สกุล Lactobacillus จัดอยู่ในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) หรือเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (hetrofermentative)

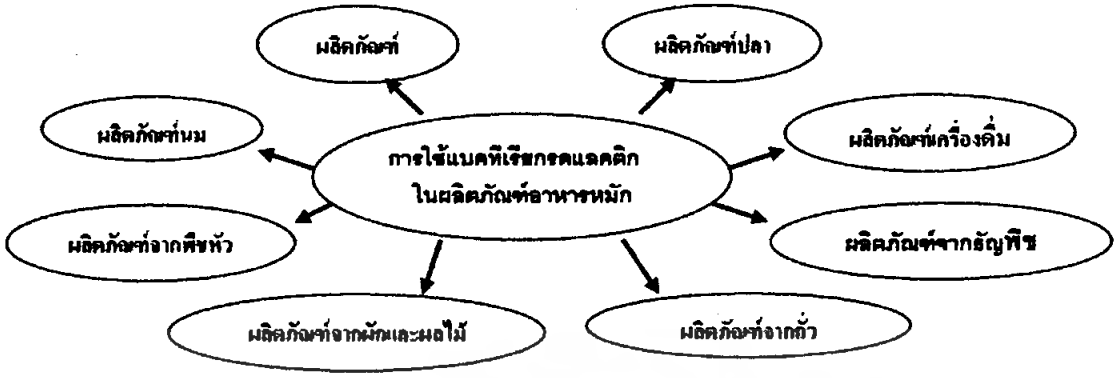
2.2.7.5 สกุล Streptococcus ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักคือ กลุ่มที่สร้างกรดแลกติกเท่านั้นซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนเป็นสกุล Lactococcus โดยยังคงชนิดและสับสปีชีส์ไว้ตามเดิม

ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกใหม่โดยแยก Enterococcus, Lactobacillus ออกจาก Streptococcus และ Tetragenococcus ออกจาก Pediococcus ดังนั้น ทำให้ขณะนี้แบคทีเรียแลกติกรวม 7 สกุล คือ Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus และ Tetragenococcus และในบางครั้งจะมีการรวม Bifidobacterium และ Propionibacterium (Axelsson, 1993; Kandler และ Weiss, 1989)

2.2.8 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม (dairy products) เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ตผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง เช่น กิมจิ ผักกาดดอง ใช้ในผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม ปลาจ่อม ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนั้นในการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดยังมีการใช้แบคทีเรียแลกติก เช่น การทำหญ้าหมัก ซึ่งเชื่อว่าได้หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี มีคุณค่าทางอาหารสูง เหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ตัวอย่างของการใช้แบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักดองบางชนิดมีรายละเอียดพอสังเขป ดังแสดงในภาพที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลกติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ
ที่มา : ขวัญเมือง (2004)

2.2.8.1 ผลิตภัณฑ์ทำนม (Dairy products)

ผลิตภัณฑ์นมมักเตรียมได้จากนมหลายชนิดอาจเป็นนมสด นมขาดมันเนย นมผงหรือนมข้นก็ได้ นำมาผ่านการโฮโมจีไนซ์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลง แล้วนำมาฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลซ์แล้วหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน ในการหมักนมเกิดได้ 2 แบบ คือ เป็นการหมักที่ให้กรดเพียงอย่างเดียวกับ kefir type เป็นการหมักที่ให้กรด ก๊าซและแอลกอฮอล์ให้เกิดขึ้นเล็กน้อย หลักการของแบคทีเรียแลกติกในการหมักก็คือ การสร้างกรดแลกติกในการหมักทำให้มีพีเอชลดลง และทำให้เกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็น curd คือทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น อย่างเช่นนมเปรี้ยว โยเกิร์ต เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivayius* subsp. *Thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* การผลิตโยเกิร์ตจะมีการหมักเกิดขึ้นภายในเวลา4 ชั่วโมง และจะเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.3-6.5 เป็น 5.5 ของการเจริญ streptococci จะลดลงและ lactobacilli จะเจริญขึ้นเมื่อสิ้นสุดการหมัก ความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์และจำนวนเชื้อของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองชนิดนี้มีประมาณ 0.90-0.95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการหมักที่ทำให้มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย คือ นมหมักที่เรียกว่า คีโตเฟอร์ ซึ่งเกิดจากการหมักนมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์ ในการหมักครั้งนี้จะประกอบด้วยแบคทีเรียแลกติกและยีสต์ที่ยึดเกาะกันเป็นสารที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว การอยู่ร่วมกันของกล้าเชื้อคีเฟอร์เป็นแบบ symbiotic ถ้าหากเชื้อคีเฟอร์อยู่ในน้ำนมสามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ การหมักคีเฟอร์ที่เกิดจากยีสต์และแบคทีเรียแลกติกจะทำหน้าที่ในการหมักนมให้เป็นสารประกอบหลายอย่าง ได้แก่ กรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลเล็กน้อย และนอกจากนี้ยังจะได้สารที่มีกลิ่นหอม กลิ่นรสของคีเฟอร์จากนมหลายชนิดจะมีกลิ่นที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของนมที่จะใช้ในการหมัก องค์ประกอบของไขมันในนม องค์ประกอบของกล้าเชื้อในดีเฟอร์ ตลอดจนการใช้เทคโนโลยีในการผลิตในแต่ละครั้ง ซึ่งจะเกิดประโยชน์ที่ได้จากการหมักนมที่เป็นเครื่องดื่มต่อสุขภาพและยังรักษาความผิดปกติของเมแทบอลิซึม และรักษาโรคภูมิแพ้ และยังมีประโยชน์ในการลดการเจริญเติบโตของมะเร็ง ใช้เป็นอาหารของทารกได้และยังมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกาย (Guzel-seydim และคณะ, 2001; Beshkova และคณะ, 2002)

2.2.8.2 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว (Fermented vegetable products)

การทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้ให้บริโภคได้นาน โดยการนำมาแปรรูปและยังร่วมไปถึงการนำผลไม้มาดองด้วย ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก ผักที่นิยมมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ เป็นต้น ส่วนผลไม้ที่นิยมใช้ในการดองได้แก่ มะขาม มะม่วง เป็นต้น ปัจจุบันการดองเป็นอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1995)

2.2.8.3 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Meat products)

เป็นการหมักเนื้อที่ใช้แบคทีเรียแลกติก เช่น แหนม ไส้กรอก ซึ่งแหนมเป็นการหมักที่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์อื่น เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการทำสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตจากเนื้อหมู หนังหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่นๆ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วใส่ถุงพลาสติก ในปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติกเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ในระหว่างการหมักมีกรดแลกติกเกิดขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง (Adam และ Moos, 1995)

นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนร่วมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากสารที่ผลิตของต้นกล้าเชื้อหรือแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่นในกลุ่มแบคเทอริโอซินโดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อนี้จะทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น

แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. เป็นเชื้อที่ใช้ในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นอกจากนี้บางผลิตภัณฑ์ยังใช้ Micrococcus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเทรต ซึ่งมีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนอย่างขึ้น (Swetwiwathana และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8.4 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Fermented fish products)

