ผลของกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน

EFFECT OF BACTERIOCIN-PRODUCING *Lactobacillus plantarum* SS7 AS STARTER CULTURE ON PATHOGENIC MICROORGANISMS DURING THAI MEAT-RICE SAUSAGES (SAI KROK ISAN) FERMENTATION

วิภาวี ใยโพธิ์ทอง

VIPAVEE YAIPHOTHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-054-342

ผลของกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน

EFFECT OF BACTERIOCIN-PRODUCING *Lactobacillus plantarum* SS7 AS STARTER CULTURE ON PATHOGENIC MICROORGANISMS DURING THAI MEAT-RICE SAUSAGES (SAI KROK ISAN) FERMENTATION

วิภาวี ใยโพธิ์ทอง

VIPAVEE YAIPHOTHONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-054-342

EFFECT OF BACTERIOCIN-PRODUCING *Lactobacillus plantarum* SS7 AS STARTER CULTURE ON PATHOGENIC MICROORGANIEMS DURING THAI MEAT-RICE SAUSAGES (SAI KROK ISAN) FERMENTATION

VIPAVEE YAIPHOTHONG

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

2019

KMITL-2019-AI-M-054-342

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน

EFFECT OF BACTERIOCIN-PRODUCING *Lactobacillus plantarum* SS7 AS STARTER CULTURE ON PATHOGENIC MICROORGANISMS DURING THAI MEAT-RICE SAUSAGE (SAI KROK ISAN) FERMENTATION

ชื่อนักศึกษา นางสาววิภาวี ใยโพธิ์ทอง

รหัสประจำตัว 58608058

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	
รศ.สพญ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 24 กรกฎาคม 2562 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง AI 501 อาคารปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 26 เดือน ก.ค. พ.ศ. 62

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน
นักศึกษา	นางสาววิภาวี ใยโพธิ์ทอง
รหัสประจำตัว	58608058
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 30 ตัวอย่าง จากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ตในเขตหนองจอกและลาดกระบัง และจากโรงงานอุตสาหกรรม พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 26 ตัวอย่าง คิดเป็น 87 เปอร์เซ็นต์, *Staphylococcus aureus* จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และพบเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ทำการคัดแยกและยืนยันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบและนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 โดยวิธี spot-on-lawn ผลการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารบางกลุ่มได้ จากนั้นศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ที่ระยะเวลาในการหมัก 0-48 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญในแบบจำลองได้ โดยชั่วโมงที่ 18 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่พบลดลงเหลือ 1.30±0.30 log cfu/ml และพบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 มีค่าสูงสุด เท่ากับ 200 AU/ml ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบลักษณะของเซลล์ *B. cereus* มีการเสียสภาพเนื่องจากสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* SS7 ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไปในชั่วโมงที่ 24 เมื่อศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อในสภาวะการหมักไส้กรอกอีสานจริง ที่ระยะเวลาการหมัก 2 วัน ผลการทดลองพบว่าไส้กรอกอีสานสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ยังตรวจพบเชื้อ *B. cereus* เหลือรอดในวันที่ 1 แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานสูตรที่มีการใช้กล้าเชื้อ

Lb. plantarum SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ร่วมกัน ซึ่งตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ตั้งแต่วันที่ 1 และ 2 ของการหมัก ผลการศึกษาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ (RAPD-PCR; Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction) พบว่ากล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถมีชีวิตรอดในระหว่างการหมักไปจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักได้

Thesis	Effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* SS7 as starter culture on pathogenic microorganisms during Thai meat-rice sausage (Sai Krok Isan) fermentation.
Student	Ms. Vipavee Yaiphothong
Student ID.	58608058
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2019
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

Contamination of pathogenic bacteria in ready to cook of Thai fermented meat-rice sausage was studied. A total of 30 of samples were obtained from local market, supermarket in Nongchok and Ladkrabang Districts and factory. The results 30 samples of Thai fermented meat-rice sausage from 3 different groups (local market, supermarket and factory) showed contamination of *Salmonella* spp. in 26/30 samples (87%), *Staphylococcus aureus* in 3/30 samples (10%), and *Bacillus cereus* in 1/30 samples (3%). Then, the isolated pathogenic bacteria was tested on bacteriocin inhibition produce by *Lactobacillus plantarum* SS7 using spot-on-lawn method. The results showed that bacteriocin produced by *Lb. plantarum* SS7 could inhibit *S. aureus* and *B. cereus* isolated from Thai fermented meat-rice sausage and some pathogenic bacteria. Then, study on the effects of *Lb. plantarum* SS7 was produced bacteriocin to inhibit *B. cereus* at 10^4 cfu/g in Isan Sausage Model Broth (ISMB). At 0-48 hours of fermentation, it was found that *B. cereus* was able to reduce the growth of cells but could not destroy all the bacteria. The amount of *B. cereus* found decreased to 1.30 ± 0.30 log cfu/ml at 18 hour and the maximum bacteriocin producing was 200 AU /ml at 24 hours. Characterization of *B. cereus* in ISMB under scanning electron microscope (SEM) found that *B. cereus* cells were destroyed by bacteriocin produced by *Lb. plantarum* SS7 in the 24 hours. Thus, *Lb. plantarum* SS7 were used as a starter culture of Thai fermented meat-rice sausage during spontaneous fermentation for 2 days. It was found that the fermented sausage without *Lb. plantarum* SS7 could detect *B. cereus* on 1 day, but did not detected on 2 days of the fermentation and compared with the fermented sausage with *Lb. plantarum* SS7

were not detectable *B. cereus* and pathogenic bacteria at 1 and 2 days of fermentation. It could be concluded that the fermented sausage with *Lb. plantarum* SS7 was able to inhibit the growth of *B. cereus* at 10^4 cfu/ml during fermentation. Identification of *Lb. plantarum* SS7 in Thai fermented meat-rice sausage with and without starter culture using Random Amplification of Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). The results showed *Lb. plantarum* SS7 as starter culture could survive until the end of the fermentation process.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ อาจารย์คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจทานแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบริษัท นายฮั่ง อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยและให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า ตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณงานทุนการศึกษา สำนักทะเบียนและประมวลผล สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนทุนในการนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้ตลอดมา และขอขอบคุณนางสาวเกวลิน ลักษณะพริ้ม และครอบครัว สำหรับการสละเวลามาช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงให้คำแนะนำและช่วยเป็นกำลังใจที่ดีในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อของข้าพเจ้าที่สนับสนุนและช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจอยู่เสมอ ทำให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ ประโยชน์อันใดที่ได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

วิภาวี ใยโพธิ์ทอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……III
กิตติกรรมประกาศ……V
สารบัญ……VI
สารบัญตาราง……VIII
สารบัญภาพ……X
บทที่ 1 บทนำ……1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย……2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……4
2.1 ไส้กรอกอีสาน……4
2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน……9
2.3 แบคทีเรียแลคติก……14
2.4 แบคเทอริโอซิน……17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……21
บทที่ 3 เครื่องมือ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย……26
3.1 วัตถุดิบ……26
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี……27
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์……29
3.4 วิธีการทดลอง……30
3.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล……45
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์……46
4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน……46
4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสาน……51

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานโดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน……..….55

4.4 ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน…..…...64

4.5 ผลการตรวจสอบยืนยันการเหลือรอดและการผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในไส้กรอกอีสาน ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) …...……...…….....68

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ……..……75

บรรณานุกรม……..……..78

ภาคผนวก……87

ภาคผนวก ก……...……88

ภาคผนวก ข……...……95

ภาคผนวก ค……...……98

ภาคผนวก ง……..……107

ประวัติผู้เขียน…...……...110

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มของ homofermentation……...….15

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกของกลุ่ม heterofermentation……...16

2.3 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก……19

3.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ……30

3.2 สารต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์……..39

4.1 ค่าเฉลี่ยพีเอช ความเป็นกรดทั้งหมด ความชื้นทั้งหมด และค่า water activity ของ ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง……47

4.2 ผลวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus, S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง……48

4.3 ผลการตรวจยืนยัน *Salmonella* groups และผลยืนยันซีโรวาห์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน……..…....49

4.4 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อแบคทีเรียแลคติกของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน……..…....53

4.5 ค่าเฉลี่ยพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ที่พบในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ทั้ง 5 รูปแบบ ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..…....58

4.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกและเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน เปรียบเทียบรูปแบบที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plamtarum* SS7 ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……61

4.7 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่มีการเติม กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*……63

4.8 ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก เปรียบเทียบตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมและ ไม่เติมกล้าเชื้อ ในระหว่างการหมัก ที่ 0, 1 และ 2 วัน……..……...66

4.9 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานในระหว่างการหมัก วันที่ 0, 1 และ 2…...67

4.10 แสดงจำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่พบจากกล้าเชื้อและเชื้อแบคทีเรียแลคติก ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐาน……..…..70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.11 สรุปผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่พบในไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 0, 1 และวันที่ 2……..……...….74

ค.1 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งจำหน่ายซุปเปอร์มาเก็ตและห้างสรรพสินค้าในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวน 8 ตัวอย่าง ……...…….…...98

ค.2 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งจำหน่าย ตลาดนัด รถเข็น แผงลอย ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวน 19 ตัวอย่าง…….……...…99

ค.3 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งผลิต โรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง …...…….……...…...101

ค.4 ผลการตรวจยืนยัน Salmonellae groups และผลยืนยันซีโรวาห์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง……..…..…..……102

ค.5 ตารางเฉลี่ยค่าพีเอช ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง……..….104

ค.6 ตารางเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง…...……..…104

ค.7 ตารางเฉลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง……..….105

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 กลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซิน กลุ่ม class IIa……..……...19

4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อเชื้อ *B. cereus* (ก) และ *S. aureus* (ข) ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน บนเพลทอาหารBSM agar…….……51

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7และ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ (ก) *Lb. sakei subs sakei* JCM 1157T (ข) *Lc. lactis* ATCC 19435 (ค) *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708 (ง) *P. pentosaceus* JCM 5885 บนเพลทอาหาร BSM agar…….……52

4.3 ผลของค่า pH ต่อเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……..….56

4.4 ผลของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกต่อเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง…….....57

4.5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plamtarum* SS7 และเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง……...…60

4.6 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *B. cereus* ในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่ช่วงระยะเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ……..….64

4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐาน…….……...71

ค.1 แสดงรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)……...105

ค.2 แสดงตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้าก่อนเติมกล้าเชื้อ (ก) ไส้กรอกอีสานบรรจุ 25 กรัม ในระหว่างการหมัก ไส้กรอกอีสานสูตรไม่เติมกล้าเชื้อ (ข) สูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (ค) สูตรเติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (ง) และ สูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml……...……..106

ง.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม) ในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก……..…...107

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ง.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรเติม
กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml ในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก……...…108
ง.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรเติม
กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/mlในวันที่ 0, 1
และ 2 ของการหมัก……...……..…….109

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ไส้กรอกอีสานเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีรสชาติเปรี้ยว ที่นิยมผลิตและบริโภคในประเทศไทย ซึ่งจะต้องนำมาทำให้สุกก่อนรับประทาน โดยกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานให้ได้รสเปรี้ยวนั้น เกิดจากการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Jindaprasert et al., 2011) โดยส่วนใหญ่จะไม่มีการควบคุมสภาวะในการหมัก (Sriphochanart and Skolpap, 2010). โดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่มักพบในผลิตภัณฑ์ เช่น *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* (Paukatong and Kunawasen, 2001; Visessanguan et al., 2006; Chokesajjawatee et al., 2009) ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยของอาหารและสุขภาพของผู้บริโภค โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนนั้น เกิดได้ทั้งจากวัตถุดิบที่ใช้ กระบวนการผลิต และการเก็บรักษา รวมถึงสุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ผลิตและผู้จำหน่าย เป็นต้น การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร

จากสาเหตุดังกล่าว จึงทำให้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน โดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์เข้ามาช่วยในกระบวนการผลิต เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน เพื่อให้มีความปลอดภัยต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วย ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Swetwiwathana et al., 2016) และมีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน ชนิด Plantaricin W (Holo et al., 2001; Swetwiwathana et al., 2016; Barbosa et al., 2016) สารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) นั้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นๆ ได้ (Klaenhammer, 1993; Ennahar et al., 2000) โดยแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อที่จะลดการใช้สารเคมีและลดการใช้ความร้อนในการแปรรูปอาหาร ทำให้อาหารยังคงมีคุณค่าทางอาหารสูง อีกทั้งการใช้แบคเทอริโอซินยังมีได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้อีกด้วย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; Swetwiwathana and Visessanguan, 2015; Omar et al., 2006)

ดังนั้นงานวิจัยนี้นี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน ศึกษา

ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน และศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เมื่อทำการหมักจริง และตรวจติดตามการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 เพื่อยืนยันการอยู่รอดของกล้าเชื้อในระหว่างการหมัก เพื่อการยอมรับในด้านคุณภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคในเรื่องของความปลอดภัยในการบริโภคผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ในแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน

1.2.3 ศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการใช้แบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

1.2.4 ศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะการหมักจริง

1.2.5 ตรวจสอบยืนยันการเหลือรอดและการผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในไส้กรอกอีสาน ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการสำรวจตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง จากแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน (ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย, ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม) โดยทำการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด, แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด, *Salmonella*, *S. aureus* และ *B. cereus*) และตรวจวิเคราะห์ทางเคมี (ความเป็นกรด-ด่าง, ความเป็นกรดทั้งหมด, ความชื้น และค่า water activity) ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสาน มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค agar spot test ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน เพื่อมาศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานโดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan sausage model broth, ISMB) จากนั้นจึง

ทำการศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะการหมักจริง โดยสุ่มวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อในระหว่างกระบวนการผลิต ที่ระยะเวลาในการหมัก 0, 1 และ 2 วัน ทำการวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง, ความเป็นกรดทั้งหมด, ปริมาณแบคทีเรียแลคติก, เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และวิเคราะห์การผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อในระหว่างการหมัก จึงทำการตรวจสอบยืนยันการเหลือรอดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและการผลิตแบคเทอริโอซินระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างไส้กรอกอีสานในแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน

1.4.2 สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ให้ผลยับยั้งโดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อมาทำการศึกษาในส่วนต่อไป

1.4.3 ทราบถึงผลของการยับยั้ง *B. cereus* โดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan sausage model broth)

1.4.4 สามารถยืนยันผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะการหมักจริง

1.4.5 สามารถยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกและการผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไส้กรอกอีสาน

2.1.1 ความหมายและคุณลักษณะของไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสานหรือไส้กรอกเปรี้ยวเป็นอาหารพื้นบ้านไทย ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของไทย เป็นไส้กรอกประเภทไส้กรอกสด ที่ผลิตจากเนื้อหมูบด มันหมู และข้าวเจ้าหุงสุก ปรุงรสด้วยเกลือ เครื่องเทศสมุนไพร เช่น กระเทียม และพริกไทย ลูกผักชี ผสมให้เข้ากัน นวดให้เหนียว บรรจุใส่ไส้หมู แล้วมัดด้วยเชือกเป็นข้อ ปล่อยไว้ให้เกิดการหมักเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยว เมื่อรับประทานต้องทำให้สุกด้วยการทอด หรือย่าง (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2555) ในการหมักไส้กรอกอีสานเป็นการหมักเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวโดยใช้กรดแลคติก โดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Phalakornkule and Tanasupawat, 2007; Sriphochanart and Skolpap, 2010) โดยในช่วงแรกของการหมักพบแบคทีเรียพวก *Pediococcus* sp. ที่ทำให้เกิดกรด และทำให้พีเอชลดลงอยู่ในช่วง 4.5-5.6 ต่อมาพบแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* sp. เจริญในช่วงหลัง

โดยกระบวนการหมักไส้กรอกอีสานให้เกิดรสเปรี้ยวนั้นเกิดจากการนำวัตถุดิบมาเติมเกลือและสารคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำซาวข้าว ข้าวสุก ข้าวคั่ว น้ำตาล หรือกระเทียม จากนั้นจึงจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับกระบวนการหมัก โดยการอัดวัตถุดิบให้แน่นเพื่อให้มีอากาศน้อยที่สุด หรือลดความชื้นในวัตถุดิบโดยการนำมาผึ่งแดด เช่น ไส้กรอกที่บรรจุให้แน่นแล้วนำมาผึ่งแดดในระหว่างการหมัก เมื่อเวลาหมักผ่านไป จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อสัมผัส (texture) เปลี่ยนแปลงทางลักษณะที่ปรากฏให้เห็น (appearance) และมีกลิ่นรสเฉพาะที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละชนิดของผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เกิดจากเอนไซม์ของจุลินทรีย์ท้องถิ่น (normal flora) ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร และเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหารจะทำการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน สารอินทรีย์อื่นๆไปเป็นกรดแลคติกกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ (Ammor et al., 2005; Martín et al., 2005) ทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหารไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารหมักซึ่งมีสภาพเป็นกรด จึงทำให้เก็บอาหารหมักดองได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดในอาหารหมักยังสร้างไวตามินเอ ไวตามินต่างๆในกลุ่มบีซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารด้วย ซึ่งความเปรี้ยวของไส้กรอกอีสานขึ้นอยู่กับส่วนผสมและอุณหภูมิของการเก็บ โดยหลังการหมักมี pH อยู่ที่ประมาณ 4.5-5.5 โดยประมาณ

2.1.2 กระบวนการผลิตไส้กรอกอีสาน

การผลิตไส้กรอกอีสาน มีส่วนผสมและกรรมวิธีการผลิตที่ทำให้ไส้กรอกอีสานมีลักษณะพิเศษในด้านกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส ส่วนผสม ประกอบด้วย เนื้อหมู, มันหมู, หนังหมูสุก, ข้าวจ้าวสุก, กระเทียม, พริกไทย และน้ำตาล

กรรมวิธีการผลิต คือ ใช้เนื้อหมูติดมันบดละเอียดพอประมาณผสมกับเครื่องปรุง คือ ข้าวจ้าวสุก หนังหมู กระเทียม และเกลือ อาจมีการเติมมันแข็งบดละเอียด เพิ่มทำให้ไส้กรอกนุ่ม นวดผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุในไส้หมูสด มัดด้วยเชือกเป็นปล้องขนาด 1-3 นิ้ว แขวนราวหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน ควรเก็บรักษา ไว้ในตู้เย็น นำมาปิ้ง ทอด หรืออบ ก่อนรับประทาน

2.1.2.1 ส่วนผสมหลักในการผลิตไส้กรอกหมัก

ในกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสาน โดยพบว่ารสชาติและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากปริมาณของเครื่องเทศ น้ำตาลและเกลือที่ใช้ในสูตรการผลิต อย่างไรก็ตามความคงตัวของผลิตภัณฑ์ตลอดจนคุณค่าทางโภชนาการของอาหารเหล่านี้ ขึ้นอยู่กับการควบคุมการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียแลคติก ส่วนผสมหลักของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก ได้แก่

2.1.2.1.1 เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นส่วนผสมเริ่มต้นในการผลิตไส้กรอกหมัก สูตรโดยทั่วไปใช้เนื้อสัตว์ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิตอาจเป็นเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อหมูนิยมใช้มากในยุโรปตอนเหนือ ยุโรปตอนกลางและประเทศจีน นอกจากนั้นมีบางประเทศที่นิยมใช้เนื้อวัวหรือเนื้อแกะ เนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ต้องมีคุณภาพดีและไม่มีรอยตำหนิต่างๆ เช่น ไม่มีรอยปนเปื้อนของเลือดหรือจุดที่มีลักษณะของเลือดคั่ง (blood splashes) สามารถอุ้มน้ำได้ดี มีค่าพีเอชประมาณ 5.6-6.0 ซึ่งจะช่วยให้การหมักในช่วงแรกได้ค่าพีเอชที่ลดลงจนพอเหมาะและสีที่ได้ไม่คล้ำ ไม่แห้งและมีความแน่น (กรมปศุศัตว์, 2551) เนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิตควรเป็นเนื้อไม่ติดมัน องค์ประกอบของเนื้อสัตว์โดยทั่วไป มีทั้งสารประกอบที่ไม่ใช่ไนโตรเจน (non-nitrogenous compound) ได้แก่ น้ำ ไขมัน แร่ธาตุและคาร์โบไฮเดรต สารประกอบที่เป็นไนโตรเจน (nitrogenous compound) ซึ่งมีโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ องค์ประกอบของโปรตีนมีความสำคัญในการผลิต เพราะปริมาณโปรตีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โปรตีนเหล่านี้จัดเรียงตัวอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า filament structure และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการหดตัว (contraction) (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529; เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)ในสูตรการผลิตยังมีการเติมเกลือประมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยประโยชน์ของเกลือ

พบว่าช่วยในการสกัดโปรตีนให้ละลายน้ำ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสที่ดี เมื่อพิจารณาถึงสีของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการผลิต สีของเนื้อสัตว์เกิดขึ้นจากเม็ดสี myoglobin และยังมีความแตกต่างกันตามชนิดของเนื้อสัตว์ที่ใช้ โดยพบว่าเนื้อวัวมีปริมาณของ myoglobin มากกว่าเนื้อหมูทำให้มีสีเข้มกว่า ดังนั้นเนื้อสัตว์ที่ได้จากสัตว์ที่มีอายุมาก จึงมีความเหมาะสมในการผลิต ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (สัญชัย จตุรสิทธา, 2543)

2.1.2.1.2 ไขมัน

ไขมันเป็นส่วนผสมที่สำคัญของการผลิตไส้กรอก โดยเฉพาะไส้กรอกหมักภายหลังจากการทำแห้ง อาจมีไขมันได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ไขมันเมื่อถูกออกซิไดซ์ทำให้เกิดการเหม็นหืน (rancidity) และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่หมักเสร็จแล้วมีอายุการเก็บสั้น ดังนั้นไขมันที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตควรมีองค์ประกอบของไขมันไม่อิ่มตัวต่ำ ไขมันในเนื้อหมูที่บริเวณส่วนหลังนิยมใช้กันมากเพราะมีองค์ประกอบของ polyunsaturated linoleic ต่ำและมี linoleic acid 8.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยอมให้เกิด auto oxidation ได้สูง (วัฒนี บุญวิทยา, 2542; สัญชัย จตุรสิทธา, 2543)

2.1.2.1.3 เกลือ

โดยปกติแล้วการผลิตไส้กรอกหมักใช้เกลือประมาณ 2.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ บทบาทที่สำคัญของเกลือคือ ช่วยในการถนอมรักษา (preservation) (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536; วัฒนี บุญวิทยา, 2542) และยังช่วยในการสกัดโปรตีนให้ละลายออกมารวมตัวกับส่วนผสมอื่นๆ การละลายของโปรตีนทำให้เกิดแผ่นฟิล์มที่มีความเหนียว (sticky film) ขึ้นรอบๆ อนุภาคของเนื้อ ในผลิตภัณฑ์บางชนิดอาจใช้เกลือได้มากกว่า 2.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ เช่นใน Italian salamis โดยอาจใช้เกลือได้สูงถึง 8 เปอร์เซ็นต์

2.1.2.1.4 คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตใช้เป็นส่วนผสมของการผลิตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจได้ว่า กิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักเกิดขึ้นอย่างเพียงพอ เป็นการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียตลอดจนสร้างกรดอินทรีย์ ทั้งชนิดและปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปทำให้เกิดสมดุลของการหมักระหว่างการสร้างกรดแลคติก และการลดลงของค่าพีเอช ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปอยู่ในช่วง 0.4-0.8 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไส้กรอกกึ่งแห้งในประเทศสหรัฐอเมริกามีการเพิ่มปริมาณกลูโคสสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ามีผลทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เชื้อแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดได้ต่างกัน การศึกษาถึงการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในการผลิตแหนม (น้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส แลคโตสและ

กาแลคโตส) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536; วัฒนี บุญวิทยา, 2542)

2.1.2.1.5 ส่วนผสมอื่นๆ

สารประกอบหลายชนิดนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น ใช้เติมลงในสูตรการผลิตเพื่อช่วยสนับสนุนกระบวนการผลิตและเพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์ ส่วนผสมอื่นๆในสูตรการผลิต ได้แก่ น้ำ เติมลงเพื่อช่วยให้ส่วนผสมต่างๆ กระจายตัวได้อย่างทั่วถึง ช่วยในการสกัดโปรตีน นอกจากนั้นยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความชุ่มฉ่ำและมีเนื้อสัมผัสดี เครื่องเทศ เครื่องปรุงรส เป็นส่วนผสมอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ ได้แก่ กระเทียม พริกไทย ปาปริกา ไส้กรอกหมักของประเทศจีนหลายชนิดมีการเพิ่มรสชาติด้วยการเติมไวน์ ส่วนสารช่วยเพิ่มรสชาติที่ใช้ในส่วนผสม ได้แก่ ผงชูรส ทั้งนี้เชื่อว่าจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ดี มีการใช้สารยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่น มีการใช้สารยับยั้งเชื้อราเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนในระหว่างการผลิต เพราะอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ เป็นผลมาจากเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบและสารประกอบอื่นๆ ที่เติมลงไปในสูตรการผลิต เช่น คาร์โบไฮเดรต สารที่ช่วยในการถนอมอาหาร เครื่องเทศ สารประกอบอื่นๆที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส การสลายโปรตีน การสลายไขมันและ ลิปิดออกซิเดชั่น โดยกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดกลิ่นรส เริ่มจากเอนไซม์ในเนื้อสัตว์และจากการหมักของจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ขนาดของบรรจุภัณฑ์ ขนาดอนุภาคของเนื้อสัตว์ (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529; เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536; วัฒนี บุญวิทยา, 2542)

2.1.3 คุณค่าทางโภชนาการของไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสาน จัดเป็นอาหารในกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการหมัก โดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียแลคติกที่ทำให้อาหารความเป็นกรดสูงขึ้น ซึ่งมีผลในการถนอมอาหาร ทำให้ลักษณะของอาหาร และคุณค่าทางโภชนาการเปลี่ยนแปลง ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจัดเป็น functional foods ชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ อาหารที่ส่งผลดีต่อสุขภาพและมีผลในการป้องกันรักษา โรคได้ อาหารหมักเกิดจากการหมักด้วยรา ยีสต์ หรือ แบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) หรือจุลินทรีย์พวกโปรไบโอติกส์ (probiotics) ซึ่ง FAO/WHO ให้ความหมายของ โปรไบโอติกส์ว่า เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งหากบริโภคเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอและก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อสัตว์และพืชยังเป็นที่นิยมรับประทานในหลายประเทศ เช่น ปลาหมัก ปลาร้า แหนม ไส้กรอกหมัก ไส้กรอกอีสาน น้ำปลา หรืออาหารหมักจากถั่วเหลือง เช่น มิโซะ ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว อีกด้วย แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับและใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพ (biopreservative) มาเป็นเวลานาน โดยมีผลต่อการรักษา สมดุลของระบบทางเดินอาหาร ส่งเสริมการเจริญของ จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญในระบบทางเดินอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด ทนต่อน้ำดีและสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้เล็กเพื่อเพิ่มจำนวนและคงอยู่ในสภาพที่มีชีวิตได้ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

