ผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เกี่ยวข้อง ในระหว่างการหมักแหนม

EFFECT OF CHITOSAN ON SOME ASSOCIATED BACTERIA DURING NHAM FERMENTATION

พิมพิกา สายสวาสดิ์

PIMPIKA SAISAWART

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2554

KMITL-2011-AI-M-054-117

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนม

EFFECT OF CHITOSAN ON SOME ASSOCIATED BACTERIA DURING NHAM FERMENTATION

T120067

พิมพิกา สายสวาสดิ์

PIMPIKA SAISAWART

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120067
วัน, เดือน, ปี 1 ก.พ. 2555

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

KMITL-2011-AI-M-054-117

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF CHITOSAN ON SOME ASSOCIATED BACTERIA DURING NHAM FERMENTATION

PIMPIKA SAISAWART

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2011

KMITL-2011-AI-M-054-117

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2011

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนม

Effect of chitosan on some associated bacteria during nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นางสาวพิมพิกา สายสวาสดิ์

รหัสประจำตัว 49068753

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง	
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 25 ตุลาคม 2554 เวลา 09.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 28 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 54

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5000 ppm ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในด้านสี รสชาติ และความชอบโดยรวม ($p>0.05$) กับตัวอย่างที่ไม่เติมไคโตซาน และผู้บริโภคยังให้คะแนนความชอบทางด้านกลิ่นของแหนมที่เติมไคโตซานที่สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of chitosan on some associated bacteria during nham fermentation
Student	Miss Pimpika Saisawart
Student ID.	49068753
Degree	Master of Science
Programme	Food Sanitation
Year	2011
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

The effect of Chitosan on inhibition of pathogens and lactic acid bacteria (LAB) was studied in Nham model broth (NMB). The results revealed that Chitosan at 100 ppm could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Anatum (initial cells about 6.5 log cfu/ml), whereas, *S.* Derby was inhibited at 500 ppm of Chitosan. At high concentration of Chitosan (5000 ppm) could diminish the cells of *Stap. aureus* within 48 h, while *S.* Anatum and *S.* Derby were only inhibited by this high concentration. Moreover, the study informed that at this higher concentration of Chitosan showed the reduction on the cell number of both studied LAB strains and implied a higher resistant of *P. pentosaceus* TISTR 536 to Chitosan than *L. plantarum* ATCC 14917. Besides, the study also informed the beneficial effect of 5% of fresh garlic on the recovered of these LAB strains in the high concentration of Chitosan (5000 ppm) during NMB fermentation. When the effect of Chitosan (5000 ppm) combined with *P. pentosaceus* TISTR 536 on *Stap. aureus* were determined in NMB, it was found that *Stap. aureus* was diminished within 42 h. The concurred results were exhibited in Nham products. It was revealed that Nham samples of which added 5000 ppm of Chitosan combined with *P. pentosaceus* TISTR 536 (6.6 log cfu/g) could inhibit more growth of *Stap. aureus* than those samples of Nham using only Chitosan or *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter culture alone. Moreover, it was found that LAB were not inhibited by 5000 ppm of Chitosan and the inoculated strain of *P. pentosaceus* TISTR 536 as starter culture could still be found by using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) during Nham fermentation. Besides, the sensory characteristics results of Nham using Chitosan compared to the control sample without Chitosan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

showed no significant difference ($p>0.05$) of acceptance in color, flavor and overall liking evaluation by the consumers, but revealed a significant difference ($p\leq0.05$) of higher acceptance in odor of the product than the samples without Chitosan.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมถึงตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบรูณ์ อีกทั้งยังให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ คณาจารย์คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ รศ. ดร.สุเมธ ตันตระเธียร ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท สุทธิลักษณ์ อินโนฟู้ดส์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างแหนมดอนเมืองสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเพื่อนนักศึกษาสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร และคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้ข้อมูล คำแนะนำและช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย สำหรับความรักความเอาใจใส่ สนับสนุนช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ประโยชน์อันใดที่ได้จากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

พิมพิกา สายสวาสดิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง VIII

สารบัญรูป IX

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 บทนำ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ไคโตซาน 4

2.2 แหนม 14

2.3 *Salmonella* spp. 17

2.4 *Staphylococcus aureus* 19

2.5 Lactic acid bacteria 21

2.6 Polymerase Chain Reaction 26

2.7 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 28

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย 29

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 29

3.2 ขั้นตอนการวิจัย 32

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 39

4.1 ผลความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในแหนมโดยวิธี Spot-on-lawn Technique 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลของความเข้มข้นไคโตซานที่มีต่อเชื้อ *S.* Anatum, *S.* Derby, coagulase positive *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ศึกษาในแบบจำลองการหมัก 42

4.3 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติก ในผลิตภัณฑ์แหนม 59

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 76

5.1 สรุปผลการทดลอง 76

5.2 ข้อเสนอแนะ 77

บรรณานุกรม 78

ภาคผนวก 85

ภาคผนวก ก 86

ภาคผนวก ข 94

ประวัติผู้วิจัย 98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน 13

2.2 รายงานการวิจัยที่ใช้โคโตซานในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 14

2.3 สารอาหารของแบบจำลองแหนมที่ทดแทนในส่วนประกอบของแหนม 16

2.4 ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก 23

4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ระหว่างการหมักในแบบจำลองแหนม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 48

4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับกระเทียม ระหว่างการหมักในแบบจำลองเป็น เวลา 48 ชั่วโมง 53

4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก เมื่อใช้ไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap.*aureus ระหว่างการหมักในแบบจำลอง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 57

4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนม ระหว่างการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง 63

4.5 คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติก จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต 66

4.6 จำนวนแบคทีเรียแลคติก กลุ่ม cocci และเชื้อ *P. pentosaceus* ในแหนมทั้งสองตัวอย่าง 72

4.7 ผลการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคติน และไคโตซาน	5
2.2	Electron micrographs ของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium	13
2.3	แบบจำลองในการหมักแหนม	16
2.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Salmonella*	17
2.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Stap. aureus*	20
2.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lactobacillus plantarum*	25
2.7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Pediococcus pentosaceus*	26
4.1	ผลของระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร	41
4.2	ผลของระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อแบคทีเรียแลคติก	41
4.3	ผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum, *S.* Derby และ *Stap. aureus* ในแบบจำลองการหมัก	44
4.4	การยืนยันเชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose- Lysine Deoxycholate agar	45
4.5	การยืนยันเชื้อ *Stap. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar	45
4.6	ผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการลดลงของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917	47
4.7	ผลของไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองแหนม	52
4.8	ผลของไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียมต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus*	56
4.9	ผลของไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียมต่อการลดลงของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536	56
4.10	ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนม	59
4.11	ผลของไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม	61
4.12	ลักษณะรูปร่างและโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก	64
4.13	ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA	67
4.14	ผลผลิตพีซีอาร์จากแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์และแบคทีเรียแลคติกในแหนม ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III และ *Alu*I	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.15 ผลผลิตพีซีอาร์จากแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์และแบคทีเรียแลคติกในแหนมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III 71

4.16 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักเป็นเวลา 4 วัน ณ อุณหภูมิห้อง 75

ก.1 การแข็งตัวของ plasma อันเนื่องจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *Stap. aureus* สร้างขึ้น 85

ก.2 ลักษณะโคโลนีของ *Stap. aureus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Braid Parker agar 91

ข.1 ตัวอย่างแบบจำลองการหมักแหนม (NMB) 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

จุลินทรีย์สามารถแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางรวมทั้งในอาหาร บางชนิดทำให้อาหารการเน่าเสีย หรือเป็นพิษ ทั้งในแง่สร้างสารพิษในอาหาร เช่น สารพิษจาก *Staphylococcus aureus* หรือจากการบริโภคอาหารที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน เช่น *Salmonella* (บุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ, 2547) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์แหนมมีปัญหาทางด้านความปลอดภัยกล่าวคือ ไม่มีการควบคุมรักษาขั้นตอนการผลิต ความสะอาดของโรงงาน วัตถุดิบและส่วนผสมให้มีคุณภาพดี อาจทำให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้ แหล่งสำคัญที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษมาจากผู้สัมผัสอาหาร ดังนั้นสุขลักษณะของคนงานจึงมีส่วนสำคัญมาก (เรณู ทวิชชาติวิทยากุล, 2539) นงคราญ เรืองประพันธ์ และ นิตยา พันธ์บัว (2535) ได้สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในแหนม พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonalla* spp. และ *Stap. aureus* ค่อนข้างสูง โดยทั่วไปสาเหตุปัญหาเหล่านี้มาจากการใช้เนื้อสัตว์ดิบเป็นส่วนผสมหลักและไม่มีการให้ความร้อนในกระบวนการผลิต จึงมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งลักษณะการบริโภคโดยทั่วไปนิยมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อน จึงเป็นปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรคซาลโมเนลโลซิส ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจของประเทศ การแก้ไขต่างๆ ซึ่งได้มีหลายงานวิจัยใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคและระยะเวลาการหมักให้สั้นลง รวมถึงการใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินเป็นกล้าเชื้อ (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533; Swetwiwathana และคณะ, 2007)

ไคโตซานเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่สารพัดประโยชน์นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากไคโตซาน ซึ่งพบว่าคุณสมบัติประการหนึ่งสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (บุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ, 2547; Tsai และ Su, 1999; Roller และ Covill, 2000; No และคณะ, 2007) Shahidi และคณะ (1999) ได้เสนอกลไกการยับยั้งของไคโตซานโดยที่ประจุบวกบนโมเลกุลสามารถเกิดปฏิกิริยาร่วมกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุลบทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นๆ บุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารโดยไคโตซาน พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของ *Stap. aureus* *Escherichia coli* และ *S.* Typhimurium โดยมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญ เท่ากับ 100 500 และ 1000 ppm ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ปลอดภัยต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้บริโภคโดยใช้ในถนอมอาหารหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดในผลิตภัณฑ์แหนม ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และ *Stap. aureus* ในแบบจำลองการหมักแหนม (Swetwiwathana และคณะ, 1999) และผลิตภัณฑ์แหนม โดยอาศัยการใช้ไคโตซานที่มีความเข้มข้นเหมาะสมในการยับยั้งเชื้อเหล่านี้ เนื่องจากไคโตซานไม่มีผลเสียต่อมนุษย์และสัตว์ ซึ่งในระหว่างการหมักแหนมจำเป็นต้องอาศัยแบคทีเรียแลคติกในการหมัก แต่ไคโตซานที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาจมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิดได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อแบคทีเรียแลคติก ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแหนม เช่น *Pediococcus pentosaceus Lactobacillus plantarum* เป็นต้น รวมถึงการศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมไคโตซาน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth; NMB)
2. ศึกษาการใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและกระเทียม ต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในแบบจำลองการหมักแหนม
3. ศึกษาการลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ในช่วงระยะเวลาการหมักในผลิตภัณฑ์แหนม รวมทั้งศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างเติมไคโตซานและไม่เติมไคโตซาน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. วิเคราะห์หาความสามารถของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาระหว่างการหมักแหนม โดยวิธี Spot-on-lawn และศึกษาการลดลงของเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในแบบจำลองแหนม

2. ศึกษาการลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งถูกยับยั้งโดยการใช้ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในแบบจำลองแหนม และผลิตภัณฑ์แหนม

3. ศึกษาผลการใช้ไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียแลคติก ที่ใช้ในการศึกษา และศึกษาผลของไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและกระเทียมต่อการลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในแบบจำลองแหนม และผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม ระหว่างเติมไคโตซานและไม่เติมไคโตซาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คุณสมบัติหลายๆประการของไคโตซานสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแหนม ซึ่งอาจสร้างความปลอดภัยและเพิ่มคุณค่าในการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนมได้มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซานเป็นพอลิแซกคาร์ไรด์ ที่มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส มีหน่วยที่ซ้ำๆกัน คือ อะซิติลกลูโคซามีน (N-Acetylglucosamine) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า 2-amino-2deoxy-ß-D-glucose เชื่อมต่อด้วยพันธะ 1,4 ß-glucosidic มีองศาการเกิดพอลิเมอร์สูง น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1×10^5-1.2×10^6 กรัมต่อโมล ไคโตซานเป็นอนุพันธ์รูปหนึ่งของไคติน แต่ปราศจากหมู่อะซิติล (Acetyl groups) หรืออาจมีหมู่อะซิติลบางส่วน ขึ้นกับองศาการเกิดดีอะซิติเลชัน (degree of Deacetylation, DD) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2543)

2.1.1 การเตรียมไคโตซาน

สารตั้งต้นที่ใช้ในการเตรียมไคโตซานคือไคติน และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการเตรียมไคโตซานจากไคตินในสภาวะที่เป็นด่างเข้มข้น คือ ปฏิกิริยาดีอะซิติเลชัน (deacetylation) ผลจากการเกิดปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันจะทำให้หมู่อะซิติลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สอง ในวงแหวนไพราโนสของไคตินถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน การดึงหรือตัดหมู่อะซิติลออกจากไคตินนั้นสามารถดึงออกได้เพียงบางส่วนหรือเกือบทั้งหมด ซึ่งจะทำให้สมบัติหลายประการของไคตินเปลี่ยนแปลงไป พบว่าเมื่อดึงหมู่อะซิติลของไคตินออกเกินครึ่งหนึ่งหรือคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปทำให้ได้สารที่มีสมบัติการละลายได้ในกรดอินทรีย์อ่อนๆ เช่น กรดแลคติกที่พบในนมเปรี้ยว กรดอะซิติก หรือกรดซิตริกที่พบในพืชตระกูลส้ม

วิธีการเตรียมไคโตซานจากไคตินมีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันในรายละเอียด แต่สามารถแบ่งวิธีการที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันได้เป็น 2 วิธี (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาลี, 2544)

1. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับด่างที่หลอมเหลว (Alkali fusion)

วิธีนี้เป็นการทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันในสภาวะที่รุนแรง โดยการหลอมละลายด่างที่อุณหภูมิสูงเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับไคติน เช่นการหลอมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส โดยให้ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน แม้ว่าไคโตซานที่เตรียมได้จะมีค่าการเกิดดีอะซิติเลชันสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ แต่จากภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยาทำให้เกิดปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชัน (depolymerization) ทำให้ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

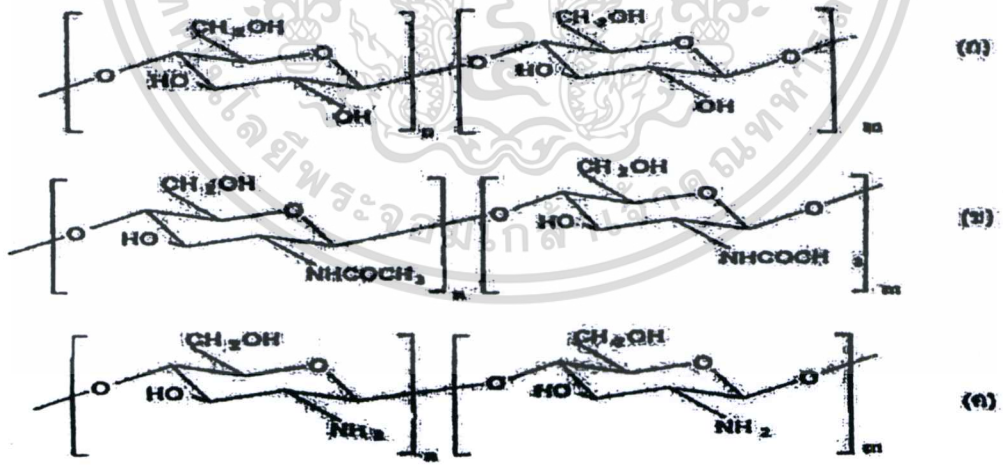
2. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินในสารละลายด่าง

วิธีนี้มีการใช้และศึกษากันมากกว่าวิธีแรก โดยสารละลายด่างที่นิยมใช้คือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ก็มีรายงานการใช้สารละลายอื่นด้วย เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมไฮดรอกไซด์ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ค่าระดับของการดีอะซิติเลชันของไคโตซานที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็นสำคัญ

2.1.2 โครงสร้างของไคโตซาน

ไคโตซานและเซลลูโลสมีโครงสร้างที่คล้ายกันมาก ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งสามารถผสมกันในสารละลายกรดอะซิติกและกรดไตรฟลูออโรอะซิติก เตรียมเป็นฟิล์มได้ (Hasegawa และคณะ, 1992) อย่างไรก็ตามความว่องไวในการทำปฏิกิริยาของไคโตซานและเซลลูโลสมีความแตกต่างกัน เมื่อเซลลูโลสละลายในกรดไตรฟลูออโรอะซิติกจะเกิดเป็นไตรฟลูออโรอะซิเทต แต่ไคโตซานจะเกิดอยู่ในรูปของเกลือเท่านั้น

ไคโตซานมีคุณสมบัติที่หลากหลายและโดดเด่นทางเคมี ทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น ด้านการเกษตร ใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ใช้เป็นยาฆ่าแมลงและไส้เดือน ยาฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2543) ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ใช้เป็นวัตถุกันเสีย ใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม (เยาวภา ไหวพริบ, 2536) เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก) ไคติน (ข) ไคโตซาน (ค)

ที่มา : Majeti (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 สมบัติทางเคมีกายภาพของไคติน ไคโตซาน

2.1.3.1 การละลาย (Sobility)

ไคตินไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างทั้งเจือจางและเข้มข้น แอลกฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เข้มข้น กรดซัลฟูริก (กรดกำมะถัน) เข้มข้น กรดฟอสฟอริก (78-79 เปอร์เซ็นต์) กรดฟอร์มิก (anhydrous formic acid) และ DMAc-LiCl (N, N-Dimethylacetamide-Lithium chloride) ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันอย่างหนาแน่นมีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน (หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะซีตามิโด)

ไคโตซานไม่ละลายในน้ำ ด่างและตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายสารไคโตซาน กรดอนินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตซานได้เช่นกัน แต่ภายใต้การคนที่อุณหภูมิสูงปานกลาง อย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น

สารละลายไคโตซานมีความเหนียว ใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวโตเนียน (non-newtonian) หมู่อะมิโนของไคโตซานจะแตกตัวในสารละลาย โดยค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pK_a) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของโพลิเมอร์ โดย pK_a ของไคโตซานมีค่าอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 6.8 ความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง ไคโตซานสามารถละลายได้ที่ความเป็นกรด- ด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 (Felt และคณะ, 1998)

2.1.3.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

มวลโมเลกุลเป็นสมบัติสำคัญในการบอกคุณสมบัติทั้งทางกายภาพ และทางเคมีของไคโตซาน ไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 1×10^6 ดาลตัน ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1×10^5 ถึง 1.2×10^6 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการผลิต การหามวลโมเลกุลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ศึกษาสมบัติการกระเจิงแสงการศึกษาสมบัติความหนืดและการใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี (Kumar, 2000)

2.1.3.3 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation)

เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน-ไคโตซาน เนื่องจากไคติน-ไคโตซานเป็นโคโพลิเมอร์ระหว่างสองโมโนเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่ร่วมกันของโมโนเมอร์แรกมากกว่าคือมีค่า Degree of deacetylation ต่ำจะแสดงสมบัติเด่นของไคติน แต่ถ้าสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สองมากกว่า คือมีค่า Degree of deacetylation สูง จะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล เป็นปัจจัยพื้นฐานทางโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อสมบัติของไคโตซาน เช่น การละลาย ความหนืด การดูดความชื้น การดูดซับไขมัน และความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการนำไปประยุกต์ใช้ (Cho และคณะ, 2000)

2.1.3.4 ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น degree of deacetylation น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น ionic strength ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายโพลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดอะซีติกจะเพิ่มขึ้น เมื่อสารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เพิ่มขึ้น เมื่อความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเพิ่มขึ้น