การหมักปลาเป็นการหมักที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ปลาร้า ปลาส้ม หลักในการหมักจะประกอบด้วย ปลา เกลือ เช่นในการผลิตน้ำปลาจะประกอบด้วยปลาและเกลือเท่ากับ 3:1 ผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุใส่ในไอ่งแล้วปล่อยให้เกิดการหมัก18 เดือน ในระหว่างที่ทีการหมักปลา ปลาจะมีการสลายตัวเอง โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลาได้ผลผลิตเป็นของเหลวสีน้ำตาลออกมา ซึ่งของเหลวที่ออกมานี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน โปรตีนและนิวคลีโอไทด์ ที่จะทำให้น้ำปลามีคุณค่าและคุณภาพทางโภชนาการมากขึ้นและยังนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบและถนอมอาหารหลายประเภท แบคทีเรียที่พบในอาหารหมักของปลา *Lactobacillus farcimnis, L. pentosus, L. plantarum, Lactobacillus* sp. และ *Leuconostos* sp. จุลินทรีย์ที่ดีต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ทนต่อเกลือได้ดีและเจริญได้เล็กน้อยในระหว่างการหมัก จึงมีการช่วยเสริมรสชาติของการหมักได้เป็นอย่างดี (Tanasupawat และคณะ, 1998)

2.2.8.5 การหมักผลิตภัณฑ์จากธัญพืช (Cereal products)

เป็นการหมักที่นอกเหนือจากผักและผลไม้ แต่เป็นการหมักธัญพืชซึ่งเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้ศึกษาการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักธัญพืชมีหลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ได้แก่ ซีอิ้ว ซึ่งในการหมักส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักได้แก่ *Aspergillus Oryzae, P. halophillus* และ *L. delbrueckii* อาหารหมักชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องปรุงรสในกลุ่มของการ fermented bean เป็นอาหารการหมักของคนญี่ปุ่นที่ใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและใช้แป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Aspergillus, Streptococcus* และ *Pediococcus*

เต้าเจี้ยว เป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับการหมักที่ได้จากถั่ว ซึ่งเป็นอาหารประเภท semi-solid ที่นิยมบริโภค และเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเช่นเดียวกัน

2.2.9 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีต่ออาหารหมัก

2.2.9.1 เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ จากการศึกษาถึงข้อมูลในกลุ่มของธัญพืช พบว่าคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นมาจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตโดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนั้นคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืชและถั่วยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย (ตารางที่ 2.2) องค์ประกอบของวิตามินบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น ในเทมเป้จากข้าวสาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าปริมาณของไนอะซิน ไรโบฟลาวิน และไทอะมินก่อนการหมักเท่ากับ 46.0, 0.4 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม เพิ่มเป็น135, 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม ภายหลังการหมัก โดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณของวิตามินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามที่แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณโปรตีนในส่วนผสมของถั่วและธัญพืช

Protein source diet (%)		Protein efficient ratio
Cereal	Legume	
100 rice	0 black bean	2.38
0 rice	100 black bean	0.98
90 rice	10 black bean	2.60
100 corn	0 black bean	1.40
90 corn	10 black bean	1.78
100 sorghum	0 black bean	0.53
90 sorghum	10 black bean	1.22
100 wheat	0 black bean	1.28
0 wheat	100 black bean	2.17
50 wheat	50 black bean	2.40

ที่มา : Wang และ Hesseltine (1981)

2.2.9.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรดและการลดลงของค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียทั้งกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นและมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก โดยแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล สมบัติทางพันธุกรรมและสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1988; Hiller และ Davision, 1991; Stiles และ Hastings, 1991) ตัวอย่างสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก

Inhibitor substance	**Strain of lactic acid bacteria**
Hydrogen peroxide	*Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp.
Nisin and diplococcin	*Streptococcus* sp.
Lactocin and lactobacillin	*Lactobacillus plantarum*
Lactobrevin	*Lactobacillus brevis*
Bulgarican	*Lactobacillus bulgaricus*
Acidophilin, lactocidin	*Lactobacillus acidophilus*
Acidolin, lactolin	

ที่มา : De Vuyst และ Vandamme (1994)

2.2.9.3 แบคทีเรียแลกติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด มีรายงานโดย Adam และ Moss (1995) ว่า การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยยับยั้งการเกิดคอเลสเทอรอลได้ นอกจากนั้นยังมีผลในการลดน้ำหนักได้ประมาณ 2.3-2.7 กิโลกรัม ภายใน 3 สัปดาห์ ซึ่งจะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนั้นในโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ*Lactobacillus acidophilus* จะช่วยให้คอเลสเทอรอลในเลือดลดลงกว่าการบริโภคนมที่ไม่มีเชื้อดังกล่าว (Marvin, 1981) การบริโภคคีเฟอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งมีผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายประการ และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้นโดยเฉพาะการย่อยแลคโทส (Hertzler และ Clancy, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.9.4 กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง แบคทีเรียแลกติกโดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาถึงการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β-lucuronidase, azoreductase และเอนไซม์ introreductase เพิ่มสูงขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก และเอนไซม์เหล่านี้ยังความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเปลี่ยนแปลงของ procacinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ ผลของ *L. acidophillus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้บริโภคลดลง (Adam และ Moss, 1995; Marvin, 1981)

2.2.9.5 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยมีความไวต่อ microphage และ lymcocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* (Adam และ Moss, 1995)

การถนอมอาหารโดยใช้แบคทีเรียแลกติกได้เกิดขึ้นมาเป็นเวลานานพร้อมกับการพัฒนาของมนุษยชาติ แต่ระยะนั้นการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกยังไม่แพร่หลายมากนัก ปัจจุบันในโลกของจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารได้รับการสนใจและพัฒนามากขึ้น แบคทีเรียแลกติกได้ถูกนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในแถบยุโรป ส่วนในประเทศไทยมีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกในแหนมบางยี่ห้อ เช่น แหนมไบโอเทค และแหนมป้าย่น นอกจากนั้นยังมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดที่มีการหมักแบบธรรมชาติ (natural fermentation) และเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติกทั้งสิ้น เช่น การทำผักดองเปรี้ยว ปลาร้า ปลาส้ม และส้มฟัก หอยดอง หน่อไม้ดอง ส่วนการผลิตซีอิ้วซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วหมักอีกชนิดหนึ่งก็ยังเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลกติก แต่เป็นแบคทีเรียแลกติกที่เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง (มากกว่า 18 %)

แบคทีเรียแลกติกที่เกิดขึ้นในอาหารหมักมีประโยชน์หลายประการ เช่น กระบวนการสร้างกรดที่เกิดขึ้นมีผลทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลง และมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคหลายชนิด นอกจากกรดแลกติกแล้วยังมีสารประกอบอีกหลายชนิดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล (มีผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์) และสารที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งคือแบคเทอริโอซิน คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ จัดเป็นโพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ช่วยย่อยกากอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บางส่วนที่ระบบของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ให้เป็นสารที่ร่างกายดูดซึมเอาไปใช้ประโยชน์ได้ และยังมีผลต่อการลดระดับคอเลสเทอรอล และสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ดังนั้นผู้ที่บริโภคอาหารที่มีโพรไบโอติกเป็นประจำจึงมีสุขภาพแข็งแรง