นอกจาก กรดแลคติกที่แบคทีเรียแลคติกสร้างออกมาซึ่งมีผลใน การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างสารเมตาบอไลท์อื่นๆ เช่น วิตามินต่างๆ วิตามินบี โฟลเอซิน (folacin) หรือสารประกอบระหว่างกรดโฟลิก และวิตามินบี 11 ซึ่งมีผลในการป้องกันความผิดปกติ ของระบบประสาท ความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ และ มะเร็งบางชนิดได้ (Stanton et al., 2005)

2.1.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักไส้กรอกอีสาน

อาหารหมักดองส่วนใหญ่ที่ผลิตในปัจจุบันนี้ยังใช้จุลินทรีย์เริ่มต้น (starter) เป็นจุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่แล้วในธรรมชาติ เนื่องจากสภาพแวดล้อมในอาหารหมักมีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรด แลคติกและจุลินทรีย์อื่นๆที่มีความสำคัญต่อการหมัก จึงทำให้มีการเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จุลินทริย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาตินี้ปนเปื้อนมากับอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการเตรียมอาหาร หรือมาจากอุปกรณ์ที่เคยใช้ในการหมัก เช่น การผลิตไส้กรอกในห้องที่เคยผลิตมานานแล้วและใช้อุปกรณ์ต่างๆที่เป็นของเดิม ย่อมทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีเช่นเดิม เมื่อความเจริญทางวิชาการของอาหารหมักดองมีมากขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นเชื้อเริ่มต้น ปัจจุบันได้มีการคัดแยกและเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก มาพัฒนาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียสำหรับผลิตไส้กรอกเปรี้ยว เพื่อจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐานมีคุณภาพสม่ำเสมอ และปรับปรุงคุณภาพของอาหารหมักดองเหล่านี้ได้ดีขึ้น คือกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกในระหว่างการหมักเนื้อสัตว์ ส่วนมากเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนต่ำกว่าความเข้มข้นที่บรรยากาศปกติ (microaerophilic condition) สามารถใช้น้ำตาลได้โดยการออกซิไดซ์ ทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้ามีปริมาณออกซิเจนจำกัดหรือถ้าการออกซิไดซ์ของน้ำตาลไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดกรดอินทรีย์ โดยส่วนใหญ่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก คือการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก มีหลักฐานดังนี้คือ มีรสเปรี้ยวขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า และการลดลงของ pH

จากระหว่าง 6.2-6.6 ไปเป็น 4.2-5.0 ระดับของความเป็นกรดนี้ยังขึ้นกับระยะเวลาของการหมักการผสมกลมกลืนกันของเนื้อ และอัตราการเปลี่ยนแปลงความชื้น ในบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้าง อะซีโตน ซึ่งจะมีส่วนเรื่องกลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก แบคทีเรียพวกนี้มีบทบาทสำคัญต่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมัก (fermentation products) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- แบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่

1.1) *Bacillus* sp. แบคทีเรียพวกนี้จะพบเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เติมสารไนเตรตเท่านั้น จะทำให้เกิดกรดแลคติก กรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์

1.2) *Clostridium* sp. แบคทีเรียพวกนี้จะหมักให้เกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก อะซิโตน บิวทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน

- แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีรูปร่างกลมหรือเป็นแท่ง (cocci or rods) ไม่มีการสร้างสปอร์ (non sporeforming) ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งจัดเป็น facultative anaerobic สามารถผลิตกรดแลคติกได้โดยใช้คาร์บอนเป็นสารอาหาร น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ กลูโคสและแลคโตส ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน

ในการผลิตไส้กรอกอีสานนั้น เป็นการหมักเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวตามธรรมชาติอีกทั้งกระบวนการหมักไม่ได้มีการควบคุม อาจทำให้การเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งการปนเปื้อนมักมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่นำมาทำไส้กรอกอีสาน และการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในไส้สุกรที่นำมาใช้ และมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ในแหนมและไส้กรอกอีสาน (Chokesajjawatee et al., 2009) สาเหตุที่ทำให้ไส้กรอกอีสานเสี่ยงต่อการปนเปื้อนนั้น จะพบว่ามาจากหลายสาเหตุด้วยกัน เช่น จากแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ ขั้นตอนการขนส่ง กระบวนการผลิตที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อน รวมถึงขั้นตอนการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้อง สามารถเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ได้ทั้งนั้น โดยจะยกตัวอย่าง เช่น *Salmonella* มักพบในเนื้อดิบหรือสัตว์ปีกที่ใช้เป็นวัตถุดิบ, *S. aureus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปและอาจพบได้ในอาหาร สิ่งแวดล้อม มนุษย์และสัตว์ และสามารถปนเปื้อนไปยังผลิตภัณฑ์จากการขาดการปฏิบัติตามสุขอนามัยส่วนบุคคลที่เหมาะสมได้ (FDA, 2012) รวมถึง *B. cereus* ที่สามารถพบได้ในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะข้าว สมุนไพรและเครื่องเทศ โดยเฉพาะ

ข้าวที่เป็นส่วนผสมของไส้กรอกอีสานก็มีความเสี่ยงต่อเชื้อ *B. cereus* ที่สามารถผลิตสารพิษที่อุณหภูมิต่ำในข้าวได้ (Finlay et al., 2002)

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทีมีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทอง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า water activity (Aw) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนอยู่ที่ประมาณ 0.86 และสภาพไม่มีออกซิเจนประมาณ 0.90 เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ คือ เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ สารพิษชนิดนี้ทนความร้อนถึงระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ (คมแข พิลาสมบัติ, 2550; Chokesajjawatee et al., 2009)

S. aureus มักพบอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ มนุษย์และสัตว์จึงเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้ (FDA, 2012) โดยจะพบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ หรือ เส้นผมและผิวหนังถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านี้ในคนทีมีสุขภาพดี และอาจพบเชื้อ ชนิดนี้ 60-80 เปอร์เซ็นต์ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมในโรงพยาบาล ตลอดจนผู้ประกอบอาหารรวมทั้งในขั้นตอนของการบรรจุและสภาพแวดล้อมภายนอกนับเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกอย่างหนึ่งคือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิทีไม่เหมาะสมเป็นผลให้อาหารทีมีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็วการได้รับเชื้อ *S. aureus* เข้าสู่ร่างกายได้จากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภท สลัดเช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน (Baruzzi et al., 2006)

Chokesajjawatee และคณะ (2009) กล่าวว่า *S. aureus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แพร่หลายมากที่สุดแห่งหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นอาหารทั่วโลก โดยอาการเป็นพิษเกิดจากการกินอาหารที่มีสารพิษ enterotoxins staphylococcal (SEs) ที่เชื้อสร้างขึ้นซึ่งเป็นสารพิษที่ทนความร้อน จึงเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคเมื่อรับประทานเข้าไป

2.2.2 *Salmonella* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) เจริญได้ดีทั้งในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน สามารถหมักกลูโคสได้ก๊าซเกิดขึ้น แต่ไม่สามารถหมักแลคโตสและซูโครสได้ ให้ไฮโดรเจนซัลไฟต์หรือก๊าซจากการหมักคาร์โบไฮเดรต อุณหภูมิที่ต่ำสุดที่เชื้อเจริญได้ในอาหารอยู่ในช่วง 6.7 – 7.8 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 10 องศาเซลเซียส ในคัสตาร์ด แฮม และสลัด ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อเจริญได้คือ 45.6 องศาเซลเซียส โดยเชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้ออยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ช่วง pH สำหรับการเจริญคือ 4.1 – 9.0 ซึ่งโดยทั่วไปเจริญได้ในอาหารที่เป็นกรดต่ำ (low acid food) สำหรับค่า aw ต่ำสุด ในการเจริญนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ซึ่งจะมีค่าประมาณ 0.93 – 0.95 (บุญศรี จงเสรีจิตต์, 2553)

Salmonella spp. เป็นเชื้อที่พบอยู่ในธรรมชาติ เช่น ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า สัตว์ปีก เต่า และกบ รวมทั้งแมลงต่าง ๆ สัตว์และสัตว์ปีกจะทำให้มนุษย์เกิดโรคซัลโมเนลโลซิสได้และเป็นพาหะนำโรคติดต่อ โดยการแพร่หลายของเชื้อทางอุจจาระ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากดิน น้ำ และสกปรกต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ มนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งให้เกิด การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยการแพร่ระบาดของโรคเกิดจากอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. เช่น น้ำที่ปนเปื้อนกับ อุจจาระ นอกจากนั้นเป็นพวกนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น ไอศกรีม เนยแข็ง คัสตาร์ด ซึ่งอาจปนเปื้อนจาก อุจจาระหรือผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ไม่เพียงพอ รวมทั้งอาจมีการแพร่ระบาดของโรคจากอาหาร ต่าง ๆ เช่น ไข่ผง ไข่แช่แข็ง หรือปลาหมึก อีกทั้งเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เช่น เนื้อสับ ไส้กรอก แฮม เบคอน ซึ่งไม่ได้เก็บในตู้เย็นและวางไว้ในอุณหภูมิห้องนาน ๆ จะทำให้เชื้อนี้เจริญขึ้นมาได้ สัตว์เลี้ยง ต่าง ๆ เช่น สุนัข แมว ก็เป็นตัวแพร่กระจายของเชื้อได้ รวมทั้งผู้ที่เป็นแหล่งของเชื้อซึ่งได้แก่ผู้ที่ซึ่งเคย เป็นโรคและหายป่วยแล้ว แต่ยังมีเชื้ออยู่ จึงเป็นพาหะของโรคได้ โดยพบว่าผู้ที่หายป่วยจากโรคจะเป็น พาหะเรื้อรังคิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ในถุงนำดี ท่อนำดี ในลำไส้หรือท่อปัสสาวะ

การเกิดโรคของเชื้อ *Salmonella* spp. หลังการรับประทานเชื้อนี้เข้าไปเชื้อจะไปเกาะติดกับเยื่อเมือกในลำไส้เล็ก และแพร่พันธุ์บนเยื่อบุ ลำไส้เล็กพร้อมกับมีการสร้างสารพิษที่ทำให้ลำไส้บวม เนื่องจากมีการสะสมของของเหลวในลำไส้ ความสามารถของเชื้อโรคในการบุกรุกและทำลายเซลล์ซึ่งเกิดการสร้าง thermostable cytotoxic factor เชื้อโรคแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษที่ไม่ทนความร้อนซึ่งมีผลต่อการหลั่งของของเหลวและสารเกลือแร่ รวมถึงการสร้างสารพิษเกี่ยวข้องกับอัตราการเติบโตของเชื้อโรค (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

2.2.3 *Bacillus cereus*

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.9 ไมครอน ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 49 องศาเซลเซียส ช่วง pH ในการเจริญได้ดีคือ 4.9–9.3 เชื้อ *B. cereus* นี่มีการกระจายตัวสูงในธรรมชาติและในอาหารแห้ง สามารถพบได้จาก ดิน เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม ผัก ธัญพืช ข้าวผัด ข้าวสวย เส้นหมี่ และขนมอบ และอาหารประเภทแป้งเช่น พาสต้า ก๋วยเตี๋ยว (Finlay et al., 2002)

บุญศรี จงเสรีจิตต์ (2552) กล่าวว่า เชื้อ *B. cereus* ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ 2 แบบ คือ อาหารเป็นพิษแบบที่มีอาการท้องร่วง เกี่ยวข้องกับการกินอาหารจำพวกเนื้อ ซุป หรือผักที่มีเชื้อปนเปื้อน รวมทั้งพวกเครื่องเทศแห้ง อาการที่เกิดขึ้นจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Cl. perfringens* หลังจากบริโภคอาหารเข้าไป 8–16 ชั่วโมง และจะหายภายใน 12–14 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นคือ ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำและปวดอักเสบอันเนื่องมาจากการถ่ายเบ่ง ส่วนอาการคลื่นไส้และอาเจียนนั้นมักไม่ค่อยเกิดขึ้น และอาการแบบที่มีอาการอาเจียน เกี่ยวข้องกับการกินอาหารจำพวกข้าวที่มีเชื้อปนเปื้อน โดยเมื่อหุงข้าวตัวเซลล์จะถูกทำลาย แต่สปอร์ยังคงอยู่ เมื่อเก็บข้าวที่หุงสุกแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่แช่เย็น ก็จะมีผลให้สปอร์ของเชื้อเจริญขึ้นมาได้และจะสร้างสารพิษที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin) ที่ทนความร้อนออกมา ถึงแม้จะนำอาหารไปอุ่นซ้ำอีกครั้งก็ไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ ซึ่งหากใช้อุณหภูมิไม่สูงพอ จะเป็นการกระตุ้นการงอกของสปอร์และสารพิษออกมาจนเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเรียกว่า “Chinese Restaurant Syndrome” ระยะฟักตัวของเชื้อนี้กินเวลา 1–5 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง แต่จะไม่มีไข้และท้องร่วง อาการดังกล่าวเป็นอยู่เพียงระยะเวลาสั้นๆ ราว 6–24 ชั่วโมง

2.1.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

ความหมายของไส้กรอกอีสานตามที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนมีดังต่อไปนี้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2555)

1. ไส้กรอกอีสานหมู หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมู ไขมัน ข้าวเจ้าสุกหรือข้าวเหนียวนึ่ง เครื่องเทศและ สมุนไพร เครื่องปรุงรส เช่น น้ำตาลทราย เกลือ กระเทียมบด พริกไทย ลูกผักชี คลุกเคล้าผสมให้เข้ากัน บรรจุในไส้ มัดเป็นเปลาะ ผ่านกระบวนการหมักจนเปรี้ยว และต้องทำให้สุกก่อนบริโภค

2. ไขมัน หมายถึง ไขมันจากสัตว์ เช่น สุกร ไก่ เป็ด

3. ไส้ หมายถึง ไส้ธรรมชาติ เช่น ไส้หมู ไส้แพะ ไส้แกะ ที่ทำความสะอาดและเก็บรักษาอย่างถูกสุขลักษณะหรือไส้เทียม เช่น ไส้ชนิดรีเจเนอเรเตด คอลลาเจน (regenerated collagen)

2.1.5.1 คุณลักษณะที่ต้องการของไส้กรอกอีสานหมู (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2555)

1. ลักษณะทั่วไป ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องมีรูปทรงเดียวกัน และมีขนาดใกล้เคียงกัน มีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ มีผิวเรียบ ไม่ฉีกขาด

2. สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบ ไส้กรอกอีสานหมูที่ใช้

3. กลิ่นรสต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักและของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น

4. ลักษณะเนื้อต้องนุ่มและไม่ร่วน

5. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

2.1.5.2 จุลินทรีย์ก่อโรคตามเกณฑ์กำหนด (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2555)

1. *Salmonella* spp. ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
2. *Staphylococcus aureus* ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
3. *Bacillus cereus* ต้องน้อยกว่า 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
4. *Clostridium perfringens* ต้องน้อยกว่า 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
5. *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.3 แบคทีเรียแลคติก

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ mesophilic bacteria แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการหมักน้ำตาล ขาดเอนไซม์คะตะเลส ขาดไซโตโครม ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดนิวคลีอิก และวิตามิน ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant)

ทนต่อความเป็นกรดโดยสามารถเจริญได้ที่ pH 4.0-4.5 บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ pH 3.2 และที่ pH สูงถึง 9.6 แต่สามารถสลายโปรตีนและไขมันได้เพียงเล็กน้อย แหล่งที่มักพบแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่น เช่น หนู หมู สัตว์ปีก มนุษย์ นมและผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พืช และอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นต้น (ศิริรัตน์ ตันไสว, 2547; อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

2.3.2 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะรูปร่างคือ พวกที่มีรูปร่างท่อน ได้แก่ lactobacilli และ carnobacteria และรูปร่างกลม ได้แก่ streptococci (Collier และคณะ, 1998) เมื่อศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐานวิทยา องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งศึกษาในระดับโมเลกุล เช่น โมลเปอร์เซ็นต์ G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ ลำดับเบสบน rRNA ทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 12 สกุล คือ Carnobacterium, Lactobacillus, Aerococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus และ Weissella ดังนี้

2.2.2.1 Homofermentation

เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติกที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตกรด แลคติกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolytic pathway ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จากการหมักกลูโคสโดยที่กลูโคส 1 โมเลกุลเมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวท 2 โมเลกุลจากนั้น ไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติกซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้น พบทั้ง D-Lactic และ L-Lactic (Adams และ Moss, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักแบบ homofermentative มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (ตารางที่ 2.1) เช่น สกุล *Lactobacillius* และชนิดที่มีรูปร่างทรงกลม ได้แก่ สกุล *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มของ homofermentation

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

ที่มา : Schlegel (1993)

2.3.2.2 Heterofermentation

เป็นการหมักให้เกิดแลคติกโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสไปเป็นเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิดได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel, 1993; Adams and Moss, 1995) ตัวอย่างของแบคทีเรียแลคติก ที่มีวิถีการหมักแบบ heterofermentative ได้แก่สกุล *Lactobacillus* บางสปีชีส์และสกุลของ *Leuconostoc* โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus* มีการหมักได้สองแบบ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกของกลุ่ม heterofermentation

Cocci	Rods
Streptococci	**Lactobacilli**
Leuconostoc mesenteroides	*Lactobacillus bifermentans*
subsp. Mesenteroides	*Lactobacillus brevis*
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum	*Lactobacillus fermentum*
Leuconostoc mesenteroides	*Lactobacillus kandleri*
subsp. Cremoris	*Lactobacillus viredescens*
Leuconostoc lactis	

ที่มา: Schlegel (1993)

2.3.2 *Lactobacillus plantarum*

Lb. plantarum อยู่ในกลุ่มของ Lactobacillus ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในกลุ่ม Gram-positive-aerotolerant สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องซาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 45 องซาเซลเซียส มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา อันเนื่องมาจากมีความแตกต่างของ GC content ภายในสกุลค่อนข้างสูง โดยอยู่ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งหรือเป็นรูปทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆหรือเป็นโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างแคตาเลส มีบางสายพันธุ์เป็นแคตาเลสเทียม มีคุณสมบัติในการใช้เป็นโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ ในนมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆและเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น ในหญ้าหมักและผักดอง (Ammor et al., 2005; Swetwiwathana et al., 2011)

โดยเชื้อในกลุ่ม Lactobacillus มักพบได้ทั่วไปและเป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่โดดเด่นในอาหารหมักดองและมีการนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก เนื่องจากคุณสมบัติที่ช่วยในเรื่องเนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะ (Bernardeau et al., 2006) นอกจากนี้ แบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่สามารถใช้เป็นสารกันเสียตามธรรมชาติเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีกระบวนการหมัก (Noonpakdee et al., 2003) โดยแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Lactobacillus จัดเป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ที่ได้รับการพิจารณาว่าเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคอีกด้วย

2.3.3 การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก

แบคทีเรียแลกติกจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน และ กรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารที่จำเพาะที่มีผลต่อลักษณะของกลิ่นรสของอาหารได้อีกด้วย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; Swetwiwathana and Visessanguan, 2005)

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยแบคทีเรียแลกติกในอาหารนั้น พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคบางกลุ่มและทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนมีผลทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น โดยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรด การลดลงของค่าพีเอช และกรดอินทรีย์ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย ทั้งกรดแลกติก และกรด อะซิตริก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น มีผลในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Ammor et al., 2005; Martín et al., 2005)

2.4 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) หมายถึง เปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซมและมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆได้ดี แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ตรงที่แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียที่มีกลุ่ม แกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคเทอริโอซินที่สามารถสร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกนั้นกลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด กลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้นั้นมักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์ในกระบวนการผลิตอาหาร แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง ทำให้มีการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อน ทำให้อาหารนั้นยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหาร ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการ เนื่องจากมีความปลอดภัย มีรสชาติสดใหม่ และพร้อมรับประทาน (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550)

แบคเทอริโอซินมีการพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบในปี ค.ศ. 1925 โดยพบว่าเชื้อ *E. coli* สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเติบโตของ *E. coli* และเรียกสารยับยั้งนั้นว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารคล้ายโคลิซิน (colicin-like) ที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก จึงเรียกสารโปรตีนที่

สามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ว่าแบคเทอริโอซิน โดยพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่ผลิตจากไรโบโซม และมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินหรือสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก หรือแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ (Klaenhammer, 1993; Ennahar et al., 2000)

2.4.1 คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีจุดสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง เมื่อพิจารณาสมบัติอื่นๆ ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ มวลโมเลกุล และความเสถียรต่อความร้อน สามารถแบ่งแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; Nissen-Meyer et al., 2009; Wen et al., 2016)

2.4.1.1 แลนติไบโอติก (lantibiotic) เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดดีไฮโดรไทโออีเทอร์ (dehydrothiorther) แลนไทโอนีน และ 3-เมทิลแลนไทโอนีน สร้างขึ้นโดยดัดแปลงกรดอะมิโนปกติในสายเปปไทด์หลังกระบวนการแปลรหัส แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ของแบคทีเรียแลคติกปีนชนิด A มีโครงสร้างคล้ายเกลียวที่ยืดออก (ชนิด B เป็นโครงสร้างก้อนกลม) ได้แก่ nisin A, nisin Z, lactocin S, lactocin, mutacin เป็นต้น

2.4.1.2 แบคเทอริโอซินที่เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนอุณหภูมิตั้งแต่ 100-121 องศาเซลเซียส แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

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

กลุ่ม b. เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยสายเปปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซินเป็นองค์ประกอบร่วม ได้แก่ Lactococcin G, Lactacin F และ LaLacotccin M

กลุ่ม c. เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยหมู่ไทออล

2.4.1.3 แบคเทอริโอซินซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) รวมทั้งเอนไซม์ เช่น hemolisins และ muramirase แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่ทนความร้อนแยกได้จากสกุล Lactobacillus เท่านั้น เช่น Acidophilucin A, Caseicin 80

2.4.1.4 แบคเทอริโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วมสำหรับการออกฤทธิ์ ไม่ได้รับการยอมรับเพราะอาจเกิดจากกรณีทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไม่ดีพอลักษณะโดยสรุปของแบคเทอริโอซินทั้ง 4 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

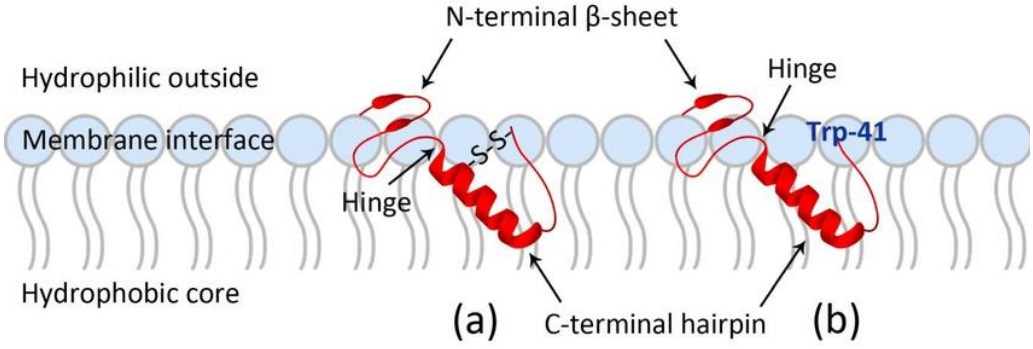
กลุ่ม (Class)	กลุ่มย่อย	ลักษณะ
I		แลนติไบโอติก
II		แบคเทอริโอซินขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนความร้อน 100-121 องศาเซลเซียส
	IIa	ออกฤทธิ์ต่อ*Listeria* ประกอบด้วย -Y-G-N-G-V-X-C- บริเวณใกล้เคียงปลายด้าน N
	IIb	การออกฤทธิ์ต้องการโปรตีนชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบร่วม
	IIc	การออกฤทธิ์ต้องการหมู่ไทออล
III		แบคเทอริโอซินขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน
IV		แบคเทอริโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตหรือ/และไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ouwehand (1998)

2.4.2 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้วยข้างของถังไม้ (barrel-stave) ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของ แบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc. Lactis* subsp. lactis พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคเทอริโอซินเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้

เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover, 1993) นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซิน class II ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน พบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับกับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออน และสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Nissen-Meyer et al., 2009;Xing Wan, 2012; Wen et al., 2016)



ภาพที่ 2.1 กลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซิน กลุ่ม class IIa

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-class-IIa-bacteriocins-in-membrane-232229756

2.4.3 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2550) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินจะช่วยในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหารและลดการป่วย เนื่องมาจากอาหารเป็นพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางกลุ่ม เช่น แบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *E. coli* VTEC 0157, *Campylobacter* และ *Salmonella* ถึงแม้ว่าฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจะไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น การใช้ความดันสูง (High Hydrostatic Pressure; HHP) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อหรือใช้ร่วมกับกรด แลคติกที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบ เช่น *S.* Anatum ที่พบมากในแหนมถูกทำลายได้เร็วขึ้น (Swetwiwathana et al., 2007) ดังนั้น แบคเทอริโอซินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและพวกที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร โดยเฉพาะจะเข้าไปมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิต

แบคเทอริโอซินได้เข้ามามีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้ แบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก เป็นต้น

Todorov (2009) ศึกษาการใช้สารแบคเทอริโอซิน เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ โดยในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการแยกแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม *Lb. plantarum* หลายสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน จากหลากหลายกลุ่มอาหารเช่น เนื้อปลา, ผลไม้, ผัก, นมและผลิตภัณฑ์ธัญพืช โดยสาร plantaricins หลายชนิดที่เชื้อ *Lb. plantarum* สร้างขึ้นนั้น มีคุณลักษณะและลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน และมีการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมรวมถึงรูปแบบการทำงานที่เหมาะสมของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคเทอริโอซิน จากแบคทีเรียกรดแลคติค โดยมุ่งเน้นที่แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย แบคทีเรีย *Lb. plantarum* เป็นต้น

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานและผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากเนื้อสัตว์