สารโพลีแซคคาไรด์ที่มีกิ่งก้านโดยเฉพาะกิ่งก้านที่มีหลายลักษณะ จะให้สารละลายคอลลอยด์ที่ข้นหนืดและอยู่ตัว เนื่องจากโมเลกุลไม่สามารถเข้าใกล้กันและจับตัวกันเป็นเจลได้ ความหนืดขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุล รูปร่างและประจุ สารโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่จะให้โซลที่มีความหนืดสูงกว่าสารที่มีโมเลกุลกิ่งก้าน ถ้าความเข้มข้นเท่ากันหรือมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน โมเลกุลที่มีกิ่งก้านมากจะพองตัวได้น้อยกว่าโมเลกุลที่ไม่มีกิ่งก้านเมื่อมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน สำหรับสารโพลีแซคคาไรด์ที่แตกตัวให้อนุมูลได้ เช่น สารที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลจะเกิดเจลได้ดีถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 2.8 เนื่องจากในสภาพเช่นนี้โมเลกุลจะไม่แตกตัว การมีประจุบวกทำให้ความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการผลักของโมเลกุล เมื่อทำการกวนโมเลกุลไม่สามารถเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงได้การต้านทานการไหลจึงเกิดขึ้นมาก นอกจากนี้ยังเกิดการพองตัวที่เกิดขึ้นมาก โดยเฉพาะโมเลกุลเป็นสายยาวและสามารถยืดออกได้เต็มที่ การใส่สารที่มีประจุลงไปทำให้ความหนืดเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากสารชนิดนี้มีผลต่อรูปร่างและขนาดของโมเลกุล นอกจากนี้ยังมีผลต่ออนุมูลที่มีประจุตรงข้ามที่ละลายอยู่ (Kumar, 2000)

2.1.3.5 Coagulating ability

ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอน (flocculant and coagulating agent) ที่ดี เนื่องจากการมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวกและจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีย้อม และโพลิเมอร์อื่น จากการวิจัยประสิทธิภาพของไคโตซาน ในการแยกโปรตีนออกจาก cheese whey พบว่าความสามารถในการจับโปรตีนเป็นสัดส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับกับโลหะหนักได้ โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของไคโตซานจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธะเชิงซ้อน (coordinate) กับหมู่อะมิโนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่อะมิโนในไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซีติลในไคติน ดังนั้นไคโตซานที่มี degree of deacetylation สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะสูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะไคโตซานยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น การเป็นผลึก และความสามารถในการดึงดูดน้ำหนักของไคโตซาน

2.1.3.6 การเสื่อมสลาย (Degradation)

ไคติน-ไคโตซานก็เหมือนกับโพลิเมอร์ หรือโพลิแซคคาร์ไรด์อื่นทั่วไป คือเมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็น โอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือ โอลิโกแซคคาร์ไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่าโมโนเมอร์ (monomer) หรือ โมโนแซคคาร์ไรด์ (monosaccharide) โอลิโกเมอร์ / โอลิโกแซคคาร์ไรด์ของไคตินและไคโตซาน คือ N-acetyl-chitooligosaccharide และ chitooligosaccha-rides ตามลำดับ ส่วนโมโนเมอร์ / โมโนแซคคาร์ไรด์ของไคตินและไคโตซานคือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ

2.1.3.7 การเสื่อมสลายโดยกรด (Acid hydrolysis)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตซาน เนื่องจากกรดเป็นแบบสุ่ม (random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ โอลิโกเมอร์ขนาดต่าง ๆ และโมโนเมอร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของโมโนเมอร์ โดยไคตินจะสามารถต้านทานต่อการเสื่อมโดยกรดได้ดีกว่าไคโตซาน

2.1.3.8 การเสื่อมสลายโดยด่าง (Alkaline degradation)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของโพลิแซคคาร์ไรด์ ในด่างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล การเสื่อมสลายแบบนี้เรียกอีกอย่างว่า peeling reaction

2.1.3.9 การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ (Enzymic degradation)

การเสื่อมสลายโดยการใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้สารเคมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคติน-ไคโตซาน ได้แก่ Chitinase (EC 3.2.1.14) สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม (random) ตรงตามตำแหน่งพันธะ (-1, 4- linkage ได้เป็น N-acetyl-chitooligosaccharide Chitosanase)(EC 3.2.1.132) สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานแบบสุ่ม (random) ตรงตำแหน่งพันธะ (-1,4-linkage) ได้เป็น chitooligosaccharide Lysozyme (EC 3.2.1.17) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายกับ chitinnase N-acetylglucosamindase (EC 3.2.1.30) และ N-aceylhexosamindase (EC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.52) ทำหน้าที่ย่อยสลาย N-acetylchitooligosaccharides เป็น N-acetylglucosamine โดยเริ่มจากปลายสายโซ่โมเลกุล (non-reducing end) (เยาวภา ไหวพริบ, 2536)

2.1.4 ประยุกต์ใช้ไคโตซานในอุตสาหกรรมอาหาร (เยาวภา ไหวพริบ, 2536)

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำเอาโพลีแซคคาไรด์ มาใช้ในการเปลี่ยนแปลงหรือควบคุมสมบัติต่างๆของอาหารอย่างมากมาย โพลีแซคคาไรด์ตัวใหม่ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือ ไคตินและไคโตซาน โดยใช้เป็น

2.1.4.1 สารลดปริมาณโคเลสเตอรอลและไขมันอื่น ๆ

โมเลกุลไคโตซานจะทำหน้าที่เป็นตัวจับไขมัน (fat scavenger) ในระบบย่อยอาหาร โดยจะจับไขมันที่มากเกินไปที่ภาวะเป็นกรดในกระเพาะอาหารและตกตะกอนบริเวณ duodenum ในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงสามารถจับไขมันและคอเลสเตอรอลและในที่สุดจะถูกขับถ่ายออกไป สมบัติดังกล่าวทำให้ไคโตซานมีแนวโน้มที่จะถูกนำไปใช้ในอาหารสุขภาพ (health food) ต่างๆ เพื่อลดความอ้วนลดปริมาณคอเลสเตอรอล และลดการเกิดมะเร็งของลำไส้ใหญ่ ความจริงแล้วสมบัติดังกล่าวนี้น่าจะนำไปใช้ในเรื่องของยา แต่สามารถใช้ในอาหารได้ในปริมาณจำกัด คือ 1-10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารโดยอาจใช้โดยตรงหรือในรูปสารประกอบกับกรดไขมัน

2.1.4.2 สารยับยั้งอาการ lactose intolerance

ปัญหาเรื่อง lactose intolerance เป็นปัญหาที่พบบ่อยในบริเวณทวีปแอฟริกา เอเชีย ลาตินอเมริการวมทั้งอเมริกา ซึ่งเกิดจากการขาดเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส วิธีแก้ปัญหาได้แก่ การใช้อนุพันธ์ของไคติน คือ alkyl-N-acetyl-D-glucosamine หรือใช้การเติมไคตินและเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ลงไปในอาหาร โดยวิธีหลังจะเป็นวิธีที่ได้ผลดีที่สุด ถ้าสามารถหาแหล่งของเอนไซม์ ไคตินเนส ที่มีราคาถูกได้ เช่น จากถั่วเหลือง เป็นต้น

2.1.4.3 สารให้กลิ่นรสอาหาร

ไคตินสามารถถูกทำให้มีโมเลกุลเล็กลง หรือที่เรียกว่า microcrystalline chitin และสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารได้ ในขณะที่ไคตินไม่สามารถละลาย หรือกระจายตัวในน้ำได้ เมื่อ microcrystalline chitin ถูกให้ความร้อนในการหุงต้ม จะทำให้เกิด parazines ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรสในอาหาร นอกจากนี้ไคโตซานยังเป็นสารช่วยจับกรดอะมิโนต่าง ๆ ในน้ำล้างจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลได้ โดยใช้เป็นตัวดูดซับในเทคนิค ion exchange chromatography กรดอะมิโนต่าง ๆ ที่ถูกซับได้ ได้แก่ arginie, alanine, glutamic acid, serine และ glycine ซึ่งล้วนแต่เป็นสารให้กลิ่นรสที่สำคัญของอาหารทะเลทั้งสิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.4 สารช่วยเพิ่มเส้นใยในอาหาร

ไคตินไคโตซานมีบทบาทเป็นเส้นใยอาหาร เส้นใยอาหารหรือไฟเบอร์เป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่ไม่มีรสหวาน ไม่ละลายน้ำ ไม่ย่อยในกระเพาะอาหารของคน ไม่ให้พลังงานหรือสารอาหารแก่ร่างกาย แต่มีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย ช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อโรคระบบทางเดินอาหาร เช่น มะเร็งลำไส้ ท้องผูก ริดสีดวงทวาร โรคหัวใจ โรคอ้วน ไขมันอุดตันเส้นเลือด ในประเทศญี่ปุ่นไคโตซานถูกเติมลง ในอาหารต่างๆ หลากหลายชนิด เช่น คุกกี้ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ บะหมี่ และน้ำส้มสายชู เป็นต้น (Shahidi และคณะ, 1999) การใช้ไคตินและไคโตซานไม่มีผลต่อกลิ่นรสหรือสีในอาหารอบ ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นสารช่วยเพิ่มเส้นใยในอาหารได้

2.1.4.5 สารที่ทำหน้าที่ต่างๆ ในอาหาร

ทั้งไคติน microcrystalline chitin และไคโตซานสามารถที่จะดูดซับน้ำได้มากกว่า microcrystalline cellulose รวมทั้งสามารถใช้เป็นสารช่วยให้เกิด emulsion ได้ ไคโตซานความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 M ทำให้เกิดอิมัลชันที่คงตัว นอกจากนี้ไคโตซานสามารถช่วยคุมลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) และความหนืด (viscosity) ของอาหารได้ด้วย

2.1.4.6 ตัวพาหะ

ไคตินและไคโตซานใช้เป็น carrier สำหรับอาหารโดยใช้เป็นตัวควบคุมการ release ของสารต่าง ๆ เช่น สีย้อม วัตถุกันเสีย สารให้ความหวาน สารกลิ่นรส และสารอาหารอื่น ๆ ณ ภาวะที่กำหนด เช่น อุณหภูมิหรือความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการ นอกจากนี้ไคโตซานสามารถลดกลิ่นของวัตถุกันเสียได้ในอาหารได้ด้วย

2.1.4.7 วัตถุกันเสีย

อนุพันธ์ของไคโตซาน คือ N-carboxymethyl chitosan สามารถยับยั้งการพัฒนากลิ่นที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เนื้อที่ไม่ผ่านการบ่มได้ ทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ไคโตซานและอนุพันธ์ยังสามารถใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารอื่นๆ ได้อีก เช่น อาหารหมักดอง วุ้นบะหมี่ ผักสด เนื้อปลาสด เป็นต้น ในบางครั้งอาจใช้ไคโตซานกับสารปฏิชีวนะที่เป็นสารประกอบกับโลหะ หรือกรดอินทรีย์บางตัว

ไคโตซานเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobials) เช่น เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากประจุบวกตรงคาร์บอน ตำแหน่งที่ 2 ของ glucosamine (หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของไคโตซาน) เมื่อความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 6 กลไกที่แท้จริง ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคติน ไคโตซานและอนุพันธ์ยังไม่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ทราบกันแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีการเสนอแนะกลไกต่างๆ ที่เป็นไปได้มากมาย เช่น การที่ไคโตซานเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวก ซึ่งสามารถเกิด interaction กับเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีน และสารอื่นของเซลล์ หรือการที่ไคโตซานเป็น chelating agent ซึ่งสามารถเลือกจับโลหะแม้ในปริมาณน้อยๆ ได้ ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารพิษ (toxin) และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.1.4.8 สารให้ความหวาน (sweetener)

ไคตินสามารถไฮโดรไลซ์เป็นหน่วยที่เล็กที่สุด N-acetyl-D-glucosamine ได้ด้วยกรดหรือเอนไซม์ไคตินเนส (chithinase) และเอนไซม์ไคโตไบเอส (chitobiase) ผลที่ได้เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์จะได้ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นสารให้ความหวานได้ นอกจากนี้ไคตินและไคโตซานยังใช้เติมในสารให้ความหวานเพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง และลดการผุของฟันได้ ปัจจุบันได้มีการใช้ไคติน ไคโตซานผสมในยาสีฟัน หมากฝรั่ง และน้ำยาบ้วนปาก เพื่อระงับกลิ่นปาก และป้องกันฟันผุ

2.1.4.9 บรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุอาหาร

เพื่อยืดเวลาการเน่าเสีย และรักษาคุณภาพของอาหารสด พลาสติกฟิล์มที่ใช้กันในปัจจุบัน คือ โพลิเอธิลีนชนิดความหนาแน่นสูง มีข้อเสียคือ ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียเร็ว เนื่องจากการกักเก็บของก๊าซออกซิเจนและการควบแน่นของน้ำ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในขณะเก็บรักษา ซึ่งสภาวะเหล่านี้ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี แผ่นฟิล์มไคโตซานเมื่อนำไปเคลือบบนผิวของผักและผลไม้ จะมีลักษณะเป็นฟิล์มบางๆ ใส ปราศจากสีและกลิ่น สามารถยืดอายุอาหารได้ดีกว่า เนื่องจากสามารถควบคุมการถ่ายเทความชื้นระหว่างอาหารและสภาวะแวดล้อมภายนอก ควบคุมอัตราการหายใจ การผลิตก๊าซเอธิลีน ควบคุมอุณหภูมิได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำไคโตซานมาเคลือบผัก ผลไม้หลายชนิด เช่น ส้ม ลูกพีท ลูกแพร กีวี สตรอเบอรี มะเขือเทศ แตงกวา มะนาว พริกหยวก (Shahidi และคณะ, 1999)

2.1.4.10 single cell protein

ไคตินที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์สามารถเปลี่ยนให้เป็น single cell protein ได้โดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวเปลี่ยน

2.1.4.11 อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม

สหรัฐอเมริกายินยอมให้ใช้ไคโตซานในการทำให้น้ำบริสุทธิ์ โดยใช้ในปริมาณไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ไคโตซานมีความสามารถในการดูดซับอนุภาคโลหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคยาฆ่าแมลงและอื่น ๆ ในน้ำ นอกจากนี้สามารถใช้โคโตซานลดความขม และช่วยทำให้น้ำผลไม้ หรือเครื่องดื่มอื่น ๆ ใสได้ รวมทั้งไคโตซานเมมเบรน สามารถใช้ในกระบวนการ Reverse osmosis ได้อีกด้วย

2.1.4.12 กระบวนการนำโปรตีนกลับมาใช้ใหม่จากของเสียที่ได้จากกระบวนการแปรรูปอาหาร

ไคโตซานสามารถจับกับโปรตีนในน้ำเสีย ที่ได้จากโรงงานแปรรูปอาหาร เช่น โรงงานแปรรูปไก่และไข่ โรงงานแปรรูปผักผลไม้ เป็นต้น ทำให้สามารถนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีกครั้งหนึ่ง โดยมักนิยมใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ในปริมาณไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารทั้งหมด เพราะทั่วไปหลังจากสารที่ตกตะกอนได้ ถูกทำให้แห้งจะมีไคโตซานโดยเฉลี่ย 0.5-8 เปอร์เซ็นต์ และมีโปรตีน 30-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ปริมาณไคโตซานที่ใช้อยู่ในช่วง 0.05-0.1 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารทั้งหมด จัดได้ว่าอยู่ในระดับที่คณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกากำหนดไว้

2.1.5 กลไกของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

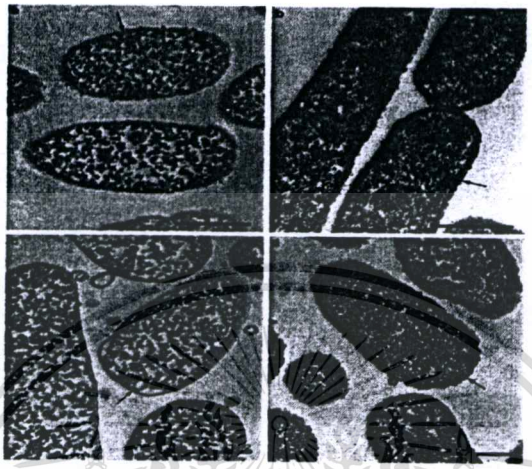
Hadwiger และคณะ (1984) ได้เสนอว่าไคโตซานอาจมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของเชื้อรา โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับ DNA แม้ว่าโมเลกุลของไคโตซานจะมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะผ่านเข้าเซลล์เมมเบรนได้ แต่ไคโตซานอาจจะถูกย่อยโดย hydrolytic enzyme เช่น chitinase จากตัวจุลินทรีย์

Tsai และSu (1999) เสนอว่าในการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซานเกิดจากการจับกันระหว่างประจุบวกของไคโตซานและประจุลบบนพื้นผิวเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ membrane permeability ทำให้เกิดการรั่วของสารประกอบภายในเซลล์ เช่น กลูโคส และ lactate dehydrogenase (LDH) จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย

ไคโตซานเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobials) เช่น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากประจุบวกตรงคาร์บอน ตำแหน่งที่ 2 ของ glucosamine (หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของไคโตซาน) เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 6 กลไกที่แท้จริง ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคติน ไคโตซานและอนุพันธ์ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัด อย่างไรก็ตามมีการเสนอแนะกลไกต่าง ๆ ที่เป็นไปได้มากมาย เช่น การที่ไคโตซานเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวก ซึ่งสามารถเกิด interaction กับเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีน และสารอื่นของเซลล์ หรือการที่ไคโตซานเป็น chelating agent ซึ่งสามารถเลือกจับโลหะแม้ในปริมาณน้อยๆ ได้ ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารพิษ (toxin) และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้มีงานวิจัยของ Helander และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2001) ศึกษาการทำงานของไคโตซานต่อเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ดังรูปที่ 2.2 อีกทั้ง Aleksandra และคณะ (2005) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพื้นฐานและฟังไจของไคโตซานในกรดแลคติก พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดังตารางที่ 2.1 และได้มีงานวิจัยต่างๆโดยใช้ไคโตซานศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารประเภทต่างๆ มากมาย ดังตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.2 Electron micrographs ของเชื้อ *E. coli* เมื่อใช้ (a) buffer, (b) chitosan (250 ppm) และเชื้อ *S.* Typhimurium เมื่อใช้ (c) buffer, (d) chitosan (250 ppm) ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.3 จุดที่ลูกศรชี้ คือ outer membrane (OM). Bar = 0.5 nm.