2.2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

2.2.10.1 สับสเตรท

สับเตรทที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาล และน้ำทิ้งจากผลิตภัณฑ์นม (whey) เป็นต้น สำหรับสับสเตรทพวกแป้งนั้นจะต้องผ่านกระบวนการการย่อย ให้ได้น้ำตาลกลูโคสเสียก่อน โดยอาศัยกรดหรือเอนไซม์ ในการเลือกใช้สับสเตรทนั้นต้องมีปริมาณมากและหาง่าย รวมถึงกระบวนการที่ต้องใช้ในการหมักเพื่อปรับสภาพสับสเตรทและค่าใช้จ่าย

2.2.10.2 อุณหภูมิ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ ก็ตามเพื่อให้ได้ปริมาณมากๆ จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื้อนั้น สำหรับการผลิตแบคทีเรียแลกติก อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างไปในแต่ละสกุล ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละสกุล

สกุล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Lactobacillus spp.	-
Thermobacterium	37-45
Atreptobacterium	28-32
Betabacterium	28-40
Pediococcus spp.	25-33
Streptococcus spp.	30-37
Leuconostoc spp.	20-25

ที่มา : ภูริวัฒน์, 2539

85384

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.10.3 ระดับ pH

ถึงแม้แบคทีเรียแลกติกจะเจริญได้ที่ระดับ pH ในช่วงกว้าง 4-7.5 แต่ค่า pH ที่เหมาะสมโดยทั่ว ๆ ไปอยู่ในช่วงประมาณ 6-6.5 และเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเมทาบอไลท์ น้ำตาลเป็นกรดแลกติก ทำให้ pH ของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงทำให้จะต้องคอยปรับค่า pH ให้สูงขึ้น การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดนั้น นอกจากการเจริญจะช้าลงแล้วยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในขณะเก็บ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดมาก ๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินการหมักได้ทันที

การปรับค่า pH ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องทราบชนิดของด่างให้เหมาะสมซึ่งมีรายงานว่าการเลี้ยง *Streptococcus* spp. นั้นการปรับค่า pH ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์แต่กล้าเชื้อที่ผลิตได้จะดำเนินกิจกรรมการหมักได้ช้ากว่ากล้าเชื้อที่ผลิตโดยการปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากเชื้อมีประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีเอสต่ำลง แต่ข้อเสียนี้จะไม่มีผลกระทบต่อกล้าเชื้อชนิดที่ต้องนำไปเพิ่มจำนวนก่อนใช้งาน เนื่องจากในระหว่างการเตรียม bulk starter เชื้อจะปรับตัวสร้างโปรตีเอสได้ตามเดิม อย่างไรก็ตามการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ปรับค่า pH จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดอยู่ในขณะแช่แข็ง นานกว่ากล้าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในการปรับค่า pH ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สำหรับการเลี้ยง *Lactobacillus acidophilus* นั้น เมื่อพบว่าปรับค่า pH ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต เชื้อจะเจริญได้ดีกว่า เนื่องจากมีการปลดปล่อยคาร์บอไดออกไซด์อย่างช้าๆ ซึ่งก๊าซนี้จะทำให้เกิดบรรยากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

2.2.10.4 ออกซิเจน

แบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เรียกว่า ไมโครแอโรไฟล์ (microaerophile) ซึ่งเมตาบอไลท์สารอาหารด้วยกระบวนการหมักในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงไม่ต้องพ่นอากาศ แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะการเลี้ยงเชื้อ จึงจำเป็นต้องมีการรบกวนซึ่งมีผลทำให้อากาศลงไปในอาหารได้ และทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสภาวะเช่นนี้เชื้อจะเจริญช้าลง ซึ่งการแก้ไขปัญหาอาจทำให้เกิดการเติมเอนไซม์คะตะเลส หรือสารรีดิวซ์ตัวอื่น ๆ เช่นพวกไพรูเวทหรือเฟอรัสซัลเฟต นอกจากการเติมสารดังกล่าวแล้ว การพ่นก๊าซคาร์บอไดออกไซด์ลงในถังเลี้ยงเชื้อ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ขจัดปัญหาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์

- หม้อสแตนเลส
- ถุงร้อน
- หนังยาง
- ช้อนตักสาร
- ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดน้ำกลั่น
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- Eppendrof
- Tip เหลือง
- Tip ฟ้า
- Foggy
- ไฟแช็ค
- Auto pipette
- Stand
- กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 เครื่องแก้ว

- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16×150 พร้อมฝา
- Flask ขนาด 125 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ (plate)
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- แผ่น Slide
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
- บิวเรต

3.2.3 เครื่องมือ

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance)
- Autoclave
- Water Bath
- pH – meter
- Stomacher
- Candle jar
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- เตาแก๊ส
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
- ตู้แช่เย็น
- ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. MRS Broth
2. Agar
3. $CaCo_3$
4. NaCl
5. NaOH
6. Ethanol 95%
7. Ethanol 70%
8. Phenolphthalein
9. สี crystal violet
10. สี safranin
11. สารละลายไอโอดีน

3.4. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

ตัวอย่างไส้กรอกอีสานจาก **บริษัทสุทธิลักษณ์อินโนฟู้ดจำกัด** 325/5 ถนนพหลโยธิน แขวงสายไหม เขตสายไหม กรุงเทพฯ 10220 โทร : (02) 9935978-80 แฟกซ์ : (02) 5236418 โดยทำการสุ่มนำไส้กรอกอีสานที่ผลิตจากโรงงานซึ่งบรรจุไส้เสร็จใหม่มาประมาณ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก แล้วบรรจุลงในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง นำมายังห้องปฏิบัติการของคณะอุตสาหกรรมเกษตร จากนั้นทำการหมักเป็นเวลา 2 วัน โดยทำการตรวจ ดังต่อไปนี้

<u>การเตรียมตัวอย่างไส้กรอกเพื่อนำมาเจือจางเริ่มต้น</u>

1. ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์แล้วลนไฟฆ่าเชื้อคีบตัวอย่างแล้วใช้กรรไกรที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยสุ่มตัดตัวอย่างที่ตำแหน่งต่าง ๆ ให้ทั่งถึง
2. ชั่งตัวอย่างอาหารใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ 25 กรัม
3. ใส่น้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่อง stomacher นาน 30 วินาทีจะได้ตัวอย่างที่มีระดับการเจือจางเป็น 1:10 หรือ 10^{-1}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 1 หาปริมาณของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่แตกต่างกัน

1.1 ทำตามวิธีเตรียมตัวอย่างไส้กรอกเพื่อนำมาเจือจางเริ่มต้นแล้วทำการเจือจางเป็นลำดับ โดยเจือจางตัวอย่างไส้กรอก **วันที่ 0** ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3}, **วันที่ 1 และ 2** ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6}

1.2 ใช้ Auto pipette ดูดไส้กรอกที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS agar ที่มี 0.5% calcium carbonate จานละ 100 µl โดย**วันที่ 0** ระดับความเจือจางละ 2 จาน **วันที่ 1 และ 2** ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ระดับความเจือจางละ 1 จาน และ ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ระดับความเจือจางละ 2 จาน

1.3 ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล เกลี่ยตัวอย่างไส้กรอกที่เจือจางแล้วบนผิวหน้าอาหารให้กระจายทั่ว

1.4 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และนำไปคัดเลือกเชื้อในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากและน้อย