Baruzzi และคณะ (2006) ทำการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่ในระหว่างกระบวนการผลิตซาลามี่ ทำการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลและศึกษาสรีรวิทยาเพื่อระบุลักษณะทางอนุกรมวิธานของสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังศึกษาการปนเปื้อนของ *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* sp. ในซาลามี่ โดยตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบจะแบ่งออกเป็น 2 สภาวะ คือ ในวันที่ 0 ของการหมัก และหลังจากหมักผ่านไปแล้ว 25 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์เชื้อ *Bacillus* sp., จุลินทรีย์ทั้งหมด รวมถึงแบคทีเรียแลคติก และทำการวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด (pH) และปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ผลที่ได้พบว่าสายพันธุ์ของ *Bacillus* sp. ที่ตรวจพบในระหว่างการหมักไส้กรอกนั้น อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงรสชาติและลักษณะทางประสาทสัมผัสของซาลามี่ได้

Bohaychuk และคณะ (2006) ทำการสำรวจตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 800 ชนิดจากตลาดค้าปลีกใน Edmonton, Alberta และ Canada ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว, ขาไก่, หมูสับ, ไส้กรอกหมักพร้อมบริโภค, เนื้อย่าง, เนื้อไก่งวง โดยทำการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความชุกของ *E. coli, Salmonella, Campylobacte*r spp. และ *L. monocytogenes* โดยผลการวิเคราะห์พบเชื้อ *E. coli* O22: H8 ที่ผลิตสารพิษจาก Shiga ในตัวอย่างเนื้อวัวดิบ พบเชื้อ *Salmonella* และ *Campylobacter* ในขาไก่ดิบประมาณ 30 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *L. monocytogenes* พบในเนื้อวัวดิบ 52 เปอร์เซ็นต์ เนื้อไก่ดิบ 34 เปอร์เซ็นต์ เนื้อหมู 24 เปอร์เซ็นต์ ไส้กรอกหมัก 4 เปอร์เซ็นต์ ไก่งวง 3

เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น จึงสรุปได้ว่าเชื้อก่อโรคที่พบในการศึกษานี้คล้ายคลึงกับการพบเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในหลายประเทศเช่นกัน

Chokesajjawatee และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาความเสี่ยงจากปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้พบการปนเปื้อน *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนม 155 ตัวอย่าง โดยจากการศึกษา พบการปนเปื้อน *S. aureus* ในตัวอย่างเท่ากับ 39.35 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างแหนมทั้งหมด โดยพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 2–3500 MPN/g โดยปัจจัยที่มีความสำคัญในการปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุดคือผู้ผลิตและความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งพบว่าการเพิ่มปริมาณของเชื้อจะเพิ่มขึ้นในวันแรกและการปนเปื้อนเชื้อจะลดลงภายหลังจากนั้น และการเก็บรักษาโดยการแช่ตู้เย็นยังเป็นการช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อได้อีกด้วย

Limsombun และคณะ (2012) ศึกษาลักษณะคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์หม่ำ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแบบดั้งเดิมของไทย ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 100 ตัวอย่างจากโรงงานผลิต 50 แห่งเพื่อตรวจวิเคราะห์หา *E. coli, S. aureus, Cl. perfringens* และ *Salmonella* ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนไทย โดยพบการปนเปื้อนของ *E. coli* สูงกว่าเกณฑ์สูงสุดที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนกำหนดไว้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการปนเปื้อน *Cl. perfringens* และ *S. aureus* จำนวน 50 และ 8 ตัวอย่างตามลำดับ และตรวจพบ *Salmonella* 15 ตัวอย่าง

Buyukunal และคณะ (2016) ทำการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp., *L. monocytogenes, E. coli* O157 รวมถึงการใช้ไนเตรทและไนไตรท์ในไส้กรอกหมักตุรกี (ซูชุก) โดยทำการเก็บตัวอย่างไส้กรอกหมักตุรกีจำนวน 132 ตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157 จากผลการศึกษาพบว่าตรวจพบ *Salmonella* spp. และ *L. monocytogenes* ทั้งหมด 2.52 เปอร์เซ็นต์ และ 2.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli* O157

2.5.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสาน และผลิตภัณฑ์ใกล้เคียง

Sarkar และ Banerjee (1996) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากหลายๆแหล่ง ได้เชื้อ 171 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* (106 สายพันธุ์) *Lactococcus* (53สายพันธุ์) *Leuconostoc* (6 สายพันธุ์) และ *Pediococcus* (6 สายพันธุ์) จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดนี้จะมี 24 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติก 19 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธีอาการ์สปอทเทสต์ (agar spot test) และเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ (well diffusion assay) และภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophages) *Lactobacillus* ทั้ง 7 ไอโซเลต จะแสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเนื่องจากเชื้อสามารถผลิตสารที่คล้ายกับแบคเทอริโอซินได้

Swetwiwathana (2533) ทำการศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์คือ *Lactobacillus* spp. (L1) และ *Pediococcus* spp. (P5) เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนม โดยมีการเติมเชื้อก่อโรคในกลุ่มของซัลเนลลา 3 สายพันธุ์ คือ *Salmonella* Derby, *Sal.* Anatum และ *Sal.* Newport เพื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก L1 และ P5 มีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนมได้เร็วกว่าแหนมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้แหนมที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังมีรสชาติ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏทางด้านสีที่เป็นที่ยอมรับ ดังนั้น จึงบอกได้ว่าการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักแหนมเพื่อควบคุมคุณภาพความปลอดภัยในระหว่างการหมักได้ดี

Swetwiwathana และ Lotong (1999) ทำการคัดแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างแหนม เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแหนมและเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์แหนม จากงานวิจัยพบว่า ได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้หลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่เป็นน่าสนใจ คือ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่สร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1 ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาประสิทธภาพในการใช้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อหมักแหนมเทียบกับแหนมที่หมักโดยธรรมชาติ รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S.* Anatum จากการทดลองดังกล่าวทำให้เชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 น่าจะเป็นทางเลือกที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของแหนมให้คงที่ในด้านรสชาติและลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์รวมถึงความปลอดภัยจากแบคทีเรียก่อโรค

มัลลิกา ไชยวุฒิ (2556) ทำการศึกษาผลของการหมักไส้กรอกอีสานที่ผลิตจากเนื้อโคพื้นเมืองไทยหมักในไส้หมูและไส้คอลลาเจนโดยสภาวะการหมักแบบแห้ง และสภาวะการหมักแบบกึ่งแห้ง โดยศึกษาสภาวะการหมักและชนิดไส้ที่บรรจุแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ค่าความชื้นและค่า a_w และศึกษาผลของการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49 ในการหมักไส้กรอกอีสาน เพื่อดูการยับยั้ง *S.* Anatum ในระหว่างการหมัก พบว่าสามารถยับยั้ง *S.* Anatum ได้ในการหมักวันที่ 2 จึงมีแนวโน้มในการนำการเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49 มาใช้ในการพัฒนาด้านคุณภาพของไส้กรอกอีสานและทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

Rattanachaikunsopon และ Phumkhachorn (2000) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารพื้นบ้าน ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคเทอริโอซิน ภายใต้สภาวะที่มีการกา จัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ สารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตขึ้นได้จากแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ซึ่งก็คือ *Lactobacillus lactis*

subsp. *lactis* ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่จำเพาะ ไวต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes) และทนความร้อน โดยแบคเทอริ โอซินที่ผลิตได้จาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* (TISTR 473) โดยไม่ต้องทำลายเซลล์ โดยแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างในช่วง log phase และจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้สูงสุดในช่วง stationary phase จึงมีการนำผลการทดลองที่ได้เพื่อไปปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อไป

Bromberg และคณะ (2004) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธีแซนวิช (sandwich test) จากตัวอย่างเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อทั้งหมด 285 ตัวอย่าง พบว่า ใน 17 ตัวอย่าง จะสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 813 สายพันธุ์ เชื้อที่แยกได้จะยับยั้งการ เจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* CTC33 และ/หรื อ *Listeria innocua* Lin11 เมื่อมีการทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ (well-diffusion assay) พบว่าเชื้อ 128 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นดัชนีได้ เชื้อที่คัดแยกได้นี้จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ *S. aureus* จะไวต่อการทดสอบมากสุด ขณะที่ *Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus plantarum* จะทนได้มากสุด สารประกอบทั้งหมดที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะถูกยับยั้งการทา งานบางส่วนหรือทั้งหมดด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติกบางชนิด

Phalakornkule และ Tanasupawat (2007) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคจากไส้กรอกหมักของไทย โดยไส้กรอกหมักส่วนใหญ่มาจากเนื้อหมูสับ เนื้อวัวหรือเนื้อหมูจาก 65 ตัวอย่างทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการทดสอบทางสัณฐานวิทยาและทางทดสอบทางชีวเคมี รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA โดยพบกลุ่มที่แยกได้พบว่าเป็น *W. confusa* (3), *P. pentosaceus* (20), *P. acidilactici* (2), *Lb. fermentum* (3), *Lb. brevis* (4), *Lb. farciminis* (4*), Lb. plantarum* (23), and *Lb. sakei* (1) และพบว่าบางสายพันธุ์ยังไม่เคยถูกแยกออกมาจากไส้กรอกหมักของไทย การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* และอีก 2 ชนิดที่สามารถยับยั้งได้ *S. aureus* ได้ คือ *W. confusa* (1), *P. acidilactici* (1), *Lb. plantarum* (3) ได้ตามลำดับ

Vatanyoopaisarn และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก 3 สายพันธุ์ คือ *P. acidilactici* (CP7-3) และ *Lb. plantarum* (CP1-15 และ CP2-11) โดยทำการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในกลุ่ม *S. aureus* โดยพบว่า ผลของแบคเทอริโอซินจาก *Lb. plantarum* CP1-15 และ *P. acidilactici* CP7-3 สามารถลดการเจริญของ *S. aureus* ได้

ดังนั้นการใช้ เชื้อผสมในกลุ่ม CP1-15, CP2-11 และ CP7-3 สามารถช่วยยืดอายุกระบวนการหมักและช่วยควบคุมจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่ต้องการ และรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้น

Arief และคณะ (2017) ทำการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* IAA-1A5 ที่ส่งผลต่อคุณภาพของไส้กรอกเนื้อ โดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่าง 3 กลุ่ม ดังนี้ ไส้กรอกเนื้อ (control), ไส้กรอกเนื้อ + 0.3 เปอร์เซ็นต์ ไนไตรท, ไส้กรอกเนื้อ + 0.3 เปอร์เซ็นต์ แบคเทอริโอซินพบว่า การใช้ plantaricin IAA-1A5 ที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* IAA-1A5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบในไส้กรอกเนื้อหลังการเก็บรักษา 6 วันได้ และสามารถนำมาใช้เป็นสารกันเสียทางธรรมชาติแทนการเติมไนไตรทในผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ที่จำหน่ายในตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย และจากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

3.1.1.2 ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทนายฮั่งอินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด จังหวัดนนทบุรี

3.1.1.3 กระเทียมปลอดเชื้อ (ยี่ห้อฟาร์มเฟรช, บริษัท เฟรช ฟอร์ม ฟาร์ม จำกัด, ไทย) ซื้อจากจากวิลล่ามาร์เก็ต สาขา เดอะ พาซิโอ้ ลาดกระบัง

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.2.1 กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Swetwiwathana et al., 2016)

3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทราบสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* RS54, RS49 และ NF38, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ M13 และ *Weissella cibaria* SI21 ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

3.1.2.3 เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน

3.1.2.3.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Bacillus cereus* AIKC 1062, *B. coagulans* JCM 2257T, *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708 และ *Lis. Innocua* ATTC 33090T รวมถึง *B. cereus* และ *Staphylococcus aureus* ที่คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสาน

3.1.2.3.2 เชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lc. lactis* ATCC 19435, *Enterococcus faecalis* JCM 5803T, *Lactobacillus sakei* subs sakei JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T และ *P. pentosaceus* JCM 5885

เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เก็บไว้ในรูปของ glycerol stock ได้รับจาก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

3.2.1.1 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group, Thailand)

3.2.1.2 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) (Elix, Germany)

3.2.1.3 Agarose (Vivantis, USA)

3.2.1.4 Calcium carbonate ($CaCO_3$) (Scharlab, Spain)

3.2.1.5 10mM Deoxynucleotide (dNTP) (#R0189, Thermo Scientific, USA)

3.2.1.6 Di-ammonium citrate ($(NH_4)_2C_6H_6O_7$) (Merck, Germany)

3.2.1.7 Di-potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Merck, Germany)

3.2.1.8 DNA Marker GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, USA)

3.2.1.9 Ethanol (C_2H_5OH) 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุราไทย, ไทย)

3.2.1.10 Ethidium bromide (Vivantis, USA)

3.2.1.11 Iodine (I_2) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.12 Kovac indole reagent (Merck, Germany)

3.2.1.13 6X Loading dye buffer (#R0611, Thermo Scientific, USA)

3.2.1.14 25mM Magnesium Chloride (MgCl2) (Thermo Scientific, USA)

3.2.1.15 Manganese sulfate·H_2O ($MnSO_4 \cdot H_2O$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.16 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.17 Molecular Biology Grade water (HypureTM, GE healthcare, USA)

3.2.1.18 10X PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (Thermo Scientific, USA)

3.2.1.19 Phenolphthalein ($C_{20}H_{14}O_4$) (Carlo Erba, Italy)

3.2.1.20 10 µM Primer OPA-3 (5′-AGTCAGCCAC-3′) (Integrated Technologies, Singapore)

3.2.1.21 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	(Carlo Erba, Italy)
3.2.1.22 Sodium acetate (CH_3COONa)	(Carlo Erba, Italy)
3.2.1.23 Sodium hydroxide (NaOH)	(Carlo Erba, Italy)
3.2.1.24 Sodium chloride (NaCl)	(Merck, Germany)
3.2.1.25 50X TAE Buffer	(Vivantis, USA)
3.2.1.26 Taq DNA polymerase	(#EP0402, Thermo Scientific,USA)
3.2.1.27 Tartaric acid ($C_4H_6O_6$)	(Merck, Germany)
3.2.1.29 Tris (Molecular Biology Grade)	(Vivantis, USA)
3.2.1.30 Tween 80	(Merck, Germany)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.2.1 ไข่ไก่	(CP, Thailand)
3.2.2.2 Agar	(Difco, USA)
3.2.2.3 Beef extract	(V.S. Chem house, Thailand)
3.2.2.4 Baird parker agar (BP)	(Difco, USA)
3.2.2.5 Brain heart infusion broth (BHI)	(Difco, USA)
3.2.2.6 Buffered peptone water (BPW)	(Difco, USA)
3.2.2.7 Dextose	(Merck, Germany)
3.2.2.8 Hektoen enteric (HE)	(Difco, USA)
3.2.2.9 Lysine indole motility medium (LIM)	(Merck, Germany)
3.2.2.10 Mannitol–Egg Yolk–Polymyxin (MYP) agar	(Difco, USA)
3.2.2.11 MRS (De Man Rogosa and Sharpe)	(Difco, USA)
3.2.2.12 Muller Kauffmann tetrathinate novobiocin broth	(Merck, Germany)
3.2.2.13 Plate count agar (PCA)	(Difco, USA)
3.2.2.14 Peptone	(Difco, USA)
3.2.2.15 Potato dextrose agar (PDA)	(Difco, USA)
3.2.2.16 Rabbit plasma with EDTA	(Merck, Germany)

3.2.2.17 Rappaport – Vassiliadis Salmonella broth (RVS)	(Merck, Germany)
3.2.2.18 Triple sugar iron agar (TSI)	(Merck, Germany)
3.2.2.19 Tryptic soy agar (TSA)	(Difco, USA)
3.2.2.20 Tryptone	(Difco, USA)
3.2.2.21 Urea agar	(Difco, USA)
3.2.2.22 Xylose lysine dextrose (XLD)	(Difco, USA)
3.2.2.23 Yeast extract	(Difco, USA)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์	(Nikon ECLIPSE E200, China)
3.3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	(JEOL IT500HR, Japan)
3.3.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	(Ohaus Corp, USA)
3.3.4 เครื่องตีปั่น	(Interscience, France)
3.3.5 เครื่องถ่ายภาพเจล	(Bio-Rad Laboratories, USA)
3.3.6 เครื่องเขย่าสาร	(Scientific Industrirs, USA)
3.3.7 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	(Bio-Rad Laboratories, USA)
3.3.8 เครื่องวัดพีเอช	(Mettler Toledo, Switzerland)
3.3.9 เครื่องผสม	(Scientific Industries, USA)
3.3.10 เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์	(Bio Lab, Thailand)
3.3.11 เครื่องวัดค่าเวอเตอร์แอคติวิตี้	(4TE AQUALAB, USA)
3.3.12 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	(Bio-Rad Laboratories, USA)
3.3.13 จานเพาะเชื้อพลาสติก	(Kartell, Italy)

3.3.14 ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)

3.3.15 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.3.16 ตู้ปลอดเชื้อ (Astec Microflow, UK)

3.3.17 ตู้อบลมร้อน (Skadi, Netherland)

3.3.18 ไมโครปิเปต และทิป (Gilson, France)

3.3.19 ไมโครเวฟ (Hitachi, Thailand)

3.3.20 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

3.3.21 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Tommy, Japan)

3.3.22 หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (NEST Biotechnology, China)

3.3.23 หลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิลิตร

3.3.24 โถดูดความชื้น

3.3.25 โถบ่มไร้ออกซิเจน

3.3.26 กระบอกตวง ขนาด 50 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.3.27 ขวดดูแรน ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.3.28 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.29 บีกเกอร์ ขนาด 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.3.30 ปากคีบ

3.3.31 ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.3.32 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน

3.4.1.1 วิธีการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

ทำการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ยังไม่ผ่านความร้อน จากแหล่งจำหน่ายต่างๆ ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 – กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 เป็นจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 ประเภท ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ที่จากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จำนวน 19 ตัวอย่าง ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ที่จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต จำนวน 8 ตัวอย่าง และไส้กรอกอีสานที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง สุ่มเก็บ

ตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ ปริมาณ 300-500 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ที่จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต ทำการเก็บตัวอย่างโดยเลือกตัวอย่างในบรรจุภัณฑ์ที่วางขายปริมาณ 300-500 กรัม ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่ำในระหว่างการขนส่ง (แช่เย็นหรือใส่กล่องเก็บรักษาด้วยแผ่นเก็บความเย็น) และนำมาทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3.4.1.2 การเตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

ทำการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกอีสานในตู้ปลอดเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ยังไม่ผ่านความร้อนตัดบรรจุภัณฑ์ออก ชั่งตัวอย่าง 200-300 กรัม และตัดชิ้นเป็นชิ้นเล็กๆ โดยใช้กรรไกรจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ แล้วจึงนำมาทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและทางจุลชีววิทยา

3.4.1.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 มาทำการตรวจตรวจวิเคราะห์ทางเคมีในไส้กรอกอีสาน ดังนี้

3.4.1.3.1 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH) (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยมสี่ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน(DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จำนวน 20 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วผสมตัวอย่างให้เข้ากัน วัดความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ซ้ำ และบันทึกผล

3.4.1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

ปิเปตตัวอย่างจากข้อ 3.4.1.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน(DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์49 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายเกิดเป็นสีชมพูอ่อน ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และบันทึกผล เพื่อนำค่ามาคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

$$\text{ค่าความเป็นกรดทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(V)(N)(90.8)(100)}{(1000)}$$

โดย V = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

N = นอร์มัลที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

90.8 = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก ($C_3H_6O_3$)

3.4.1.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

อบกระป๋องอะลูมิเนียม (aluminium cans) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น (desiccator) นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และบันทึกค่าที่ได้ นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน จากข้อ 3.4.1.2 มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 2 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น แล้วจึงนำไปชั่งนำหนักและบันทึกค่าเพื่อคำนวณหาปริมาณความชื้นในหน่วยเปอร์เซ็นต์

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ - น้ำหนักอาหารหลังอบ}}{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ}} \times 100$$

3.4.1.3.4 การวิเคราะห์ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (aw) (ตามวิธีใช้เครื่องรุ่น 4T บริษัท Aqualab, USA)

สอบเทียบเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ รุ่น 4TE ยี่ห้อ AQUALAB โดยนำน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ใส่ในตลับตัวอย่าง จากนั้นนำเข้าเครื่องวอเตอร์แอคติวิตี้เพื่ออ่านค่าโดยต้องได้ค่าสอบเทียบวอเตอร์แอคติวิตี้อยู่ระหว่าง 0.997-1.003 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไส้กรอกอีสานจากข้อ 3.4.1.2 ใส่ในตลับตัวอย่างให้ได้ประมาณครึ่งตลับ แล้วเกลี่ยตัวอย่างให้เรียบแบนพอสมควร ใส่เข้าเครื่องและอ่านค่าวอเตอร์แอคติวิตี้และค่าอุณหภูมิที่ปรากฏบนหน้าจอแสดงผล จดบันทึกค่า ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.4.1.4 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.4.1.4.1 การเจือจางตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนเตรียมจากข้อ 3.4.1.2 ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุงปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลาย butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (BAM, 2003) ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) ที่ความเร็ว 8 นาน 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-8} ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* และปริมาณ *S. aureus*

3.4.1.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM, 2002)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.4.1 มาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี Aerobic Plate Count โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-4} - 10^{-8} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อระดับความเจือจางละ 2 จาน เททับ (pour plate)ด้วยอาหาร Plate count agar (PCA) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น cfu/g

3.4.1.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ISO, 1998; Swetwiwathana et al., 2007)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.4.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-4} - 10^{-8} โดยทำการปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe (MRS agar) + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ ระดับความเจือจางละ 2 จาน ทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) ลงบนจานเพาะเชื้อจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง และบ่มภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ในโถบ่มไร้ออกซิเจน (candle jar) ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนี รายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น cfu/g

3.4.1.4.4 การวิเคราะห์ *S. aureus* (BAM, 2002)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.4.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} โดยทำการปิเปตตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ (ปริมาตร 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) และที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird-Parker agar (BP agar) และทำการเกลี่ยเชื้อบนจานเพาะเชื้อจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีที่มีสีดำขอบขาว มีการตกตะกอนและรอบโคโลนีมี

บริเวณใส (clear zone) และสุ่มเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทำการทดสอบยืนยันเชื้อ โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร Brain Heart Infusion (BHI) broth ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติม rabbit plasma ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อดูการสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลส (coagulase) ทำการอ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma เนื่องจากเอมไซม์ coagulase ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น ซึ่งถ้าผลการทดสอบเกิดการแข็งตัว ถือว่า coagulase positive ถ้าไม่เกิดการแข็งตัวถือว่าไม่ใช่ coagulase positive จากนั้นจึงทำการคัดเลือกโคโลนีที่ให้ผลยืนยันเป็น coagulase positive เพื่อทำการส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus* โดยทำการส่งวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขต่อไป

3.4.1.4.5 การวิเคราะห์เซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* (BAM, 2002)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.4.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} โดยทำการปิเปตตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ (ปริมาตร 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) และที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) agar ทำการเกลี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีที่มีสีชมพู มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆโคโลนี โดยคัดเลือกจำนวน 3-5 โคโลนี มาทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity test) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแตะลงบนผิวหน้าอาหาร Trypticase soy sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกิริยา hemolytic positive โดยเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีการสร้างโซนใส และทำการส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* โดยทำการส่งวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขต่อไป

ทำการตรวจหาสปอร์ของ *B. cereus* โดยนำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.4.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} แบ่งใส่ขวดดูแรน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Baillie, 1964) และทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นทำการปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} จากขวดดูแรน จำนวน 3 ซ้ำ (ปริมาตร 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร) และที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MYP agar ทำการเกลี่ยเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีที่มีสีชมพู มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆโคโลนี โดยคัดเลือกโคโลนีมาทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic

activity test) โดยใช้อาหาร Trypticase soy sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกิริยา hemolytic positive โดยเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีการสร้างโซนใส (BAM, 2002) และทำการส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* โดยทำการส่งวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขต่อไป

3.4.1.4.6 การวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002)

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เตรียมตัวอย่าง จากข้อ 3.4.1.2 มาชั่งตัวอย่างละ 25 กรัมใส่ในถุงปลอดเชื้อ เติม Buffered peptone water ปริมาณ 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) ที่ความเร็ว 8 นาน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร Rappapost Vassiliadis Soya (RVS) broth ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร Muller-kauffman tetrathionate brilliant green (MKTTn) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดอาหาร RVS broth และ MKTTn broth มาทำการ steak plate ลงบนอาหาร Xylose Lysine Deoxycholate (XLD agar) และ Hektoen Enteric Agar (HE agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลา คือพบโคโลนีสีชมพูหรือมีสีดำตรงกลางหรือมีสีดำทั้งโคโลนีเนื่องจากการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์บนเพลทอาหาร XLD agar และลักษณะโคโลนี กลมสีฟ้าหรือฟ้าอมเขียว หรือสีดำ บนเพลทอาหาร HE agar จากนั้นทำการเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว เก็บเชื้อลงในหลอดอาหาร TSA agar เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้ ถ่ายเชื้อลงในอาหารทดสอบ Triple sugar iron (TSI) agar, Lysine-Indole-Medium (LIM) และ ยูเรีย (Urea agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกผล จากนั้นเลือกโคโลนีที่ให้ผลการยืนยันขั้นต้น ตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

TSI				LIM			Urea	VP
slant	butt	H_2S	gas	lysine	indole	motile		
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-	-	-

ที่มา: Ohashi และคณะ (1978)

ทำการทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางเซรั่มวิทยา เพื่อตรวจกลุ่มของเชื้อซัลโมเนลลา โดยหยด agglutinating antiserum ชนิด A-I ลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วใช้ลูปเขี่ยเชื้อจาก TSA agar เกลี่ยเชื้อให้ทั่วหยดของ antiserum บนสไลด์ และสังเกตการตกตะกอนของเชื้อในหยด antiserum ที่ใช้ทดสอบ ถ้าเป็นเชื้อซัลโมเนลลาจะเกิดการตกตะกอนของเชื้อขึ้น ถ้าไม่ใช่เชื้อจะละลายอยู่ในหยดของ antiserum จะมีสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนมทั้งหยด แล้วจึงส่งตรวจวิเคราะห์ยืนยัน เพื่อหาเซโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขต่อไป

3.4.1.5 การคัดเลือกและเก็บเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน

ทำการคัดเลือก และเก็บเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella* spp. ที่คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสาน และทดสอบยืนยันเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขแล้ว โดยนำเชื้อ *S. aureus*,*B. cereus* ท และ *Salmonella* spp. ที่แยกได้ จากข้อ 3.4.1.4.4-3.4.1.4.6 มา streak plate บนอาหาร TSA agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ จากนั้นถ่ายเชื้อในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อ *B. cereus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มเชื้อ *S. aureus* และ Salmonella ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อในหลอดอาหารทำการเก็บในรูปแบบ stock glycerol โดยใส่สารละลายกลีเซอรอลและเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลว ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ปริมาตรละ 0.5 มิลลิลิตร และเก็บเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินต่อไป