ที่มา : Helander และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.1 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน

Microorganism	Chitosan MIC values (mg/cm^3)
Escherichia coli	1
Pseudomonas aeruginosa	1.7
Staphylococcus aureus	0.7
Salmonella Paratyphi	2
Candida albicans	0.6
Trichophyton mentagrophytes	2.2
Microsporum canis	1.1

ที่มา : Aleksandra และคณะ (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 รายงานการวิจัยที่ใช้โคโตซานในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Microorganism	food
Bacillus cereus	fruit and veg.
	meat
	seafood
Clostridium perfringens	sausage
Escherichia coli	Meat
	sausage
Lactobacillus curvatus	fruit and veg.
	meat
Salmonella Enteritidis	meat
Salmonella Typhimurium	meat
Staphylococcus aureus	meat

ที่มา : No และคณะ (2007)

2.2 แหนม

แหนม (Nham หรือ Fermented ground pork) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมู และหนังหมู อาจมีหูหมู จมูกหมูอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างผสมอยู่ แล้วเติมเครื่องปรุง ห่อเป็นมัดหรือบรรจุในภาชนะบรรจุ หมักจนได้รสเปรี้ยว อาจนำไปฉายรังสีด้วยก็ได้ โดยผ่านรังสีแกมมาไม่เกิน 7 กิโลเกรย์ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2547) ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่สำคัญประเภทหนึ่งซึ่งมีต้นกำเนิดในภาคเหนือ เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมูหมักที่มีลักษณะกึ่งแห้ง ทำจากเนื้อหมูและหนังหมูเป็นหลัก โดยอาศัยกระบวนการหมักให้เกิดกรดอินทรีย์จากสารคาร์โบไฮเดรตโดยปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ในระหว่างการหมักจะต้องควบคุมสภาวะให้เหมาะสมเพื่อกำหนดให้จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536) จุลินทรีย์ที่พบในระยะแรกจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะที่สร้างกรดได้ดี และเจริญในที่มีอากาศน้อย คือ กลุ่ม homofermentative cocci เช่น *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ที่เจริญจำนวนมาก เชื้อชนิดนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างเป็นกรดแลคติกออกมาส่วนใหญ่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ซึ่งความเป็นกรด-ด่างของแหนมวันที่ 4 ควรมีค่าต่ำกว่า 4.5 และมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(บุษกร อุตรภิชาติ., 2545) การผลิตแหนมส่วนใหญ่อาศัยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ปะปนมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติและสามารถสร้างกรดได้

จรูญ คำนวณตา (2509) รายงานว่าการผลิตแหนมอาศัยกระบวนการหมักทำให้เกิดกรดอินทรีย์ในระยะแรกของการหมักจุลินทรีย์หลักที่ติดมากับเนื้อหมู ได้แก่แบคทีเรียแลคติกมีรูปร่างแท่งและรูปร่างกลมซึ่งสามารถสร้างกรดได้ และพวกที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียหลังการหมัก 24 ชั่วโมงแล้วซึ่งแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตัวอื่นๆได้ รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

เนื้อสัตว์ดิบส่วนมากจะมีการปนเปื้อนของ *Salmonella* สูงมาก เนื่องจากการผลิตแหนมในประเทศเป็นอุตสาหกรรมแบบครัวเรือน มักใช้แรงงานคนในการผลิตการควบคุมสุขลักษณะจึงเป็นไปได้ยาก ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแหนมในด้านต่างๆมากมาย ซึ่งส่วนมากจะเน้นถึงงานวิจัยในด้านการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย การฉายรังสีเพื่อความปลอดภัยในการผลิตแหนม รวมถึงคุณภาพที่ดีของแหนม เพื่อที่จะปรับปรุงคุณภาพทั้งในแง่ของกระบวนการผลิต และความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังเช่นงานวิจัยของ Swetwiwathana และคณะ (2003) ได้ศึกษาการสร้าง bacteriocin ของแบคทีเรียแลคติกในแหนม เป็นสารที่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่เป็น indicator ได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ N100 และ N190 จะให้ผลยับยั้งพวกแกรมบวกที่เป็น Pathogens ในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และพวกแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้ดี ต่อมา Swetwiwathana และคณะ (2004) ศึกษาผลของกระเทียมและไนไตร์ทที่มีต่อการผลิต Pediocin PA-1 ของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ *S.* Anatum ในสภาวะการหมักแหนมจำลอง (NMB) พบว่ากระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เจริญได้ดีทั้งในที่มีและไม่มีไนไตร์ท เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ใส่กระเทียม สามารถลดจำนวนของ *S.* Anatum ได้ภายใน 30 ชั่วโมง

การผลิตแหนมในประเทศส่วนมากยังเป็นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือน ซึ่งมักใช้กำลังคนในการผลิต ดังนั้นการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Stap. aureus* และ*Salmonella* จึงมีโอกาสที่ปนเปื้อนเป็นไปได้มาก มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารเป็นพิษในผลิตภัณฑ์แหนม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S.* Anatum ซึ่งพบมากและทนต่อการทำลายด้วยกรดในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533) อีกทั้งยังมีการสุ่มตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพฯ และปริมณฑล พบมีความชุกของการปนเปื้อนเชื้อ *Stap. aureus* ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนยังอยู่ในระดับต่ำ (นิภา โชคสัจจะวาที, 2552)

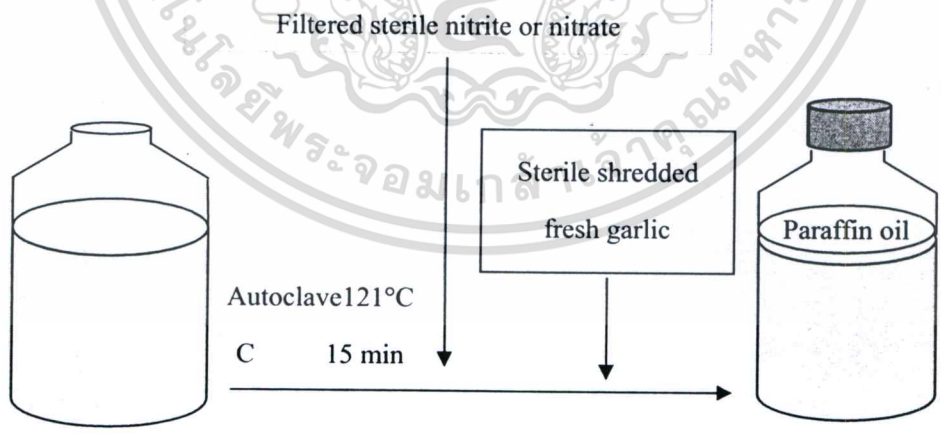
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แบบจำลองการหมักแหนม (Nham Model Broth : NMB)

สามารถทำได้โดยการใช้สารอาหารมาทดแทนส่วนประกอบต่างๆที่ใช้ในการทำแหนม (ตารางที่ 2.3) โดยใช้สารสกัดจากเนื้อทดแทนเนื้อหมู หนังหมูสุกไม่เป็นปัจจัยในการเจริญของเชื้อ กลูโคสทดแทนข้าวสุก กระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ทดแทนกระเทียมสด โซเดียมคลอไรด์ทดแทนเกลือ และไนไตร์ทหรือไนเตรทต้องกรองฆ่าเชื้อ แล้วปรับสภาพการหมักแหนมให้เหมือนกับการหมักแหนมจริง (รูปที่ 2.3) ดังนี้

ตารางที่ 2.3 สารอาหารของแบบจำลองแหนมที่ทดแทนในส่วนประกอบของแหนม

ส่วนประกอบแหนม	ส่วนประกอบแบบจำลองแหนม (NMB)
เนื้อหมู 650 กรัม	เนื้อสกัด (Meat extract) 10 กรัม
หนังหมูสุก 350 กรัม	ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ
ข้าวสุก 60 กรัม	กลูโคส 10 กรัม
กระเทียม 50 กรัม	กระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 50 กรัม
เกลือ 25 กรัม	เกลือ 25 กรัม
ไนไตร์ท/ไนเตรท 125/500 ppm	กรองฆ่าเชื้อในปริมาณเท่าเดิม
กรดแอสคอบิก 0.5 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส 0.3 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม



รูปที่ 2.3 แบบจำลองในการหมักแหนม

ที่มา : Swetwiwathana และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จากรูปที่ 2.3 เติมส่วนประกอบของแบบจำลอง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และปรับค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ เท่ากับ 0.97 โดยใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เติมไนไตร์ทที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ และกระเทียมสับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เททับด้วยน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.3 *Salmonella* spp.

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรง อยู่ในตระกูลเอนเตอโรแบคเทอริซิอี (family enterobactericeae) มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (รูปที่ 2.4) แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง เชื้อ *Salmonella* เจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดีกว่า การเกิดโรคอาหารเป็นพิษสืบเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร (สุมณฑาวัฒนสินธุ์, 2545)

รูปที่ 2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Salmonella*

ที่มา : http://www.food-info.net/uk/bact/salm.htm

Salmonella เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนต่อความร้อน สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนความร้อนขึ้นกับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญได้ *S.* Senftenberg เป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่า *Salmonella* ทั่วไป ถึง 10–20 เท่า โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลาในการให้ความร้อนนานถึง 1 ชั่วโมง ในการทำลายจุลินทรีย์ดังกล่าว (อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ, 2546)

การแพร่กระจาย แหล่งที่อยู่อาศัยอันดับแรก คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ แล้วแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย วนเวียนเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหารสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ โดยปกติแล้ว *Salmonella* จะแพร่จากสัตว์ไปสู่คนโดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
120067

บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน *Salmonella* หรืออาจเป็นการแพร่จากบุคคลหนึ่งไปยังอีกบุคคลหนึ่งได้ โดยคนหรือสัตว์อาจเป็นพาหะ (carrier) โดยมีอาการปกติแต่มี *Salmonella* อยู่ในทางระบบทางเดินอาหาร ดังนั้น คนหรือสัตว์ที่เป็นพาหะจึงเป็นแหล่งแพร่ *Salmonella* ในทางระบาดวิทยา จำแนกเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. เชื้อ *Salmonella* ที่อาศัยคนเป็นโฮสต์เพียงอย่างเดียว

   ประกอบด้วย *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi C จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงมากที่สุด

2. เชื้อ *Salmonella* ที่ปรับตัวตามโฮสต์ (สามารถทำให้เกิดโรคกับคนโดยผ่านทางอาหาร)

   ประกอบด้วย *S.* Enteritidis, *S.* Pullorum และ *S.* Gallinarum อาศัยเป็ด-ไก่เป็นโฮสต์ประจำ

3. เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่จำกัดโฮสต์

   ได้แก่เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ ประกอบด้วยเชื้อ *Salmonella* ที่เหลือทั้งหมดซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Salmonellosis)

การเจริญ เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากไม่ใช้น้ำตาลสองชั้นโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น แลคโตส ซูโครส แต่สามารถหมักน้ำตาลชั้นเดียว เช่น กลูโคส ให้ก๊าซ สามารถเจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง ระหว่าง 4.0-9.0 (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ความสามารถในการทำให้เกิดโรค *Salmonella* ที่มีอาหารเป็นพาหะรอดชีวิตจากการย่อยของระบบทางเดินอาหาร และมีจำนวนเซลล์มากพอที่จะก่อให้เกิดโรค การติดเชื้อโดยทั่วไปต้องการจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6-10^8 cfu/g แต่จากหลักฐานทางระบาดวิทยา การติดเชื้ออาจเกิดจากเซลล์เพียงแค่ 2-3 เซลล์เท่านั้น (Robinson และคณะ, 2000) เซลล์จะเข้าเกาะที่เนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหารและเข้าไปอยู่ในลำไส้เล็กส่วนปลายแล้วเพิ่มจำนวนขึ้น หลังจากนั้นจะผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลืองเข้าทำลายเม็ดเลือดขาว เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะทำให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และคณะ, 2544) *Salmonella* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้จากสารพิษเอนโดทอกซิน (endotoxin) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ โพลีแซคคาไรด์-พอลีเพปไทด์ลิปิด เอ (Polysaccharide-polypeptide-lipid A) มีอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อผู้บริโภคทานอาหารที่มีเชื้อนี้เข้าไปในปริมาณที่สูงพอ จะเกิดอาการภายใน 6-36 ชั่วโมง (Hobbs และ Gilbert, 1978) โดยความรุนแรงของอาการจะแตกต่างตามปริมาณของเชื้อ สายพันธุ์ และความต้านทานของผู้บริโภค

อาการเป็นพิษ *Salmonella* เกี่ยวข้องกับสารพิษ 2 ชนิดคือ เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) และ ไซโตทอกซิน (cytotoxin) Koupal และ Deibel (1975) รายงานว่าความเป็นพิษของเอนเทอโรทอกซินของ *Salmonella* จะทำให้เกิดลักษณะความเป็นพิษคล้ายกับพิษของ *E. coli* โดยทำให้ cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) เพิ่มขึ้นในลำไส้และชักนำให้ของเหลวในร่างกายของสัตว์ทดลองตกตะกอน นอกจากนี้เอนเทอโรทอกซินของเชื้อ *Salmonella* ยังมีลักษณะทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวภาพและพันธุกรรมคล้ายกับสารพิษของเชื้ออหิวาต์ (Cholera toxin-CT) เชื้อ *Salmonella* ยังก่อให้เกิดอาการคล้ายบิด ทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นอาการที่นอกเหนือจากฤทธิ์ของเอนเทอโรทอกซิน และจากการวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่า สารพิษที่ทำให้เกิดอาการคล้ายบิดและทำให้เยื่อบุลำไส้ของสัตว์ทดลองถูกทำลายคือสารพิษประเภท ไซโตทอกซิน (Koo และ Peterson, 1983)

อาการของโรคอาหารเป็นพิษ ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษได้ภายในเวลา 12-14 ชั่วโมงหลังการบริโภคอาหาร ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่น และท้องเดิน ตามด้วยอาการเหงื่อแตก อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ เป็นลม มีไข้ปานกลาง มึนงง อาการมักทรงตัวราว 2-3 วัน อัตราการตายเฉลี่ยร้อยละ 4.1

การป้องกันและการควบคุม การควบคุมเชื้อ *Salmonella* จำเป็นต้องทำตลอดห่วงโซ่อาหาร นับตั้งแต่ระดับฟาร์ม (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

สำหรับรายงานการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์แหนม อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ในแหนม 56 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Salmonella* ทั้งสิ้น 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมากได้แก่ *S.* Derby และ *S.* Anatum พบถึง 20.50 และ 14.72 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่า *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะการหมักแหนมได้ดีที่สุด ต่อมา อดิศร เสวตวิวัฒน์ และอรุณ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้า จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนมากถึง 30 ตัวอย่าง

2.4 *Staphylococcus aureus*

Stap. aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลม (cocci) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (รูปที่ 2.5) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.0 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศได้ดีกว่า (Pearson และ Dutson, 1990) สามารถสร้างสารพิษซึ่งขับออกมานอกเซลล์เรียกว่าเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ได้แก่ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลให้เกิดอาการท้องเดิน เอนเทอโรทอกซินสามารถผลิตภายหลังจากที่เชื้อได้มีการเจริญแล้ว ปริมาณเชื้อที่เจริญสามารถสร้างสารพิษทำให้เกิดอันตรายกับผู้ที่บริโภคเข้าไปที่ระดับ 10^6 cfu/g อุณหภูมิที่เชื้อสามารถผลิตสารพิษอยู่ในช่วง 15.6-46.1 องศาเซลเซียส ซึ่งในสภาวะที่เหมาะสมจะผลิตเอนเทอโรทอกซินได้ภายใน 4-6 ชั่วโมง การผลิตเอนเทอโรทอกซินจะเกิดได้ดีเมื่อไม่มีการแข่งขันเพื่อการเจริญจากเชื้อแบคทีเรียตัวอื่นที่ปนในอาหาร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อนี้มักพบภายหลังกระบวนการผ่านความร้อนแล้ว (William และ Dennis, 1988) ในอดีตโรคอาหารเป็นพิษจำกัดอยู่เฉพาะสปีชีส์เดียว คือ *Stap. aureus* ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อ *Staphylococcus* สปีชีส์อื่นก็สร้างสารพิษขึ้นด้วย แต่เนื่องจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus* อาศัยสมบัติการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และเทอร์โมนิวคลีเอส (thermonuclease; TNase) ของแบคทีเรียเป็นสำคัญ เชื้อ *Stap. aureus* มีสมบัติดังกล่าวนี้ การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์จึงมุ่งเน้นไปที่ *Stap. aureus* เพียงสปีชีส์เดียว หลังจากเทคนิคการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหารได้พัฒนาขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อ *Staphylococcus* สปีชีส์อื่นที่สร้างเอนเทอโรทอกซินด้วย แต่โอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่า *Stap. aureus* มาก

สปีชีส์ของเชื้อ *Staphylococcus* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ แต่พบในอาหารมีประมาณ 18 สปีชีส์ ในจำนวนนี้มีเพียง 6 สปีชีส์ ที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส และเทอร์โมนิวคลีเอส

การแพร่กระจาย เชื้อ *Staphylococcus* เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน (host-adapted organism) ในบรรดาเชื้อ *Staphylococcus* ทั้งหลาย ปรากฏว่า เชื้อ *Stap. aureus* เป็นสาเหตุทำให้เป็นพิษขึ้นบ่อยที่สุด

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการแพร่กระจายของเชื้อ *Stap. aureus* ในอาหาร ดังนี้

1. ความต้องการอาหารในการเจริญและผลิตเอนเทอโรทอกซิน

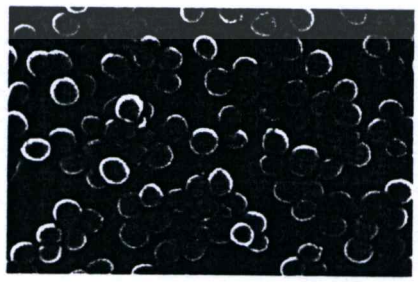
Stap. aureus ต้องการอาหารที่มีสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเป็นการเฉพาะ เช่น ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการวิตามินบีจากไธอามีนและกรดนิโคตินิก ในสภาวะไร้อากาศแบคทีเรียต้องการยูเรซิลอีกด้วย

2. ช่วงอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต

โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่ *Stap. aureus* เจริญอยู่ระหว่าง 7-47.8 องศาเซลเซียส และช่วงอุณหภูมิที่สร้างเอนเทอโรทอกซินอยู่ระหว่าง 10-46 องศาเซลเซียส แต่เหมาะสมที่สุด คือ 40-45 องศาเซลเซียส

3. อิทธิพลของปัจจัยร่วม

ปัจจัยที่ร่วมเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* เช่น เกลือแกงกับสารเคมีต่างๆ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่า a_w และอุณหภูมิ เป็นต้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)



รูปที่ 2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Staphylococcus aureus*

ที่มา : http://www.koshland-science-museum.org/exhib_infectious/antibiotics_02.jsp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ

สารพิษเอนเทอโรทอกซินจากเชื้อ *Stap. aureus* เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และระบบกล้ามเนื้อที่อยู่นอกอำนาจการควบคุมของจิตใจ อาการของโรคจะเกิดขึ้นภายหลังการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเอนเทอโรทอกซินเข้าไปแล้วประมาณ 4-6 ชั่วโมง โดยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ปวดบริเวณท้องน้อย บางรายอาจมีอาการปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ เหงื่อออก อ่อนเพลีย มีไข้ ความดันโลหิตต่ำ อุจจาระและอาเจียนเป็นเลือด ส่วนระดับความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนเทอโรทอกซินที่ได้รับเข้าไป และภูมิต้านทานของแต่ละบุคคลด้วย ปริมาณเอนเทอโรทอกซินต่ำที่สุดที่มีผลทำให้เกิดอาการของโรคประมาณ 1 ไมโครกรัมต่ออาหาร 100 กรัม (Bergdoll, 1973) ส่วนระดับของเอนเทอโรทอกซินในอาหารที่ทำให้เกิดอาการของโรคขึ้นอยู่กับระดับของการปนเปื้อนของเชื้อ ชนิดของอาหาร เวลาและอุณหภูมิในการฟักตัวของเชื้อโดยพบว่าปริมาณเชื้อ *Stap. aureus* ที่มีผลทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคจะมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อกรัม (Pearson และ Dutson, 1990)

2.5 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

แบคทีเรียแลคติก เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม และรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson, 1993) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต

2.5.1 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ทั้งในที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophillic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.58-6.20 (Salminen และ Wright, 1993) ซึ่งแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้ดังนี้

2.5.1.1 แบ่งตามรูปร่างและการเรียงตัว คือ (Axelsson, 2004)

1. รูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*
2. รูปร่างกลม ได้แก่ *Aerococcus*, *Tetragenococcus* และ *Pediococus*
3. รูปร่างกลม เป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptoccucs*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Leuconostoc*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 แบ่งตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

1. โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative)

เป็นแบคทีเรียพวกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน Glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway; EMP) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Pedioccocus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *L. acidophilus* และ *L. delbrueckii*

2. เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative)

เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกและเอธานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์โดยผ่าน Phosphoglyconate pathway หรือ Phosphoketolase pathway ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Lactococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. plantarum, L. casei, L. fermentum* และ *L. brevis*

2.5.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารโดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารหลายชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.5.2.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติกชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และในกลุ่มของเฮทโทโรเฟอร์เมนเททีฟ พบว่ามีการสังเคราะห์กรดอะซีติกและกรดฟอร์มิกร่วมอยู่ด้วย การสะสมของกรดส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลง มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยปกติแล้วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยวิธีการแพร่ผ่าน เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวและปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโตรพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ และทำลายความสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลายซึ่งจะขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ ยับยั้งกลไกการขนส่งอาหารและกระบวนการสร้างพลังงานทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญและอยู่รอด จากการทดลองของ Torriani และคณะ (1997) พบว่า การทดสอบกรดแลคติกที่มีผลต่อการเจริญของ จุลินทรีย์ในผักสลัด พบว่าถ้าเติมกรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปสามารถทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ และเมื่อเติมกรดแลคติก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ประจำถิ่นในผัก รวมถึง กรดอะซิติก ซึ่งกรดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก

จุลินทรีย์	ความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลในการยับยั้ง	ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะซิติกที่มีผลต่อการยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)
Salmonella Aertryke	4.9	0.04
Staphylococcus aureus	5.0	0.03
Phytomonas phaseoli	5.2	0.02
Bacillus cereus	4.9	0.04
Bacillus mesentericus	4.9	0.04
Saccharomyces cerevisiae	3.9	0.59
Aspergillus niger	4.1	0.27

ที่มา : Edward (1980)

2.5.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นสารที่ได้จากการแมทาบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ที่จะเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส จะไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นโดยการออกซิไดซ์อย่างแรงบนเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่หมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl group) ของโปรตีนในเซลล์ โครงสร้างชั้นนอกของกรดนิวคลีอิคและไขมันที่เยื่อหุ้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ ในบางปฏิกิริยาจะมีการจับออกซิเจนไว้ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ในสภาวะอากาศจึงไม่สามารถเจริญได้ (Salminen และ Wright, 1998)

2.5.2.3 เอทานอล (Ethanol)

เกิดจากการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดเอทานอล เป็นสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆในการเจริญเติบโต

2.5.2.4 อะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

อะซีทัลดีไฮด์เกิดจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) จึงผลิตอะซีทัลดีไฮด์ออกมา ซึ่งเป็นการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ และมีรายงานว่า อะซีทัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นเพียง 10-100 พีพีเอ็ม (ppm) สามารถยับยั้ง *E. coli*, *Stap. aureus* และ *S.* Typhimurium (พงศ์เทพ วิไลพันธ์, 2546)

2.5.2.6 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล ได้มาจากกระบวนการการสลายซิเตรทในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งขับออกมาโดยจุลินทรีย์พวก *Lactococci*, *Pediococci* และ *Leuconostoc* (พงศ์เทพ วิไลพันธ์, 2546) สุกานดา วนิชวัฒนะ (2538) รายงานว่า หากมีการใช้ไดอะซิทิลที่มีความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้

2.5.2.7 รูทีริน (Ruterin)

เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีนแต่เป็น β-hydroxypropionaldehyde ที่มีโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างปานกลาง สร้างมาจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ซึ่งรูทีรินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อรา ยีสต์ และโปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* และ *Clostridium* (อรวินทร์ เลาหรัชนันท์, 2532)

2.5.2.8 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

เป็นสารที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก ซึ่งแบคเทอริโอซินจะทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดขึ้นอยู่กับชนิด ความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสภาพแวดล้อม ชนิด จำนวนเซลล์เป้าหมาย และการรวมตัวกับสารอาหาร ซึ่งจะทำลายเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลจะร่วมกันทำให้เกิดช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลย์ของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงาน (Ennahar และคณะ, 2000)

แบคเทอริโอซินที่ยอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ มีเพียงไนซิน (nisin) ซึ่งในประเทศอังกฤษและบางประเทศที่ได้ใช้ไนซินเป็นวัตถุกันเสียในอาหารมาตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1950 และเมื่อปี ค.ศ. 1988 USFDA ได้ยอมรับไนซินเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) การคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ไนซินมาใช้เป็นตัวการหมักกรดแลคติก จะช่วยส่งเสริมผลในแง่ของการควบคุมแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะพวกที่สร้างสปอร์ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่ต้องระวังไม่ให้ไนซินกลายเป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักอาหารนั้นๆ เอง (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.5.3 แบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์แหนม

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์แหนมได้แก่ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* เป็นต้น

2.5.3.1 *L. plantarum* (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ มีขนาด 0.9-1.2 ไมโครเมตร ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (calciumpentotinase) และไนอะซิน (niacin) ในการเจริญเติบโต (รูปที่ 2.6)

รูปที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Lactobacillus plantarum*

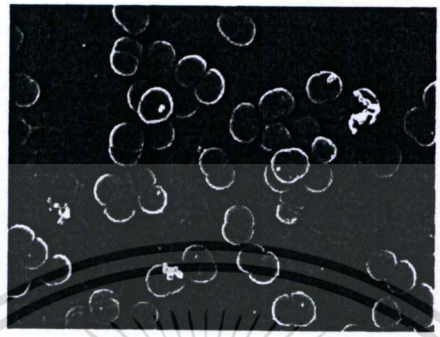
ที่มา : http://kaiserprobiotics.org/probiotic-strains/lactobacillus-plantarum/

2.5.4.2 *Pediococcus pentosaceus*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรี มีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเจริญบนอาหารกลูโคส (glucose) เปปโตน (peptone) และยีสต์เอ็กแทรกซ์ (yeast extract) โคโลนีจะเป็นสีขาวมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเล็กมาก ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญ เช่น ไบโอติน (biotin) ไนอะซิน และกรดโฟลิก ในการเจริญ ไม่ทนความร้อน เซลล์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Pediococcus pentosaceus*

ที่มา : http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm

2.6 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (วีระพงษ์ ลุลิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว., 2551)

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรืออีกชื่อว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามธรรมชาติ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase, co-enzymes และ co-factors ต่างๆ นอกจากนี้สามารถสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ได้จาก mRNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase หรือ RNA-dependent DNA polymerase โดยปฏิกิริยานี้เรียกว่า Reverse Transcription PCR (RT PCR) ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการเปลี่ยนตัวอย่างที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ แต่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA เพื่อพร้อมสำหรับกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบต่อไป เทคนิคพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกดีเอ็นเอชิ้นส่วนนั้นออกมาให้บริสุทธิ์เสียก่อน และไม่ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณมาก เพียงดีเอ็นเอจากหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอก็สามารถนำมาใช้ได้ ทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมากซึ่งไม่เคยทำได้มาก่อน เทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม สามารถนำมาตรวจหรือศึกษาต่อด้วยการทำ agarose gel electrophoresis เพื่อย้อมดูแถบดีเอ็นเอได้โดยตรงด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เนื่องจากดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นมีปริมาณมากขึ้นจนสามารถมองเห็นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม พีซีอาร์ แบบดั้งเดิมก็มีขีดจำกัดเนื่องจากใช้เวลานานในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่ไม่สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้ บอกได้เพียงว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในสิ่งที่ตรวจหรือไม่ จึงเป็นการหาปริมาณในลักษณะ semi-quantitative เท่านั้น

2.6.1 ส่วนประกอบของพีซีอาร์

1. DNA template

คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส์ส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือ เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

2. Primer

เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำพีซีอาร์จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

3. Deoxynucleotides (dNTPs)

เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

4. DNA polymerase

เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

5. PCR buffer

เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น ความเป็นกรด-ด่าง และเกลือต่างๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

6. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler หรือ PCR machine)

เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำพีซีอาร์ ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นตอนคือ denaturing, annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

2.6.2 ขั้นตอนพื้นฐานของพีซีอาร์

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักของการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่วนไปวนมา 30 ถึง 40 รอบ ในเครื่อง thermal cycler

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Denaturation

ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นการทำลายพันธะระหว่างนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ทำให้สายดีเอ็นเอ (DNA) ที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นคู่แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่างๆจากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านั้นจะหยุดลงหมด

2. Annealing

ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer ไปเกาะติดกับ template เพื่อเตรียมตัวตั้งต้นต่อสายคู่ของ template

3. Extension

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase ทำให้มีการนำนิวคลีโอไทด์ต่างๆมาต่อทางด้าน 3′ ของ primer โดยต่อให้ complementary กับ sequence บน template ที่ primer มาเกาะไว้ ทำให้เกิดการสร้างดิเอ็นเอต่อเนื่องได้มากเพราะเป็นการสร้างแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ คือ ถ้าเริ่มจาก DNA template สายคู่สายเดียว เมื่อถึงวงจรที่สองจะมีจำนวนผลผลิต (PCR product) เพิ่มขึ้น เป็น 2 คู่ ซึ่งแต่ละคู่เมื่อผ่านขั้นตอนของพีซีอาร์ในรอบที่สามจะได้ผลผลิตพีซีอาร์ออกมาเป็น 2^3 คู่ การเพิ่มจะเป็นแบบ exponential ได้ product ใน n cycle เป็น 2^n คู่ นั่นคือในรอบที่ 30 จะมีจำนวน DNA เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนทั้งหมด 2^{30} = 1,073,741,764 คู่

2.6.3 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Gibthai Traning Center, 2011)

เป็นการศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซม ด้วย Restriction enzyme ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย Restriction enzyme เหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ agarose gel electrophoresis

ในบางกรณีการดูแบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอจากเจลไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของแบบแผนเหล่านั้นได้อย่างชัดเจน สามารถนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีนส์ หรือลำดับเบสที่จำเพาะมาเป็นตัวตรวจสอบ (Probe) โดยวิธี southem blot hybridization เช่นการทำ Ribotyping หรือ DNA fingerprinting ทั้ง 2 วิธี สามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของชนิด หรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ได้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของ Restriction enzyme ที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนม โดยมีรายละเอียดวัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

- *Salmonella* Anatum
- *Salmonella* Derby

ได้ความอนุเคราะห์จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917
- *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2 วัตถุดิบ

- แหนม

ได้ความอนุเคราะห์ส่วนผสมแหนมจากบริษัทสุทธิลักษณ์ อินโนฟู้ดส์ จำกัด ผลิตภัณฑ์แหนมดอนเมือง

- ไคโตซาน (85 เปอร์เซ็นต์ deacetylated degree) (A.N. Lab, จังหวัดสมุทรสาคร)

3.1.3 อุปกรณ์

- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Heraeus type 6000, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Tomy SS-245, Japan)
- ขวดแก้วทนความร้อน
- บิวเรต
- ปิเปต
- เตาให้ความร้อนและเครื่องผสมแบบแถบแม่เหล็ก (IKA, Malaysia)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow Clean Air , USA)
- เครื่องวัดค่าพีเอช (Inolab, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Dragon 3002, China)
- เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex genie 2, USA)
- ไมโครเวฟ (Sharp R-351, Japan)
- เครื่องตีปั่น (Nasticator, Spain)
- ขวดปรับปริมาตร ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และ ทิป (Bio-Rad Laboratories, USA)
- ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
- เข็มและลูปเขี่ยเชื้อ
- กระติกน้ำแข็ง

3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- โซเดียมคลอไรด์ (Merck, USA)
- โซเดียมไนไตรท์ (Merck, USA)
- โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent, Italy)
- โซเดียมแอสคอเบท (Fluka, Switzerland)
- กลีเซอรอล (Carlo Erba Reagent, Italy)
- น้ำมันพาราฟฟิน (Metha Group Trading Ltd., Thailand)
- ฟีนอฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ (Carlo Erba Reagent, Italy)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, USA)
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)
- กรดแลคติก (Carlo Erba Reagent, Italy)
- กรดแอสคอบิก (Fluka, Switzerland)
- แคลเซียมคาร์บอเนต (Merck, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Potassium tellurite (Merck, USA)
- Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, USA)
- Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck, USA)
- Xylose- Lysine Deoxycholate (XLD) (Scharlau, spain)
- Triple Sugar Iron (TSI) (Difco, USA)
- Lysine Indole Motility (LIM) (Difco, USA)
- Trypticase soy agar (TSA) (Merck, USA)
- Trypticase soy broth (TSB) (Merck, USA)
- Meat extract (Difco, USA)
- Tryptone (Hardy Diagnostics, USA)
- Glucose (SP Scientific, Thailand)
- Baird-Parker agar (BP) (Difco, USA)
- De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, USA)
- Nutrient agar (NA) (Merck, USA)
- Peptone (Hardy Diagnostics, USA)

3.1.4 สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Vivantis Biochemical, USA) 20 เปอร์เซ็นต์
- Proteinase K (Vivantis Biochemical, USA) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- Sodium chloride (Merck, USA)
- Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1)
- Ethanol (Merck, USA)
- Agarose (Vivantis Biochemical, USA)
- TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
- 0.5x TAE buffer
- Ethidium bromide (Vivantis Biochemical, USA) 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 6x Loading dye buffer (Fermentas, USA)
- DNA Marker (SM 0321, Fermentas, USA)
- 10x PCR buffer (Fermentas, USA)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$) (Fermentas, USA)
- Deoxynucleotides (dNTPs) (Fermentas, USA)
- Primer REVB sequence (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Primer BEF sequence (5′-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′)
- Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA)
- Restriction enzyme
  - *Alu*I (ER 0011, Fermentas, USA)
  - *Hae*III (ER 0151, Fermentas, USA)

3.2 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

3.2.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้คือ *S.* Anatum, *S.* Derby และ coagulase positive *Stap. aureus* ทำการถ่ายเชื้อด้วย Streak plate technique ลงบนหลอดเอียงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น stock culture ถ่ายเชื้อเดือนละครั้งระหว่างการทดลอง ส่วน แบคทีเรียแลคติกคือ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917 ทำการถ่ายเชื้อ แบบ deep tube ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar +1 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อเดือนละครั้งระหว่างการทดลอง

3.2.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

การเตรียมสารละลายเชื้อแต่ละชนิด โดยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ทำการถ่าย เชื้อจาก stock culture ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลง ใน TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาตรวจหาความเข้มข้นของเชื้อ (ให้มีเชื้อแต่ละชนิด ประมาณ 10^8 cfu/ml)

ส่วนเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทำการถ่ายเชื้อจาก stock culture ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำมาตรวจหาความเข้มข้นของเชื้อ (ให้มีเชื้อแต่ละชนิดประมาณ 10^8 cfu/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การเตรียม Nham Model Broth (NMB) (Swetwiwathana และคณะ, 1999)

เตรียมแบบจำลองการหมักแหนม Nham Model Broth (NMB) ดังรูป ข.2 จากสูตร NMB ที่ไม่เติมไนไตรท์ (ดังภาคผนวก ข.1.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวด duran นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นค่อยๆ เทน้ำมันพาราฟินที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หนาประมาณ 1 เซนติเมตร โดยวิธี aseptic technique

3.2.4 การเตรียมไคโตซานที่ใช้ในการทดลองใน Nham Model Broth (NMB)

ไคโตซานที่ใช้ในการทดลอง คือ shrimp chitosan (85 เปอร์เซ็นต์ deacetylated degree) โดยคำนวณปริมาณของผงไคโตซานให้มีความเข้มข้นตามต้องการ แล้วนำมาละลายในสารละลายกรดแอซิติกที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจากบุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ, 2547) แล้วเติมส่วนประกอบของ NMB (ดังภาคผนวก ข.1.2) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 190 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล 8 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีการ Spot-on-lawn (ดัดแปลงจาก Cadirci และ Citak, 2005)

การทดลองหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (*S.* Anatum, *S.* Derby และ *Stap. aureus*) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) 10 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารแขวนลอยเซลล์ของแต่ละเชื้อ (จากการเตรียมในข้อ 3.2.2) 10 ไมโครลิตร ทำการ pour plate เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เขียนระบุตำแหน่งที่จะหยดสารละลายไคโตซานที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 แล้ว จากนั้นหยดสารละลายไคโตซานที่จะทดสอบแต่ละความเข้มข้น (100 500 1000 2000 และ 3000 ppm ใน 1 เปอร์เซ็นต์ กรดแอซีติก) 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งน้ำกลั่นที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.0 ซึ่งเป็นชุดควบคุม ทิ้งไว้ 20 นาที ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง

ส่วนการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก เทอาหารเลี้ยงเชื้อ NA 10 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS+ 1 เปอร์เซ็นต์ agar 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียแลคติกของแต่ละเชื้อ จากข้อ 3.2.2 ทำการทดลองทดสอบผลการยับยั้งเชื้อของสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองข้างต้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2539)

3.2.6 การศึกษาความเข้มข้นของไคโตซาน ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth; NMB) (Swetwiwathana และคณะ, 1999)

3.2.6.1 ศึกษาผลของการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum, *S.* Derby และ *Stap. aureus* กับไคโตซานที่ระดับต่างๆ โดยวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ระหว่างช่วงเวลาการหมักในแบบจำลองแหนม

ทำการถ่ายเชื้อ *S.* Anatum, *S.* Derby และ coagulase positive *Stap. aureus* แต่ละเชื้อลงในแบบจำลองแหนม ที่มีความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆกันดังนี้ 0 100 500 1000 5000 และ 10000 ppm และทำให้แต่ละขวดมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml ปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำมันพาราฟินที่ฆ่าเชื้อทุกขวด แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ภายหลังจากบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการยืนยันเชื้อ *Salmonella* และ *Stap. aureus* โดยเขี่ยทุกโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ XLD และ BP ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่น และดูลักษณะการเกิดโคโลนีเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

สำหรับเชื้อ *Stap. aureus* ทำการสุ่มโคโลนีตรวจสอบยืนยันเชื้อสายพันธุ์เชื้อ 1-3 โคโลนี เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ coagulase (ดังภาคผนวกที่ ก.2)

3.2.6.2 ศึกษาผลของการลดลงของเชื้อแบคทีเรียแลคติกกับไคโตซานที่ระดับต่างๆ ในระหว่างช่วงเวลาการหมักในแบบจำลองแหนม

ทำการถ่ายเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917 แต่ละเชื้อลงในแบบจำลองแหนม ที่มีความเข้มข้นของไคโตซานต่างๆกันดังนี้ 0 100 500 1000 5000 และ 10000 ppm และทำให้แต่ละขวดมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml ปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำมันพาราฟินที่ฆ่าเชื้อทุกขวด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า pH วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก (ดังภาคผนวกที่ ก.1) และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS + 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ + 1.4 เปอร์เซ็นต์ agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2539)

3.2.6.3 ศึกษาผลของไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองแหนม

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสม ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้ดีที่สุด จากการทดลองข้างต้น (การทดลองที่ 3.2.6.1) นำมาศึกษาผลของไคโตซานเมื่อใช้ร่วมกับกระเทียมต่อแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก เนื่องจากงานวิจัยของ Gil และคณะ (2004) พบว่า ไคโตซานสามารถลดเชื้อ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ลงได้ แต่อย่างไรก็ตามกระเทียมมีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก มีรายงานว่า กระเทียมมีส่วนในการเร่งกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยเร่งการผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักชนิด dry sausage รวมทั้งแหนม (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2542) ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการใช้ไคโตซานร่วมกับ 5 เปอร์เซ็นต์ กระเทียม (Swetwiwathana และคณะ, 1999) ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917

ทำการผสมไคโตซานที่มีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ลงในแบบจำลองการหมักแหนม จากนั้นเติม 5 เปอร์เซ็นต์ กระเทียม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง แล้วทำการสับกระเทียมให้ละเอียดโดยใช้ aseptic technique ตามวิธีของ Swetwiwathana และคณะ (1999) จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.6.2

3.2.6.4 ศึกษาผลของไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกและกระเทียม ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในแบบจำลองแหนม

เมื่อทราบระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.2.6.1 และ 3.2.6.3) จึงนำมาศึกษาผลของไคโตซานเมื่อใช้ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (เซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml) ที่ทนต่อไคโตซานได้ดีที่สุด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (เซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/ml) ที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุด จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.6.1 และ 3.2.6.2 เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก อีกทั้งเนื่องจากมีงานวิจัยของ อดิศร (2542) พบว่าน้ำสกัดกระเทียม สามารถทำลายและลดจำนวนเชื้อ *Stap. aureus* และ *S.* Anatum ได้ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลวเลี้ยงเชื้อ TSB จึงศึกษาผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุด

3.2.7 การศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติก ในผลิตภัณฑ์แหนม

เนื่องจากสภาวะปัจจัยการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในแบบจำลอง (NMB) และ ผลิตภัณฑ์แหนมแตกต่างกัน (Darmadji และ Izumimoto, 1994) ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาการใช้ไคโตซานระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.2.6.1) เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียแลคติก เพื่อทราบถึงความสามารถของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์แหนม รวมถึงทดสอบผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่มีไคโตซานกับผู้บริโภค โดยใช้ส่วนผสมแหนมที่ผลิตทางการค้าจาก บริษัท สุทธิลักษณ์ อินโนฟูดส์ จำกัด

3.2.7.1 ศึกษาผลของไคโตซานและกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในผลิตภัณฑ์แหนม

นำส่วนผสมแหนมจาก บริษัทสุทธิลักษณ์ อินโนฟูดส์ จำกัด มาผสมเชื้อ *Stap. aureus* โดยเติมเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^3 cfu/g ลงในแหนมที่มัดแบบตุ้มจิ๋ว ปริมาณ 25 กรัม จากนั้นเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และที่เติมไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมที่สุด (จากการทดลองที่ 3.2.6.3) แล้วเปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน จากนั้นบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง และตรวจนับปริมาณเชื้อ *Stap. aureus* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเฉพาะ BP agar ที่ผสม egg yolk+ tellurite บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *Stap. aureus* และตรวจยืนยันด้วยการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ coagulase (ดังภาคผนวกที่ ก.2)

3.2.7.2 ศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในผลิตภัณฑ์แหนม

ผลิตแหนมตามสูตรการทดลองข้างต้น ผสมเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เหลือรอดได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 3.2.6.3 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 cfu/g ลงในแหนมที่มัดแบบตุ้มจิ๋ว ปริมาณ 25 กรัม จากนั้นเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วเปรียบเทียบกับแหนมไม่เติมไคโตซาน จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง และตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเฉพาะ MRS+0.5 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะมีออกซิเจนต่ำ โดยใช้ candle jar