2.1 เมื่อทำการตรวจนับในขั้นตอนแรกเรียบร้อยแล้ว จะทำการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตปริมาณกรดแลกติกได้มากและน้อย ซึ่งจะกำหนดให้โคโลนีที่มีรัศมีของโซนใสรอบโคโลนี 0.1 – 0.2 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดน้อย และรัศมีของโซนใสมากกว่า 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมาก

2.2 สุ่มโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกน้อยและมาก อย่างละ 5 โคโลนีของแต่วัน มาทำการ deep tube ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS Agar ที่มี 1% calcium carbonate หลอดละ 1 โคโลนี

2.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การย้อมสีแบบแกรมเพื่อตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียแลกติกจากขั้นตอนที่ 2 มาทำการย้อมสีแบบแกรม ตามวิธีดังต่อไปนี้

3.1 หยดน้ำกลั่นบนแผ่น slide 1 หยด ในปริมาณพอสมควร

3.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อเพียงเล็กน้อย แตะลงบนหยดน้ำแล้วแผ่กระจายเชื้อให้ทั่วในหยดน้ำ(smear)

3.3 ทิ้งให้รอยสเมียร์แห้งเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ทำการฟิกซ์ (fix) รอยสเมียร์ โดยการลนผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ 2-3 ครั้ง

3.5 หยดสี crystal violet ลงบนรอยสเมียร์ให้ท่วม ทิ้งไว้นาน 1-2 นาที

3.6 ล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลเบา ๆ

3.7 เติมสารละลายไอโอดีนของแกรมให้ท่วมรอยสเมียร์

3.8 ล้างสารละลายไอโอดีนออกด้วยแอลกอฮอล์ 15-20 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ไหลเบา ๆ ทันที

3.9 ย้อมทับด้วยสี safranin นาน 1 นาที

3.10 ล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลเบา ๆ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

3.11 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

4.1 จากการย้อมสีแบบแกรม ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างเป็นแบบ cocci และแบบ rod ทั้งของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมากและน้อย ของแต่ละวัน มาอย่างละ 1 หลอด

4.2 ถ่ายเชื้อในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่คัดเลือกใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS borth 5 มิลลิลิตร เชื้อละ 1 หลอด โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ

4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

4.4 ใช้ Auto pipette ดูดเชื้อในหลอดทดลองปริมาณ 100 µl ถ่ายลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 50 มิลลิลิตร เชื้อละ 1 ขวดอีกครั้ง

4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกรด และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ ฮีมาไซโตมิเตอร์ ในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

ขั้นตอนที่ 5 การหาสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกเบื้องต้นโดยใช้ API 50 CH (bioMérieux® SA ประเทศฝรั่งเศส)

5.1 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างแบบ cocci และ rod จากขั้นตอนที่ 4 ที่สร้างกรดกรดน้อยที่สุด มาอย่างละหนึ่งหลอด

5.2 ทดสอบหาชนิดของสายพันธุ์ ด้วยวิธี Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH)

5.3 ดูการ Fermentation carbohydrate แล้วตรวจ Database เพื่อหาสายพันธุ์ของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การหาปริมาณของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่แตกต่างกัน

ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ซึ่งกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียแลกติกที่มีอยู่ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนมาจากเนื้อสัตว์และเครื่องปรุงต่างๆ ปัจจุบันแบคทีเรียแลกติกถูกนำมาใช้ในอาหารหมักอย่างกว้างขวาง โดยกิจกรรมหลักของแบคทีเรียแลกติกต่อผลิตภัณฑ์อาหาร คือ เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสมของอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ กรดแลกติก กรดแอซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเฉพาะ

การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาปริมาณของแบคทีเรียแลกติก ในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 ตามลำดับ ทำการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกเพื่อนำมาเจือจางเริ่มต้นแล้วทำการเจือจางต่อ โดยเจือจางตัวอย่างไส้กรอก **ชั่วโมงที่ 0** ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3}, **ชั่วโมงที่ 24 และ 48** ที่ระดับการเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ใช้ Auto pipette ดูดไส้กรอกที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มี MRS agar ที่มี 0.5% calcium carbonate จานละ 100 µl นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

จากการทดลองหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกในไส้กรอกอีสาน พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเห็นได้อย่างชัดเจน ในระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกของไส้กรอกอีสานในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

เวลา	จำนวนโคโลนีที่นับได้ ระดับความเจือจาง						ผลการตรวจนับ (cfu/g)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
วันที่ 0 (ชั่วโมงที่ 0)	> 300	265	47.5	-	-	-	3.7×10^{4}
วันที่ 1 (ชั่วโมงที่ 24)	> 300	> 300	> 300	216	90	18	2.2×10^{6}
วันที่ 2 (ชั่วโมงที่ 48)	> 300	> 300	> 300	296	132.5	23	3.0×10^{6}

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลองที่ระดับความเจือจางนั้น

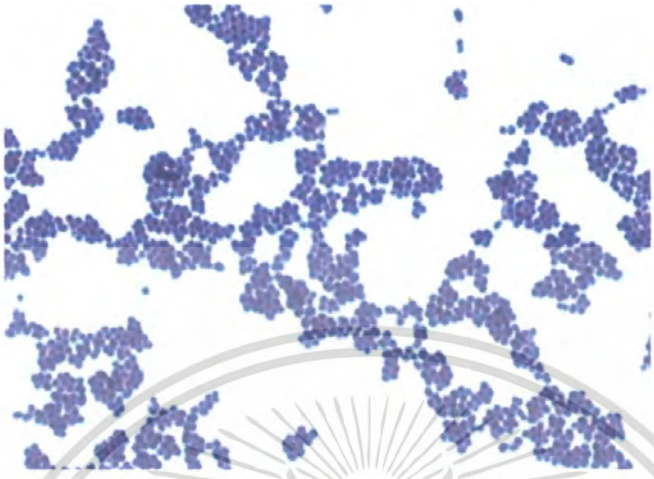
ขั้นตอนที่ 2 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกปริมาณมากและน้อย

ทำการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกรดแลกติกมากและน้อย โดยกำหนดให้โคโลนีที่มีรัศมีของโซนใสรอบโคโลนี 0.1 – 0.2 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดน้อย และรัศมีของโซนใสมากกว่า 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมาก คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกน้อยและมาก มาอย่างละ 5 โคโลนี นำมาเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS Agar ที่มี 1% calcium carbonate หลอดละ 1 โคโลนีบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 การย้อมสีแบบแกรมเพื่อตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะ และสีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

นำแบคทีเรียแลกติกจากขั้นตอนที่ 2 มาย้อมสีแบบแกรม เพื่อทำการตรวจสอบรูปร่าง ลักษณะและการติดสีของโคโลนี พบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่าง 2 แบบ คือ ดอคไค (cocci) และแบบแท่ง (rod) ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกแบบคอคไค (cocci)

ภาพที่ 4.2 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกแบบแท่ง (rod)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาการผลิตกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

จากการย้อมสีแบบแกรม ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีรูปร่างเป็นแบบคอคไค (cocci) และแบบแท่ง (rod) ทั้งของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมากและน้อยมาอย่างละ 1 หลอดจากนั้นทำการถ่ายเชื้อที่คัดเลือกใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS borth 5 มิลลิลิตร เชื้อละ 1 หลอด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Auto pipette ดูดเชื้อในหลอดทดลองปริมาณ 100 µl ถ่ายลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 50 มิลลิลิตร เชื้อละ 1 ขวดอีกครั้งและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง, ปริมาณกรด และปริมาณแบคทีเรียแลกติก ในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