3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสาน (ดัดแปลงจาก Ennahar et al., 1999; Swetwiwathana et al., 2016 ; Arief et al., 2017)

3.4.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR536 จาก glycerol stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้ว จำนวน 1

มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เชื้อความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml

3.4.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากข้อ 3.4.1.5 ได้แก่ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella* spp. และเชื้อแบคทีเรียทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *B. cereus* 1062, *Lc. lactis* ATCC 19435, *En. faecalis* JCM 5803T, *Lb. sakei* subs sakei JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *P. pentosaceus* JCM 5885, *B. coagulans* JCM 2257T, *K. rhizophila* (M. luteus) NBRC/IF 12708 และ *Lis. innocua* ATTC 33090T จากข้อ 3.1.2.3 โดยทำการถ่ายเชื้อจาก glycerol stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่ม *B. cereus* 1062, *Lc. lactis* ATCC 19435, *En. faecalis* JCM 5803T, *Lb. sakei* subs sakei JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *P. pentosaceus* JCM 5885, *B. coagulans* JCM 2257T และ *K. rhizophila* (M. luteus) NBRC/IF 12708 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มเชื่อ *S. aureus, Salmonella* spp. และ *Lis. innocua* ATTC 33090T ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อความเข้มข้นที่ 10^6 cfu/ml

3.4.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน Plantaricin W ที่สร้างโดยเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ด้วยวิธี spot- on lawn (Mayr - Harting et al., 1972, Schillinger and Lucke., 1989, Corsetti et al., 2004)

นำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR536 จากข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนเพลทอาหาร Bacteriocin Screening Medium agar (BSM) โดยทำการแบ่งเพลทอาหารเป็น 4 ส่วน ทำการทดสอบเชื้อตัวอย่างละ 2 ช่อง รอจนหยดเชื้อบนจานเพาะเชื้อแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อกล้าแบคทีเรียแลคติกเจริญบนเพลทอาหาร BSM agar แล้ว จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนและเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน ที่เตรียมจากข้อ 3.4.2.2 โดยดูดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดใส่ในหลอดอาหาร TSA agar + 0.6 เปอร์เซ็นต์ yeast extract ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมและอุ่นอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไป vortex เพื่อให้เชื้อกระจายตัวในหลอดแล้วจากนั้นเทลงบนเพลทอาหาร BSM agar ที่มีการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกแล้ว บ่มจานเพาะเชื้อในโถบ่มไร้

ออกซิเจน (candle jar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบผลโดยดูการเกิดโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของกล้าแบคทีเรียแลคติก เพื่อสังเกตการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ โดยวัดขนาดความกว้างของโซนใสที่เกิดจากการยับยั้ง โดยใช้ไม้บรรทัดวัดความกว้างของโซนใสทั้ง 4 ด้าน บันทึกหน่วยเป็นเซนติเมตร นำมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินตามวิธีการใน ภาคผนวก ค. โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.3 ศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน โดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

ทำการเลี้ยงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 cfu/ml ตามขั้นตอนข้อ 3.4.2.1 และเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^6cfu/ml ตามขั้นตอนข้อ 3.4.2.2 จากนั้นจึงเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB) ในภาคผนวก ก.16 (มัลลิกา ไชยวุฒิ, 2555) โดยปรับปรุงจากสูตรแบบจำลองการหมักแหนม (Nham Model Broth, NMB) ของ Swetwiwathana และคณะ (1999) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที โดยกำหนดรูปแบบของแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานเป็นตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์เป็นชุดควบคุม (รูปแบบที่ 1) ตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อจุลินทรีย์ และเติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (รูปแบบที่ 2) ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (รูปแบบที่ 3) ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 4) และตัวอย่างที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml และเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) ดังนี้

รูปแบบที่ 1 คือ ISMB (ชุดควบคุม)

รูปแบบที่ 2 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

รูปแบบที่ 3 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

รูปแบบที่ 4 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 5 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ทำการบ่มขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ISMB ที่รูปแบบต่างๆ ทุก 6 ชั่วโมง ตั้งแต่วันที่เริ่มต้นใส่เชื้อที่ 0 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมงของการหมัก เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี จุลชีววิทยา ตรวจสอบความเข้มข้นและการสร้างสารแบคเทอริโอซินด้วยวิธี spot- on lawn และลักษณะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของแบคเทอริโอซิน ดังต่อไปนี้

3.4.3.1 การเก็บตัวอย่างในรูปแบบจำลองการหมัก

ทำการเก็บตัวอย่างในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา

3.4.3.2 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี

3.4.3.2.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (AOAC, 2000)

นำตัวอย่าง ISMB ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3.1 มาทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง

3.4.3.2.2 การวิเคราะห์ความเป็นกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

นำตัวอย่าง ISMB ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน(DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์49 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายเกิดเป็นสีชมพูอ่อน ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง และบันทึกผล เพื่อนำค่ามาคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

3.4.3.3 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.4.3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ISO, 1998**;** Swetwiwathana et al., 2007)

นำตัวอย่าง ISMB ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3.1 มาทำการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี spread plate บนอาหาร MRS agar + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ ตามวิธีการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ 3.4.1.4.3

3.4.3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. cereus* (BAM, 2002)

นำตัวอย่าง ISMB ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3.1 มาทำการวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดในรูปแบบจำลองการหมัก ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร TSA ตามวิธีการวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ 3.4.1.4.5

3.4.3.4 ศึกษาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Swetwiwathana et al., 2003)

ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน ในหลอดอาหาร TSB ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^8 ตามขั้นตอนจากข้อ 3.4.3.2 จากนั้นดูดเชื้อ *B. cereus* ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหาร TSB + 0.5 เปอร์เซ็นต์ agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้และรอจนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

เก็บตัวอย่างจากแบบจำลองการหมัก (ISMB) ทั้ง 5 รูปแบบ จากข้อ 3.4.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้โดยใช้หลอดฉีดยาปลอดเชื้อฉีดผ่านตัวกรอง (sterile polysuifone membrane) ขนาด 0.20 ไมครอน ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงทำการเจือจางสารแบคเทอริโอซินที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน(DI) แบบ 2 fold dilution ให้ได้ระดับการเจือจางที่ 1:0 1:1 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เททับด้วยเชื้อ *B. cereus* ที่เตรียมไว้ โดยทำการแบ่งช่องบนเพลทอาหารโดยไล่ระดับการเจือจางจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย จากนั้นรอจนหยดของเหลวบนผิวอาหารแห้ง จึงทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดโซนใส (clear zone) ที่เกิดจากการยับยั้งตามความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน โดยนำค่าความเจือจางที่ยับยั้งได้สูงสุดมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ โดยคิดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน Arbitrary Unit (AU/ml) ซึ่งคำนวณได้จากส่วนกลับของค่าอัตราการเจือจางสูงสุด ที่มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อมิลลิลิตร ดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน} = \frac{\text{ระดับการเจือจางสูงสุดที่เกิดการยับยั้ง} \times 1000 \text{ AU/ml}}{\text{ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (ไมโครลิตร)}}$$

3.4.3.4 ศึกษาลักษณะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

เก็บตัวอย่าง ISMB จากข้อ 3.4.3 โดยเลือกตัวอย่างรูปแบบที่ 4 คือ ISMB + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 24 และ ตัวอย่างรูปแบบที่ 5 คือ ISMB + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 36 ตามลำดับ รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge) มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสที่ได้ทิ้ง และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Swetwiwathana et al., 2003) และเติมสารละลายที่ช่วยรักษาสภาพเซลล์ เพื่อเตรียมส่งวิเคราะห์ตัวอย่าง ตามวิธีการใน ภาคผนวก ข ทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพื่อดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการหมักในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด SEM-EDS (IT500HR) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4 ศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะการหมักจริง

ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้าที่ยังไม่ผ่านความร้อน ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทนายฮั่ง อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด จังหวัดนนทบุรี มาทำการเตรียมไส้กรอกอีสานแบ่งเป็น 4 สูตร คือ

- สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (control)

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า 500 กรัม

- สูตรที่ 2 คือไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า 500 กรัม เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 cfu/ml จากข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- สูตรที่ 3 คือไส้กรอกอีสานที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า 500 กรัม เติมเชื้อ *B. cereus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml จากข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- สูตรที่ 4 คือไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า 500 กรัม เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 cfu/ml จากข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเชื้อ *B. cereus* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml จากข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำส่วนผสมไส้กรอกอีสานทั้งหมดบรรจุใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อและมัดให้เป็นตุ้ม โดยแต่ละตุ้มมีน้ำหนักประมาณ 25 กรัม จากนั้นรีดเอาอากาศออกและมัดให้แน่น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 1 และ 2 วัน หรือจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในไส้กรอกอีสาน โดยทำการวิเคราะห์ทางเคมีและทางจุลชีววิทยา โดยวิธีดังต่อไปนี้

3.4.4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของไส้กรอกอีสานในกระบวนการหมัก

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2, สูตรที่ 3 และ สูตรที่ 4 ระยะเวลาการหมัก 0, 1 และ 2 วัน มาทำการวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH) (AOAC, 2000) ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.4.1.3.1 และวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000) ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 3.4.1.3.2

3.4.4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 และ สูตรที่ 4 ระยะเวลาของการหมักที่ 0, 1 และ 2 วัน โดยการสุ่มไส้กรอกอีสานสูตรละ 75-100 กรัม (3-4 ตุ้ม) และทำการเตรียมตัวอย่าง ตามขั้นตอนที่ 3.4.1.2 จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร MRS agar + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ โดยใช้วิธี spread plate (ISO, 1998) ตามวิธีการข้อ 3.4.1.4.3

3.4.4.3 การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามมาตรฐานไส้กรอกอีสาน

นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรที่ 1, สูตรที่ 3 และ สูตรที่ 4 ระยะเวลาของการหมักที่ 0, 1 และ 2 วัน โดยการสุ่มไส้กรอกอีสานสูตรละ 75-100 กรัม (3-4 ตุ้ม) และทำการเตรียมตัวอย่าง ตามขั้นตอนที่ 3.4.1.2 จากนั้นนำมาวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนไส้กรอกอีสานหมู (มผช. 144/2555) ดังนี้

3.4.4.1.1 *Staphylococcus aureus* ตามวิธีการของ BAM (2002)

3.4.4.1.2 *Bacillus cereus* ตามวิธีการของ BAM (2002)

3.4.4.1.3 *Salmonella* spp. ตามวิธีการ ISO 6579: 2002 (2002)

รายละเอียดวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามข้อ 3.4.1.4.4-3.4.1.4.6

3.4.5 การตรวจสอบยืนยันการเหลือรอดของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในไส้กรอกอีสาน ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.4.5.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกอีสาน

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานแต่ละสูตร จากข้อ 3.4.4.1 ทำการสุ่มโคโลนีที่มีโซนใสที่เจริญบนอาหาร MRS agar+ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ นำมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวโดยใช้วิธี streak plate technique ลงบนอาหาร MRS agar + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ มาทำการยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ และตรวจสอบยืนที่สร้างแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ต่อไป

3.4.5.2 การตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR-RAPD)

3.4.5.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอ (DNA) โดยวิธีการให้ความร้อน (Packeiser และคณะ, 2556)

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่ทราบสายพันธุ์ (เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงจากข้อ 3.2) และเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ 1-2 โคโลนี มาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นให้ถังน้ำแข็งนาน 3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ส่วนใสด้านบน

3.4.5.2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) โดยเทคนิค PCR –RAPD

ปิเปตส่วนใสของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ที่เตรียมได้จากการหมุนเหวี่ยง จากข้อ 3.4.5.2.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาสังเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพเมอร์ OPA-3 (5'-AGTCAGCCAC-3') (Oneca et al., 2003) ที่จำเพาะกับแบคทีเรียแลกติกเข้าจับแบบสุ่ม ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	10x	1.0
$MgCl_2$	25 mM	0.8
dNTP	10 mM	0.4
Primer OPA – 3	10 µM	0.4
Taq DNA polymerase	5U/µl	0.2
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ		7.2
สารละลายดีเอ็นเอจากการหมุนเหวี่ยง		2.0
รวม		12

เตรียมสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยนำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

รอบที่ 1	94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที
รอบที่ 2-45	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที
	36 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
รอบที่ 3	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที

พักปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ เสร็จสิ้นลง ขั้นต่อไปคือทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ด้วยเครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.5.2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 3.4.5.2.2 มาผสมกับ 6X loading dye จากนั้นทำการตรวจสอบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TAE buffer โดยใช้ 100 bp DNA Ladder plus เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที จากนั้นถ่ายภาพเจลภายใต้

แสงอัตราไวโอเลตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล แล้วทำการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานกับรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่ทราบสายพันธุ์ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง โดยใช้โปรแกรม Quality one เพื่อยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกและ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน

3.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานในแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มจากแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน (ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย, ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม) และมีผลวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา และผลวิเคราะห์ทางเคมีของตัวอย่างในแต่ละแหล่งจำหน่ายเป็นตัวแปรตาม วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 16.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 จากนั้นศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและหลอดจำลองที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ต่อระยะเวลาในการหมักนาน 48 ชั่วโมง โดยมีผลวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และผลวิเคราะห์ทางเคมีเป็นตัวแปรตาม เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างหลอดจำลองทั้ง 5 รูปแบบ โดยใช้วิธี T-Test

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน

ทำการสำรวจเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน โดยเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานทั้งหมด 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งตามแหล่งจำหน่ายออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้ ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจาก ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จำนวน 19 ตัวอย่าง ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ตจำนวน 8 ตัวอย่าง และ ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากโรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานมาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่าง (พีเอช), ความเป็นกรดทั้งหมด, ความชื้น และค่า water activity และทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่ม *Salmonella, B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มักพบว่ามีการปนเปื้อนได้ในไส้กรอกอีสานและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักประเภทอื่นๆ

4.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน

ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอช ความเป็นกรดทั้งหมด ความชื้น และค่า water activity ของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้ง 30 ตัวอย่าง จากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม ดังตารางที่ 4.1 พบว่าค่าพีเอชเฉลี่ยที่ได้คือ 4.67, 4.64 และ 4.58 ตามลำดับ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด เท่ากับ 0.23, 0.30 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่าความชื้นเท่ากับ 43.40, 39.33 และ 33.83 เปอร์เซ็นต์ และค่า water activity เท่ากับ 0.982, 0.976 และ 0.970 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าพีเอชและค่าความเป็นกรดทั้งหมดของตัวอย่างไส้กรอกอีสานจากทั้ง 3 แหล่งจำหน่าย ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้นและค่า water activity ของไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอยมีค่ามากกว่าไส้กรอกอีสานจากห้างสรรพสินค้าและซูเปอร์มาร์เก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เนื่องจาก ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนที่ผลิตจากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย มักจะเป็นการผลิตเองในครัวเรือน และไม่มีการควบคุมคุณภาพและกระบวนการผลิต และปล่อยให้เกิดการหมักเองโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่มีการควบคุมอุณหภูมิและสภาวะแวดล้อมในกระบวนการหมัก จึงอาจทำให้ไส้กรอกอีสานที่ได้มีความชื้นและค่า water activity ที่สูงกว่าตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่มาจากห้างสรรพสินค้าและซูเปอร์มาร์เก็ต

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยพีเอช ความเป็นกรดทั้งหมด ความชื้นทั้งหมด และค่า water activity ของไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งจำหน่ายที่แตกต่างกัน ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

แหล่งจำหน่าย	พีเอช[ns]	ความเป็นกรดทั้งหมด (%)[ns]	ความชื้นทั้งหมด (%)	Water activity
ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย (19 ตัวอย่าง)	4.67	0.23	43.40[ab]	0.982[ab]
ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต (8 ตัวอย่าง)	4.64	0.30	39.33[a]	0.976[a]
โรงงานอุตสาหกรรม (3 ตัวอย่าง)	4.58	0.26	33.83[b]	0.970[b]
ค่าเฉลี่ย	4.64(±0.04)	0.28(±0.03)	39.86(±4.48)	0.98(±0.01)

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.1.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 30 ตัวอย่าง จากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบจากทั้ง 3 แหล่งจำหน่าย มีค่าอยู่ระหว่าง 10^6-10^8cfu/g โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 2.3×10^8, 4.8×10^7 และ 1.8×10^8 cfu/g ของตัวอย่างจากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม ตามลำดับ และพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง 1.1×10^6-1.1×10^8 cfu/g โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 3.9×10^7, 1.9×10^7 และ 2.9×10^7 cfu/g ตามลำดับ

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 19 ตัวอย่างจากแหล่งจำหน่ายตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และพบ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าทั้งหมด 8 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* และตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 67

เปอร์เซ็นต์ และพบเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus, S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

แหล่งจำหน่าย	***B. cereus***		***S. aureus***	***Salmonella* spp.**
	เซลล์	สปอร์		
ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย (19 ตัวอย่าง)	ND	ND	2 (11%)	18 (95%)
ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต (8 ตัวอย่าง)	ND	ND	ND	6 (75%)
โรงงานอุตสาหกรรม (3 ตัวอย่าง)	ND	1 (33%)	1 (33%)	2 (67%)
ทั้งหมด	0	1 (3%)	3 (10%)	26 (87%)

หมายเหตุ ND หมายถึง ตรวจไม่พบ (not detected)

จากการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 87 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นจากกลุ่มตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย พบจำนวน 18 ตัวอย่าง จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต พบจำนวน 6 ตัวอย่าง และจากโรงงานอุตสาหกรรม พบจำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบทางซีรั่มวิทยา (*Salmonella* groups) เพื่อทำการจัดกลุ่มของเชื้อ *Salmonella* spp. ผลการ การจัดกลุ่มพบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม C (23 ตัวอย่าง) และกลุ่ม E (6 ตัวอย่าง) ดังแสดงใน ตารางที่ 4.3

ทำการส่งตัวอย่างเพื่อยืนยันสายพันธุ์ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่า เชื้อ *Salmonella* spp. ในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 26 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งสิ้น 7 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบได้แก่ *Salmonella* Bovismorbificans จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Sal.* Corvallis จำนวน 2 ตัวอย่าง, *Sal.* Give จำนวน 1 ตัวอย่าง, *Sal.* Hvittingfoss จำนวน 9 ตัวอย่าง, *Sal.* Kedougou จำนวน 4 ตัวอย่าง, *Sal.* Krefeld จำนวน 4 ตัวอย่าง และ *Sal.* Rissen จำนวน 12 ตัวอย่าง ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจยืนยัน *Salmonella* groups และผลยืนยันซีโรวาห์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

แหล่งจำหน่าย	ตัวอย่าง	ตรวจพบเชื้อ *Salmonella*	*Salmonella* group	เซโรไทป์ที่ตรวจพบ
ตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย	19	18	Group C (16) Group E (3)	serovar Bovismorbificans (2) serovar Corvallis (2) serovar Give (1) serovar Hvittingfoss (6) serovar Kedougou (3) serovar Krefeld (2) serovar Rissen (12)
ห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต	8	6	Group C (4) Group E (2)	serovar Hvittingfoss (2) serovar Kedougou (1) serovar Krefeld (1) serovar Rissen (2)
โรงงานอุตสาหกรรม	3	2	Group C (3) Group E (1)	serovar Hvittingfoss (1) serovar Krefeld (1)

จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus, S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2548) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แหนมมากถึง 30 ตัวอย่าง คิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด และมีรายงานว่า อุกฤษฏ์ สุกใส และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองจากเนื้อสัตว์ในจังหวัดเชียงราย พะเยา แพร่ และน่าน โดยตรวจพบเชื้อก่อโรคในแหนม 71 ตัวอย่างจากทั้งตัวอย่าง 84 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 7 ตัวอย่าง และพบเชื้อ *S. aureus* จำนวน 11 ตัวอย่าง และ Baruzzi และคณะ (2006) ศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการผลิตซาลามี่ และตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อน เช่น *B. cereus* และ *S. aureus* ในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนั้นยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ที่มักพบปนเปื้อนได้ทั่วไปในอาหารหลากหลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มธัญพืช ข้าว สมุนไพรและเครื่องเทศ ที่เป็นส่วนผสมหลักของไส้กรอกอีสาน (Finlay et al.,

2002) และงานวิจัยของ Limsombun และคณะ (2012) ที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแบบดั้งเดิมของไทย (หม่ำ) โดยพบการปนเปื้อนคิดเป็น 15 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (จากทั้งหมด 100 ตัวอย่าง นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในกลุ่ม *L. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Salmonella* ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานและแหนมที่ไม่มีการควบคุมกระบวนการผลิต (Chokesajjawatee et al., 2010; Visessanguan et al., 2006)

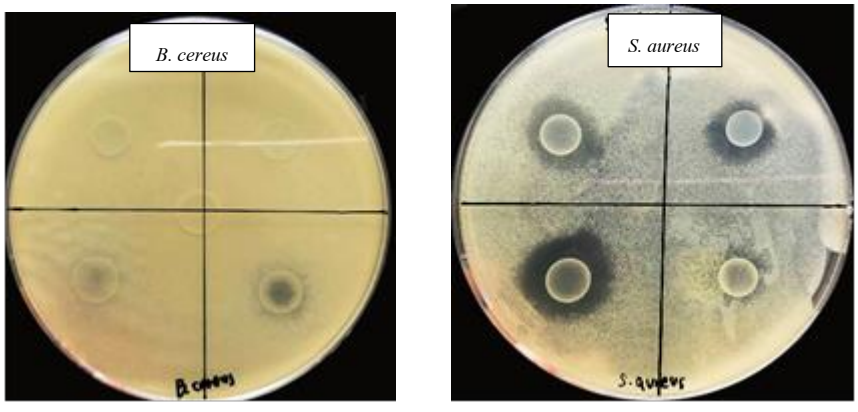
ไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากแหล่งจำหน่ายตลาดนัด รถเข็น และแผงลอยมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *S. aureus* และ *Salmonella* spp. มากที่สุด จากตัวอย่างทั้งหมดใน 3 แหล่งจำหน่าย เนื่องจากลักษณะของไส้กรอกอีสานที่เตรียมจำหน่ายโดยที่ยังไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนถูกวางจำหน่ายในสภาพแวดล้อมแบบเปิดโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษา ไม่มีการบรรจุในภาชนะปิดสนิทและถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรม ที่มีกระบวนการผลิตในระบบปิด ถึงแม้จะยังไม่ผ่านความร้อนแต่ตัวอย่างถูกบรรจุในภาชนะปิดสนิทและวางขายโดยมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้ตรวจพบเชื้อก่อโรคในกลุ่มนี้น้อยกว่าตัวอย่างที่พบจากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย ผลการวิเคราะห์ทางเคมีและการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องของค่าพีเอชและค่าความเป็นกรด ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน โดยที่เชื้อ *Salmonella* จะไม่สามารถเติบโตได้ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Swetwiwathana และคณะ (1999) และ Veerawatanayotin และคณะ (2010) รายงานว่าเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ไม่สามารถตรวจพบที่ pH ต่ำกว่า 4.5 ในผลิตภัณฑ์แหนมและแบบจำลองการหมักแหนม

การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *B. cereus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจากทั้ง 3 แหล่งจำหน่ายนั้น อาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาจากวัตถุดิบ ขั้นตอนการผลิตที่สามารถทำให้เกิดการปนเปื้อนกับผลิตภัณฑ์ และอาจเกิดจากการไม่รักษาสุขอนามัยส่วนบุคคลที่เหมาะสมของผู้ปฏิบัติ มีรายงานว่า *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษที่อุณหภูมิต่ำในข้าว และพบสปอร์ของ *B. cereus* อยู่ในส่วนประกอบของสารปรุงแต่งผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จึงทำให้พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ (Shinakawa et al., 1988) การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. มีสาเหตุมาจาก *Salmonella* spp. เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้ทั่วไปในเนื้อสัตว์และสัตว์ปีก ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไส้กรอกอีสาน และสามารถเกิดการปนเปื้อนได้

ตั้งแต่การเลือกซื้อวัตถุดิบ การจัดเก็บ รวมถึงการเก็บรักษาโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนได้ และการพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* เนื่องจากขั้นตอนการผลิตที่สามารถทำให้เกิดการปนเปื้อนกับผลิตภัณฑ์ และอาจเกิดจากผู้ปฏิบัติงานไม่ปฏิบัติตามสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดีในการปฏิบัติงาน (Paukatong and Kunawasen, 2001; Chokesajjawatee et al., 2010; Visessanguan et al., 2006)

4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในไส้กรอกอีสาน

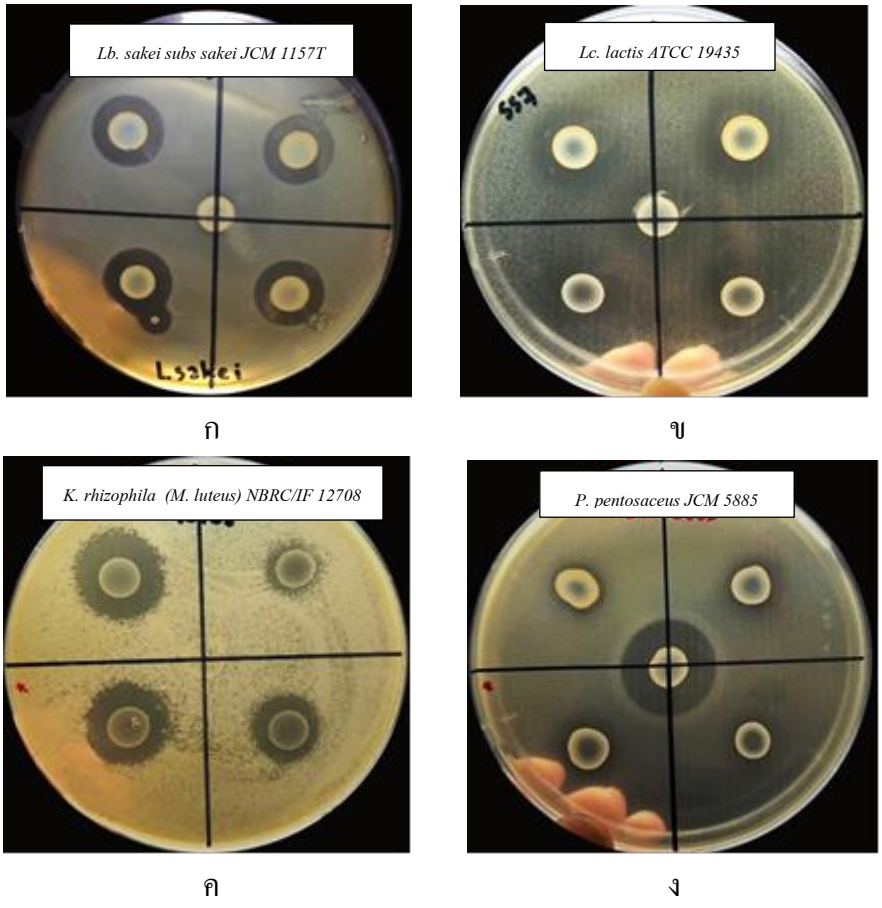
จากการสำรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน จากตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย จากห้างสรรพสินค้าและซุปเปอร์มาเก็ต และจากโรงงานอุตสาหกรรม พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่ม *B. cereus, S. aureus* และ *Salmonella* spp. ทำการคัดแยกและยืนยันสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยเทคนิค Spot-on-lawn ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่ตรวจพบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสาน และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการทดสอบ โดยทำการศึกษาและเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 และ *Lb. plantarum* SS7 ต่อเชื้อในกลุ่มต่างๆ ดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ก ข