3.2.7.3 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

ทำการจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์แหนม ในระหว่างการหมักและการเก็บรักษา เพื่อยืนยันการเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งเปรียบเทียบชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา (ชุดควบคุม) กับตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาร่วมกับไคโตซาน โดยทำการนับโคโลนีแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในระดับความเข้มข้นที่สามารถนับได้ (30-300 โคโลนี) ทุกๆ 24 ชั่วโมง ของระยะเวลาการหมักแหนม (จากการทดลองที่ 3.2.7.2) แล้วนำโคโลนีที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยวิธีการย้อมแกรมเพื่อตรวจแยกลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (microscopic morphology) จากนั้นสุ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับกล้าเชื้อแบคทีเรียที่เติมลงในตัวอย่างแหนม ตัวอย่างละ 5 โคโลนี นำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม (PCR-RFLP) ตามวิธีการของ Jindaprasert และคณะ (2011) (ดังภาคผนวกที่ ก.3) เปรียบเทียบความหลากหลายของดีเอ็นเอแบคทีเรียแลคติกที่ได้กับเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ เพื่อยืนยันและระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

3.2.7.4 วิเคราะห์คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้ไคโตซาน

เมื่อได้ไคโตซานที่มีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (การทดลองที่ 3.2.6.1) นำมาลงในส่วนผสมแหนมตามสูตรของบริษัทสุทธิลักษณ์ อินโนฟู้ดส์ จำกัด โดยมัดบรรจุแบบตุ้มจิ๋ว ปริมาณ 20 กรัม ทำการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค เปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ด้วยวิธี 5 point hedonic scale ให้คะแนนความชอบทางด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยโดย Duncan's New Mutiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 การออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยการทดลอง 3 ซ้ำ ปัจจัยคือความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับต่างๆ โดยมีปริมาณการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ค่าการเหลือรอดของแบคทีเรียแลคติก ค่าความเข้มข้นของกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นตัวแปรผลตอบ (response) เมื่อวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์แหนมจึงออกแบบการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (randomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร โดยเลือกศึกษา *Salmonella* Anatum *S.* Derby และ coagulase positive *Staphylococcus aureus* เนื่องจากพบการปนเปื้อนค่อนข้างสูงในผลิตภัณฑ์แหนม (นงคราญ เรืองประพันธ์ และ นิตยา พันธ์บัว , 2535; อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์, 2539) นอกจากนี้ช่วงระยะเวลาระหว่างการหมักแหนมยังมีเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งมีผลต่อการสร้างกรดแลคติกและรสชาติในผลิตภัณฑ์แหนม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 อีกด้วย

4.1 ผลความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในแหนมโดยวิธี Spot-on-lawn technique

จากการศึกษาถึงผลของสารละลายไคโตซานระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ที่ 0 100 500 1000 2000 และ 3000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้งแกรมลบและแกรมบวกที่พบมากในแหนม ได้แก่ *S.* Anatum (รูปที่ 4.1 ก) *S.* Derby (รูปที่ 4.1 ข) และ coagulase positive *Stap. aureus* (รูปที่ 4.1 ค) ตามลำดับ พบว่า เชื้อ coagulase positive *Stap. aureus* ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน 100 500 1000 2000 และ 3000 ppm สามารถเกิด inhibition zone แต่ขณะเดียวกันเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Derby ไม่พบการเกิด inhibition zone ที่ความเข้มข้น 100 และ 500 ppm ตามลำดับ เช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุม (น้ำกลั่นที่ปรับกรด-ด่างเป็น 6.0) ที่ไม่พบการเกิด inhibition zone แสดงว่า *S.* Derby สามารถทนต่อสารละลายไคโตซานได้ดีที่สุด จึงแสดงให้เห็นว่า 100 ppm ที่ระดับความเข้มข้นน้อยสุดของการศึกษานี้ สารละลายไคโตซานมีประสิทธิภาพการยับยั้งต่อเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าพวก *Salmonella* และเมื่อระดับความเข้มข้นของไคโตซานมากขึ้น ประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของบุญศรี จงเสรีจิตต์ และ คณะ (2547) พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration; MIC) ของเชื้อ *Stap aureus*, *E. coli* และ *S.* Typhimurium เท่ากับ 100 500 และ 1000 ppm ตามลำดับ และงานวิจัยของ No และคณะ (2002) โดยศึกษาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 4 ชนิด และแกรมบวก 7 ชนิด พบว่า ไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์

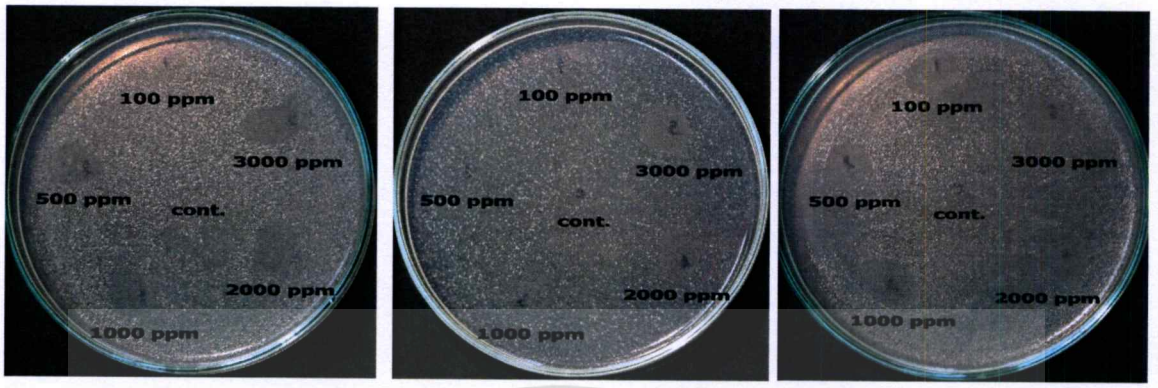
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม แบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ รวมทั้งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hui และคณะ (2004) ซึ่งพบว่า การลดลงของ *E. coli* และ *Stap. aureus* เกิดจากกลไกของไคโตซานในการทำลาย outer และ inner membrane ของเซลล์ *E. coli* และ *Stap. aureus* โดยใช้กล้อง transmission electron microscopy (TEM) โดยที่ไคโตซานสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกจากกัน ทำให้สารต่างๆในเซลล์ลดลง การทำลายนี้อาจเกิดจากการ electrostatic interaction ระหว่างหมู่ NH_3^+ ของไคโตซาน และหมู่ของสารประกอบ phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์

นอกจากนี้การศึกษายังได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิด ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีผลต่อกระบวนการหมักแหนม พบว่า รูปที่ 4.2 (ก) และ (ข) แสดงผลของสารละลายไคโตซานระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่ 0 100 500 1000 2000 และ 3000 ppm ต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *L. plantarum* ATCC 14917 (รูปที่ 4.2 ก) และ *P. pentosaceus* TISTR 536 (รูปที่ 4.2 ข) ตามลำดับ โดยพบว่า เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 เกิด inhibition zone ขึ้นเล็กน้อย ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของไคโตซาน สามารถเกิด inhibition zone ได้กว้างยิ่งขึ้น ส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เกิด inhibition zone ที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ppm โดยที่ 0 100 และ 500 ppm ไม่พบ zone ของการยับยั้งเชื้อ จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อสารละลายไคโตซานได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Darmadji และ Izumimoto (1994) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการถนอมเนื้อสัตว์ พบว่าใน liquid medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไคโตซานระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (1000 ppm) สามารถยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. pentosaceus* และงานวิจัยของ No และคณะ (2002) ที่พบว่า ไคโตซาน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.9 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติก เช่น *L. plantarum*, *L. brevis* และ *L. bulgaricus* ได้

ดังนั้นการทดลองลำดับต่อไป จึงศึกษายืนยันการลดลงของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและแบคทีเรียแลคติก เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคโตซานระดับต่างๆ จากการศึกษานี้ในแบบจำลองการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.1 ผลของระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร : (ก) *Salmonella* Anatum, (ข) *Salmonella* Derby และ (ค) *Staphylococcus aureus*

หมายเหตุ cont. คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 6

(ก) (ข)

รูปที่ 4.2 ผลของระดับความเข้มข้นของไคโตซานต่อแบคทีเรียแลคติก : (ก) *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 และ (ข) *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

หมายเหตุ control คือ น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของความเข้มข้นไคโตซานที่มีต่อเชื้อ *S.* Anatum, *S.* Derby, coagulase positive *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ศึกษา

4.2.1 ผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ (*S.* Anatum , *S.* Derby และ *Stap. aureus*) ในระหว่างการหมักในแบบจำลอง

จากการทดลองข้างต้น พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษตั้งแต่ 100 ppm ขึ้นไป รวมถึงยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ได้ที่ระดับ 1000 ppm และยับยั้ง *L. plantarum* ได้ที่ระดับ 500 ppm แต่เนื่องจากมีการศึกษาผลของไคโตซานต่อคุณภาพในไส้กรอกหมูสด (Soultos และคณะ, 2008) และ ผลของไคโตซานต่อการถนอมเนื้อสัตว์ (Darmadji และคณะ, 1994) โดยทั้งสองงานวิจัยได้ใช้ระดับความเข้มข้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (5000 ppm) และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (10000 ppm)

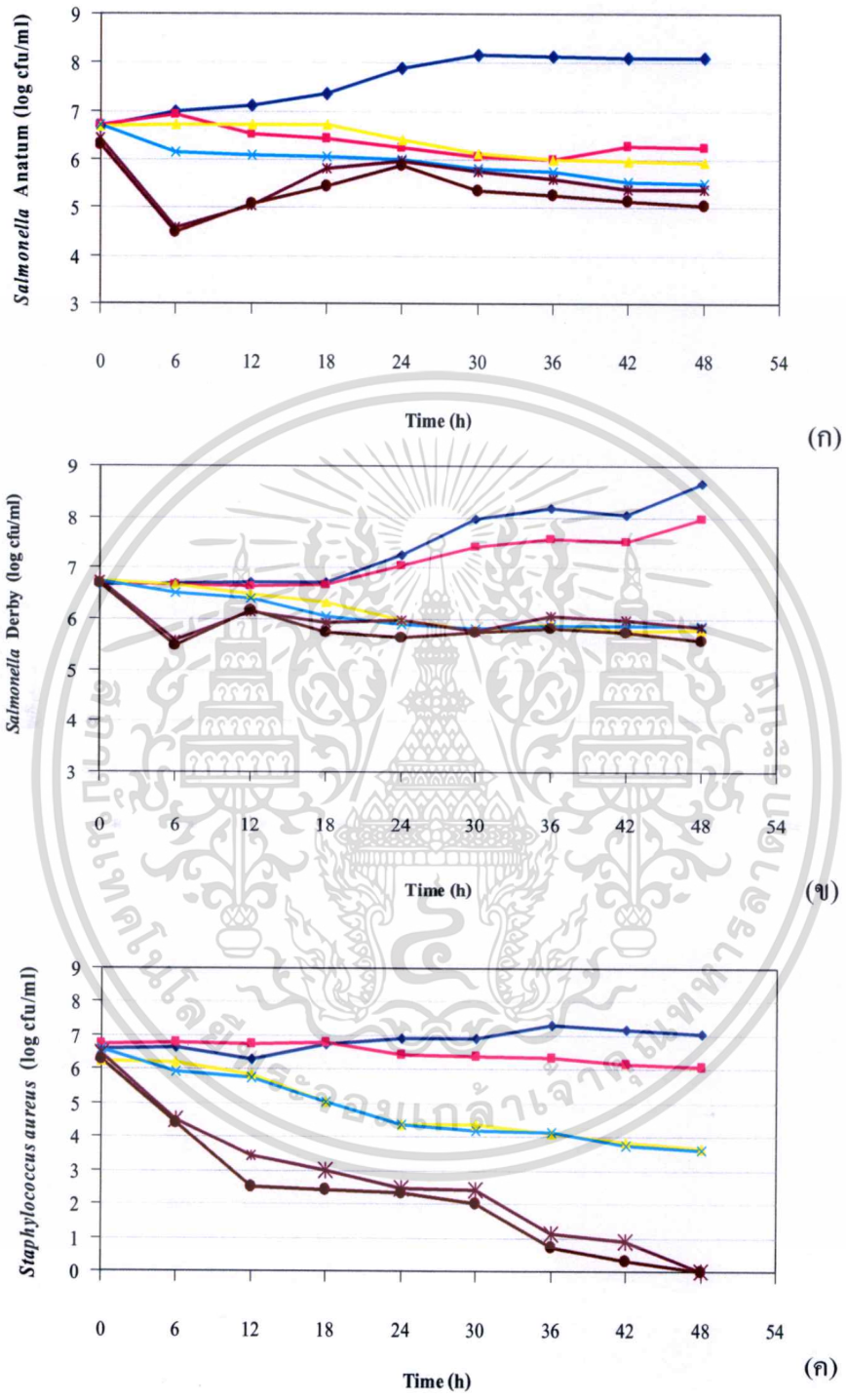
ดังนั้นการทดลองนี้ จึงใช้ความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับ 0 100 500 และ 1000 ppm ในระหว่างการหมักแหนมแบบจำลอง เพื่อยืนยันผลการยับยั้งเชื้อต่าง ๆ และศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มเติมตามสภาวะที่ใช้จริงในผลิตภัณฑ์เนื้อ คือ 5000 และ 10000 ppm เพื่อยืนยันผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อที่จำเป็นต่อการหมักแหนมใน NMB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทียบกับ NMB ที่ไม่ได้เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) โดยเริ่มจากผลการลดลงของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ (ภาพที่ 4.3 ก, ข และ ค) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ดียิ่งขึ้น โดยที่การหมัก 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นไคโตซาน 100 ppm ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *S.* Derby ที่ 24 ชั่วโมงการหมัก เริ่มเพิ่มจำนวนขึ้น อย่างต่อเนื่อง ใกล้เคียงกับชุดตัวอย่างควบคุม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไคโตซาน 500 และ 1000 ppm ที่เวลาการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* ลดลงทีละน้อย แต่ขณะเดียวกันเชื้อ *Stap. aureus* ลดลงทีละเล็กน้อย จนถึง 12 ชั่วโมงจะลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากที่ได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นไคโตซานเพื่อศึกษาผลการลดลงของเชื้อในผลิตภัณฑ์แหนม พบว่าในชั่วโมงการหมักที่ 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ 5000 และ 10000 ppm เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิด ลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเวลาการหมักผ่าน 12 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* ค่อยเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Helander และคณะ (2001) พบว่าเชื้อ *S.* Typhimurium สามารถทนต่อไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 20000 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB แต่ในขณะเดียวกันเชื้อ *Stap. aureus* ลดลงจนไม่พบเชื้อ *Stap. aureus* ในระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งในการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanatt และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดมิ้นในการถนอมผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าในหลอดทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient broth (NB) ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่า *S.* Typhimurium ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.3 แสดงผลของไคโตซานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เชื้อ *S.* Anatum (รูปที่ 4.3 ก) ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 ppm มีผลต่อการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum เพียง 1-2 log cfu/ml ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1000 5000 และ 10000 ppm ลดลงเพียง 2-3 log cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน NMB ครบ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเชื้อ *S.* Derby (รูปที่ 4.3 ข) ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ไคโตซานไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Derby และที่ระดับความเข้มข้น 500 1000 5000 และ 10000 ppm ทำให้เชื้อลดลง 3 log cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน NMB ครบ 48 ชั่วโมง โดยที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm ในชั่วโมงการหมักที่ 6 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* ทั้งสองลดลงอย่างรวดเร็ว และเชื้อทั้งสองชนิดค่อยๆเพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากนั้น อาจเพราะเชื้อทั้งสองสามารถกลับมาฟื้นตัวได้อีก สำหรับ เชื้อ *Stap. aureus* (รูปที่ 4.3 ค) เมื่อใช้ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ปริมาณเชื้อลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อปริมาณไคโตซานเพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm เชื้อลดลงถึง 4 log cfu/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน NMB ครบ 48 ชั่วโมง ขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นสูง 5000 และ 10000 ppm สามารถลดเชื้อดังกล่าวลงถึง 7 log cfu/ml และตรวจไม่พบเชื้อเมื่อบ่มเพาะ NMB ครบ 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อที่ตรวจพบทุกโคโลนีในระหว่างการศึกษาที่เจริญบน trypticase soy agar (TSA) ได้ทำการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น โดยที่การศึกษาผลของไคโตซานนั้นจะนำโคโลนีเชื้อ *Salmonella* ที่พบบน TSA ไปตรวจยืนยันด้วยการทำ spot technique (ภาคผนวกที่ ก.5) บนอาหาร Xylose- Lysine Deoxycholate (XLD) agar (รูปที่ 4.4) และ โคโลนีเชื้อ *Stap. aureus* ที่พบบน TSA ไปตรวจยืนยันด้วยการทำ spot technique บนอาหาร Baird Parker egg yolk agar (รูปที่ 4.5) และเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ coagulase ให้ผลเป็นบวก (รูปที่ ก.1) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Stap. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำพวก *Salmonella* ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.1 และงานวิจัยของบุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียในอาหารโดยไคโตซาน พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus*, *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้ดีตามลำดับ อีกทั้งยังมีงานวิจัยของ Darmadji และ Izumimoto (1994) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas fragi* พบว่า *E. coli* สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่า เชื้อ *Stap. aureus*, *B. subtilis* และ *Ps. fragi*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (—◆—), 100 ppm (—■—), 500 ppm (—▲—),1000 ppm (—✕—), 5000 ppm (—✱—) และ10000 ppm (—●—) ต่อการลดลงของเชื้อ : (ก) *Salmonella* Anatum, (ข) *Salmonella* Derby และ (ค) *Staphylococcus aureus* ในแบบจำลองการหมัก (ผลจากค่าเฉลี่ยที่ทำการทดลอง 3 ครั้ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก) (ข)

รูปที่ 4.4 เชื้อ *Salmonella* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) Trypticase soy agar (TSA) และยืนยันเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) Xylose- Lysine Deoxycholate (XLD) agar

(ก) (ข)

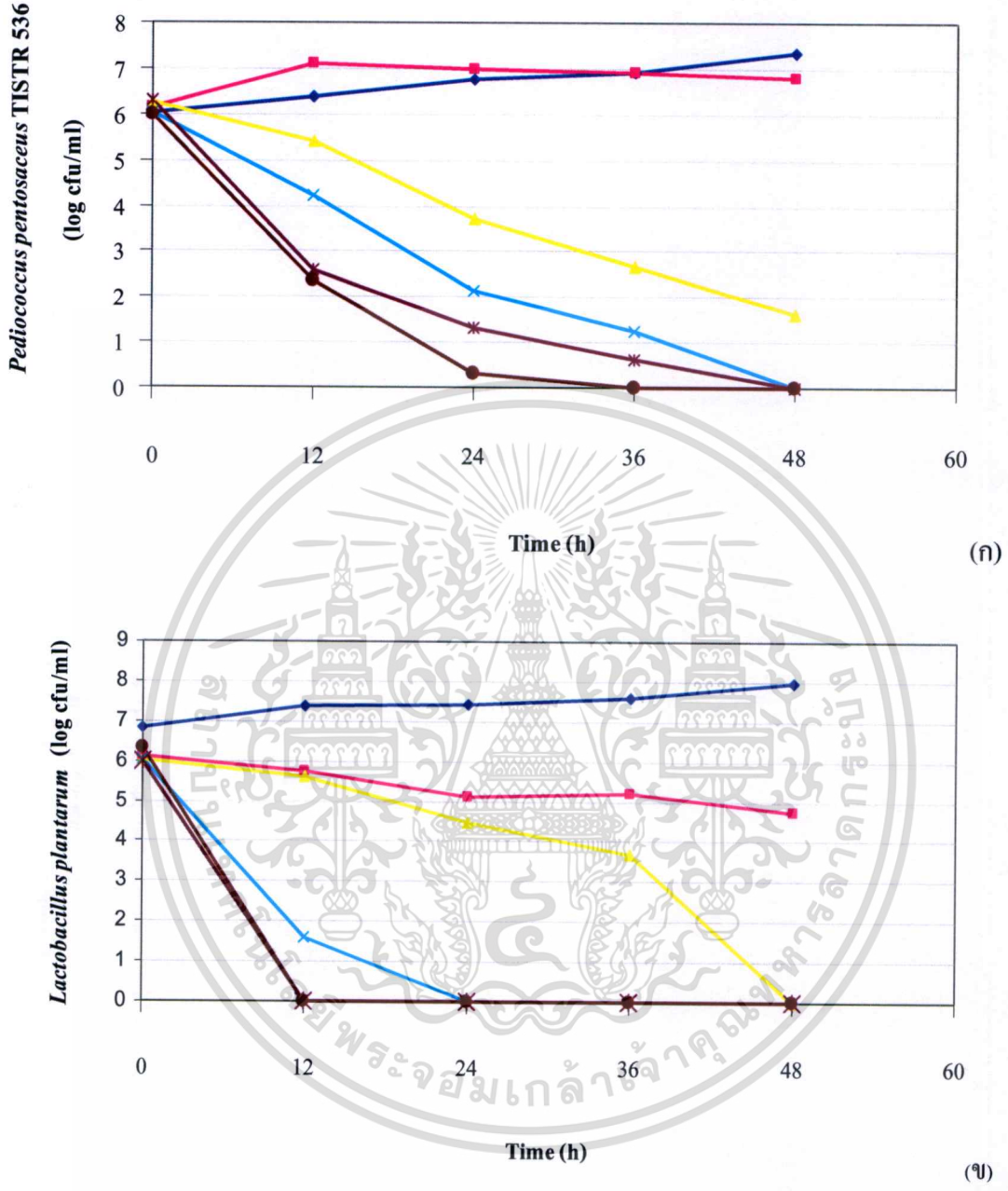
รูปที่ 4.5 เชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก) Trypticase soy agar (TSA) และยืนยันเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข) Baird-Parker (BP) + egg yolk agar tellurite