จากการทดลองพบว่าปริมาณของแบคทีเรียแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 16 หลังจากนั้น พบว่าปริมาณของแบคทีเรียแลกติกมีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth มีปริมาณลดลง รวมทั้งแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตปริมาณกรดออกมามาก ส่งผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.5 และภาพที่ 4.3 และ 4.6 และเมื่อทำการหาปริมาณกรดพบว่าปริมาณกรดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.6 และภาพที่ 4.4 และ 4.7 จากปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.7 และภาพที่ 4.5 และ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งที่ 1

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	ปริมาณแบคทีเรียแลกติก (เซลล์/มิลลิลิตร)			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	0.44×10^{6}	1.00×10^{10}	2.80×10^{10}	0.88×10^{10}
2	0.66×10^{6}	1.00×10^{10}	3.55×10^{10}	1.11×10^{10}
3	0.44×10^{6}	1.07×10^{10}	1.14×10^{10}	1.02×10^{10}
4	0.22×10^{6}	0.59×10^{10}	1.15×10^{10}	0.93×10^{10}
5	0.22×10^{6}	0.22×10^{10}	1.37×10^{10}	0.80×10^{10}
6	0.22×10^{6}	0.48×10^{10}	0.93×10^{10}	0.62×10^{10}
7	0.44×10^{6}	0.66×10^{10}	2.53×10^{10}	2.67×10^{10}
8	0.22×10^{6}	1.19×10^{10}	1.07×10^{10}	0.67×10^{10}
9	0.66×10^{6}	0.92×10^{10}	1.64×10^{10}	1.24×10^{10}
10	0.22×10^{6}	0.72×10^{10}	0.75×10^{10}	0.67×10^{10}
11	0.44×10^{6}	0.47×10^{10}	1.37×10^{10}	0.80×10^{10}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	% acid (v/v)			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	0.15	0.90	1.20	1.50
2	0.15	1.20	1.20	1.50
3	0.15	0.90	1.20	1.20
4	0.15	0.60	0.60	0.90
5	0.15	0.90	1.20	1.20
6	0.15	0.60	0.90	1.20
7	0.30	0.60	1.20	1.50
8	0.30	0.90	0.90	1.20
9	0.15	0.60	1.20	1.20
10	0.15	0.60	0.90	0.90
11	0.15	0.60	0.60	0.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าความเป็นกรด – ด่างของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	pH			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	6.49	4.52	4.28	4.14
2	6.54	4.48	4.26	4.19
3	6.35	4.64	4.21	4.13
4	6.44	4.53	4.45	4.66
5	6.55	4.49	4.38	4.25
6	6.55	4.41	4.32	4.25
7	6.54	5.33	4.54	4.15
8	6.51	4.49	4.34	4.15
9	6.38	5.06	4.77	4.38
10	6.56	4.31	4.53	4.75
11	6.60	5.26	5.04	4.83

****หมายเหตุ****

หลอดที่ 1 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.3 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 2 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.4 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 3 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.2 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 4 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.05 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 5 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.3 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 6 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.3 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 7 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.4 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

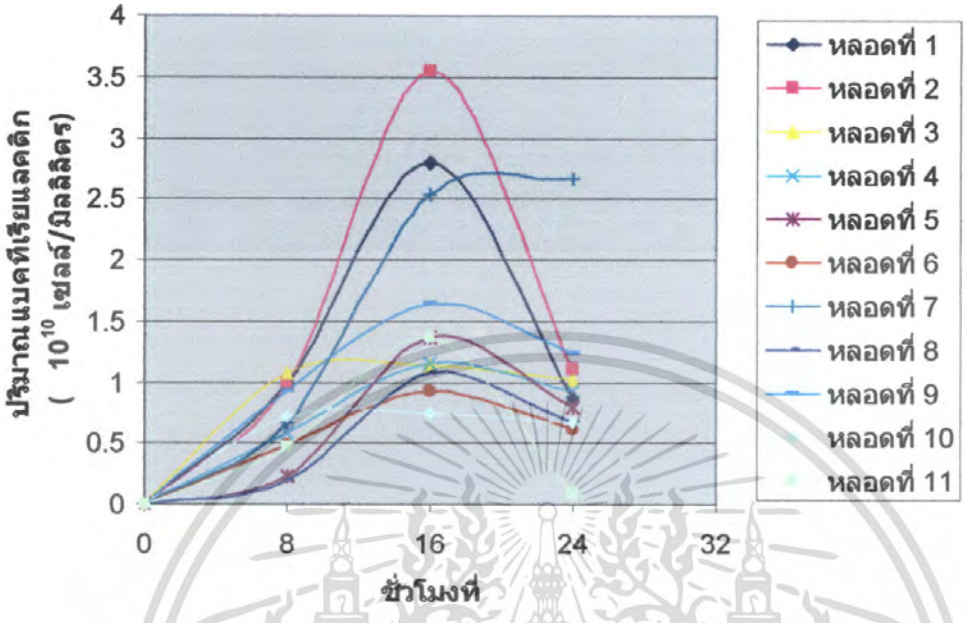
หลอดที่ 8 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.3 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 9 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

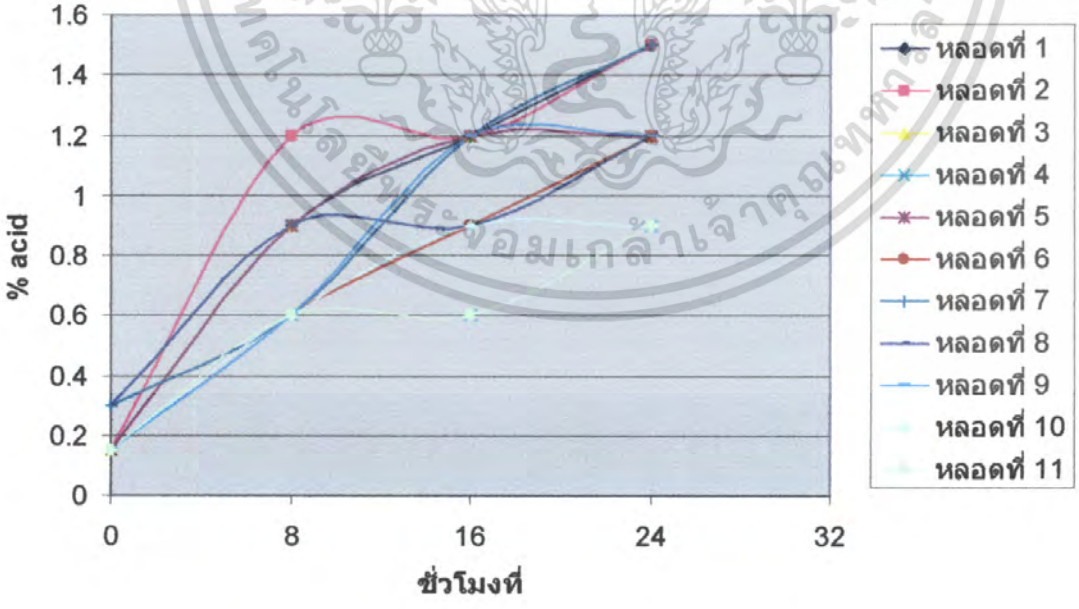
หลอดที่ 10 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.05 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 11 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.05 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