ภาพที่ 4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ต่อเชื้อ *B. cereus* (ก) และ *S. aureus* (ข) ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนบนอาหาร BSM agar

ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 จากภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นความกว้างของการเกิดโซนใส (clear zone) ของสารแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งต่อเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนโดยที่โซนใสในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เฉลี่ยอยู่ที่ 0.13±0.057 เซนติเมตร (ซม.) และเชื้อ *S. aureus* เฉลี่ยอยู่ที่ 0.43±0.115 ซม. แสดงในตารางที่ 4.4



ก ข

ค ง

ภาพที่ 4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ทดสอบ (ก) *Lb. sakei subs sakei* JCM 1157T (ข) *Lc. lactis* ATCC 19435 (ค) *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708 (ง) *P. pentosaceus* JCM 5885 บนเพลทอาหาร BSM agar

จากผลการทดสอบการยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 และ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและแบคทีเรียแลคติกได้ เช่น *Lb. sakei* subs sakei JCM 1157T, *Lc. lactis* ATCC

19435, *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 4.2 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lis. innocua* ATTC 33090T ได้ดีที่สุด โดยค่าเฉลี่ยการยับยั้งอยู่ที่ 0.80±0.141 ซม. และจากผลการทดสอบสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ATCC 1062 ได้ถึง 0.60±0.353 ซม. และให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lc. lactis* ATCC 19435 และ *Lb. sakei subs sakei* JCM 1157T ได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยโซนใสที่ได้อยู่ที่ 0.96±0.378 ซม. และ 0.40±0.200 ซม. ตามลำดับ และไม่มีการยับยั้งเชื้อ *B. coagulans* JCM 2257T ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อแบคทีเรียแลคติกของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยช่วงการเกิดโซนใส (เซนติเมตร)*	
	P. pentosaceus TISTR536**	*Lb. plantarum* SS7**
เชื้อก่อโรคที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน		
B. cereus	-	0.13±0.057
S. aureus	-	0.43±0.115
เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร		
B. cereus ATCC 1062	0.20±0.141	0.60±0.353
B. coagulans JCM 2257T	0.00±0.000	0.00±0.000
K. rhizophila (M. luteus) NBRC/IF 12708	0.00±0.000	0.20±0.230
Lis. innocua ATTC 33090T	0.80±0.141	0.20±0.070
เชื้อแบคทีเรียแลคติก		
En. faecalis JCM 5803T	1.20±0.848	0.30±0.000
Lb. dextranicus JCM 5887T	1.00±0.378	0.40±0.100
Lb. sakei subs sakei JCM 1157T	0.20±0.141	0.40±0.200
Lc. lactis ATCC 19435	0.75±0.057	0.96±0.378
P. pentosaceus JCM 5885	0.95±0.404	0.37±0.208

หมายเหตุ * หมายถึง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

** หมายถึง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^6

- หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด Plantaricin W (Swetwiwathana et al., 2016) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus และ S. aureus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางสายพันธุ์ เช่น *B. cereus* ATCC 1062, *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708*, Lis. innocua* ATTC 33090T และแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ทดสอบได้ดี พบว่าจากเชื้อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 11 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ 10 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดโซนใส พบว่าแบคทีริโอซิน ที่ผลิจจากเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lc. lactis* ATCC 19435 ได้มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยโซนใสที่ได้อยู่ที่ 0.96±0.378 ซม. และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบปนเปื้อนในไส้กรอกอีสานได้ดี

แบคเทอริโอซิน เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Proteinaceous antimicrobial substance) ชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียบางชนิด มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย จึงทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนและสูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอตเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์โดนทำลาย (Klaenhammer, 1993; กฤตพร รำจวนเกียรติ, 2551) และพบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของฐาปนี และ ศิริกานต์ (2543) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ (outer membrane layer) ทำให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด Pediocin PA-1 จะพบว่า สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pediococcus* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่กว้างโดยสามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (Nielsen et al., 1990; Rozben et al., 1993; Schillinger Holzapzel, 1990) สอดคล้องกับรายงาน พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารได้หลายกลุ่ม เช่น *Lis. monocytogenes, Lis. inocua, S. aureus* และ *Salmonella* ที่พบปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อหมักและผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมัก (Swetwiwathana et al., 2003; Veerawatanayotin et al., 2010)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus* ที่พบในไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนและเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ได้ จากนั้นจึงนำเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มาทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน โดย

การใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสานต่อไป

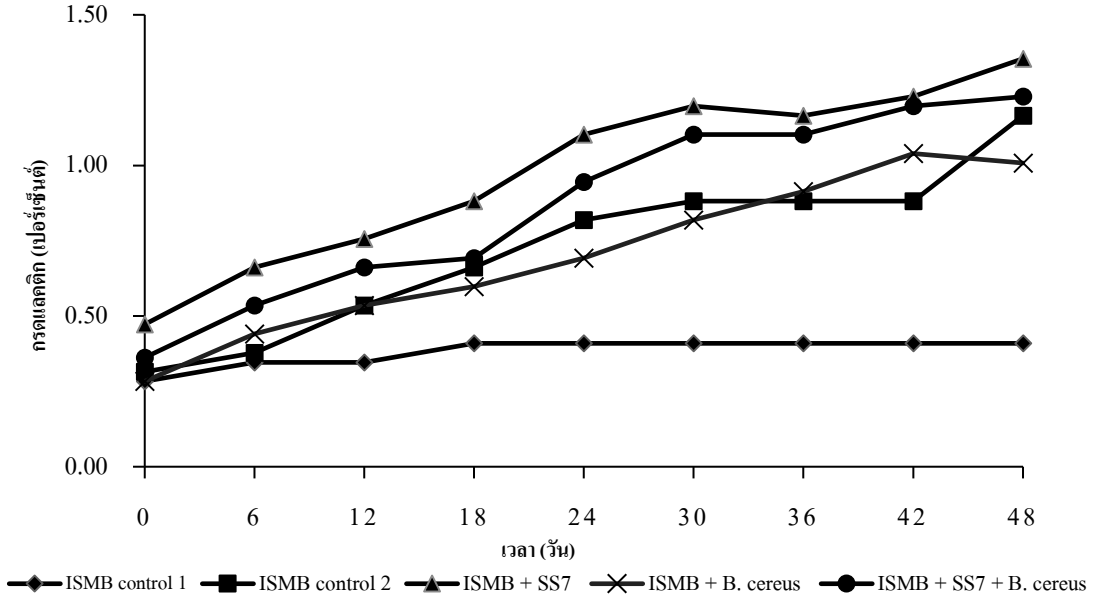
4.3 ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน โดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

จากการทดลองการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่พบปนเปื้อนในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 โดยวิธี spot-on-lawn บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM agar พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนได้ จากนั้นจึงทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* โดยการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เพื่อศึกษาผลของกรดแลคติก ค่าพีเอช การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติก และพีเอช ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

ทำการศึกษาการหมักไส้กรอกอีสานในรูปแบบจำลองรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การหมักไส้กรอกอีสานที่ไม่เติมกล้าเชื้อเป็นชุดควบคุม (รูปแบบที่ 1) การหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อ และเติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (รูปแบบที่ 2) การหมักที่เติมกระเทียม + กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (รูปแบบที่ 3) การหมักที่เติมกระเทียม + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 4) และการหมักที่เติมกระเทียม +กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่พบเริ่มต้นในแบบจำลองการหมักชุดควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 (รูปแบบที่ 1) อยู่ที่ 0.28±0.09 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็น 0.41±0.09 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 และแบบจำลองการหมักที่เติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (รูปแบบที่ 2) มีปริมาณกรดแลคติกที่ 0.32±0.05 เปอร์เซ็นต์ ถึง 1.17±0.22 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 ในแบบจำลองการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบที่เติมเชื้อ *B. cereus* (รูปแบบที่ 4) พบว่าปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นถึง 1.01±0.05 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 และรูปแบบที่เติมเชื้อ *B. cereus* และกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 (รูปแบบที่ 5) พบว่ามีปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นมากกว่ารูปแบบที่ไม่เติมกล้าเชื้อ โดยปริมาณกรดแลคติกเพิ่มจาก 0.36±0.07 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 1.23±0.00 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.3) ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ที่ลดลงในแต่ละช่วงระยะเวลาในการหมัก โดยค่าพีเอช

เริ่มต้นในแบบจำลองการหมักชุดควบคุมที่เติมและไม่เติมกระเทียม อยู่ที่ 6.66 และ 6.68 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าพีเอชอยู่ที่ 4.12 และ 6.56 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ ISMB control คือ ISMB (ชุดควบคุม)

ISMB + Gal คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

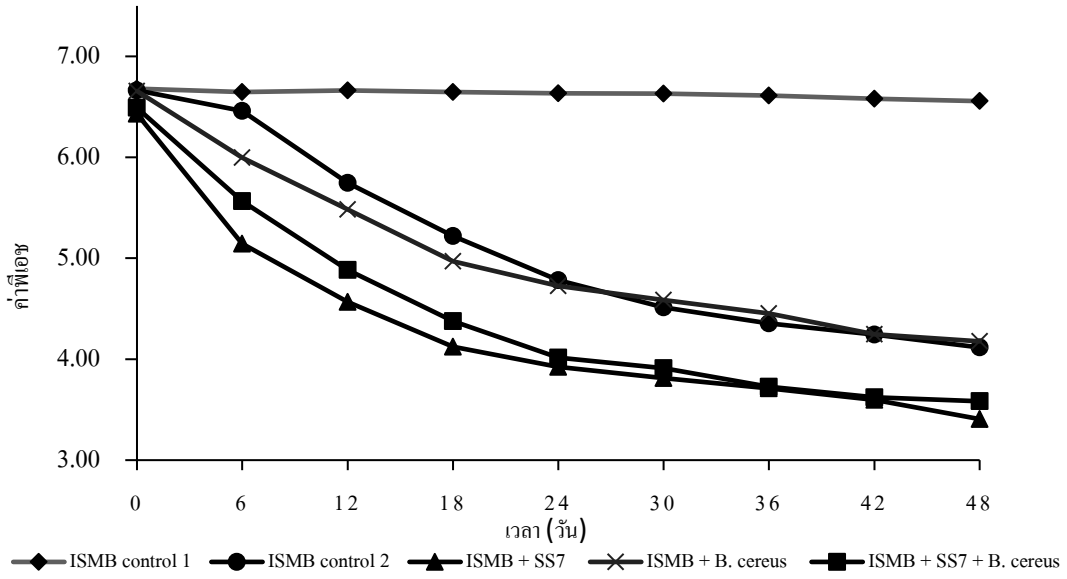
ISMB + SS7 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

ISMB + *B. cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ISMB + SS7 + *B. cereus* คือ ISMB+ กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองการหมักชุดที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน พบว่ารูปแบบที่เติมเชื้อ *B. cereus* อย่างเดียวมีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.66 และลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก จนถึงชั่วโมงที่ 48 มีค่าพีเอชอยู่ที่ 4.18 ส่วนรูปแบบที่เติมเชื้อ *B. cereus* และกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.49 ในระหว่างการหมักได้ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 ที่ชั่วโมงที่ 18 และลดลงจนมีค่าพีเอชอยู่ที่ 3.58 ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งจะเห็นได้ว่ารูปแบบที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มีการลดลงของค่าพีเอชได้เร็วกว่าตัวอย่างในรูปแบบที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (ภาพ

ที่ 4.4) ซึ่งค่าพีเอชที่ต่ำ อาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเจริญได้ช้ากว่าเนื่องจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ผลของค่าพีเอชที่ลดลงนอกจากเป็นเพราะเชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญในระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานมีการใช้กลูโคสและสารอาหารอื่นๆเป็นส่วนประกอบ ทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก และยังมาจากกระเทียมที่เติมลงไปในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน เนื่องจากสารอัลลิซิน (allicin) ที่มีอยู่ในกระเทียมมีคุณสมบัติกรดทำให้ค่าพีเอชของไส้กรอกอีสานลดลงในระหว่างการหมัก (Sallam et al., 2007; Yim et al., 2015) จึงเป็นสาเหตุให้ค่าพีเอชในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่เติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าพีเอชลดลง



ภาพที่ 4.4 แสดงค่าพีเอชในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ ISMB control คือ ISMB (ชุดควบคุม)

ISMB + Gal คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

ISMB + SS7 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

ISMB + *B. cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ISMB + SS7 + *B. cereus* คือ ISMB+ กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ตารางที่ 4.5 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ทั้ง 5 รูปแบบ บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	**รูปแบบที่ 1** **ISMB Control**		**รูปแบบที่ 2** **ISMB + Gal**		**รูปแบบที่ 3** **ISMB + Gal + SS7**		**รูปแบบที่ 4** **ISMB + Gal + *B.cereus***		**รูปแบบที่ 5** **ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus***	
	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด
0	6.68±0.14	0.28±0.09	6.66±0.11	0.32±0.05	6.43±0.29	0.47±0.09	6.66±0.13	0.28±0.00	6.49±0.20	0.36±0.07
6	6.65±0.13	0.35±0.05	6.46±0.14	0.38±0.00	5.14±0.35	0.66±0.09	6.00±0.17	0.44±0.05	5.57±0.31	0.54±0.05
12	6.66±0.15	0.35±0.05	5.75±0.08	0.54±0.05	4.57±0.10	0.76±0.09	5.48±0.31	0.54±0.05	4.88±0.12	0.66±0.09
18	6.65±0.13	0.41±0.05	5.22±0.13	0.66±0.09	4.12±0.14	0.88±0.05	4.97±0.25	0.60±0.05	4.38±0.23	0.69±0.14
24	6.63±0.13	0.41±0.05	4.78±0.09	0.82±0.05	3.92±0.08	1.10±0.05	4.73±0.39	0.69±0.05	4.02±0.08	0.95±0.00
30	6.63±0.13	0.41±0.05	4.51±0.06	0.85±0.09	3.81±0.04	1.20±0.05	4.59±0.45	0.82±0.14	3.91±0.06	1.10±0.05
36	6.61±0.12	0.41±0.05	4.35±0.17	0.88±0.05	3.71±0.01	1.17±0.11	4.45±0.37	0.91±0.05	3.73±0.02	1.10±0.14
42	6.58±0.10	0.41±0.05	4.24±0.12	0.88±0.05	3.60±0.09	1.23±0.00	4.25±0.21	1.04±0.25	3.62±0.03	1.20±0.05
48	6.56±0.09	0.41±0.09	4.12±0.04	1.17±0.22	3.41±0.19	1.35±0.11	4.18±0.18	1.01±0.05	3.58±0.10	1.23±0.00

หมายเหตุ รูปแบบที่ 1 ISMB Control คือ ISMB (ชุดควบคุม)

รูปแบบที่ 2 ISMB + Gal คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

รูปแบบที่ 3 ISMB + Gal + SS7 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

รูปแบบที่ 4 ISMB + Gal + *B.cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

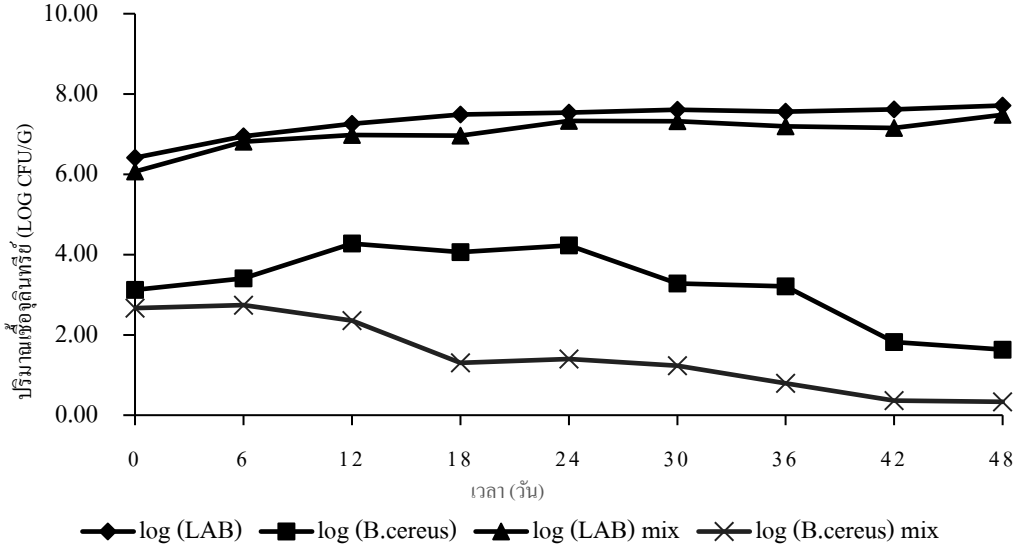
รูปแบบที่ 5 ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

4.3.2 ผลของการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

ผลการศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานโดยทำการเปรียบเทียบรูปแบบที่มีการเติม (รูปแบบที่ 3 และ 5) และไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 (รูปแบบที่ 4) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลคติกและเชื้อ *B. cereus* ดังภาพที่ 4.5 และตารางที่ 4.6 พบว่า แบบจำลองที่มีการเติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (รูปแบบที่ 3) มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียแลคติกจาก 6.41 log cfu/ml เพิ่มเป็น 7.71 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเปรียบเทียบกับแบบจำลองที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียแลคติกจนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยเพิ่มจาก 6.07 log cfu/ml เพิ่มเป็น 7.48 log cfu/ml (ตารางที่ 4.6) จำนวนของเชื้อ *B. cereus* ที่เปลี่ยนแปลงในรูปแบบจำลองไส้กรอกอีสานที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 พบว่ารูปแบบที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกนั้น (รูปแบบที่ 4) การเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml มีการลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 (ภาพที่ 4.5) เนื่องจากระยะแรกของการหมักเชื้อ *B. cereus* อาจจะยังใช้เวลาปรับตัวในรูปแบบจำลองการหมักจึงมีการเจริญน้อย แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีในแบบจำลอง ก่อนที่จะค่อยๆ ลดลงในชั่วโมงที่ 30 และเหลือเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 1.63 log cfu/ml ซึ่งพบว่าที่รูปแบบที่ 4 เชื้อ *B. cereus* ลดลง 1.49 log ในระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) พบว่ามีเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 2.67 log cfu/ml และเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 โดยลดลงจนถึง 1.30 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 18 และลดลงอย่างต่อเนื่องถึงชั่วโมงที่ 48 ซึ่งพบเชื้อ *B. cereus* อยู่ที่ 0.33 log cfu/ml ซึ่งการเติม *Lb. plantarum* SS7 ทำให้เชื้อ *B. cereus* ลดลง 2.34 log ในระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.6)

ผลของการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน แสดงให้เห็นการลดลงของเชื้อที่พบในแบบจำลองที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) เป็นผลมาจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น มีการสร้างกรดแลคติกในแบบจำลองการหมัก ทำให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเพิ่มขึ้น และมีค่าพีเอชลดลงในระหว่างการหมักมีผลต่อการลดลงของเชื้อ *B. cereus* โดยพบว่าที่สภาวะความเป็นกรด (ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5) สามารถลดการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ (Benedict et al., 1993) และคุณสมบัติของสารอัลลิซิน (allicin) ที่เป็น

สารที่มีอยู่ในกระเทียม ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายกลุ่มและเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่มีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรค (Swetwiwathana, 2000; Talia et al., 2001; Sallam et al., 2004) รวมถึงผลของการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่มีการสร้างสารแบคเทอริโอซินชนิด Plantaricin W มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน (2555) ได้ทำการศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi โดยศึกษาผลของการใช้ไนไตรท์ กระเทียม ความเป็นกรดร่วมกับสารแบคเทอริโอซิน โดยผลการศึกษาพบว่าผลของการใช้กระเทียมร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ที่พีเอช 4.5 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมได้



ภาพที่ 4.5 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plamtarum* SS7 และเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ log (LAB) คือ แบคทีเรียแลคติกในรูปแบบจำลอง ISMB+ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml
log (*B. cereus*) คือ เชื้อ *B. cereus* ในรูปแบบจำลอง ISMB + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml
log (LAB) mix คือเชื้อแบคทีเรียแลคติกในรูปแบบจำลอง ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml
log (*B. cereus*) mix คือ เชื้อ *B. cereus* ในรูปแบบจำลอง ISMB+ กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml + *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกและเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน เปรียบเทียบรูปแบบที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plamtarum* SS7 บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	**รูปแบบที่ 3** **ISMB + Gal + SS7**		**รูปแบบที่ 4** **ISMB + Gal + *B.cereus***		**รูปแบบที่ 5** **ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus***	
	LAB (log cfu/ml)	*B. cereus* (log cfu/ml)	LAB (log cfu/ml)	*B. cereus* (log cfu/ml)	LAB (log cfu/ml)	*B. cereus* (log cfu/ml)
0	6.41±0.47	-	-	3.12±0.04	6.07±0.53	2.67±0.28
6	6.94±0.04	-	-	3.40±0.18	6.81±0.09	2.74±0.54
12	7.25±0.02	-	-	4.27±0.08	6.98±0.07	2.35±0.31
18	7.49±0.30	-	-	4.05±0.85	6.97±0.04	1.30±0.30
24	7.54±0.30	-	-	4.23±0.62	7.33±0.28	1.39±0.08
30	7.61±0.43	-	-	3.27±0.21	7.32±0.04	1.23±0.24
36	7.56±0.30	-	-	3.20±0.18	7.19±0.36	0.79±0.42
42	7.62±0.16	-	-	1.82±0.51	7.15±0.17	0.35±0.47
48	7.71±0.21	-	-	1.63±0.35	7.48±0.24	0.33±0.35

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

LAB คือ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)

รูปแบบที่ 3 ISMB + Gal + SS7 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

รูปแบบที่ 4 ISMB + Gal + *B.cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 5 ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus* คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 + เชื้อ*B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

4.3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน

ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน พบว่าที่ระยะเวลาในการหมักตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง พบการสร้างแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงที่ 100 AU/ml และมีผล

การยับยั้งสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินสูงสุดอยู่ที่ 200 AU/ml และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินลดลงจนตรวจไม่พบ (ตารางที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่ากล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 สร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้สอดคล้องกับการลดลงของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (รูปแบบที่ 5) พบการลดลงของเชื้อ *B. cereus* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ที่ทำการหมักจนถึงสิ้นสุดการหมัก พบเชื้อ *B. cereus* เหลือรอดอยู่ที่ 0.33 log cfu/ml โดยในระยะแรกนั้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกกำลังปรับตัวและเจริญในแบบจำลองการหมัก จนถึงชั่วโมงที่ 24 ที่มีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียแลคติกเป็น 7.33±0.28 log cfu/ml (ตารางที่ 4.6) และมีการผลิตแบคเทอริโอซินในระหว่างการหมัก โดยพบการลดลงของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองสอดคล้องกับการสร้างแบคเทอริโอซินที่พบในชั่วโมงที่ 24 มีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินสูงสุดอยู่ที่ 200 AU/ml (ตารางที่ 4.7) และเนื่องจากสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตออกมายับยั้งจุลินทรีย์แล้วยังคงเหลืออยู่ในแบบจำลอง จึงทำให้พบความเข้มข้นในชั่วโมงที่ 30-36 อยู่ที่ 10-100 AU/ml เนื่องจากปัจจัยของความเป็นกรดและพีเอชที่อยู่ในแบบจำลองร่วมด้วยจึงทำให้แบคเทอริโอซินเสียประสิทธิภาพในการยับยั้ง จึงพบการความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินน้อยลงจนสิ้นสุดการหมัก

จากผลการทดสอบ พบว่าแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน สามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานได้ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaboré และคณะ (2013) ที่ศึกษาการยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ATCC 14579 ในตัวอย่างเนื้อบด โดยใช้เชื้อ *Lb. plantarum* UG1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด plantaricin UG1 โดยผลการยับยั้งของ *L. plantarum* UG1 ที่ผลิต plantaricin UG1 นั้น มีผลให้เชื้อ *B. cereus* ATCC 14579 ลดจำนวนลง 2 log cfu/g ที่ระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน (2555) ได้ทำการศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Sal.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม โดยพบว่าค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินสูงสุดที่ได้ คือ 3200 AU/ml ในชั่วโมงที่ 30 สามารถควบคุมเชื้อ *Sal.* Ratchaburi ได้ แต่ไม่สามารถทำลายได้ทั้งหมด และงานวิจัยของ มัลลิกา ไชยวุฒิ (2556) ที่ศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* RS49 ความเข้มข้น 400 AU/ml ในการยับยั้งเชื้อ *Sal.* Anatum ในแบบจำลองไส้กรอกอีสาน โดยมีแนวโน้มการลดลงของเชื้อที่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 30 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่พบในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*

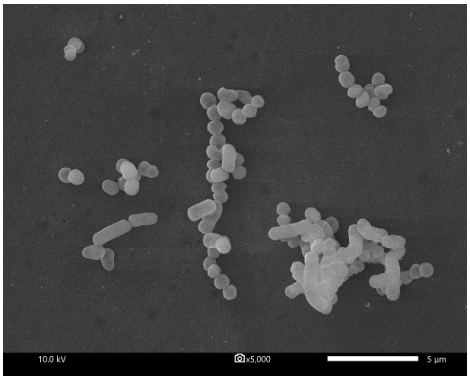
เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)*		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	0	0	0
6	0	0	0
12	0	0	0
18	100	10	55
24	200	200	200
30	100	100	100
36	10	10	10
42	0	0	0
48	0	0	0

หมายเหตุ * รูปแบบที่ 3 ISMB + Gal + SS7 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml ที่ใช้ในการทดลองหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน

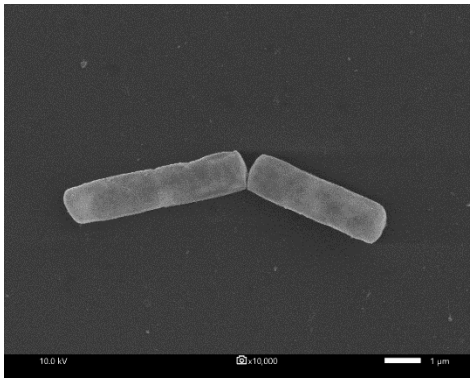
4.3.4 ลักษณะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

ผลการตรวจสอบลักษณะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมัก (รูปแบบที่ 4) ที่ชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4.6 ก และ ข) จะเห็นว่าเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองมีลักษณะเป็นรูปท่อนสมบูรณ์ ผนังเซลล์เรียบไม่มีรอยฉีกขาด เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ *B. cereus* ในแบบจำลองที่มีเชื้อ *B. cereus* ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (รูปแบบที่ 5) ชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 4.6 ค และ ง) ลักษณะของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด โดยพื้นผิวของเซลล์ขรุขระ ผนังเซลล์มีการฉีกขาด ทำให้ลักษณะเซลล์ไม่สมบูรณ์ และทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ *B. cereus* ในแบบจำลองที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ชั่วโมงที่ 36 (ภาพที่4.6 จ และ ฉ)

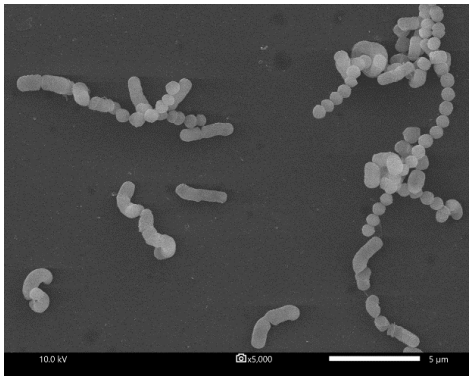
ก)



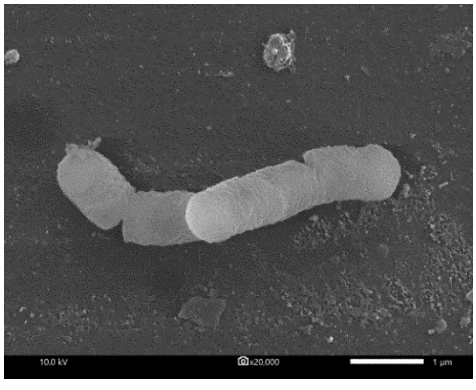
ข)



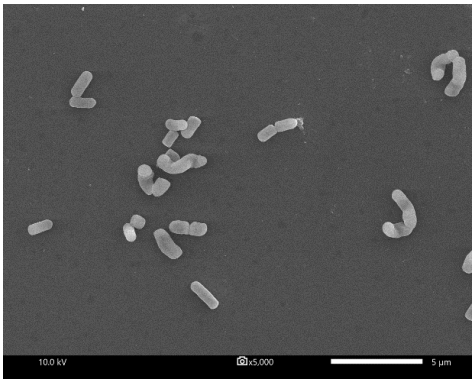
ค)



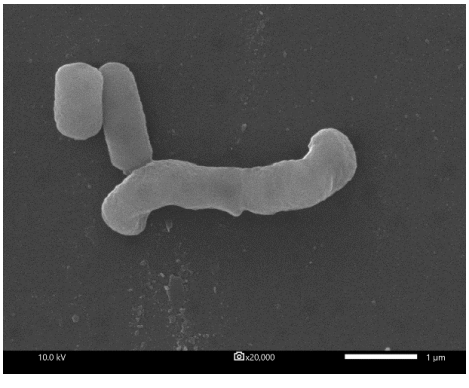
ง)



จ)



ฉ)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *B. cereus* ในรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสานที่ช่วงระยะเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

หมายเหตุ (ก), (ข) คือ ลักษณะของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 24 ที่กำลังขยาย 5000 และ 20000 เท่า

(ค), (ง) คือ ลักษณะของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมัก + *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ชั่วโมงที่ 24 ที่กำลังขยาย 5000 และ 20000 เท่า

(จ), (ฉ) คือ ลักษณะของเชื้อ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมัก + *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ชั่วโมงที่ 36 ที่กำลังขยาย 5000 และ 20000 เท่า

ลักษณะภายนอกของเซลล์ไม่พบการฉีกขาดหรือเสียหายของผนังเซลล์ แต่ลักษณะของเซลล์มีการบิดงอ ทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนไป จากภาพ จะเห็นได้ว่า *B. cereus* ที่พบในชั่วโมงที่ 24 ลักษณะเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับภาพเซลล์ในชั่วโมงที่ 36 เนื่องจากการสร้างแบคเทอริโอซินที่พบในชั่วโมงที่ 24 มีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินสูงสุดอยู่ที่ 200 AU/ml (ตารางที่ 4.6) จึงอธิบายได้ว่า ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักในแบบจำลองไส้กรอกอีสาน เซลล์ของ *B. cereus* เสียสภาพเนื่องจากสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ได้มากที่สุด (ภาพที่ 4.6) โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ *B. cereus* ที่พบเนื่องจากการทำงานของสารแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ทำให้เกิดการรั่วไหลของไอออนจากนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่าย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550; Khan et al., 2016)

4.4 ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน

จากผลการทดลองในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน พบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ในแบบจำลองได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างกระบวนการหมัก การทดลองใช้ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้า จากบริษัทนายฮั่ง อินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่างทั้ง 4 สูตร ดังนี้ สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (control), สูตรที่ 2 คือไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml, สูตรที่ 3 คือไส้กรอกอีสานที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml และสูตรที่ 4 คือไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml โดยทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1 และ 2 เพื่อทำการวิเคราะห์ค่าพีเอช ความเป็นกรดแลคติกและตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแลคติก เชื้อ *B. cereus* และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามมาตรฐานในตัวอย่างไส้กรอกอีสานต่อไป

4.4.1. ค่าพีเอชและกรดแลคติก ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน

ผลการทดลองวิเคราะห์ค่าพีเอชและกรดแลคติก ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน พบว่าวันที่ 0 ของการหมัก ไส้กรอกอีสาน สูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.97±0.44, 5.82±0.36, 5.85±0.34 และ 5.90±0.43 ตามลำดับ เมื่อทำการหมักครบ 2 วัน ไส้กรอกอีสานแต่ละสูตรมีค่าพีเอชที่ลดลงอย่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($p>0.05$) คือมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.09±0.25, 3.97±0.13, 4.03±0.22

และ 3.98±0.24 ตามลำดับ โดยค่าพีเอชที่ลดลงแปรผันตรงกับปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก จากผลการวิเคราะห์ วันที่ 0 ของการหมัก มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก เท่ากับ 0.29±0.08, 0.36±0.06, 0.28±0.04 และ 0.28±0.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการหมักครบ 2 วัน ไส้กรอกอีสานแต่ละสูตร มีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.74±0.18, 1.03±0.38, 0.86±0.35 และ 0.90±0.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) โดยกระบวนการหมักให้เกิดกรดแลคติกนั้นเกิดจากจุลินทรีย์ที่อยู่ตามโดยธรรมชาติมีทั้งจุลินทรีย์ที่สร้างกรดและทำให้อาหารเน่าเสีย และกลุ่มแบคทีเรียแลคติก และรวมทั้งกล้าเชื้อที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ มีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นตัวกลางของการสร้างกรดแลคติกจึงทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545; Visessanguan et al., 2006) จึงทำให้ค่าพีเอชและความเป็นกรด ในวันสุดท้ายของการหมักตัวอย่างไส้กรอกอีสานในแต่ละสูตรไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.8 ค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในระหว่างการหมัก ที่ 0, 1 และ 2 วัน

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	สูตร control		สูตร + SS7		สูตร +*B. cereus*		สูตร + SS7+*B. cereus*	
	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	pH	เปอร์เซ็นต์กรด
0	5.97±0.44^{a}	0.29±0.08^{b}	5.82±0.36^{a}	0.36±0.06^{b}	5.85±0.34^{a}	0.28±0.04^{b}	5.90±0.43^{a}	0.28±0.07^{b}
1	4.59±0.54^{b}	0.45±0.03^{b}	4.27±0.22^{b}	0.58±0.06^{b}	4.39±0.35^{b}	0.48±0.08^{b}	4.30±0.28^{b}	0.58±0.05^{b}
2	4.09±0.25^{b}	0.74±0.18^{a}	3.97±0.13^{b}	1.03±0.38^{a}	4.03±0.22^{b}	0.86±0.35^{a}	3.98±0.24^{b}	0.90±0.32^{a}

หมายเหตุ สูตร control หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (control)
สูตร + SS7 หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^{6} cfu/ml
สูตร + *B. cereus* หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^{4} cfu/ml
สูตร + SS7+B. cereus หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^{6} cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^{4} cfu/ml
a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

4.4.2 การเจริญของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน

เมื่อทดลองใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^{6} cfu/ml เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน โดยทำการเปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานสูตรที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกในวันแรกของการหมัก วันที่ 0 ของสูตรมีการเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 10^{6} cfu/ml (สูตรที่ 2) มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 6.114 log cfu/g สูตรที่เติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 10^{6} cfu/ml และเชื้อ

ตารางที่ 4.9 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานในระหว่างการหมัก วันที่ 0, 1 และ 2

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	จุลินทรีย์ที่พบ	สูตรที่ 1 สูตร control	สูตรที่ 2 สูตร + SS7	สูตรที่ 3 สูตร +*B. cereus*	สูตรที่ 4 สูตร + SS7+*B. cereus*
0	LAB (log cfu/g)	5.959	6.114	5.819	6.255
	S. aureus (log cfu/g)	2.301	-	-	1.477
	B. cereus (log cfu/g)	3.000	ND	3.653	3.176
	Salmonella (ต่อตัวอย่าง 25 g.)	ND	-	-	ND
1	LAB (log cfu/g)	7.114	8.000	7.623	7.505
	S. aureus (log cfu/g)	ND	-	-	1.301
	B. cereus (log cfu/g)	ND	ND	2.301	ND
	Salmonella (ต่อตัวอย่าง 25 g.)	ND	-	-	ND
2	LAB (log cfu/g)	7.431	8.041	7.612	8.079
	S. aureus (log cfu/g)	ND	-	-	ND
	B. cereus (log cfu/g)	ND	ND	ND	ND
	Salmonella (ต่อตัวอย่าง 25 g.)	ND	-	-	ND

หมายเหตุ สูตร control หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (control)

สูตร + SS7 หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

สูตร + *B. cereus* หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

สูตร + SS7+B. cereus หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

LAB หมายถึง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (log cfu/g)

ND หมายถึง ตรวจไม่พบ (Not Detect)

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

B. cereus 10^4 cfu/ml ร่วมกัน (สูตรที่ 4) มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 6.255 log cfu/g ส่วนไส้กรอกอีสานสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 5.959 log cfu/g และวันที่ 2 ของการหมักปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น พบว่าสูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 (สูตรที่ 2) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 8.041 log cfu/g สูตรที่เติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 และเชื้อ *B. cereus* ร่วมกัน (สูตรที่ 4) มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 8.041 log cfu/g และสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก อยู่ที่ 7.431 log cfu/g (ตารางที่ 4.9) เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่พบระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานในวันที่ 0 และวันที่ 2 พบว่า ไส้กรอกอีสานสูตรที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกกลุ่มมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อ (สูตรที่ 1) เนื่องจากไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml มีปริมาณของเชื้อเริ่มต้นมากกว่ากลุ่มควบคุมทำให้อัตราการเติบโตและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแลคติกสูงกว่า ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ซึ่งพบมีการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่มาจากวัตถุดิบซึ่งมีตามธรรมชาติและไม่สามารถควบคุมได้ จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการเจริญได้น้อยกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 พบว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะพีเอชต่ำ และความเป็นกรดที่สูง ทำให้สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ในระหว่างกระบวนการหมัก จึงช่วยในเรื่องความปลอดภัยในการบริโภคไส้กรอกอีสาน (Klaenhammer, 1993; Ennahar et al., 2000; Woraprayote et al., 2013)

4.4.3 ผลการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตามมาตรฐานไส้กรอกอีสาน

ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างไส้กรอกที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่าเมื่อเปรียบเทียบไส้กรอกอีสานสูตรที่ 3 ที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml กับไส้กรอกอีสานสูตรที่ 4 ที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ร่วมกัน พบว่า เชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นในวันที่ 0 เท่ากับ 3.653 log cfu/g และ3.000 log cfu/g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) โดยตัวอย่างที่เติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ยังสามารถตรวจพบเชื้อ *B. cereus* อยู่ที่ 2.301 log cfu/g ในวันที่ 1 แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในวันที่ 2 ของการหมัก เปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานสูตรที่ 4 ที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml โดยตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ตั้งแต่วันที่ 1 และ 2 ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าไส้กรอกอีสานที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในการหมัก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานได้

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ในกลุ่ม *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน โดยเปรียบเทียบไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในระหว่างการหมักวันที่ 0, 1 และ 2 ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานปริมาณ 25 กรัม โดยตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) และไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (สูตรที่ 4) ในวันที่ 0 ของการหมัก พบเชื้อ *S. aureus* ที่ 2.301 log cfu/g และ 1.477 log cfu/g ตามลำดับ และตรวจไม่พบในวันที่ 2 ของทุกตัวอย่าง ผลการตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อในระหว่างการหมักวันที่ 0, 1 และ 2 ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานปริมาณ 25 กรัม โดยตรวจพบในตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) และไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (สูตรที่ 4) ในวันที่ 0 ของการหมัก และตรวจไม่พบในวันที่ 1 และ 2 ของทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4.9) สอดคล้องกับงานวิจัยของ มัลลิกา ไชยวุฒิ (2556) ศึกษาการใช้แบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* RS49 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานต่อการยับยั้งเชื้อ *Sal.* Anatum ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน โดยเปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานที่ทำการหมักตามธรรมชาติ ผลการทดลองตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Sal.* Anatum ในไส้กรอกอีสานตลอดระยะเวลาในการหมัก 2 วัน

การเติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสาน มีผลให้ผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและช่วยให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ในไส้กรอกอีสานได้ และส่งผลต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดี (Lücke, 2000) เช่น *Salmonella* spp. ที่ไม่สามารถเจริญได้ในค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 รวมถึงคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน ที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกลุ่ม *B. cereus* และ *S. aureus* ที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ และยังช่วยในเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภคอีกด้วย (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533; Ammor et al., 2007) สอดคล้องกับการทดลองของ อรุณวรรณ อินทร์ช่วย และคณะ (2554) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D4 เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมเนื้อโค โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0 และ 3 เพื่อตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่าง พบว่า ในวันที่ 3 ตรวจไม่พบเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในตัวอย่างแหนม เนื่องจากตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. salivarius* D4 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด ทำให้ค่าพีเอชลดลงและความเป็นกรดสูงขึ้น ทำให้ตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคในวันสุดท้ายของการหมัก และงานวิจัยของ Vural (1998) มีการศึกษาการใช้แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. acidilactici* เพื่อเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักไส้กรอกกึ่งแห้งของตุรกี พบว่าการใช้กล้าเชื้อ

สามารถควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และยังช่วยคุณภาพของไส้กรอกกึ่งแห้ง และเมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับของผู้บริโภคอีกด้วย

จากผลการทดลองสรุปว่าไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml และตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่สิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยผลที่ได้เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2555) ที่ห้ามตรวจพบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่าง 25 กรัม, *S. aureus* ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และ *B. cereus* ต้องพบน้อยกว่า 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งจากผลการทดลอง เป็นการยืนยันการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการผลิตไส้กรอกอีสานให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและได้รับการยอมรับตามมาตรฐานกำหนดอีกด้วย

4.5 ผลการตรวจสอบยืนยันการเหลือรอดของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในไส้กรอกอีสานด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

จากการทดลองการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานได้ จึงทำการเก็บตัวอย่างโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย แลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานแต่ละสูตร จากข้อ 4.4 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ จากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน สูตรที่ 1 คือ ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, สูตรที่ 2 คือ ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และสูตรที่ 4 คือไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ในระหว่างการหมักวันที่ 0, 1 และ 2 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแลคติกที่ทราบสายพันธุ์ มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อมาตรฐานโดยการทำเทคนิคพีซีอาร์ด้วยการใช้ไพรเมอร์ OPA-3 (5′-AGTCAGCCAC-3′) (Oneca et al., 2003) เพื่อจำแนกกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเปรียบเทียบแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานสูตรที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 กับแบคทีเรียแลคติกที่ทราบสายพันธุ์ โดยนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer โดยใช้ 100 bp DNA Ladder plus เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (marker) เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่พบ โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสงอัตราไวโอเลตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล พบขนาดแถบดีเอ็นเอของเชื้อแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 4.10

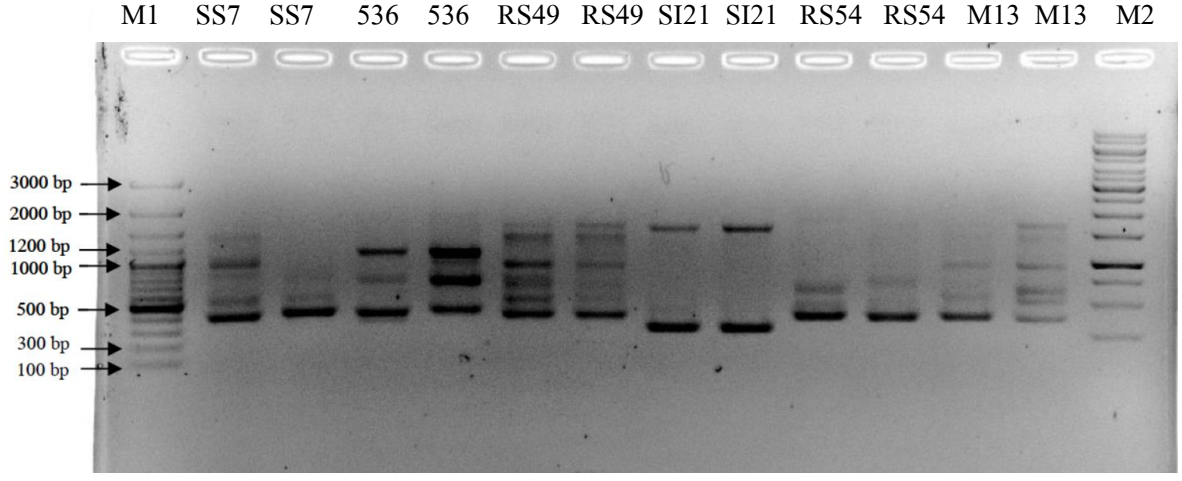
ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอที่พบจากกล้าเชื้อและเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า ที่ 50 โวลต์ นาน 90 นาที

เชื้อแบคทีเรียแลคติก	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบบนอะกาโรสเจล (คู่เบส)
Lb. plantarum SS7	300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1800
Lb. plantarum RS 49	300 400 600 650 1000 1550
Lb. plantarum RS 54	300 500 700 800 1000 1500
P. pentosaceus TISTR 536	300 700 750 1200
P. pentosaceus M13	300 700 750 1000
W. cibaria SI 21	300 350 650 1200 1700

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 และเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทราบสายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. plantarum* RS54, RS49 และ NF38, *P. pentosaceus* TISTR 536 และ M13 และ *W. cibaria* SI21 ที่ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ซึ่งเป็นไพรเมอร์สายสั้นเพียงชนิดเดียวมีประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับเบส ด้วยการจับแบบสุ่ม (สุกัญญา วาวงค์ และคณะ, 2554) พบว่าจากการจำแนกแถบดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก ในกลุ่ม *Lb plantarum, P. pentosaceus* และ *W. cibaria* นั้น สามารถระบุความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่พบในแต่ละสายพันธุ์ได้ (ตารางที่ 4.10) โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่สามารถพบได้ในกระบวนการหมักไส้กรอกอีสาน มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันแต่จะมีแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบเฉพาะ ที่ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่างและเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานออกจากกันได้

จากการสุ่มโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสานแต่ละสูตร จำนวนตัวอย่างละ 20 โคโลนี มาตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่พบตามวิธีการข้างต้น พบว่าที่กระบวนการหมักวันที่ 0 ไส้กรอกอีสานสูตรไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) พบลักษณะเชื้อที่มีแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 จำนวน 2 โคโลนี (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์) พบเป็นเชื้อกลุ่มอื่นอีก 15 โคโลนี (คิดเป็น 75เปอร์เซ็นต์) และไม่พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 โคโลนี (คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์) เปรียบเทียบกับไส้กรอกอีสานเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml พบเชื้อในกลุ่ม *Lb. plantarum* SS7จำนวน 7 โคโลนี (คิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์) และเชื้อกลุ่มอื่น 11 โคโลนี (คิดเป็น 55

เปอร์เซ็นต์) จากผลการวิเคราะห์พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในสัดส่วนมากกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อ และพบว่าตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ร่วมกัน (สูตรที่ 4) พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 จำนวน 5 โคโลนี (คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งน้อยกว่าไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้ออย่างเดียว เนื่องจากวันแรกของการบวนการหมัก กล้าเชื้ออาจจะยังไม่สามารถปรับตัวได้ดีในสภาวะการหมักไส้กรอกอีสานจริง และเนื่องจากการเติมเชื้อ *B. cereus* ร่วมด้วย ทำให้มีการแข่งขันการเจริญของกล้าเชื้อและเชื้อก่อโรค จึงตรวจพบกล้าเชื้อเหลือรอดน้อยกว่าตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว และยังมีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ ในกลุ่ม *Lb. plantarum, P. pentosaceus* และ *W. cibaria* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่มักพบในไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งมีอยู่ในวัตถุดิบและสามารถพบได้ในกระบวนการหมักตามธรรมชาติ เช่นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มของ *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella* และ *Enterococcus* (Ammor et al., 2005; Martín et al., 2005; Santos et al., 2005)



ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer ที่ 50 โวลต์ นาน 90 นาที

ช่อง M1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder plus

ช่อง SS7 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7

ช่อง RS49 และ RS54 คือ *Lb. plantarum* RS49 และ RS54

ช่อง T536 และ M13 คือ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ M13

ช่อง SI21 คือ *Weissella cibaria* SI 21

ช่อง M2 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder

ผลการตรวจตัวอย่างวันที่ 1 พบว่าไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml ทั้งหมด 20 โคโลนี พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ถึง 10 โคโลนี (คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นสัดส่วนที่มากกว่า ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ร่วมกัน (สูตรที่ 4) ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ 7 โคโลนี (คิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์) เทียบกับสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) ที่พบน้อยสุดคือ 3 โคโลนี (คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักวันที่ 2 พบว่า ไส้กรอกอีสานกลุ่มที่เติมกล้าเชื้ออย่างเดียว พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มากกว่าไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ร่วมกัน คือพบ 12 และ 8 โคโลนี (คิดเป็น 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ โดยที่ตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) พบแค่ 3 โคโลนี (คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์) จึงสรุปได้ว่า ในระยะเริ่มต้นของการหมัก วันที่ 0 ตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (สูตรที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีความหลากหลาย และมีบางส่วนที่แถบดีเอ็นเอคล้ายกับกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 เนื่องจากกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกมาได้จากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน (Swetwiwathana et al., 2016) โดยพบว่าสามารถพบได้ในตัวอย่างและอาจมาจากกระบวนการผลิตได้ และมีบางส่วนที่ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากความเป็นไปได้ที่เชื้อยังไม่เจริญได้ดีในระยะแรกของการหมัก จึงสุ่มตรวจไม่พบ เมื่อเทียบกับไส้กรอกอีสานที่มีการเติมกล้าเชื้ออีก 2 สูตร ซึ่งในวันที่ 0 ของกระบวนการหมัก จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 อยู่บ้างแต่ยังมีปริมาณที่น้อยอยู่ เมื่อเทียบกับวันที่ 2 ของการหมัก ที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญได้เต็มที่แล้ว จึงพบกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในตัวอย่างของการหมักในวันที่ 2 มากกว่า

จากผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน โดยเปรียบเทียบสูตรที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ผลการทดลองพบว่า ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 2 ของการหมักทั้งหมด 20 โคโลนี พบว่ามี 12 โคโลนี (คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์)ซึ่งมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Lb. plantarum* SS7 ซึ่งมากกว่าที่ตรวจพบในตัวอย่างไม่เติมกล้าเชื้อ จึงสรุปผลการทดลองได้ว่า ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในผลิตภัณฑ์จนถึงวันสุดท้ายที่สิ้นสุดกระบวนการหมักได้

ตารางที่ 4.11 ผลการตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่พบในไส้กรอกอีสานที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 0, 1 และวันที่ 2

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	สูตร	จำนวน (โคโลนี)	จำนวนโคโลนีแบคทีเรียแลคติกที่พบ (เปอร์เซ็นต์)				
			Lb. plantarum SS7	*Lb. plantarum* RS49 และRS54	*P. pentosaceus* TISTR536 และ M13	W. *cibaria* SI21	ไม่พบแบนดีเอ็นเอ
0	สูตร control	20	2 (10%)	7 (35%)	6 (30%)	2 (10%)	3 (15%)
	สูตร + SS7	20	7 (35%)	9 (45%)	2 (10%)	0 (0%)	2 (10%)
	สูตร + SS7+*B. cereus*	20	5 (25%)	10 (50%)	4 (20%)	1 (5%)	0 (0%)
1	สูตร control	20	3 (15%)	7 (35%)	4 (20%)	2 (20%)	3 (15%)
	สูตร + SS7	20	10 (50%)	5 (25%)	3 (15%)	1 (5%)	1 (5%)
	สูตร + SS7+*B. cereus*	20	7 (35%)	8 (40%)	2 (10%)	0 (0%)	1 (5%)
2	สูตร control	20	3 (15%)	10 (50%)	5 (25%)	1 (5%)	2 (20%)
	สูตร + SS7	20	12 (60%)	5 (25%)	2 (10%)	0 (0%)	1(5%)
	สูตร + SS7+*B. cereus*	20	8 (40%)	7 (35%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)

หมายเหตุ สูตร control หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ (control)

สูตร + SS7 หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

สูตร + SS7 + *B. cereus* หมายถึง ไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml.

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง พบว่าจากแหล่งจำหน่ายตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย 19 ตัวอย่าง ตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. 18 ตัวอย่าง คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และพบ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากห้างสรรพสินค้าทั้งหมด 8 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 6 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* และตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. 2 ตัวอย่าง และพบเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* จำนวน 1 ตัวอย่าง และจากการตรวจสอบพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonell*a spp. ในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนทั้งหมด 26 ตัวอย่างจากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เมื่อทำการทดสอบทางซีรั่มวิทยา (*Salmonella* groups) พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม C (23 ตัวอย่าง) และกลุ่ม E (6 ตัวอย่าง) เมื่อยืนยันสายพันธุ์แล้ว พบว่าสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ *Salmonella* Rissen จากตัวอย่างในแหล่งจำหน่ายตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกอีสาน ด้วยเทคนิค Spot-on-lawn พบว่าแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* SS7 ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด Plantaricin W สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus* ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางสายพันธุ์ได้แก่ *Lb. sakei* subs sakei JCM 1157T, *Lc. lactis* ATCC 19435, *K. rhizophila* (*M. luteus*) NBRC/IF 12708 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 เมื่อเปรียบเทียบขนาดโซนใส พบว่าแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lc. lactis* ATCC 19435 ได้มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยโซนใสที่ได้อยู่ที่ 0.96±0.378 เซ็นติเมตร.

ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* โดยใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในสภาวะจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน พบว่ารูปแบบที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml ชั่วโมงที่ 48 ค่าพีเอชเท่ากับ 3.58±0.10 และปริมาณกรดแลคติก เท่ากับ 1.23±0.00 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *B. cereus* ที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml พบว่ามีการลดลงของ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 จนถึงชั่วโมงที่ 48 มีเชื้อเหลือรอดเท่ากับ 1.30±0.30 log cfu/ml และผลการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย

แลคติก *Lb. plantarum* SS7 พบว่าที่ชั่วโมงที่ 24 มีค่าแบคเทอริโอซินสูงสุด เท่ากับ 200 AU/ml และลักษณะเซลล์ *B. cereus* ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน มีการเสียสภาพจากสารแบคเทอริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก

การใช้ *Lb. plantarum* SS7 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกอีสานในสภาวะการหมักจริง พบว่าในวันที่ 0 ของการหมัก ไส้กรอกอีสานสูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 6.114 cfu/g ค่าพีเอชและกรด เท่ากับ 5.82±0.36 และ0.36±0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไส้กรอกอีสานสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 5.959 log cfu/g ค่าพีเอชและกรด เท่ากับ 5.97±0.44 และ 0.29±0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับวันที่ 2 ของการหมัก พบว่าสูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 8.041 log cfu/g ค่าพีเอชและกรด เท่ากับ 3.97±0.13 และ 1.03±0.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสูตรที่ไม่เติมกล้าเชื้อ มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก อยู่ที่ 7.431 log cfu/g ค่าพีเอชและกรด เท่ากับ 4.09±0.25 และ 0.74±0.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่พบ ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานในวันที่ 0 และวันที่ 2 พบว่า ไส้กรอกอีสานสูตรที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกกลุ่มมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงกว่ากลุ่ม ไส้กรอกอีสานที่มีการใช้กล้าเชื้อในการหมักสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานได้

ผลการศึกษาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสานด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าสามารถยืนยันการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 จากตัวอย่างไส้กรอกอีสานในวันที่ 2 ของกระบวนการหมัก แสดงให้เห็นว่า กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 สามารถมีชีวิตรอดในระหว่างการหมักไปจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในส่วนของกระบวนการผลิตไส้กรอกอีสานควรต้องมีการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดี รวมถึงควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและส่วนผสมที่ใช้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตลอดจนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน โดยทำการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา โดยขั้นตอนการปฏิบัติดังกล่าวจะช่วยในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มาจากกระบวนการผลิตได้

ส่วนของผู้ขายโดยเฉพาะจากแหล่งจำหน่ายในกลุ่มตลาดนัด รถเข็น และแผงลอย เนื่องจากส่วนใหญ่นอกจากจะเป็นการผลิตเองตามครัวเรือนแล้ว ก่อนวางจำหน่ายไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านการให้

ความร้อนสามารถเกิดการปนเปื้อนได้จากหลายสาเหตุ จึงต้องมีการระมัดระวังในเรื่องของสุขลักษณะส่วนบุคคลของผู้ขาย การเก็บไส้กรอกอีสานที่อุณหภูมิห้องก่อนการจำหน่ายก็เป็นสาเหตุให้เชื้อก่อโรคเพิ่มจำนวนและอาจผลิตสารพิษที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ในส่วนของผู้บริโภคก่อนจะรับประทานไส้กรอกอีสานต้องผ่านการให้ความร้อนจนทำให้ไส้กรอกอีสานสุกก่อน และควรเลือกบริโภคจากแหล่งจำหน่ายที่มีการดูแลความสะอาดของร้านและตัวผู้ขาย เพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคไส้กรอกอีสานที่อาจปนเปื้อนเชื้อก่อโรคได้

5.2.2 ในการทดลองการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองไส้กรอกอีสานเมื่อได้ผลการทดลองเบื้องต้นมาทำการทดลองหมักในไส้กรอกอีสานจริง ควรมีการวิเคราะห์ข้อมูลในแง่ของคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ รวมถึงด้านการทดสอบทางประสาทสัมผัส ต่อการยอมรับของผู้บริโภค จะทำให้งานวิจัยมีความครบถ้วนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

5.2.3 ในปัจจุบันมีการทดลองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อที่จะลดการใช้สารเคมีและลดการใช้ความร้อนในการแปรรูปอาหาร โดยสามารถทำการศึกษาการใช้ประโยชน์ในแง่ของการใช้กล้าเชื้อในกระบวนการผลิตร่วมกับวิธีอื่นๆ เพื่อลดความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยของอาหารและสุขภาพของผู้บริโภคได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** โรงพิมพ์วัฒนาพานิช. กรุงเทพมหานคร.

ชัยวัฒน์ อินเรือง, มุธิตา มะธิปิไข, อังสนา คำเงิน และ อุกฤษฎ์ สุกใส. 2558. **ความชุกของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในจังหวัดเชียงราย พะเยา แพร่ และน่าน.**

นฤมล ทองงาม. 2553. **การศึกษาลักษณะบางประการของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2553. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวัง สนามจันทร์. นครปฐม.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. กลุ่มงานส่งเสริมและประกันคุณภาพการศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.

มัลลิกา ไชยวุฒิ. 2556. **ผลของส่วนผสมของไส้กรอกอีสานและกล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* RS49 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ต่อ *Salmonella* Anatum ในระหว่างการหมัก**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาสุขาภิบาลอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. พิมพ์ครั้งที่ 2.** โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพมหานคร.

วัฒนี บุญวิทยา. 2542. **เทคโนโลยีเนื้อและผลิตภัณฑ์.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. ปทุมธานี.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทาง อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม"** เล่มที่ I. โรงพิมพ์ สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

ศิริรัตน์ ตันไสว. 2547. **การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติคทนร้อน ที่ผลิตสารไบโอเจนิกเอมีน จากอาหารหมักไทย**. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2555. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช**. 144/2555. ไส้กรอกอีสาน หมู.

สุกัญญา วาวงค์, คมแข พิลาสมบัติ, นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2554. **การตรวจหาการมีชีวิตรอดของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเนื้อโค ด้วยวิธีพีซีอาร์อาร์เอพีดี.** วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 2: 65-72.

สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน. 2555. **การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาสุขาภิบาลอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุกัญญา วาวงค์. 2555. **การตรวจสอบการมีอยู่ของกล้าเชื้อ *Lactococcus lastis* subsp. Lactis P2 และ Sb2, *Lactobacillus salivarius* D4 และ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 ในแหนมเนื้อโค.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **แบคทีเรียแลคติก**. โรงพิมพ์ภาพพิมพ์. กรุงเทพ.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. **แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก**. วารสารวิทยาศาสตร์. 23 : 145-148.

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

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

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, X., and Zagorec, M. 2005. **Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages.** Food Microbiology. 22: 373–382.

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

Arief, I.I., Wulandari, Z., Sinaga, E.S. and Situmorang, D.M. 2017. **Application of purified bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 as a bio-preservative of beef sausage**. Pakistan Journal of Nutrition. 16 (6): 444-450.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. **Official Methods of Analysis, 16th ed**. AOAC International, Arlington, Virginia, USA.

Aymerich, M. T., Garriga, M., Monfort, J. M., Nes, I. and Hugas, M. 2000. **Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins**. Food Microbiology. 17: 33–45.

Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S.and Hugas, M. 2006. **Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages.** Journal of Applied Microbiology. 100: 40–49.

Baillie A. and Norris J.R. 1964. **Antigen changes during spore formation in *Bacillus cereus*.** Journal of Bacteriology. 87(5): 1221-1226.

Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona H, Ivanova, I. V., Chobert, J. M., Haert, T. and Franco, B. D. G. M. 2013. **Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami**. Journal of Applied Microbiology 116: 64-72.

Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova V., Belguesmia, Y., Choiset, Y. Rabesona, H., Chobert, J. M.. Haert, T. and Franco, B. D. G. M. 2016. **Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami**. Food Control 60: 103-11.

Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L. and Morea, M. 2006. **Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage**. Meat Science. 72: 261-269.

Benedict, R.C., Partridge, T., Wells, D., Buchanan, R.L., 1993**.** ***Bacillus cereus:*** **aerobic growth kinetics**. Journal of Food Protection. 56(3): 211–214.

Bernardeau, M., Guguen, M., and Vernoux, J.P. 2006. **Beneficial lactobacilli in food and feed: long-termuse, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments**. FEMS Microbiology. 30: 487–513.

Bohaychuk, V. M., Gensler, GE., King, RK., Manninen, K. I., Sorensen, Wu, JT., Stiles, ME. and Mullen LM. 2006. **Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada.** Journal of Food Processing and Preservation. 69: 2176–2182.

Botthoulath, V., Upaichit, A. and Thumarat, U. 2018. **Characterization of *Listeria*-active bacteriocin produced by a new strain *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* SKI19 isolated from "sai krok e-san mu".** International Food Research Journal 25(6): 2362-2371.

Buyukunal, S., Sakar, F., Turhan, I., Erginbas, C., Altunatmaz, S., Aksu, F., Eker, F. and Kahraman, T. Raman, T. 2015. **Presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 and nitrate-nitrite residue levels in Turkish traditional fermented meat products (Sucuk and Pastırma).** Journal of the Faculty of Veterinary Medicine. 22(2): 233-236.

Chokesajjawatee, N., Pornaem, S., Zo Y-G., Kamdee, S., Luxananil, P. and Wanasen, S. 2009**.** **Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product**. Food Microbiology. 26: 547-551.

Collier, L., Balows, A. and Sussman, M. 1998. **Microbiology and Microbial Infections**: **Systematics Bacteriology.** Vol. 2. 10th ed. Oxford University press. London. pp. 99-105

Dong-Gyun Yim., Kyoung-Hwan Jang and Ku-Young Chung. 2015. **Effect of GdL addition on physico-chemical properties of fermented sausages during ripening.** Korean Journal Food Science. 35:(3). 322-329.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. **Class II a bacteriocins from Food Preservation**. Journal of Bioscience and Bioengineering. 6: 705-716.

Finlay, W. J., Logan, N. A. and Sutherland, A. D. 2002. ***Bacillus cereus*** **emetic toxin production in cooked rice.** Food Microbiology. 19: 431–439.

Guven, K., Mutlu, M.B. and Avci, O. 2006. **Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in Turkey.** Journal of Food Safety. 26: 30-40.

Food and Drug Administration (FDA). 2012. **Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook,** 2nd ed. US Food and Drug Administration. Washington DC.

Hammes, W. P., Bantleon, A. and Min, S. 1990. **Lactic acid bacteria in meat fermentation.** FEMS Microbiology Letters. 87: 165–173.

Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. and Nes, I. F. 2001. **Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics**. Microbiology. 147(3): 643–651.

ISO 6579: 2002. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.** International Organization for Standardizations, Geneva, Switzerland.

Jindaprasert, A., Jirajaroenrat, K. and Swetwiwathana, A. 2011. **Characterization of lactic acid bacteria in Thai traditional fermented sausage during fermentation and storage**. Proceedings of The 4th International conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Products, 2011 Aug 29-31. Khon Kaen, Thailand. P. 1-7.

Khan, I. and Kang, S. C. 2016. **Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi – A traditional Korean fermented food**. Food Control 60: 88-94.

Kanagaraj, J., Selvi, A. T., Senthilvelan, T., Babu, N. C. and Chandrasekar, B. 2014. **Evaluation of new bacteriocin as a potential short-term preservative for goat skin**. American Journal of Microbiological Research. 2(3): 86-93.

Klaenhammer, T. R. 1993. **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria**. FEMS Microbiology Reviews. 12(3): 39-85.

Limsombun, T., Nakrin, C., Jindaprasert, A., Sethakul, J. and Swetwiwathana A. 2012. **Microbiological quality of Mum (Thai traditional fermented beef)**. Proceedings of the 15th AAAP Animal Science Congress; 2012 Nov 26-30; Thammasat University, Rangsit Campus: Thailand. P. 2973-2977.

Mayr-Harting, A., Hedges, A. J. and Berkeley, R. C. W. 1972. **Methods for studying bacteriocins**. Methods Microbiology. 315-442.

Mohamed WS and Ghanyem HR. 2015. **Effect of some preservatives on *Bacillus cereus* isolated from some meat product.** Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association. 61(146): 1-7.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P. and Panyim, S. 2003. **Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a tradition Thai fermented sausage.** Journal Food Microbiology. 81: 137–145.

Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M. and Torre, P. 2003. **PCR and RAPD identification *of Lactobacillus plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains**. FEMS Microbiology Reviews. 227: 271–277.

Ouwehand, A.C. 1998. **Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects,** 2nd edition. Marcel Dekker. New York. pp. 139-159.

Paukatong, K. V. and Kunawasen S. 2001. **The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) generic model for the production of Thai pork sausage (Nham)**. Berliner and Munchener Tierarztliche Wochenschrift. 114: 39–43.

Phalakornkule, C. and Tanasupawat, S. 2006. **Characterization of lactic acid bacteria from traditional Thai fermented sausages**. Journal of Culture Collections. 5: 46-57.

Rantsiou, K., and Cocolin, L. 2006. **New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review.** International Journal of Food Microbiology. 108: 255–267.

Sabo, S., Vitolo, M., Gonzalez, J. and Oliveira, R. 2014. **Overview of *Lactobacillus plantarum*as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria**. Food Research International. 64: 527-536.

Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H., and Bjorkroth, J. 2005. **Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos".** International Journal of Food Microbiology. 97: 285–296.

Schlegel, H. G. 1993. **General Microbiology.** 7th ed. Cambridge University Press. New York. pp. 300-305.

Schillinger, U. and Holzapfel W.H. 1990. **Antibacterial activity of carnobacteria**. Food Microbiology. 7: 305–310.

Shinakawa, K., Konuma, H., Tokumaru, M., Takesama, N., Hashikiwa, M. and Shigehisa, T. 1988. **Enumeration of aerobic spore-formers and *Bacillus cereus* in meat product additives**. Journal of Food Protection. 51(8): 648-654.

Sriphochanart, W. and Skolpap W. 2010. **Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages**. Journal of Food Biotechnology. 24:293–311.

Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Sinderen, D.V. 2005**. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites.** Journal of Food Science.16: 198-203.

Swetwiwathana, A., Fischer, A., Lotong N. and U. Leutz. 1999. **Controlling the growth of *Salmonella* Anatum in Nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic**. Fleisch Wirtschaft International. 9: 124-128.

Swetwiwathana, 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 47th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST) Proceedings. Volumn II: P: 18-19. August 26-31, 2001. Krakow, Poland. เลขหน้า

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. **Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in Nham (Traditional Thai fermented meat)**. The 49th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). 2003 Aug 31–Sep 5. Sao Paulo, Brazil. P. 322 - 324.

Swetwiwathana, 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* TISTR536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella* anatum during Nham fermentation**. Fleischwirtschaft International. 22(3): 46–49.

Swetwiwathana, A. and Visessanguan, W. 2015. **Potential of bacteriocin - producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health.** Meat Science. 109: 101–105.

Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2016. **Plantaricin W producer: *Lactobacillus plantarum* SS7 isolated from Isan-sausage (traditional Thai fermented meat-rice sausage)**. The 62nd International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). 2016 Aug 14-19. Bangkok, Thailand. P

Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1992. **Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *Lactobacillus sakei* LTH 673.** Systematic and Applied Microbiology. 15: 460–468.

U.S. Food and Drug Administration. 2002. **Bacteriological Analytical Manual Chapter 14 *Bacillus cereus* (BAM 2002).** [Online]. Available from:https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070875.html. (Accessed March 15, 2017).

U.S. Food and Drug Administration. 2002. **Bacteriological Analytical Manual Chapter 12 *Staphylococcus aureus* (BAM 2002)**. [Online].Available from: https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.html. (Accessed March 15, 2017).

Vatanyoopaisarn, S., Prapatsornwattana, K., Kuhakongkeat, T. and Phalakornkule, C. 2011**. Potential use of lactic acid bacteria with bacteriocin-like activity against *Staphylococcus aureus* as**

dual starter cultures in Thai fermented sausage "Sai Krok Prew". International Food Research Journal. 18:697-704.

Visessanguan W., Benjakul S., Smitinont T., Kittikun C., Thepkasikul P. and Panya A. 2006. **Changes in microbiological, biochemical and physic-chemical properties of Nham inoculated with different levels of *Lactobacillus curvatus***. LWT-Food Science and Technology. 39: 814-826.

Vural, H. 1998. **The use of commercial starter cultures in the production of Turkish semi-dry fermented sausages.** The Journal European Food Research and Technology. 207: 410–412.

Veerawatanayotin S, Jindaprasert A, Pilasombut K, Sethakul J, Swetwiwathana A. 2010. **Effect of pediocin PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and *S.* Ratchaburi in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth**. Proceeding of the 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST); 2010 Aug 15-20; Jeju, Korea; 2010. P.1-4.

Wen, L S., Philip, K. and Ajam, N. 2016**. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*.** Food Control. 60: 430-439.

Woraprayote W., Malila Y., Sorapukdee S., Swetwiwathana A., Benjakul S. and Visessanguan W. 2016. **Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products**. Meat Science. 120: 118-132.

Yaiphothong, V., Vattanamanee, S., Jindaprasert, A. and Swetwiwathana, A. 2017. **Prevalence of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Thai fermented meat-rice sausage (Sai Krok Isan) from local market, supermarket and factory in Nongchok and Ladkrabang District**. The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products; 2017 July 25-28. Khon Kaen, Thailand. P.265-270.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 Buffer Peptone Water (Difco, USA)

Peptone	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 ลิตร ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ไม่ควรนานเกิน 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)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MKTTn ปริมาตร 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 $CaCO_3$ กระจายให้ทั่ว ก่อนที่จะถ่ายอาหารลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

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

Magresium Chloride, anhydrous	13.5	g	Potassium Dihydrogen	1.45	g
Sodium Chloride	9.0	g	Malachite Green	0.036	g
Dipofassium Phosphape	0.03	g			

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ่ายใส่ในหลอดทดลองในปริมาตร 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	$FeSO_4$	0.2	g

Sucrose	10	g	$Na_2S_2O_3$	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 $\pm$ 0.2	

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 76.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้ส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันกวนตลอดเวลาถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปริมาตรประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวหลอดปิดจุกเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งโดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร และมี Butt ยาวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

ก.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase (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 $\pm$ 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้าฆ่าเชื้อใน 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 $\pm$ 0.2	
K_2HPO_4	2.5	g			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Baid-Parker medium (Difco, U.S.A)

Tryptone	10	g	Beef extract	1	g
Yeast extract	1	g	Sodium pyruvate	10	g
Glycine	12	g	Lithium chloride.$6H_2O$	5	g

Agar	15	g	น้ำกลั่น	950	ml

Final pH: 7.0 ± 0.2

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอชที่ 7.0 ± 0.2เทสารละลายที่ได้ลงใน ฟลาส์ก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ ฟลาส์กละ 190 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.9.1 เตรียมสารละลาย 1 % Potassium tellurite

Potassium tellurite	1	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย Potassium tellurite ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิทเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ก.9.2 เตรียม Egg yolk – tellurite emulsion

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70 % ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่แล้วทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยผสมในอัตราส่วน 1: 1 จากนั้นนำ Egg yolk emulsion ที่ได้จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 1% Potassium tellurite ที่กรองปลอดเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ก.9.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร Baird – Parker base medium มา 190 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส) เติม Egg yolk – tellurite emulsion ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันระวังฟองอากาศ แล้วเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ก.10 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar (Difco, U.S.A)

Beef extract	1	g	Peptone	10	g
Mannitol	10	g	NaCl	10	g
Phenol red	0.025	g	Agar	15	g
น้ำกลั่น	900	ml			
Final pH:	7.2 ± 0.2				

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงใน ฟลาส์ก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ ฟลาส์กละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.10.1 เตรียมสารละลาย Polymyxin B solution

ละลายผง Polymyxin B sulfate 1 MU (sigma P1004) ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ 0.2 ไมโครเมตร เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้

ก.10.2 Egg yolk emulsion, 50 %

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70 % ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่แล้วทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยผสมในอัตราส่วน 1: 1 ปิดฝาเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ก.10.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร MYP agar มา 225 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) เติม polymyxin B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 50 % Egg yolk emulsion ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จะได้อาหาร MYP agar ที่มี polymyxin B 100,000 IU/L

ก.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysin Desoxycholate (XLD) Agar (Difco, U.S.A)

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 $\pm$ 0.2		
NaCl	5.0	g			

ละลายส่วนผสมทั้งหมดต้มพอเดือดให้วุ้นละลายระวัง Overheat จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือได้ ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงใน

จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อไม่ควรใส่ฟลาสก์ไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชั่วโมง (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

ก.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric Agar (Difco, U.S.A)

Peptone	15	g	Sodium Chloride	5	g
Yeast Extract	3	g	Sucrose	14	g
Lactose	14	g	Salicin	2	g
Sodium Thiosulfate	5	g	Ammonium Citrate	1.5	g
Bile Salts	2	g	Bromthymol Blue	0.05	g
Acid Fuchsin	0.08	g	Agar	13.5	g
น้ำกลั่น	1	L			

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ต้มพอเดือดให้วุ้นละลายระวัง overheat จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือได้ ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ไม่ควรใส่ฟลาส์กไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชั่วโมง (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

ก.13 น้ำยาเจือจาง Buttlefild's PhosPhate Buffered (BAM R11, 2001)

ก.13.1 การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล และปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บในตู้เย็น

ก.13.2 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 นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.14 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Difco, USA ชั่ง 55 g/ 1000ml)

Tween 80	1.0	ml	di – Potassium hydrogen phosphate	2.0	g

Sodium acetate	5.0	g	di – ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Manganese sulfate	0.05	g	Magnesium sulfate	0.2	g
Glucose	20.0	g	Tryptone	10.0	g
Yeast extract	4.0	g	Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L	Meat extract	8.0	g

ละลายส่วนประกอบ 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยการต้มให้เดือด จากนั้นนำไปนึ่งเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.15 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar + 0.5% $CaCO_3$ (Difco, USA ชั่ง 55 g/ 1000ml)

Tween 80	1.0	ml	di – Potassium hydrogen phosphate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g	di – ammonium hydrogen citrate	2.0	g
Manganese sulfate	0.05	g	Magnesium sulfate	0.2	g
Calcium carbonate	5.0	g	Trytone	10.0	g
Glucose	20.0	g	Agar	15.0	g
Yeast extract	4.0	g	Meat extract	8.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L			

ละลายส่วนประกอบ 55 กรัม เติม Agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยการต้มให้เดือดจากนั้นนำไปนึ่งเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.16 อาหารเหลวจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ดัดแปลงจาก Swetwiwathana และคณะ, 1999)

Meat extracts	10.0	g	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 (Swetwiwathana และคณะ, 1999)

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (pH) ตามวิธีการของ (AOAC, 2000)

เมื่อได้ตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนหลังจากทำการเตรียมตัวอย่างแล้ว ชั่งตัวอย่างละ 5 กรัม ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน(DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จำนวน 20 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วผสมตัวอย่างให้เข้ากัน วัดความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอช)pH meter) โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ซ้ำ และบันทึกผล

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด ตามวิธีการของ (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างจากข้อ ข. 1 ตัวอย่างละ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน (DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์49 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายเกิดเป็นสีชมพูอ่อน ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และบันทึกผล เพื่อนำค่ามาคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก

$$\text{ค่าความเป็นกรดทั้งหมด} = \frac{(V)(N)(90.01)(100)}{(1000)}$$

โดย V = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

N = นอร์มัลที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

90.8 = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก ($C_3H_6O_3$)

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีการของ (AOAC, 2000)

1) อบกระป๋องอะลูมิเนียม (aluminium cans) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและไปทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น (desiccator) นำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกค่า

2) นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนหลังจากทำการเตรียมตัวอย่างแล้ว มาชั่งตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และบันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง ทำซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง

3) นำไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4) ทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักและบันทึกค่า

5) คำนวณหาปริมาณความชื้นในหน่วยเปอร์เซ็นต์

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ} - \text{น้ำหนักอาหารหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักอาหารก่อนอบ}}$$

ข.4 การหาค่าเวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water activity หรือ a_w) (ตามวิธีการใช้เครื่องบริษัท AQUALAB รุ่น 4TE)

1) สอบเทียบ (calibrate) เครื่องวัดค่าเวอเตอร์แอคติวิตี้ รุ่น 4TE ยี่ห้อ AQUALAB โดยนำน้ำ DI (deionized water) ใส่ในตลับตัวอย่าง จากนั้นนำเข้าเครื่องเวอเตอร์แอคติวิตี้ โดยต้องใส่ค่าเวอเตอร์แอคติวิตี้อยู่ระหว่าง 0.997-1.003 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2) นำตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อนหลังจากทำการเตรียมตัวอย่างแล้ว มาชั่งตัวอย่างละ 3 กรัม แล้วนำไปใส่ในตลับตัวอย่างแล้วเกลี่ยตัวอย่างแหนมให้เรียบแบนพอสมควร

3) นำตลับตัวอย่างเข้าเครื่องเวอเตอร์แอคติวิตี้ บิดปุ่มอ่านค่าไปที่คำว่า READ แล้วรอจนกระทั่งไฟสีเขียวกระพริบ จากนั้นจึงอ่านค่าเวอเตอร์แอคติวิตี้และค่าอุณหภูมิที่ปรากฏบนหน้าจอแสดงผล

4) จดบันทึกค่า จากนั้นนำตลับตัวอย่างออก แล้วนำตลับตัวอย่างต่อไปที่ใส่ตัวอย่างไส้กรอกอีสานแล้วมาวัดค่า

ข.5 การตรวจสอบผลดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, 2536)

1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวรายและหวีให้เรียบร้อย

2) เตรียมสารละลายอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer

3) หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ความร้อนโดยไมโครเวฟ จนอะกาโรสละลายหมด

4) ตั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส หยดสารเอธิเดียมโบร์ไมด์เล็กน้อยเขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงค่อยเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

5) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอะกาโรสโฟรีซิสให้พอดีเท 1XTAE buffer ให้ท่วมเจล
6) ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร รวมเป็น 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงไปที่ช่องในแผ่นเจลแต่ละช่อง
7) ดูดสารละลายดีเอ็นเอมาตราฐาน (100 bp ladder plus) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงช่องในแผ่นเจลเพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ
8) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดเครื่อง ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 90 นาที
9) จากนั้นนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับ ดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแน่นอน (marker) ทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษาแล้วถ่ายรูปและบันทึกด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documention)