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลของไคโตซานต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักในแบบจำลอง

เมื่อทำการศึกษาผลของไคโตซานที่ ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน (0 100 500 1000 5000 และ 10000 ppm) ต่อแบคทีเรียแลคติกที่เป็นเชื้อสำคัญในการหมัก ได้แก่ เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากแหนม (Swetwiwattana, 2005) และ *L. plantarum* ATCC 14917 พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (รูปที่ 4.6 ก) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับ 500 ppm สามารถยับยั้งเชื้อลดลง 5 log cfu/ml และเมื่อระดับความเข้มข้นของไคโตซานสูงที่ 1000, 5000 และ 10000 ppm สามารถลดลงถึง 6-7 log cfu/ml ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพิ่มขึ้นอีกด้วย สำหรับผลของไคโตซานต่อเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 (รูปที่ 4.6 ข) ในช่วงเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน 100 ppm เชื้อลดลง 3 log cfu/ml และเมื่อความเข้มข้นที่ระดับ 500 ppm ลดลงถึง 8 log cfu/ml แต่ในขณะเดียวกันในช่วงเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมง ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm สามารถลดลง 8 log cfu/ml และที่ระดับความเข้มข้น 5000 และ 10000 ppm ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อลดลงถึง 6 log cfu/ml ในระยะเวลาการหมักเพียง 12 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่า *L. plantarum* ATCC 14917 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gil และคณะ (2004) พบว่า ในกระบวนการผลิตเบียร์ ไคโตซาน (100 ppm) สามารถลดเชื้อ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ลงได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Darmadji และ Izumimoto (1994) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการถนอมเนื้อสัตว์ พบว่าใน liquid medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไคโตซานระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (1000 ppm) สามารถยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* ได้ดีกว่าเชื้อ *P. pentosaceus* ดังนั้นสรุปได้ว่าไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (◆), 100 ppm (■), 500 ppm (▲) และ 1000 ppm (✕), 5000 ppm (✱) และ 10000 ppm(●) ต่อการลดลงของเชื้อ : (ก) *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ (ข) *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของและความเข้มข้นกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ระหว่างการหมักในแบบจำลองแหนม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียแลคติก	ความเข้มข้นไคโตซาน (ppm)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)					ค่าความเข้มข้นกรดแลคติก (%) ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)				
		0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
Pediococcus	0	6.11	4.85	4.52	4.46	4.40	0.32	0.42	0.49	0.60	0.68
pentosaceus	100	6.10	5.11	4.67	4.49	4.42	0.30	0.39	0.46	0.58	0.66
	500	6.09	5.94	5.74	5.67	5.30	0.30	0.32	0.35	0.36	0.45
	1000	6.11	5.84	5.84	5.62	5.39	0.32	0.35	0.35	0.36	0.44
	5000	6.10	5.86	5.85	5.85	5.85	0.30	0.35	0.35	0.35	0.36
	10000	6.11	6.07	6.00	5.99	5.99	0.32	0.32	0.33	0.33	0.33
Lactobacillus	0	6.08	5.39	5.22	4.30	4.77	0.33	0.35	0.36	0.49	0.60
plantarum	100	6.10	5.73	5.43	4.86	4.81	0.32	0.33	0.35	0.41	0.58
	500	6.10	5.79	5.77	5.42	5.11	0.30	0.31	0.32	0.39	0.45
	1000	6.08	5.98	5.85	5.78	5.85	0.30	0.31	0.32	0.34	0.36
	5000	6.08	6.01	5.99	5.99	5.98	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34
	10000	6.08	5.92	5.91	5.90	5.90	0.33	0.34	0.34	0.35	0.35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่าไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิด เนื่องจากค่าความเป็นกรดลดลงและค่าความเข้มข้นกรดแลคติกสูงขึ้น เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antimicrobial activity) ดียิ่งขึ้น จากงานวิจัยของ Tsai และ Su (1999) ที่พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซานขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์เพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และไอออนของเกลือ ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นกรดแลคติก จึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของไคโตซาน จากการศึกษาผลของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ในการหมักแบบจำลองการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษา 2 ชนิด ได้แก่ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917 ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด- ด่าง และความเข้มข้นกรดแลคติก ตามระยะเวลาการหมักทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.1) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับต่างๆ ระหว่างการหมักในแบบจำลองแหนม 48 ชั่วโมง โดยที่เมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเพียงเล็กน้อย จะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของไคโตซาน 100 ppm ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงทีละน้อยจนเวลาการหมักผ่านไป 36 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่มีความแตกต่างเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (0 ppm) และความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงอย่างช้าๆ จนที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.30 และ 5.39 ตามลำดับ ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นสูง 5000 และ 10000 ppm เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปทุก 12 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างช้าๆ และเริ่มคงที่ โดยที่ตัวอย่างควบคุม (0 ppm) มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว จนถึงเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 4.40 เนื่องจากการทดลองข้างต้น ไคโตซานมีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิดที่มีเป็นส่วนสำคัญในการผลิตกรดแลคติก จึงเป็นผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างจากตัวอย่างควบคุม (0 ppm) (Gil และคณะ, 2004) ในขณะเดียวกันเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 เมื่อใช้ความเข้มข้น 100 ppm ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (0 ppm) จะเห็นได้ว่าไคโตซานอาจทำลายเชื้อนี้ได้ดีกว่า *P. pentosaceus* TISTR 536 และเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างมีความแตกต่างจากตัวอย่างควบคุมสูงขึ้นตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิด โดยพบว่าเมื่อเวลาการหมักผ่านไปทุกๆ 12 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือคงที่ เมื่อระดับความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นกรดแลคติกในตัวอย่างควบคุมได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงแสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีผลต่อค่าความเข้มข้นกรดแลคติก ซึ่งได้สอดคล้องกับการเหลือรอดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากการทดลองข้างต้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไคโตซานมีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิด โดยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่า *L. plantarum* ATCC 14917 รวมทั้งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นกรดแลคติกเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง (ต่ำกว่า 6.3) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานดียิ่งขึ้น (Hans และ Bendas, 2008)

4.2.3 ผลของไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองการหมักแหนม

ในการทดลองที่ 4.2.2 ไคโตซานสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิดได้ แต่เนื่องจากมีงานวิจัย พบว่า กระเทียมมีผลส่งเสริมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก และช่วยเร่งผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักชนิด dry sausage รวมทั้งผลิตภัณฑ์แหนม (Swetwiwathana และคณะ, 1998) ดังนั้นการทดลองต่อไป แสดงถึงผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *L. plantarum* ATCC 14917 โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไคโตซานที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคคือ ที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้หมด ร่วมกับกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เติมไคโตซานเพียงอย่างเดียว

จากการทดลองการใช้ไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับ กระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้น 5000 ppm ของไคโตซานที่ไม่เติมกระเทียมสามารถทำลายเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 หมด (รูปที่ 4.7 ก) แต่เมื่อเติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังเหลือรอดถึง 3 log cfu/ml โดยที่ชั่วโมงการหมัก 12 ชั่วโมง เชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถกับมาฟื้นตัวได้อีก ดังนั้นกระเทียมมีส่วนในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในส่วนของเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 (รูปที่ 4.7 ข) พบว่า เมื่อระดับความเข้มข้น 5000 ppm ของไคโตซานที่ไม่เติมกระเทียมทำลายเชื้อได้ในช่วงระยะเวลาการหมักที่ 12 ชั่วโมง แต่เมื่อเติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการหมัก 12 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อเพิ่มทีละน้อย จนเหลือรอดถึง 2-3 log cfu/ml ในช่วงระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง เนื่องจากกระเทียมมีสาร inulin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพรีไบโอติก ซึ่งเป็นสารอาหารในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Gibson และ Roberfroid, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Woojin และคณะ (2010) ที่พบว่าไคโตซาน (40 ppm) ในการหมัก Dongchimi สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติก

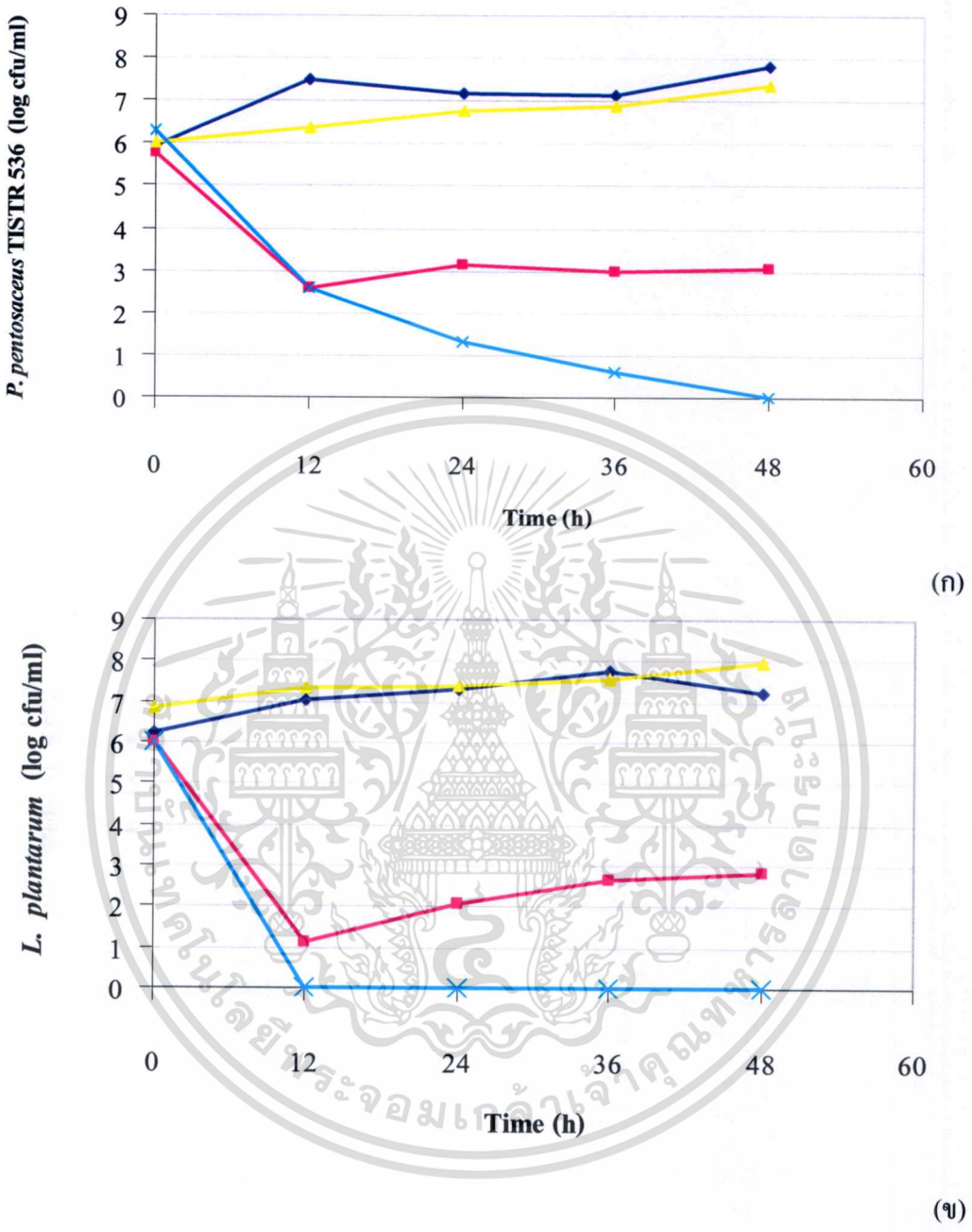
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถกลับมาฟื้นตัวได้ อาจเนื่องจากใน Dongchimi มีส่วนประกอบของกระเทียมอยู่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อาจกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ดังนั้นผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมกระเทียม ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเหลือรอด หลังจากใช้ไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm แต่เนื่องจากใช้ความเข้มข้นของไคโตซานค่อนข้างสูง อาจส่งผลถึงการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นกรดแลคติก จากการใช้กระเทียมร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ตารางที่ 4.2) ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 พบว่า ในตัวอย่างควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว ในเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมงมีค่าต่ำกว่า 4.00 แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น 5000 ppm ของไคโตซาน เพียงอย่างเดียว ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงอย่างช้าๆ จนเวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.82 และ 5.81 ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ร่วมกับกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเร็วขึ้นจนเวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.02 และ 5.11 ซึ่งได้สอดคล้องจากการเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (รูปที่ 4.7) เพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่างได้มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นกรดแลคติก โดยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ค่าความเข้มข้นกรดแลคติกยิ่งเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลองข้างต้น ทำให้สามารถตัดสินใจเลือกเชื้อ *Stap. aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในการทดลองหลังจากนี้ เนื่องจากไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 100 500 และ 1000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* และทำลายได้หมดที่ 5000 และ 10000 ppm แต่ในขณะที่ *Salmonella* มีผลแค่เพียงยับยั้งการเจริญเท่านั้น ดังนั้นไคโตซานอาจเป็นองค์ประกอบที่ไม่เหมาะสมในการควบคุม *Salmonella* ในการหมักแหนม เป็นเหตุให้มุ่งเน้นที่จะศึกษาเชื้อ *Stap. aureus* ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ผลของไคโตซานร่วมกับกระเทียมต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแบบจำลองแหนม: NMB (▲), NMB + 5 เปอร์เซ็นต์ กระเทียม (◆), NMB +ไคโตซาน 5000 ppm (✕) และ NMB + ไคโตซาน5000 ppm + 5 เปอร์เซ็นต์ กระเทียม (■) ต่อการลดลงของเชื้อ: (a) *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ (b) *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกเมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับกระเทียม ระหว่างการหมักในแบบจำลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แบคทีเรียแลคติก	ตัวอย่าง NMB	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)					ค่าความเข้มข้นกรดแลคติก (%) ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)				
		0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
Pediococcus	garlic	6.16	4.59	4.33	4.01	3.88	0.33	0.58	0.67	0.91	1.05
pentosaceus	5000 ppm CS+G	6.15	5.40	5.21	5.15	5.02	0.32	0.49	0.51	0.55	0.67
	non-CS	6.16	4.67	4.25	4.05	3.93	0.35	0.54	0.64	0.86	0.98
	5000 ppm CS	6.15	5.99	5.96	5.87	5.82	0.32	0.47	0.49	0.54	0.54
Lactobacillus	garlic	6.16	4.98	4.22	3.97	3.80	0.34	0.55	0.65	0.73	0.98
plantarum	5000 ppm CS+G	6.15	5.44	5.23	5.13	5.11	0.33	0.46	0.52	0.58	0.61
	non-CS	6.16	4.81	4.13	3.89	3.79	0.34	0.45	0.70	0.92	1.04
	5000 ppm CS	6.15	5.99	5.98	5.82	5.81	0.32	0.43	0.45	0.50	0.50

หมายเหตุ garlic คือ NMB ที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์

5000 ppm CS+G คือ NMB ที่เติมทั้งไคโตซาน 5000 ppm และกระเทียม

non-CS คือ NMB ที่ไม่เติมทั้งไคโตซานและกระเทียม (ชุดควบคุม)

5000 ppm CS คือ NMB ที่เติมไคโตซาน 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม ในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ในแบบจำลองการหมักแหนม

จากการทดลองข้างต้นความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ที่ดีที่สุดคือ ที่ระดับ 5000 ppm และเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ดังนั้นการทดลองหลังจากนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาไคโตซานที่ระดับ 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* รวมทั้งมีงานวิจัยของ อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2542) พบว่า น้ำสกัดกระเทียม สามารถทำลายและลดจำนวนเชื้อ *Stap. aureus* และ *S.* Anatum ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ TSB ได้ จึงมีการศึกษาการใช้ไคโตซานที่ระดับ 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* อีกด้วย

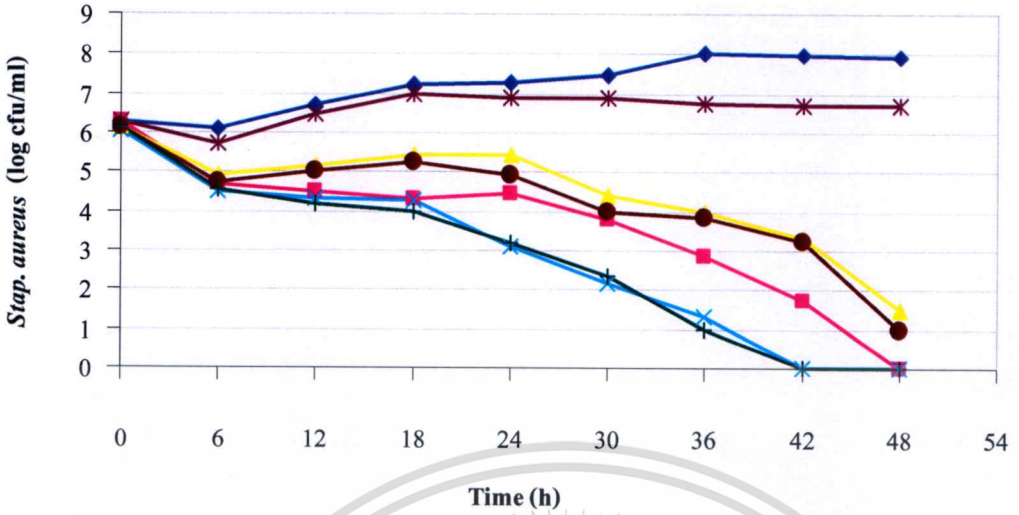
จากรูปที่ 4.8 พบว่า เชื้อ *Stap. aureus* (ชุดควบคุม) เริ่มต้นอยู่ที่ 6.1 log cfu/ml เมื่อการหมักผ่านไป 12 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญขึ้นทีละน้อยจนถึง 8 log cfu/ml ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ขณะเดียวกันเมื่อใช้ไคโตซาน 5000 ppm สามารถทำให้เชื้อ *Stap. aureus* ลดลงถึง 8 log cfu/ml ในช่วงการหมักที่ 48 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว เชื้อลดลงเพียง 6-7 log cfu/ml แสดงให้เห็นว่าไคโตซานสามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าการเติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว แต่เมื่อนำไคโตซานมาใช้ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ในชั่วโมงการหมักที่ 36 ชั่วโมง ลง 8 log cfu/ml ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ดีกว่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เติมแต่ไคโตซาน หรือกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียว แต่ในขณะเดียวกัน กระเทียมมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ในชั่วโมงการหมักที่ 36 ชั่วโมง ถึง 8 log cfu/ml ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับการใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เนื่องจากกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตกรดแลคติกทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง เป็นผลให้ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อดียิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตซาน ในเมื่อยิ่งค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำลงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดียิ่งขึ้น (Hans และ Bendas, 2008) นอกจากนี้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังสามารถผลิต pediocin PA-1 (Swetwiwathana, 2005) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งกระเทียมมีสาร allicin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนสและไตรโอฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของจุลินทรีย์ที่เจริญโดยใช้ออกซิเจนมากกว่าไม่ใช้ออกซิเจน (Willis, 1956)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