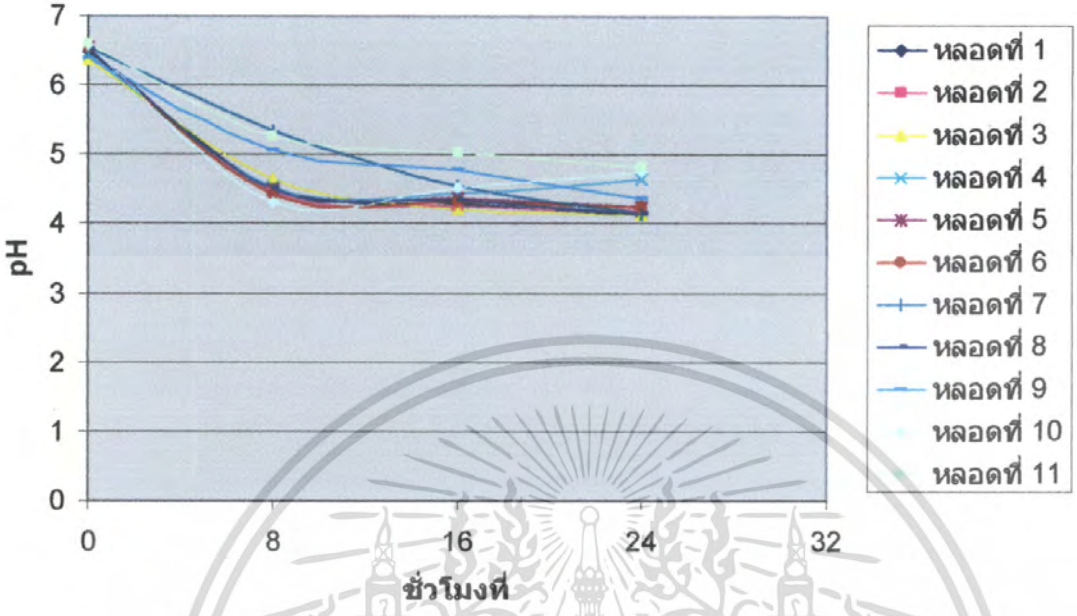


ภาพที่ 4.3 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24



ภาพที่ 4.4 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ค่าความเป็นกรด – ด่างของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งที่ 2

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก (เซลล์/มิลลิลิตร)			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	0.44×10^{6}	0.13×10^{10}	0.49×10^{10}	2.62×10^{10}
2	0.22×10^{6}	0.28×10^{10}	0.25×10^{10}	0.97×10^{10}
3	0.88×10^{6}	0.57×10^{10}	1.95×10^{10}	2.48×10^{10}
4	0.44×10^{6}	0.01×10^{10}	0.10×10^{10}	0.48×10^{10}
5	0.66×10^{6}	0.19×10^{10}	0.25×10^{10}	1.51×10^{10}
6	0.44×10^{6}	0.16×10^{10}	0.20×10^{10}	0.97×10^{10}
7	0.22×10^{6}	0.54×10^{10}	1.37×10^{10}	2.31×10^{10}
8	0.22×10^{6}	0.74×10^{10}	1.42×10^{10}	0.44×10^{10}
9	0.66×10^{6}	0.43×10^{10}	3.20×10^{10}	1.20×10^{10}
10	0.22×10^{6}	0.07×10^{10}	0.08×10^{10}	0.62×10^{10}
11	0.44×10^{6}	0.14×10^{10}	0.26×10^{10}	0.44×10^{10}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	% acid (v/v)			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	0.30	0.60	0.90	0.90
2	0.30	0.60	0.90	0.90
3	0.30	0.90	1.20	1.80
4	0.30	0.30	0.60	1.50
5	0.30	0.60	0.90	1.20
6	0.60	0.60	0.60	0.90
7	0.30	0.90	1.20	1.20
8	0.15	0.60	0.90	0.90
9	0.30	0.60	1.20	1.50
10	0.15	0.90	1.20	1.50
11	0.30	0.60	0.90	1.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นกรด - ด่างของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

หลอดที่	pH			
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 8	ชั่วโมงที่ 16	ชั่วโมงที่ 24
1	6.19	4.93	4.55	4.42
2	6.19	5.21	4.82	4.64
3	6.19	4.43	4.39	4.14
4	6.16	6.06	4.98	4.28
5	6.16	4.70	4.48	4.20
6	6.13	5.10	4.94	4.83
7	6.19	5.04	4.39	4.25
8	6.27	4.90	4.66	4.51
9	6.17	4.87	4.25	4.19
10	6.23	4.79	4.34	4.19
11	6.18	4.44	4.42	4.31

****หมายเหตุ****

หลอดที่ 1 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 2 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 3 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.6 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 4 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.4 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 5 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.05 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 6 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

หลอดที่ 7 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบกลม

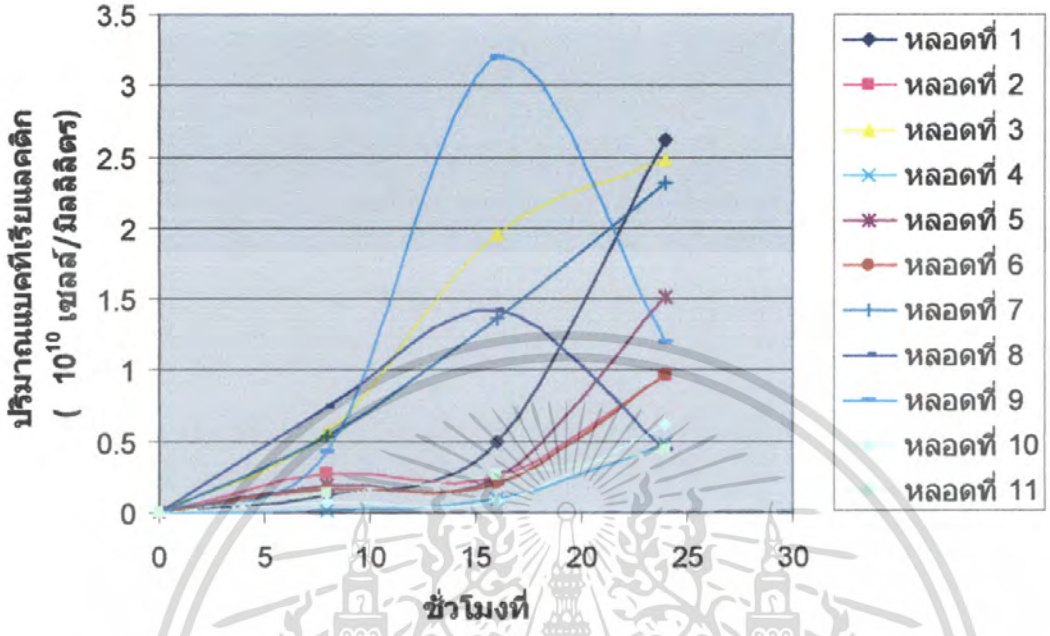
หลอดที่ 8 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.05 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 9 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.4 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