ข.6 การเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล (ตามวิธีการใช้โปรแกรม Quantity one)

1) ภาพที่ถ่ายได้จากเครื่องถ่ายภาพเจล จะแสดงแถบดีเอ็นเอในแต่ละช่อง ซึ่งมีขนาดและจำนวนที่แตกต่างกัน
2) ระบุขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานในช่อง Marker ตั้งแต่ขนาด 100bp ถึง 3000 bp
3) ระบุขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรียแลคติก ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐาน
4) ระบุขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างในแต่ละช่องของเจล
5) เปรียบเทียบขนาดและจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเทียบกับเชื้อมาตรฐานเพื่อยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่างนั้นๆ

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาของตัวอย่างไส้กรอกอีสาน

ตารางที่ ค.1 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยาของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน จากแหล่งจำหน่าย ซุปเปอร์มาเก็ตและห้างสรรพสินค้าในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวน 8 ตัวอย่าง

Sample	pH	Total acid	Moisture	Water activity	Total Plate Count (CFU/g)	Total Lactic (CFU/g)	*B.cereus* (cell)	*B.cereus* (Spore)	*S.aureus*	*Salmonella*
01	4.43	0.3601	33.46	0.985	7.6×10^7	1.9×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	Not detect
02	4.71	0.3286	39.72	0.970	6.7×10^6	1.0×10^6	Not detect	Not detect	Not detect	detect
03	4.41	0.4536	50.75	0.988	5.2×10^7	1.8×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	Not detect
04	4.89	0.2262	66.62	0.990	1.0×10^8	3.8×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
05	4.75	0.3232	41.76	0.987	1.1×10^8	1.4×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
06	4.88	0.1295	37.59	0.972	7.4×10^7	1.7×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
07	4.77	0.1602	36.19	0.978	8.2×10^7	1.9×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
08	4.56	0.1923	41.12	0.987	1.2×10^8	1.6×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
ค่าเฉลี่ย	4.67	0.2717	43.40	0.982						
ค่าต่ำสุด	4.41	0.1295	33.46	0.970						
ค่าสูงสุด	4.88	0.4536	66.62	0.990						

ตารางที่ ค.2 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา ของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน แหล่งจำหน่าย ตลาดนัด รถเข็น แผงลอย ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวน 19 ตัวอย่าง

Sample	pH	Total acid	Moisture	Water activity	Total Plate Count (CFU/g)	Total Lactic (CFU/g)	*B.cereus* (cell)	*B.cereus* (Spore)	*S.aureus*	*Salmonella*
09	4.53	0.3601	37.31	0.983	5.2×10^{8}	8.3×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
10	4.73	0.3277	51.60	0.974	5.8×10^{8}	1.1×10^{8}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
11	4.39	0.4071	39.12	0.984	7.9×10^{7}	8.8×10^{6}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
12	4.57	0.3286	39.80	0.969	4.3×10^{7}	2.5×10^{7}	Not detect	Not detect	2.0×10^{2}	detect
13	4.60	0.2984	34.07	0.976	1.5×10^{8}	3.4×10^{7}	Not detect	Not detect	2.0×10^{1}	detect
14	4.60	0.2984	35.34	0.975	1.5×10^{8}	4.5×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
15	4.65	0.3286	40.83	0.976	4.5×10^{7}	2.9×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
16	4.60	0.2984	39.21	0.981	8.9×10^{7}	6.4×10^{6}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
17	4.53	0.3286	37.31	0.986	6.8×10^{7}	2.4×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
18	4.43	0.4071	37.70	0.984	2.6×10^{8}	1.9×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
19	4.73	0.3601	37.31	0.974	2.4×10^{8}	2.7×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
20	4.57	0.2984	41.65	0.974	9.6×10^{7}	4.3×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
21	4.43	0.3286	35.34	0.964	1.4×10^{8}	6.7×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect
22	5.44	0.2984	37.84	0.979	3.0×10^{8}	2.7×10^{7}	Not detect	Not detect	Not detect	detect

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา ของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน จากแหล่งจำหน่าย ตลาดนัด รถเข็น แผงลอย ในเขตหนองจอกและลาดกระบัง จำนวน 19 ตัวอย่าง

Sample	pH	Total acid	Moisture	Water activity	Total Plate Count (CFU/g)	Total Lactic (CFU/g)	*B.cereus* (cell)	*B.cereus* (Spore)	*S.aureus*	*Salmonella*
23	4.76	0.2263	42.43	0.973	2.7×10^8	2.6×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
24	4.81	0.1939	41.70	0.971	3.0×10^8	6.7×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
25	4.73	0.3601	41.60	0.975	1.1×10^8	2.0×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
26	4.61	0.2984	40.31	0.978	7.8×10^7	3.3×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	Not detect
27	4.52	0.3286	36.84	0.980	1.2×10^8	2.4×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
ค่าเฉลี่ย	4.64	0.3197	39.33	0.976						
ค่าต่ำสุด	4.39	0.1939	34.07	0.964						
ค่าสูงสุด	5.44	0.4071	51.6	0.986						

ตารางที่ ค.3 แสดงผลวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา ของตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน จากแหล่งผลิตโรงงานอุตสาหกรรม จำนวน 3 ตัวอย่าง

Sample	pH	Total acid	Moisture	Water activity	Total Plate Count (CFU/g)	Total Lactic (CFU/g)	*B.cereus* (cell)	*B.cereus* (Spore)	*S.aureus*	*Salmonella*
28	4.32	0.3232	31.66	0.970	1.3×10^8	1.7×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	detect
29	4.28	0.3556	36.43	0.971	1.5×10^8	2.0×10^7	Not detect	3.0×10^1	4.5×10^2	detect
30	5.16	0.2984	33.41	0.969	2.5×10^8	2.9×10^7	Not detect	Not detect	Not detect	Not detect
ค่าเฉลี่ย	4.58	0.3257	33.83	0.970						
ค่าต่ำสุด	4.28	0.2984	31.66	0.969						
ค่าสูงสุด	5.16	0.3556	36.43	0.971						

ตารางที่ ค.4 ผลการตรวจยืนยัน *Salmonella* groups และผลยืนยันซีโรวาห์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	*Salmonella* group	เซโรไทป์ที่ตรวจพบ
Sam 01 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Kedougou
Sam 01 – XLD/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 02 – XLD/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 02 – HE/MK	AI	*Salmonella* Rissen
Sam 03 – XLD/MK	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 04 – HE/RV	AI	*Salmonella* Kedougou
Sam 05 – XLD/RV	AI	*Salmonella* Rissen
Sam 07 – XLD/MK	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 07 – XLD/ RV	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 08 – XLD/RV	AI	*Salmonella* Krefeld
Sam 08 – HE/MK	AI/E	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 09 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 10 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 10 – HE/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 11 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Rissen
Sam 12 – XLD/RV	AI	No *Salmonella* species
Sam13 – XLD/MK	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 13 – HE/RV	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 14 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 14 – HE/MK	AI/C	*Salmonella* Bovismorbificans
Sam 16 – HE/MK	AI	*Salmonella* Krefeld

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลการตรวจยืนยัน *Salmonella* groups และผลยืนยันซีโรวาห์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่พบในตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ไม่ผ่านความร้อน ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	*Salmonella* group	เซโรไทป์ที่ตรวจพบ
Sam 16 – HE/RV	AI	-
Sam 17 – XLD/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 17 – HE/MK	AI/C	-
Sam 20 – XLD/MK	AI/C	*Salmonella* Corvallis
Sam 20 – XLD/RV	AI/C	-
Sam 20 – HE/RV	AI	*Salmonella* Rissen
Sam 21 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Kedougou
Sam 21 – XLD/RV	AI/E	-
Sam 21 – HE/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 24 – XLD/MK	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 24 – HE/RV	AI	-
Sam 25 – XLD/MK	AI/C	*Salmonella* serovar Rissen
Sam 25 – HE/RV	AI/C	-
Sam 26 – XLD/MK	AI/E	*Salmonella* Give
Sam 26 – XLD/RV	AI	*Salmonella* Krefeld
Sam 27 – XLD/RV	AI/C	*Salmonella* Rissen
Sam 27 – HE/MK	AI	*Salmonella* Kedougou
Sam 27 – HE/RV	AI	-
Sam 28 – XLD/MK	AI/E	*Salmonella* Krefeld
Sam 29 – XLD/MK	AI/C	No growth after enrichment
Sam 29 – HE/RV	AI	*Salmonella* Hvittingfoss
Sam 30 – HE/MK	AI/C	*Salmonella* Bovismorbificans
Sam 30 - XLD/MK	AI	-

ตารางที่ ค.5 ตารางเฉลี่ยค่าพีเอช ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง

ชั่วโมง	0	6	12	18	24	30	36	42	48
รูปแบบที่ 1 ISMB Control	6.68	6.65	6.66	6.65	6.63	6.63	6.61	6.58	6.56
รูปแบบที่ 2 ISMB + Gal	6.66	6.46	5.75	5.22	4.78	4.51	4.35	4.24	4.12
รูปแบบที่ 3 ISMB + Gal + SS7	6.43	5.14	4.57	4.12	3.92	3.81	3.71	3.60	3.41
รูปแบบที่ 4 ISMB + Gal + *B.cereus*	6.66	6.00	5.48	4.97	4.73	4.59	4.45	4.25	4.18
รูปแบบที่ 5 ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus*	6.49	5.57	4.88	4.38	4.02	3.91	3.73	3.62	3.58

ตารางที่ ค.6 ตารางเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง

ชั่วโมง	0	6	12	18	24	30	36	42	48
รูปแบบที่ 1 ISMB Control	0.284	0.347	0.347	0.410	0.410	0.410	0.410	0.410	0.410
รูปแบบที่ 2 ISMB + Gal	0.315	0.378	0.536	0.662	0.819	0.855	0.882	0.88	1.166
รูปแบบที่ 3 ISMB + Gal + SS7	0.473	0.662	0.756	0.882	1.103	1.197	1.166	1.229	1.355
รูปแบบที่ 4 ISMB + Gal + *B.cereus*	0.284	0.441	0.536	0.599	0.693	0.819	0.914	1.040	1.008
รูปแบบที่ 5 ISMB + Gal + SS7 + *B.cereus*	0.362	0.536	0.662	0.693	0.945	1.103	1.103	1.197	1.229

ตารางที่ ค.7 ตารางเฉลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (ISMB) รูปแบบที่ 3, 4 และ 5 ที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง

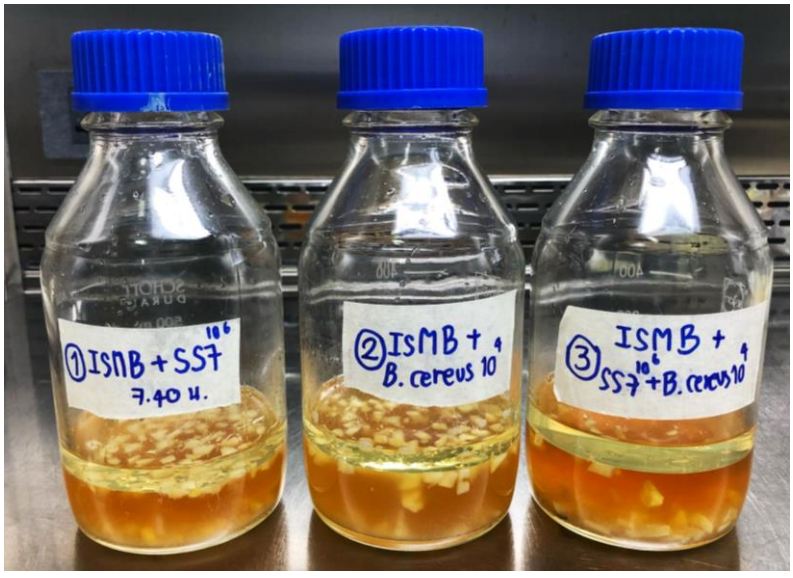
ชั่วโมง	0	6	12	18	24	30	36	42	48
รูปแบบที่ 3 (LAB log cfu/g)	6.413	6.944	7.255	7.485	7.540	7.612	7.564	7.620	7.713
รูปแบบที่ 4 (*B. cereus* log cfu/g)	3.124	3.406	4.274	4.059	4.233	3.280	3.205	1.820	1.634
รูปแบบที่ 5 (LAB log cfu/g)	6.068	6.814	6.980	6.966	7.333	7.321	7.194	7.152	7.482
รูปแบบที่ 5 (*B. cereus* log cfu/g)	2.670	2.743	2.358	1.305	1.398	1.232	0.795	0.360	0.333

หมายเหตุ LAB คือ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)

รูปแบบที่ 3 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml

รูปแบบที่ 4 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml

รูปแบบที่ 5 คือ ISMB + กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + เชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 + เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml



ภาพที่ ค.1 แสดงรูปแบบจำลองการหมักไส้กรอกอีสาน (Isan Sausage Model Broth, ISMB)

ก

ข

ค

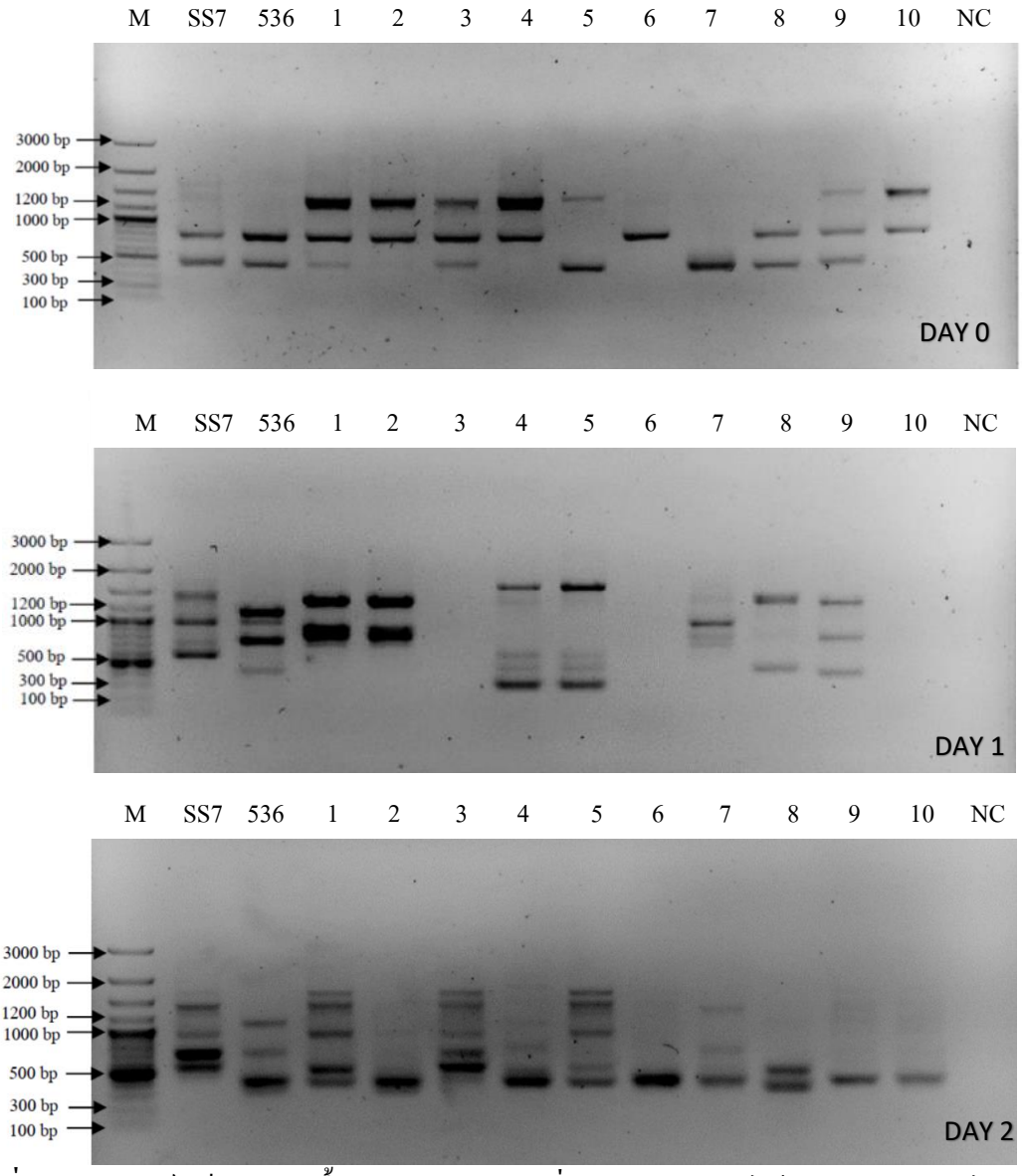
ง

จ

ภาพที่ ค.2 แสดงตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ผลิตทางการค้าก่อนเติมกล้าเชื้อ (ก) ไส้กรอกอีสานบรรจุ 25 กรัม ในระหว่างการหมัก ไส้กรอกอีสานสูตรไม่เติมกล้าเชื้อ (ข) สูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS 7ที่ 10^6 cfu/ml (ค) สูตรเติมเชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4cfu/ml (ง) และ สูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS 7ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml (จ)

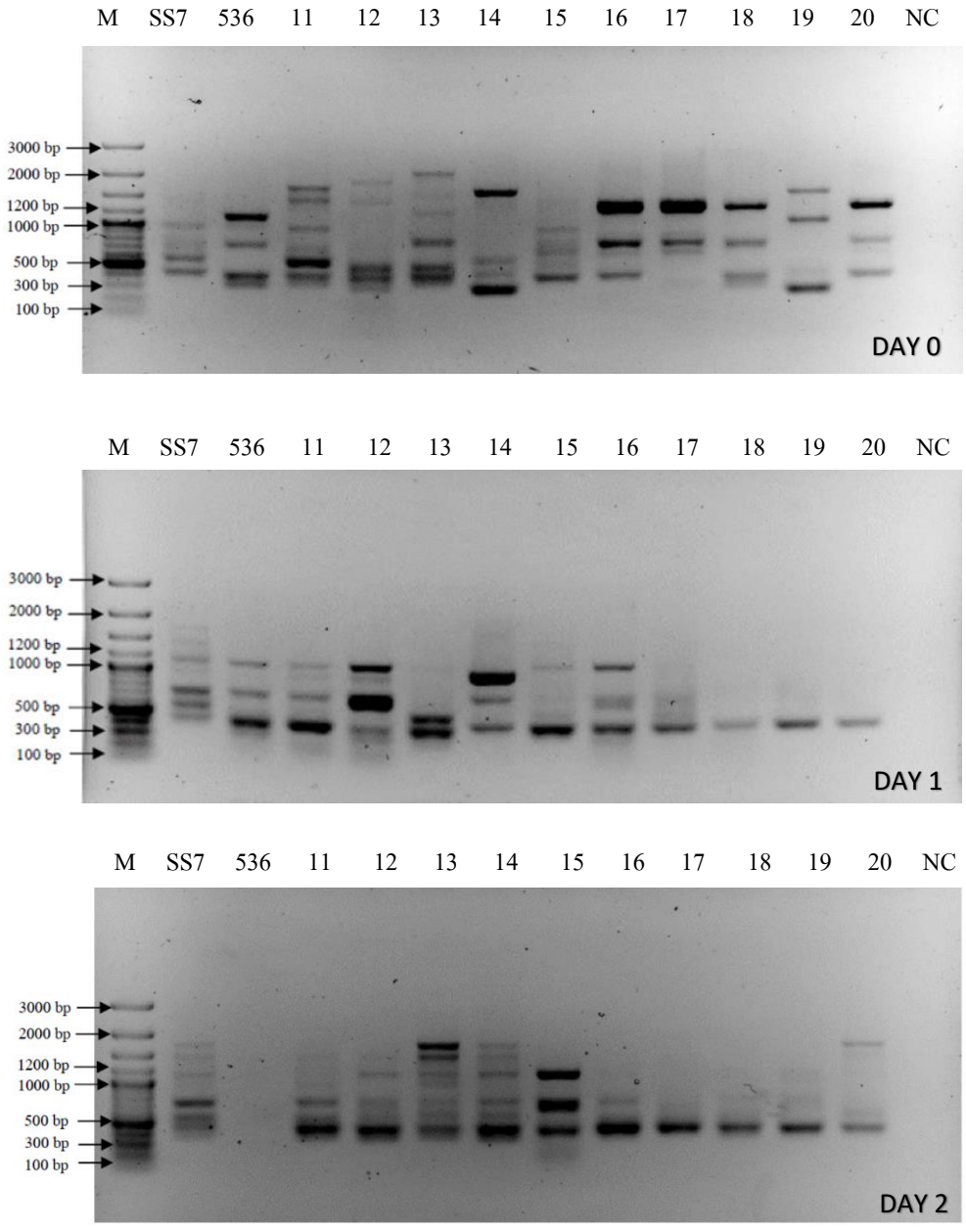
ภาคผนวก ง

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์-อาร์เอพีดีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก



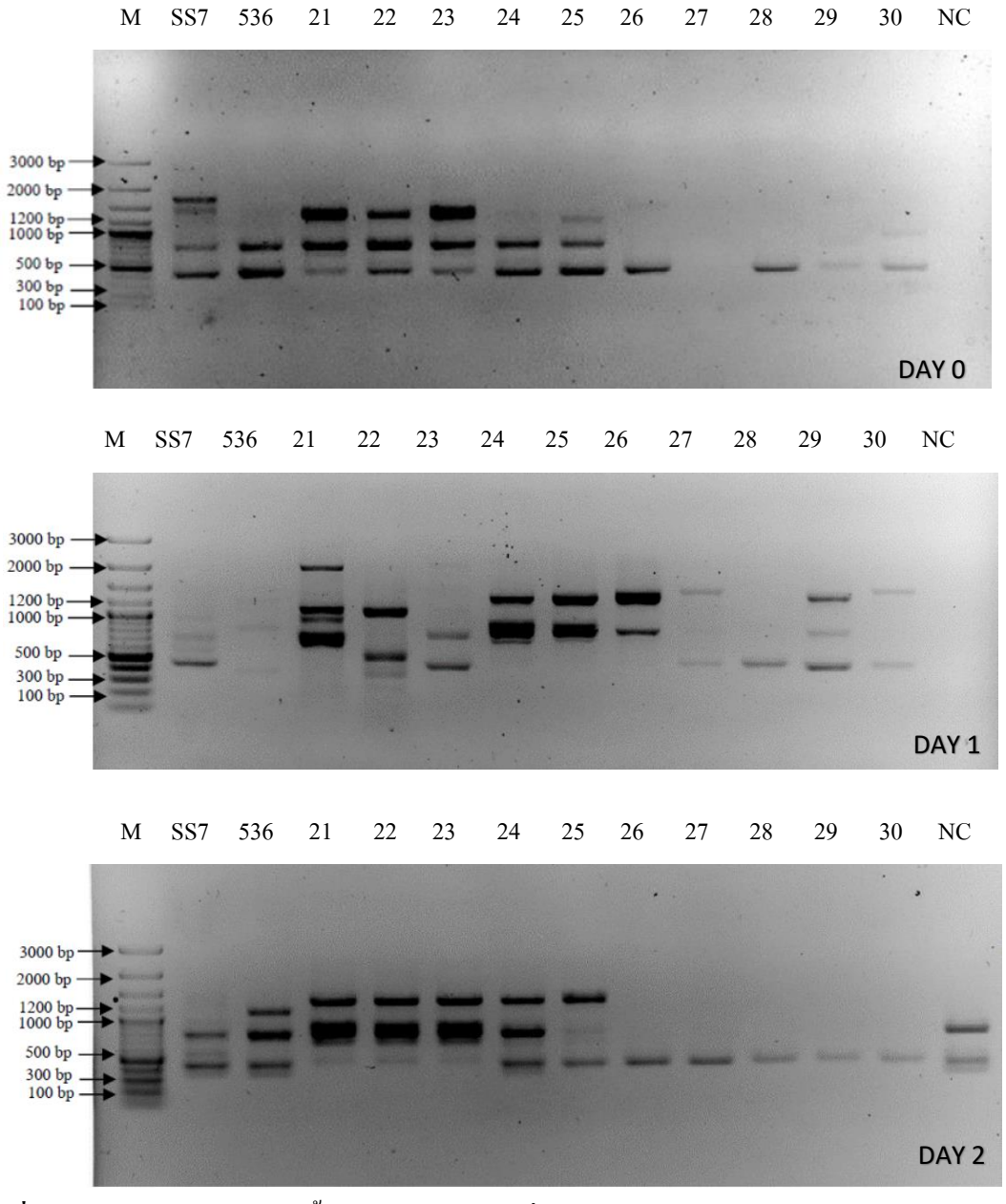
ภาพที่ ง.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม) ในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder plus, ช่อง SS7 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7,ช่อง 536 คือแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, ช่อง 1-10 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานชุดควบคุม วันที่ 0, 1 และ 2



ภาพที่ ง.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml ในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder plus, ช่อง SS7 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7,ช่อง 536 คือแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, ช่อง 11-20 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml วันที่ 0, 1 และ 2



ภาพที่ ง.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากตัวอย่างไส้กรอกอีสานสูตรเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/mlในวันที่ 0, 1 และ 2 ของการหมัก

หมายเหตุ ช่อง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder plus, ช่อง SS7 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7,ช่อง 536 คือแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, ช่อง 21-30 คือ แถบดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกอีสานที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 ที่ 10^6 cfu/ml และ เชื้อ *B. cereus* ที่ 10^4 cfu/ml วันที่ 0, 1 และ 2

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว วิภาวี ใยโพธิ์ทอง
วัน เดือน ปีเกิด	4 สิงหาคม พ.ศ. 2536
ที่อยู่	11 หมู่ 7 ซอยเชื่อมสัมพันธ์ 26 แขวงโคกแฝด เขตหนองจอก จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10530
E-mail	annann.vipavee@gmail.com
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2557 จบการศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	พ .ศ.2557 ผู้ช่วยนักวิจัยเรื่องการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ตามสุขลักษณะที่ดีของร้านอาหาร กิจกรรมที่ 5 การวิจัยและประเมินความ เสี่ยงด้านอาหารปลอดภัย ภายใต้โครงการ การพัฒนาอุตสาหกรรม อาหารของ“ไทยให้เป็นครัวอาหารคุณภาพของโลก ปี งบประมาณ ”2557 (Thailand Food Quality to the World)
การนำเสนอผลงาน	Yaiphothong, V., Vattanamanee, S., Jindaprasert, A. and Swetwiwathana, A. 2017. **Prevalence of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Thai fermented meat-rice sausage (Sai Krok Isan) from local market, supermarket and factory in Nongchok and Ladkrabang District**. The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products; 2017 July 25-28. Khon Kaen, Thailand. P.265-270.