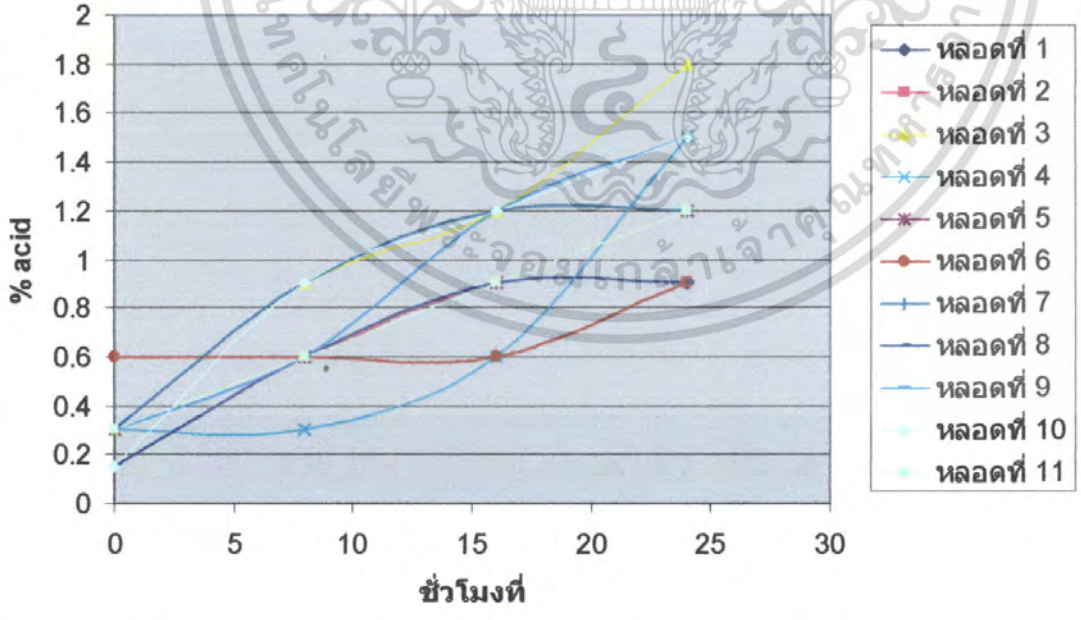
หลอดที่ 10 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.4 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

หลอดที่ 11 รัศมีของส่วนใสรอบ ๆ โคโลนี 0.1 cm มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

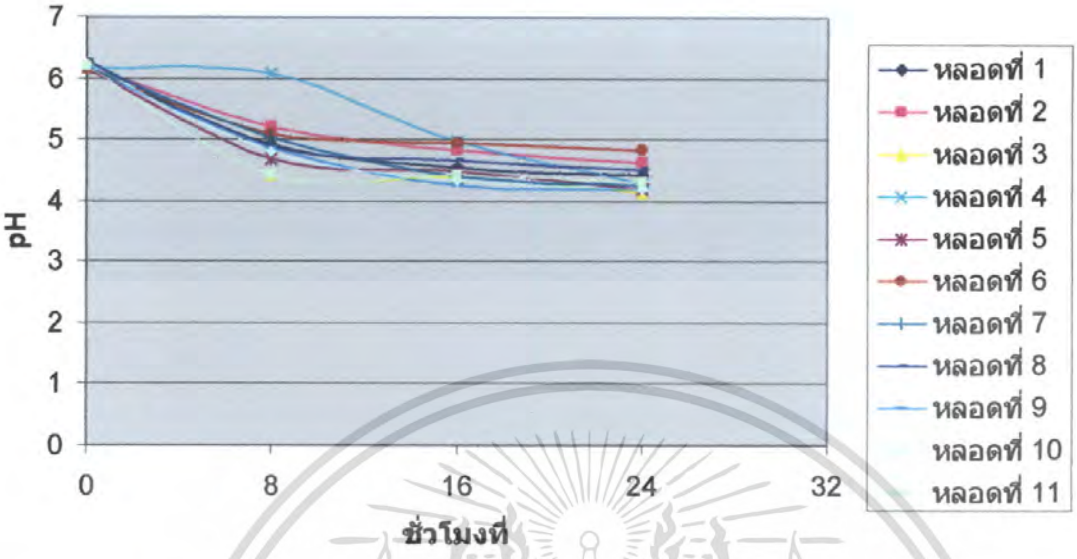


ภาพที่ 4.6 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ค่าความเป็นกรด - ด่างของแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24

ขั้นตอนที่ 5 การหาสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกเบื้องต้นโดยใช้ API 50 CH (bioMérieux® SA ประเทศฝรั่งเศส)

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากขั้นตอนที่ 4 ที่มีปริมาณกรดน้อยที่สุดโดยที่ทำการเลือกรูปร่างแบบคอคไค (cocci) และแบบแท่ง (rod) มาอย่างละหลอดทดสอบหาชนิดของสายพันธุ์โดยใช้ Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH)

จากการทำการทดสอบด้วย Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH) ผลตรวจการเปลี่ยนแปลงของสีออกมาดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 และ ภาพที่ 4.9 และ 4.10 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่ตรวจพบเป็นแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactococcus lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

API 50 CH Medium

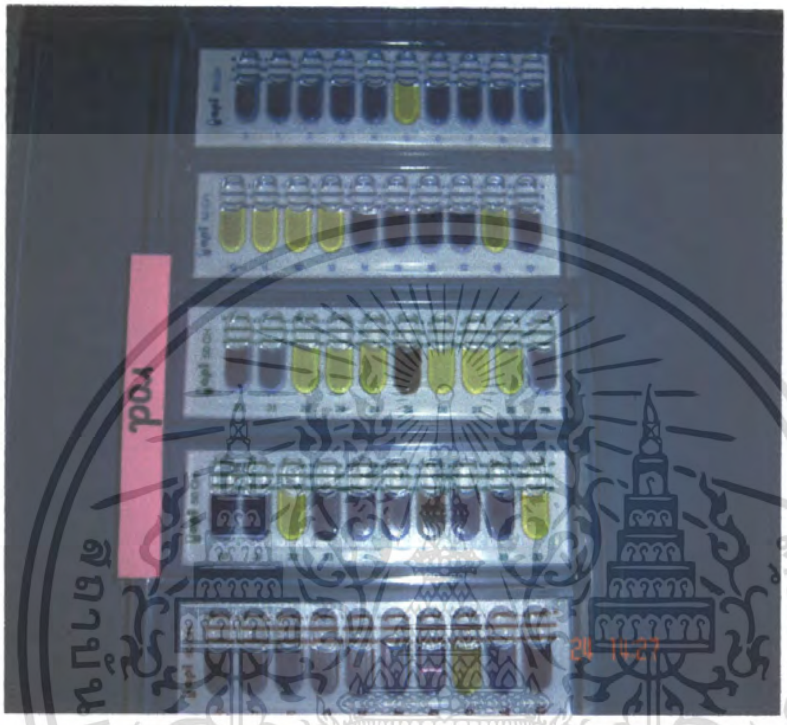
ตารางที่ 4.8 ผลการตรวจ API 50 CH Medium หลอดหมายเลข 1 (ครั้งที่ 2)

	0 CTRL	1 GLY	2 ERY	3 DARA	4 LARA	5 RIB	6 DXYL	7 LXYL	8 ADO	9 MDX
24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	10 GAL	11 GLU	12 FRU	13 MNE	14 SBE	15 RHA	16 DUL	17 INO	18 MAN	19 SOR
24	+/-	+	+	+	-	-	-	-	+/-	-
48	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	20 MDM	21 MDG	22 NAG	23 AMY	24 ARB	25 ESC	26 SAL	27 CEL	28 MAL	29 LAC
24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	30 MEL	31 SAC	32 TRE	33 INU	34 MLZ	35 RAF	36 AMD	37 GLYG	38 XLT	39 GEN
24	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	+
48	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	+
	40 TUR	41 LYX	42 TAG	43 DFUC	44 LFUC	45 DARL	46 LARL	47 GNT	48 2KG	49 5KG
24	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-

****หมายเหตุ****

+	หมายถึง	มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
+/-	หมายถึง	มีการเปลี่ยนเป็นสีเขียว
-	หมายถึง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจด้วยวิธี Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH) ของหลอดที่ 1 (ครั้งที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

API 50 CH Medium

ตารางที่ 4.9 ผลการตรวจ API 50 CH Medium หลอดหมายเลข 6 (ครั้งที่ 2)

	0 CTRL	1 GLY	2 ERY	3 DARA	4 LARA	5 RIB	6 DXYL	7 LXYL	8 ADO	9 MDX
24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	10 GAL	11 GLU	12 FRU	13 MNE	14 SBE	15 RHA	16 DUL	17 INO	18 MAN	19 SOR
24	+/-	+	+	+	-	-	-	-	+/-	-
48	+/-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	20 MDM	21 MDG	22 NAG	23 AMY	24 ARB	25 ESC	26 SAL	27 CEL	28 MAL	29 LAC
24	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-
48	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-
	30 MEL	31 SAC	32 TRE	33 INU	34 MLZ	35 RAF	36 AMD	37 GLYG	38 XLT	39 GEN
24	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+
48	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+
	40 TUR	41 LYX	42 TAG	43 DFUC	44 LFUC	45 DARL	46 LARL	47 GNT	48 2KG	49 5KG
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-

****หมายเหตุ****

+	หมายถึง	มีการเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
+/-	หมายถึง	มีการเปลี่ยนเป็นสีเขียว
-	หมายถึง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจด้วยวิธี Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH) ของหลอดที่ 6 (ครั้งที่ 2)

****หมายเหตุ****

0 ConTRoL	10 GALactose	20 α-Methyl-D Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcerol	11 GLUcose	21 α-Methyl-D Glucoside	31 Sucrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N Acetyl Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MaNnosE	23 AMYgdalin	33 INUlin	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SorBosE	24 ARButin	34 MeLeZitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCulin	35 RAFfinose	45 D ARabitoL
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicin	36 Starch	46 L ARabitoL
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLycoGen	47 GlucoNaTe
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XyLiTol	48 2 Keto Gluconate
9 β Methyl-D XYloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENtiobiose	49 5 Keto Gluconate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมากและน้อยจากไส้กรอกอีสาน โดยเริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS agar ที่มี 0.5% calcium carbonate ในชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 ตามลำดับ ทำการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกจากการวัดรัศมีของโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งมีเกณฑ์กำหนด คือ โคโลนีที่มีรัศมีของโซนใส 0.1-0.2 เซนติเมตร เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดน้อย และรัศมีของโซนใสตั้งแต่ 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดมาก นำมาเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS agar ที่มี 1% calcium carbonate บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาทำการย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบรูปร่างลักษณะ และการติดสีของโคโลนี ซึ่งจะพบ 2 รูปร่าง คือ แบบคอคไค (cocci) และแบบแท่ง (rod) จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ได้มาทำการศึกษาการผลิตกรด โดยทำการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกรด และปริมาณแบคทีเรียแลกติก ในชั่วโมงที่ 0, 8, 16 และ 24 ตามลำดับ พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 16 หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีแน้วโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth มีปริมาณลดลง รวมถึงแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตปริมาณกรดออกมามากจึงส่งผลในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกด้วย ส่วนปริมาณกรด พบว่าปริมาณกรดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากการที่ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ตวจวิเคราะห์มมีค่าลดลงตามมาด้วย

ขั้นสุดท้ายจะทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกอีกครั้ง โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีการสร้างกรดน้อยที่สุด นำมาตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี Carbohydrate Fermentation Kit Test (API 50 CH) พบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม *Lactococcus lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

การทำไส้กรอกอีสาน. [online]. เข้าถึงได้จาก : coursewares.mju.ac.th/ft470/Lab/chapterp07.doc

โครงสร้างของไดอะซิทิล. [online]. เข้าถึงได้จาก : www.answers.com

โครงสร้างของอะซิทิลดีไฮด์. [online]. เข้าถึงได้จาก : www.chemistrydaily.com

แบคทีเรียกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://plasom.com/general_2.htm.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง,ดร.2546 แบคทีเรียกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง (Lactic Acid Bacteria in Fermented Food Products). วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม. 3(1). เดือนตุลาคม 2546 – มีนาคม 2547.

ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญ. 2539. กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 6-10

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

Axelsson, Lot. 1993. Lactic acid Bacteria : Classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria (Salminen, S. and Von Wright, A., eds.) p. 1-64. Marcel Dekker. New York

Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I. and Spasov, Z.N. 2002. Pure culture for making kefir. Food Microbiology. 19: 537-544

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria : Microbiology, Genetics and Application. Blackie Academic & Professional, New York.

Guzel-seydim, Z.B., Seydim, A.C., greene, A.K. and Bodin, A.B. 2000. Determination of organic acid and volatile flavor substances in kefir during fermentation . J. Food Composition and Analysis. 13:35-43.

Hammers, W. P. 1987. Proceeding from Food Ingredients European Conference on Ingredients and Additive. Wiesbaden. p.. 22.

Hansen, B. E. 2002. Commercial bacterial starter culture for fermented food of the future. Int. J. Food Microbial. 78: 119-131.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. Research. 103 (5) : 582-586

Hiller, A.J. and Davision, B.E. 1991. Bacteriocin as food preservatives. Food Res.Qoart. 51:60-64.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, Non-Sporing Gram Positive Rods. In Bergeys Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (Sneath,P.H..,Mair,N.S., Sharpe,M.E.and Holt,J.G.eds.). P 1208-1234.William and Wilkins Co. Baltimore.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimic. 70:337-349

Marvin, L. S. 1981. Use of microbial culture : Dairy products. Food Technol. 35 (1) : 79-83.

Steinkrus, K. 1995. Handbook of Indigenous Fermented Foods.2nd.Marcel Dekker,Inc.USA.p.135.

Stiles, M.E. and Hastings, J.W. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria : Protential for use in meat preservation. Trends in Food Sci. and Techno. 2(10):247-251.

Swetwiwathana, A., Zendo T., Lotong N., Nayamaha, J. and Sonomoto, K. 2003. 49 International Congress of Meat Science and Technology proceedings. p. 322-324

Tanasupawat, S., Sane Okada and Kazuo Komagata. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand.

Wang, H. L. and Hesseltin, C. W. 1981. Use of microbial culture : Legume and cereal products. Food Technol. 35 (1) : 79-83.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W. H. 1997. The lactic bacteria : The Genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, New York. pp. 7-15.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้