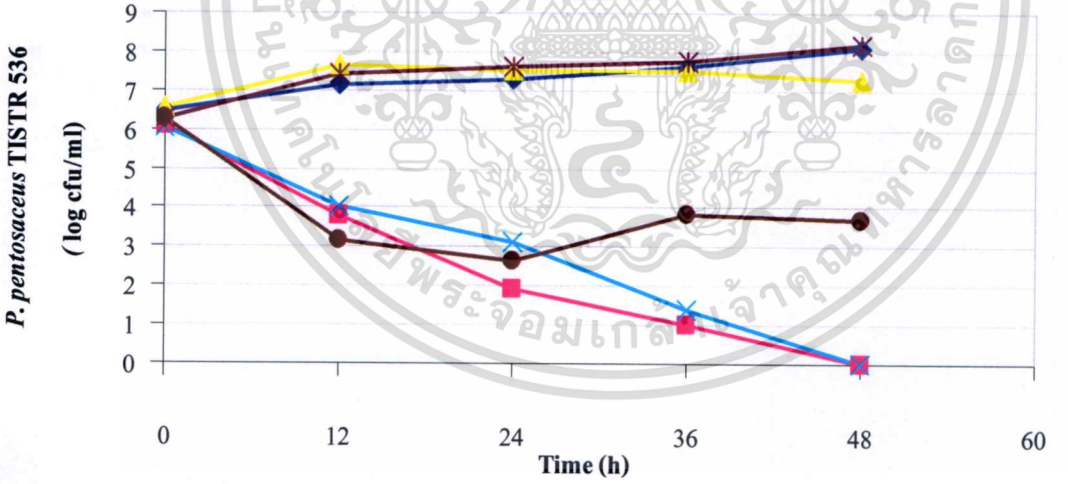
จึงทำให้การใช้ร่วมกันระหว่างไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ดียิ่งขึ้น

ดังนั้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก จึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ของไคโตซาน แสดงให้เห็นจากรูปที่ 4.9 พบว่าการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (ชุดควบคุม) เริ่มต้นที่ 6.4 log cfu/ml เชื้อมีการเจริญจนถึง 8 log cfu/ml ในเวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมร่วมกับเชื้อ *Stap. aureus* หรือกระเทียมอย่างเดียว แต่เมื่อเติมไคโตซาน 5000 ppm เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ถูกทำลายเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง อาจเนื่องจากเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสมในการยับยั้งเชื้อของไคโตซาน เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จึงถูกทำลายไปด้วย แต่ในขณะที่เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อและกระเทียม เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาการหมักที่ 12 ชั่วโมง และลดลงอีกเล็กน้อยในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง แต่เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 36 ชั่วโมง เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เริ่มมีการเจริญและเริ่มคงที่ ซึ่งได้สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.2.3 พบว่ากระเทียมมีผลกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ผลของไคโตซาน(CS) 5000 ppm ร่วมกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม ต่อการลดลงของเชื้อ *Staphylococcus aureus* : *Stap. aureus* (—◆—), *Stap. aureus*+ CS (—■—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* (—▲—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + CS (—✕—), *Stap. aureus*+ Garlic (—✱—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + Garlic (—●—) และ *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + Garlic+ CS (—+—)



รูปที่ 4.9 ผลของไคโตซาน(CS) 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม ต่อการลดลงของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 : *P. pentosaceus* (—◆—), *P. pentosaceus* + CS (—■—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* (—▲—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + CS (—✕—), *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + Garlic (—✱—) และ *Stap. aureus* + *P. pentosaceus* + Garlic+ CS (—●—)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นกรดแลคติก เมื่อใช้ไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ระหว่างการหมักในแบบจำลอง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					ค่าความเข้มข้นกรดแลคติก (%)				
	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)					ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)				
	0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
Pp	6.15	5.29	4.49	4.02	3.91	0.23	0.39	0.50	0.60	0.64
PpCS	6.10	6.07	5.17	4.85	4.51	0.26	0.29	0.45	0.54	0.58
PpSt	6.15	4.84	4.60	4.38	4.00	0.23	0.42	0.51	0.52	0.60
PpStCS	6.14	6.00	5.53	5.50	4.88	0.26	0.30	0.32	0.32	0.50
PpStG	6.10	4.80	4.50	4.32	3.98	0.23	0.44	0.56	0.61	0.65
PpStGCS	6.15	5.98	5.01	4.81	4.45	0.23	0.32	0.35	0.42	0.53

หมายเหตุ Pp คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

PpCS คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และไคโตซาน 5000 ppm

PpSt คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Stap. aureus*

PpStCS คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536, *Stap. aureus* และไคโตซาน 5000 ppm

PpStG คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 , *Stap. aureus* และกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์

PpStGCS คือ NMB ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 , *Stap. aureus*, กระเทียม5 เปอร์เซ็นต์ และไคโตซาน 5000 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (ชุดควบคุม) เมื่อเวลาการหมักผ่านไป ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 3.91 ซึ่งมีผลใกล้เคียงกับการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับเชื้อ *Stap. aureus* และการเติม กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับเชื้อ *Stap. aureus* และกระเทียม ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4.00 และ 3.98 ตามลำดับ เป็นผลให้ปริมาณเชื้อ *Stap. aureus* ลดลง (รูปที่ 4.8) ในขณะเดียวกันเมื่อเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน 5000 ppm ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มลดลงอย่างช้าๆ อาจเนื่องจากไคโตซานเริ่มทำลายเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เมื่ออยู่ในค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม แต่เมื่อเติมกระเทียมลงไป มีค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน 5000 ppm อาจเป็นผลจากกระทียมไปช่วยให้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เหลือรอด ในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และความเข้มข้นกรดแลคติกมีค่าแปรผันตามค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น ค่าความเข้มข้นกรดแลคติกน้อยลง แต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำลง ค่าความเข้มข้นกรดแลคติกมีค่ามากขึ้น

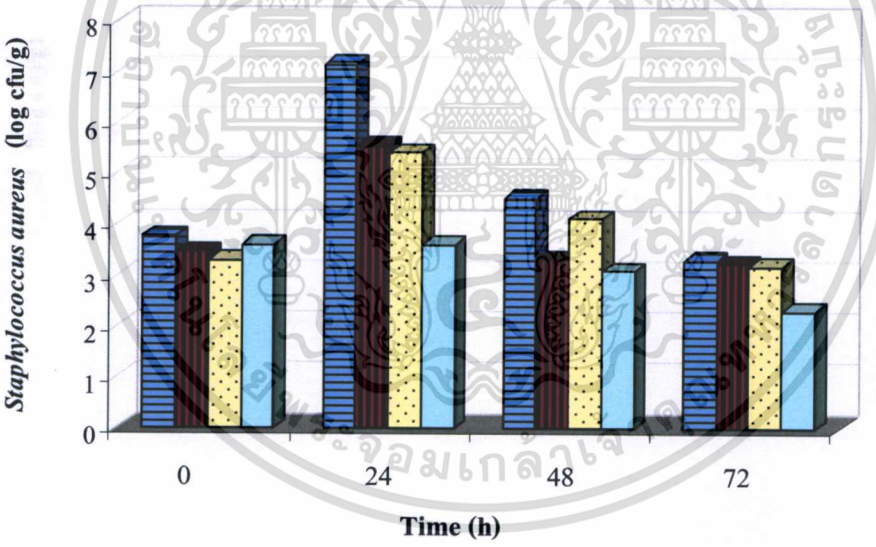
จากการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบที่เหมาะสมในการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนมการทดลองต่อไป โดยใช้ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่ 5000 ppm สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ซึ่งมีงานวิจัยของ Darmadji และ Izumimoto (1994) พบว่าไคโตซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร ในผลิตภัณฑ์เนื้อได้ รวมทั้งกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

4.3.1 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนม

จากผลการทดลองในแบบจำลองการหมักแหนมข้างต้น ทำให้ทราบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อของไคโตซาน คือเชื้อ *Stap. aureus* และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ตามลำดับ เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ คือที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm ดังนั้นการทดลองที่ 4.3.1 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนมที่ได้จากบริษัทสุทธิลักษณ์ อินโนฟู้ดส์ จำกัด โดยแสดงผลตัวอย่างแหนมที่เติมเชื้อ *Stap. aureus* 3.6 log cfu/g และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ลงในแหนม



รูปที่ 4.10 ผลร่วมของไคโตซาน กล้าเชื้อ และกระเทียม ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนม : แหนมที่เติมเชื้อ *Stap. aureus* (▤), แหนมที่เติมเชื้อ *Stap. aureus* และไคโตซาน (▥), แหนมที่เติมเชื้อ *Stap. aureus* และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (▦) และแหนมที่เติมทั้งเชื้อ *Stap. aureus* กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และไคโตซาน (□)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm โดยน้ำหนัก ลงในผลิตภัณฑ์แหนม เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* พบว่า เมื่อเติมเชื้อ *Stap. aureus* 3.6 log cfu/g ลงในแหนม (ชุดควบคุม) ไคโตซานก็มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้เพียงเล็กน้อย อีกทั้งในชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาการหมัก ปริมาณของเชื้อ *Stap. aureus* เพิ่มสูงถึง 7 log cfu/g อาจก่อให้เกิดอันตรายจากสารพิษของเชื้ออีกด้วย จึงสรุปได้ว่าไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ในแหนมเพียงเล็กน้อย อาจเนื่องจากแหนมยังไม่ได้อยู่ในสภาวะที่จะทำให้ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เมื่อเติมเชื้อ *Stap. aureus* 3.6 log cfu/g และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.7 log cfu/g ลงในแหนม โดยที่เมื่อระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง พบว่า แหนมที่เติมทั้งเชื้อ *Stap. aureus*, *P. pentosaceus* TISTR 536 และไคโตซาน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าแหนมที่เติมเชื้อ *Stap. aureus* และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ไม่เติมไคโตซาน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จะเห็นได้ว่าไคโตซานมีผลต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดี เมื่อใช้ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เห็นได้จากแหนมที่เติมแต่เชื้อ *Stap. aureus* และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีผลต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus* เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเติมเชื้อ *Stap. aureus* กับ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน 5000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมไคโตซาน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ช่วยเร่งการผลิตกรดแลคติกให้เร็วขึ้น เป็นเหตุทำให้แหนมมีสภาวะที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อได้ดียิ่งขึ้น และสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* อีกด้วย

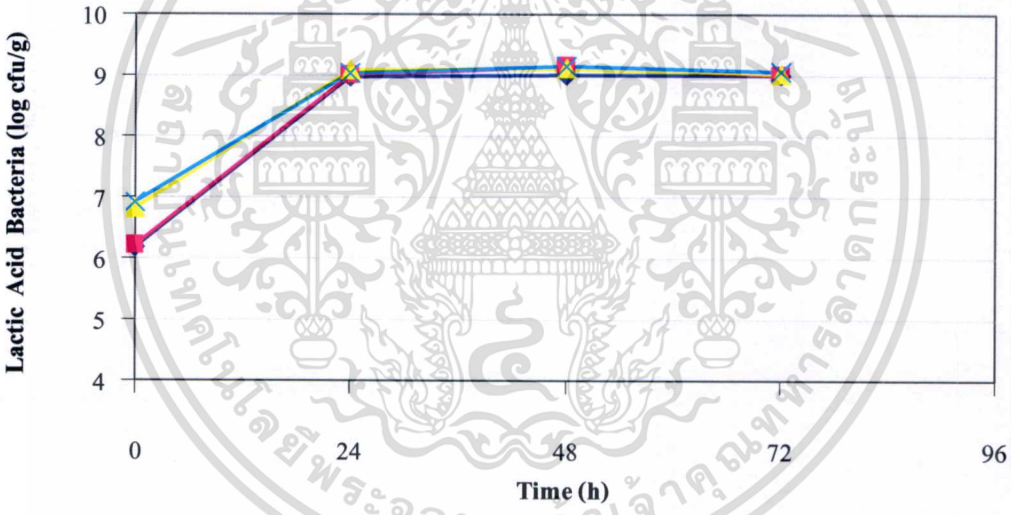
นอกจากนี้ในตัวอย่างแหนมโดยธรรมชาติ ที่ไม่มีการเติมเชื้อ *Stap. aureus* แต่เติมไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าแหนมที่เติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับตัวอย่างแหนมโดยธรรมชาติ จะเห็นได้ว่าในแบบจำลอง(NMB) ไคโตซานสามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าในผลิตภัณฑ์แหนมจริง โดยในผลิตภัณฑ์แหนมไคโตซานไม่มีผลต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus* แต่เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดียิ่งขึ้น แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้หมด เนื่องจากปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น ความเป็นเนื้อเดียวกัน ใน NMB น้อยกว่าในแบบจำลองการหมัก หรือในผลิตภัณฑ์แหนม อาจมีองค์ประกอบที่ขัดขวางการทำงานของไคโตซาน เช่น ส่วนประกอบของเนื้อและไขมัน ซึ่งทำให้การกระจายตัวช้าลง (Ananou และคณะ, 2005) ซึ่งการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Kanatt และคณะ (2008) ในการศึกษาผลของไคโตซานร่วมกับสารสกัดมิ้นท์ ต่อการถนอมเนื้อแกะ พบว่า ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ไคโตซานที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้ แต่เมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดมิ้นท์ (0.1 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ในเนื้อแกะ

4.3.2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ในผลิตภัณฑ์แหนม

จากการทดลองในแบบจำลองแหนม (NMB) (การทดลองที่ 4.2.6) ไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกอย่างมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม โดยการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.7 log cfu/g ลงในผลิตภัณฑ์



รูปที่ 4.11 ผลของไคโตซานต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม : แหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อและไคโตซาน (—◆—), แหนมที่เติมไคโตซาน (—✳—), แหนมที่เติมกล้าเชื้อ (—▲—) และแหนมที่เติมกล้าเชื้อและไคโตซาน (—■—)

จากรูปที่ 4.11 จะเห็นได้ว่า เมื่อเติมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm ลงในแหนม พบว่า ไคโตซานไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) โดยที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นอยู่ที่ 6.1 log cfu/g เมื่อระยะเวลาการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นถึง 9 log cfu/g และคงที่จนถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นอยู่ที่ 6.8 log cfu/g พบว่า ไคโตซานก็ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียว

ดังนั้น ไคโตซาน 5000 ppm ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์แหนมมีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รูปแท่งและกลมปะปนกัน ทำให้ไคโตซานอาจไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อเหล่านั้นก่อน และในผลิตภัณฑ์แหนมมีปัจจัยที่อาจไปขัดขวางการทำงานของไคโตซาน เช่น องค์ประกอบของแหนม เป็นต้น รวมทั้งในผลิตภัณฑ์แหนมมีกระเทียม ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้น (การทดลองที่ 4.2.3) พบว่า กระเทียมมีความสามารถช่วยให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเหลือรอด

จากตารางที่ 4.4 แสดงผลการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมักค่าความเป็นกรด-ด่างของแหนมอยู่ในช่วง 6.3-6.5 เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปทุกๆ 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างของแหนมจะลดลงทีละน้อย แต่เมื่อเทียบตัวอย่างแหนมที่เติมไคโตซาน ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงช้ากว่าตัวอย่างที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) เห็นได้จากในระยะเวลาชั่วโมงการหมักที่ 72 ค่าความเป็นกรด-ด่างของแหนมที่เติมไคโตซาน มีค่าเท่ากับ 5.15 แต่ตัวอย่างแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.92 อีกทั้งตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.88 โดยมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ 5000 ppm ไคโตซาน ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.07 ดังนั้นไคโตซาน 5000 ppm มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม ($p \leq 0.05$) ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากไคโตซานมีค่าความเป็นด่างค่อนข้างสูง เมื่ออยู่ในสภาวะกรด อาจทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของแหนมมีค่าความเป็นกรดน้อยลง รวมทั้งได้แสดงผลการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ค่าความเข้มข้นกรดแลคติกมีความแปรผกผันกับค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนม เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยลง ความเข้มข้นกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงแรกค่าความเข้มข้นกรดแลคติกของตัวอย่างมีค่า 0.3-0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น (72 ชั่วโมง) ค่าความเข้มข้นกรดแลคติกของตัวอย่างสูงถึง 0.7-0.9 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) กับ ตัวอย่างที่เติมไคโตซาน พบว่า ไคโตซานมีผลต่อค่าความเข้มข้นกรดแลคติกเพียงเล็กน้อย ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างการหมัก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะเวลาการหมัก (h)				ค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ระยะเวลาการหมัก (h)			
	0	24	48	72	0	24	48	72
N	$6.50^{c} \pm 0.02$	$5.54^{c} \pm 0.01$	$5.35^{c} \pm 0.01$	$4.92^{a} \pm 0.01$	$0.47^{c} \pm 0.01$	$0.46^{b} \pm 0.01$	$0.52^{b} \pm 0.01$	$0.84^{cd} \pm 0.01$
CS	$6.32^{a} \pm 0.01$	$5.61^{f} \pm 0.01$	$5.41^{c} \pm 0.01$	$5.15^{c} \pm 0.02$	$0.44^{d} \pm 0.01$	$0.42^{a} \pm 0.01$	$0.47^{a} \pm 0.01$	$0.79^{a} \pm 0.01$
St	$6.57^{c} \pm 0.02$	$5.54^{c} \pm 0.02$	$5.39^{d} \pm 0.01$	$5.11^{d} \pm 0.02$	$0.49^{f} \pm 0.02$	$0.46^{b} \pm 0.03$	$0.59^{c} \pm 0.01$	$0.81^{b} \pm 0.01$
StCS	$6.31^{a} \pm 0.01$	$5.57^{e} \pm 0.01$	$5.42^{e} \pm 0.02$	$5.07^{bc} \pm 0.05$	$0.39^{b} \pm 0.01$	$0.49^{d} \pm 0.01$	$0.68^{f} \pm 0.02$	$0.85^{d} \pm 0.01$
536St	$6.55^{dc} \pm 0.02$	$5.32^{a} \pm 0.01$	$5.28^{b} \pm 0.01$	$4.87^{a} \pm 0.03$	$0.55^{g} \pm 0.01$	$0.57^{g} \pm 0.02$	$0.68^{f} \pm 0.02$	$0.90^{e} \pm 0.02$
536StCS	$6.52^{cd} \pm 0.01$	$5.55^{d} \pm 0.02$	$5.46^{f} \pm 0.01$	$5.02^{b} \pm 0.01$	$0.36^{a} \pm 0.01$	$0.47^{c} \pm 0.02$	$0.65^{c} \pm 0.01$	$0.84^{c} \pm 0.01$
PP536	$6.49^{b} \pm 0.01$	$5.52^{b} \pm 0.01$	$5.17^{a} \pm 0.02$	$4.88^{a} \pm 0.01$	$0.47^{c} \pm 0.02$	$0.54^{f} \pm 0.01$	$0.77^{g} \pm 0.02$	$0.90^{e} \pm 0.01$
536CS	$6.54^{cdc} \pm 0.01$	$5.52^{b} \pm 0.03$	$5.46^{f} \pm 0.01$	$5.07^{c} \pm 0.01$	$0.42^{c} \pm 0.01$	$0.51^{c} \pm 0.01$	$0.62^{d} \pm 0.01$	$0.84^{c} \pm 0.02$

หมายเหตุ a-g หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

N หมายถึง แหนมที่ไม่เติมไคโตซาน

CS หมายถึง แหนม +ไคโตซาน

St หมายถึง แหนม + เชื้อ *Stap. aureus*

StCS หมายถึง แหนม +ไคโตซาน + เชื้อ *Stap. aureus*

536St หมายถึง แหนม + เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 + เชื้อ *Stap. aureus*

536StCS หมายถึง แหนม + เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 + เชื้อ *Stap. aureus*+ไคโตซาน

PP536 หมายถึง แหนม + เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

536CS หมายถึง แหนม + เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 +ไคโตซาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

เนื่องจากตัวอย่างแหนมที่ใช้ในการศึกษาไม่สามารถทำให้ปลอดเชื้อ และศึกษาผลเฉพาะกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมลงในส่วนผสมแหนมที่นำมาจากบริษัทได้ ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองข้อ 4.3.2 ว่ากล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักจริง จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแหนม 2 ตัวอย่าง คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน 5000 ppm ทุกๆ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการหมัก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ (รูปที่ 4.12) จากนั้นสุ่มตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมในตัวอย่างแหนมทั้ง 2 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA ด้วยพีซีอาร์ และจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกโดยใช้เทคนิคของ PCR-RFLP

(ก) (ข)

รูปที่ 4.12 ลักษณะรูปร่าง และโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก : (ก) ลักษณะสัณฐานวิทยา (cocci) โดยกล้องจุลทรรศน์ และ (ข) ลักษณะโคโลนีต่างๆของแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียแลคติกในแหนม

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียแลคติกในแหนมแล้ว นำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 4.5 พบว่าดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สกัดได้ มีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1201-2507 ng/µl และค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A_{260}/A_{280}) ที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1.80-2.0 แต่มีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในบางสายพันธุ์ มีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอต่ำกว่ามาตรฐาน ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนโปรตีนจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นำมาสกัดมีอาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย

4.3.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติก

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแหนมที่สกัดได้ (100 ng/µl) มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์คู่ที่ใช้ ได้แก่ primer REVB (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) และ primer BEF (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′) (Kanokratana และคณะ, 2004) จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 ไวลล์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนมทั้ง 2 ตัวอย่าง ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 1500 bp ดังรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต

แหล่งที่มาของเชื้อ	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ	ค่าการดูดกลืนแสง		คุณภาพดีเอ็นเอ
	(ng/µl)	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$
P. pentosaceus TISTR 536				
บริสุทธิ์	1375.8	0.775	0.165	1.67
N+536 0 ชั่วโมง	2507.6	0.275	0.134	2.05
N+536+CS 0 ชั่วโมง	1510.9	0.233	0.117	1.99
N+536 24 ชั่วโมง	1201.7	0.222	0.108	2.05
N+536+CS 24 ชั่วโมง	1373.3	0.735	0.483	1.52
N+536 48 ชั่วโมง	1166.5	0.246	0.141	1.75
N+536+CS 48 ชั่วโมง	1811.3	0.367	0.221	1.66
N+536 72 ชั่วโมง	1229.1	0.237	0.121	1.96
N+536+CS 72 ชั่วโมง	1837.4	0.250	0.132	1.89

หมายเหตุ N+536 0 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

N+536+CS 0 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

N+536 24 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

N+536+CS 24 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

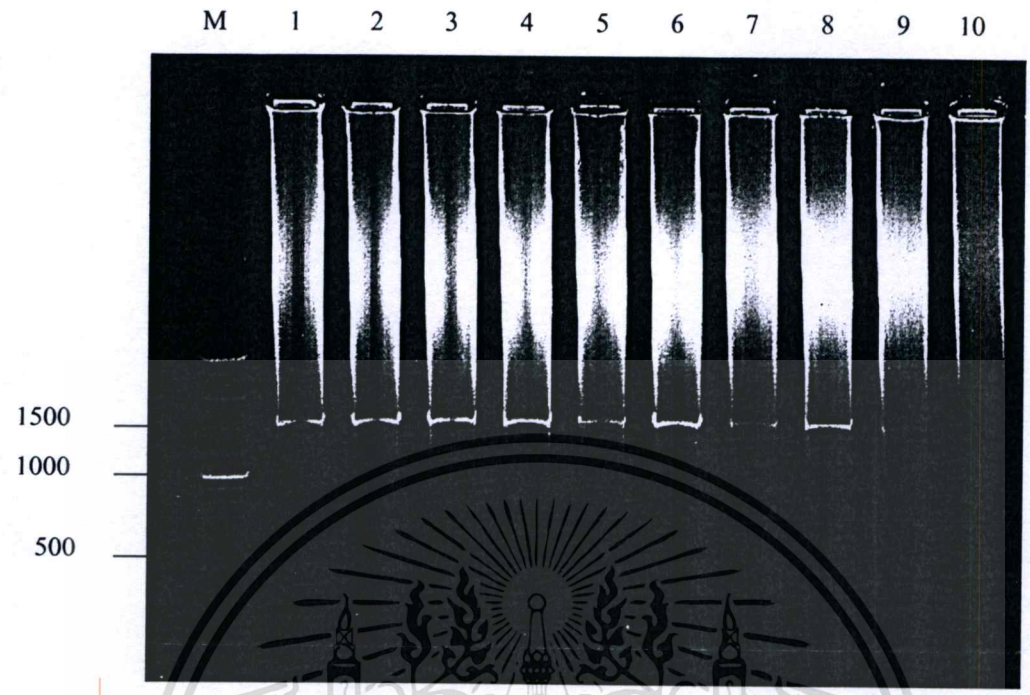
N+536 48 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

N+536+CS 48 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

N+536 72 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

N+536+CS 72 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติก และตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

Lane 1 คือ กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

Lane 2 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

Lane 3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

Lane 4 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

Lane 5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

Lane 6 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Lane 7 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Lane 8 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 9 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 10 คือ ตัวอย่างควบคุม (น้ำกลั่นปลอดเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.3 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์แบคทีเรียแลคติกที่ได้จากข้อ 4.3.3.2 มาวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Alu*I จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 ไวลล์ เป็นเวลา 22 นาที แล้วตรวจสอบเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม จากการเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้จากการตัดเอนไซม์จำเพาะทั้งสองชนิดของยีน 16s rDNA เชื้อแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างแหนมทั้ง 2 ตัวอย่าง และแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่ทราบสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อ *Weisella cibaria* SI21 *L. plantarum* NF3 และ *P. pentosaceus* TISTR 536

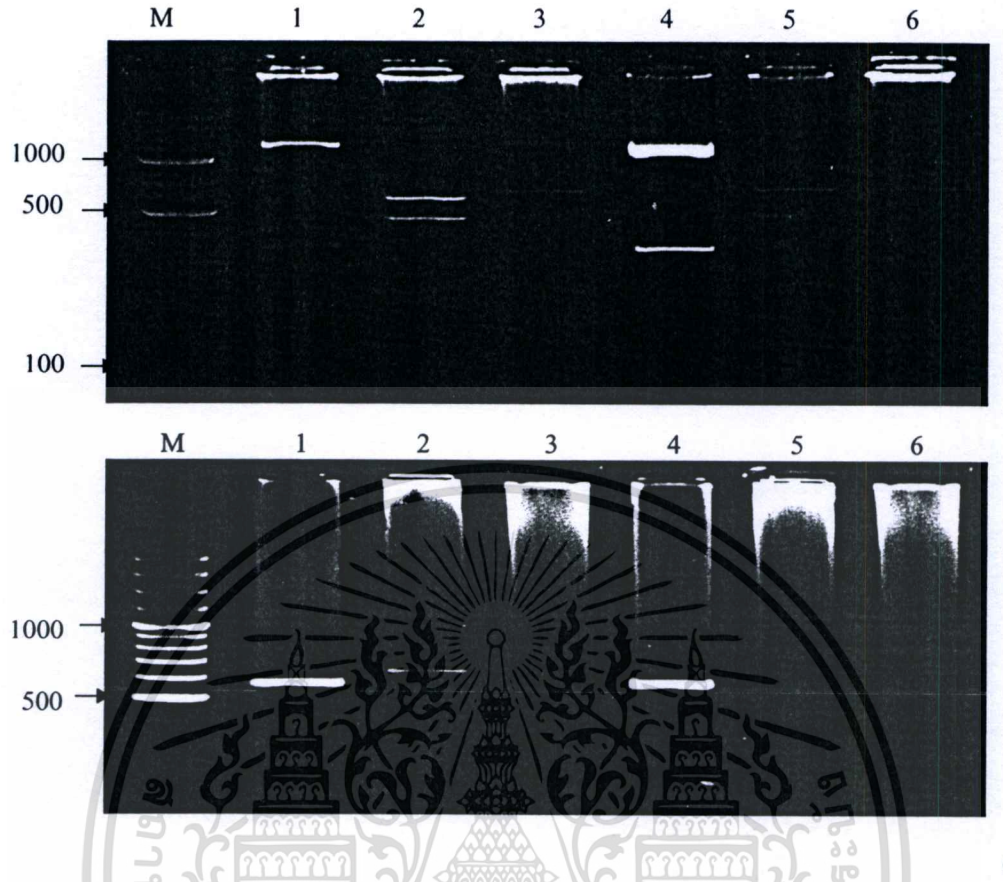
จากการทดลอง ในรูปที่ 4.14 ก พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ จากตัวอย่างแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง (lane 5) และตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (lane 6) ปรากฏชิ้นดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III เช่นเดียวกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 บริสุทธิ์ ที่เติมลงในตัวอย่างแหนม (lane 3) แสดงว่าเชื้อ *P. pentosaceus* ยังเหลือรอดอยู่ในผลิตภัณฑ์แหนม นอกจากนี้ยังปรากฏชิ้นดีเอ็นเอ ใน lane 4 แตกต่างจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งอาจจะเป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติก cocci สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่เชื้อ *P. pentosaceus* ในผลิตภัณฑ์แหนม และจากการเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I ในรูปที่ 4.14 ข พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน (lane 4) ปรากฏชิ้นดีเอ็นเอเหมือนกับเชื้อ *W. cibaria* SI21 (lane 1) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก cocci สายพันธุ์อื่น เป็นเชื้อ *W. cibaria* และการจำแนกความหลากหลายของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Alu*I สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2010) โดยศึกษาการจำแนกสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแลคติกของลูกหม่อนสุกในไต้หวัน จากเทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *W.* cibaria *L. plantarum Lactococcus lactis* และ *Leuconostoc pseudomesenteroides* รวมทั้งงานวิจัยของ Jindaprasert และคณะ (2011) โดยศึกษาบทบาทของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในระหว่างการหมักไส้กรอกอีสาน ซึ่งใช้การตัด 16s rDNA ของแบคทีเรียแลคติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Alu*I พบว่าสามารถระบุชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในไส้กรอกอีสาน ดังนั้นสรุปได้ว่า การตัด 16s rDNA ของแบคทีเรียแลคติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Alu*I ทำให้ทราบว่าแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน พบเชื้อ *P. pentosaceus* และ *W. cibaria* ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง แต่การใช้เอนไซม์ *Hae*III ปรากฏชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ชัดเจนกว่าเอนไซม์ *Alu*I ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์ *Hae*III ในการตัด 16s rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อให้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

จากรูปที่ 4.15 ตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน และแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่า ในระหว่างการหมักแหนมทั้ง 2 ตัวอย่าง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถตรวจพบเชื้อ *P. pentosaceus* เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์แหนม โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III เหมือนกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่เติมลงในแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ผลผลิตพีซีอาร์จากแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์และแบคทีเรียแลคติกในแหนม ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III (ก) และ *Alu*I (ข) ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

Lane 1 คือ เชื้อ *Weisella cibaria* SI 21

Lane 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* NF3

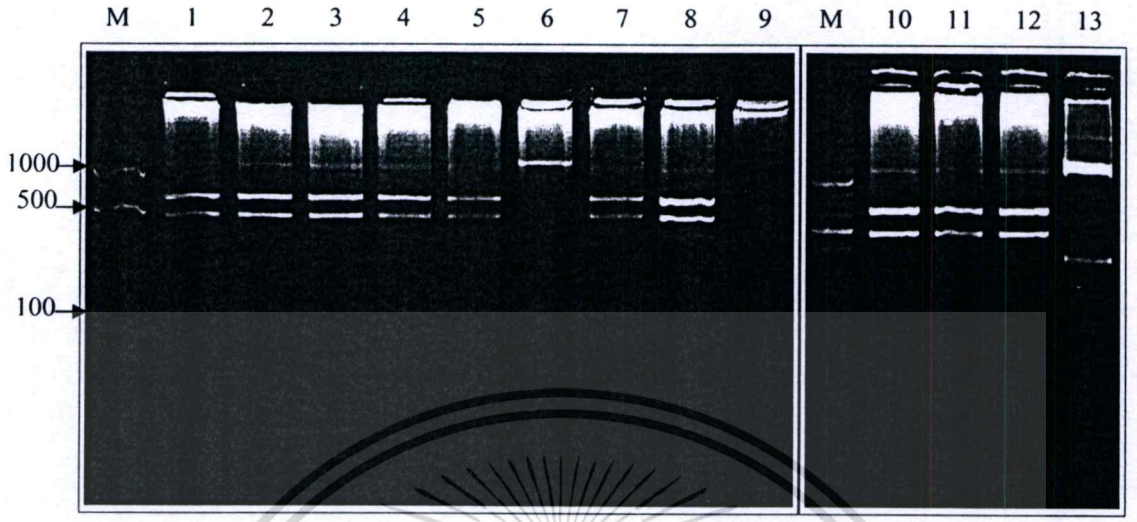
Lane 3 คือ เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

Lane 4 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 5 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 6 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ผลผลิตพีซีอาร์จากแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์และแบคทีเรียแลคติกในแหนม ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hae*III ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

Lane 1 คือ กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

Lane 2 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

Lane 3 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 0 ชั่วโมง

Lane 4 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

Lane 5 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

Lane 6 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

Lane 7 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Lane 8 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Lane 9 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Lane 10 คือ กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

Lane 11 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อ ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 12 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

Lane 13 คือ LAB จากแหนมที่เติมกล้าเชื้อร่วมกับไคโตซาน ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.4 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

ตารางที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียแลคติก กลุ่ม cocci และเชื้อ *P. pentosaceus* ในแหนมทั้งสองตัวอย่าง

ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อ (log cfu/g)	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)			
		0	24	48	72
แหนมที่เติมกล้าเชื้อ	LAB	6.82^{Cb}	9.04^{Ba}	9.11^{Aa}	9.04^{Ba}
P. pentosaceus	rod	6.23^{Cc}	7.53^{Bf}	8.58^{Ac}	8.62^{Ad}
TISTR 536	cocci	6.69^{Cc}	8.88^{Bb}	8.96^{Ab}	8.83^{Bb}
(ชุดควบคุม)	* *P. pentosaceus*	6.69^{Cc}	8.88^{Bb}	8.96^{Ab}	8.83^{Bb}
แหนมที่เติมกล้าเชื้อ	LAB	6.92^{Ca}	9.03^{Ba}	9.13^{Aa}	9.04^{Ba}
P. pentosaceus	rod	6.48^{Cd}	7.66^{Bc}	8.61^{Ac}	8.83^{Ab}
TISTR 536 ร่วมกับ	cocci	6.72^{Cc}	8.78^{Ac}	8.81^{Ac}	8.68^{Bc}
ไคโตซาน	* *P. pentosaceus*	6.72^{Cc}	8.68^{Ad}	8.71^{Ad}	8.46^{Be}

* เชื้อ *P. pentosaceus* ที่จำแนกสายพันธุ์แล้ว

หมายเหตุ a-f หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

A,B,C หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าในตัวอย่างแหนมทั้งสองชนิด คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.7 log cfu/g และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.7 log cfu/g ร่วมกับไคโตซาน พบเชื้อแบคทีเรียแลคติก (LAB) เริ่มต้นที่ 6.8-6.9 log cfu/g มีแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม cocci อยู่ประมาณ 6.7 log cfu/g เมื่อทำการสุ่มจำแนกเชื้อ cocci มาจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าเป็นเชื้อ *P. pentosaceus* อยู่ 74.24 และ 63.85 เปอร์เซ็นของแบคทีเรียแลคติก ในทั้งสองตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมง ในตัวอย่างแหนมที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) พบเชื้อ *P. pentosaceus* คิดเป็น 69.09 70.77 และ 61.82 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ตามลำดับ และตัวอย่างแหนมที่เติมไคโตซาน เมื่อระยะเวลาการหมัก 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบเชื้อ *P. pentosaceus* อยู่ 45.28 37.93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 26.18 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างแหนมที่เติมไคโตซานเชื้อ *P. pentosaceus* ลดลงมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *P. pentosaceus* ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่สภาวะของแบบจำลองการหมัก (NMB) ไคโตซานมีผลต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิดแต่เนื่องจากแหนมมีส่วนประกอบของกระเทียม ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ดังนั้นไคโตซานที่เติมในตัวอย่างแหนมไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

4.3.4 ผลของไคโตซานต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม

ผลิตภัณฑ์แหนมใช้สูตรของบริษัทสุทธิลักษณ์ อินโนฟู้ดส์ จำกัด โดยที่ใช้ตัวอย่างแหนมชุดที่ 1 แบบไม่เติมทั้งไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ชุดที่ 2 เติมไคโตซาน 5000 ppm ชุดที่ 3 เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* 536 และชุดที่ 4 เติมทั้งไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 30 คนด้วยวิธี 5 point hedonic scale ให้คะแนนความชอบทางด้านสี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมที่หมัก เป็นเวลา 4 วัน ณ อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 4.16) เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางประสาทสัมผัสระหว่างแหนมชุดที่ไม่เติมทั้งไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.6 log cfu/g (ชุดควบคุม) แหนมชุดที่เติม 5000 ppm ไคโตซานเพียงอย่างเดียว แหนมชุดที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.6 log cfu/g เพียงอย่างเดียว และแหนมชุดที่เติมทั้ง 5000 ppm ไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 6.6 log cfu/g ว่าจะแตกต่างกันทางสถิติหรือไม่ ดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม

ตัวอย่าง (sample)	ค่าคะแนนต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส				
	สี (color)^{ns}	กลิ่น (odor)	รสชาติ (flavor)^{ns}	เนื้อสัมผัส (texture)	ความชอบโดยรวม (overall liking)^{ns}
N	3.60 ± 0.81	3.40^{ab} ± 1.00	3.60 ± 1.04	3.53^{b} ± 0.86	3.80 ± 0.71
N+CS	3.36 ± 0.76	3.43^{ab} ± 1.04	3.40 ± 0.85	3.60^{ab} ± 0.87	3.73 ± 0.87
N+536	3.63 ± 0.66	3.30^{b} ± 0.99	3.80 ± 0.15	4.00^{a} ± 1.05	3.87 ± 0.78
N+536+CS	3.43 ± 1.00	3.77^{a} ± 0.77	3.57 ± 0.16	4.00^{a} ± 0.89	3.80 ± 0.96

หมายเหตุ a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

N หมายถึง ผลิตภัณฑ์แหนมที่ไม่เติมไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

N+CS หมายถึง ผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมไคโตซานอย่างเดียว

N+536 หมายถึง ผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

N+536+CS หมายถึง ผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมทั้งไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

จากตารางที่ 4.7 พบว่าค่าคะแนนเฉลี่ยต่อลักษณะของสี รสชาติ และความชอบโดยรวม ไม่มีความแตกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไคโตซานไม่มีผลต่อลักษณะที่ปรากฏเหล่านั้น แต่ในขณะเดียวกันค่าคะแนนเฉลี่ยต่อลักษณะกลิ่นของแหนมที่เติมทั้ง 5000 ppm ไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีค่ามากที่สุดคือ 3.77 ± 0.77 คะแนน ส่วนแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียวมีคะแนนน้อยที่สุดคือ 3.30 ± 0.99 คะแนน อาจเนื่องจากไคโตซานมีกลิ่นเฉพาะตัว อาจส่งผลกลบกลิ่นไม่พึงประสงค์ในตัวอย่างแหนมที่อาจมีกลิ่นของกระเทียมฉุนเกินไป ส่วนค่าคะแนนเฉลี่ยต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 อย่างเดียว และที่เติมทั้งไคโตซาน 5000 ppm และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีค่ามากที่สุดคือ 4.00 ± 1.05 และ 4.00 ± 0.89 ตามลำดับ อาจเนื่องจากการใช้กล้าเชื้อในการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่าไม่เติมกล้าเชื้อ ดังนั้นการใช้ไคโตซานในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันทางสถิติ

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานแต่ละคะแนนค่อนข้างสูง อาจทำให้มีความเชื่อถือน้อย เนื่องมาจากผู้ทดสอบไม่มีการฝึกหัด หรือไม่นิยมบริโภคผลิตภัณฑ์แหนม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

รูปที่ 4.16 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมที่หมักเป็นเวลา 4 วัน ณ อุณหภูมิห้อง : (ก) แหนมที่ไม่เติมทั้งไคโตซานและกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (ข) แหนมที่เติมไคโตซาน 5000 ppm เพียงอย่างเดียว (ค) แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียว และ (ง) แหนมที่เติมทั้งไคโตซาน 5000 ppm และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารในกลุ่มแกรมบวก (*Stap. aureus*) ได้ดีกว่ากลุ่มพวกแกรมลบ (*Salmonella*) โดยระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับ 100 ppm พบการเกิด inhibition zone กับ เชื้อ *Stap. aureus* แต่ไม่พบในกลุ่ม *Salmonella* และพบการเกิด inhibition zone กับ กลุ่มแลคติกแบคทีเรีย คือ เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 และเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ความเข้มข้นของไคโตซานที่สูงขึ้นในระดับ 500 ppm และ 1000 ppm ตามลำดับ

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของ ไคโตซาน 6 ระดับ ได้แก่ 0 100 500 1000 5000 และ 10000 ppm ในแบบจำลองการหมักแหนม (NMB) พบว่าในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* ถูกยับยั้งตั้งแต่ความเข้มข้นของไคโตซานในระดับ 100 ppm ขึ้นไป และถูกทำลายที่ระดับความเข้มข้น 5000 ppm ขึ้นไป แต่ในขณะที่เชื้อ *S.* Derby ถูกยับยั้งตั้งแต่ความเข้มข้นของไคโตซานในระดับ 500 ppm ขึ้นไป ความเข้มข้นสูงขึ้นไม่สามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ถูกยับยั้งตั้งแต่ความเข้มข้นของไคโตซานระดับ 100 ppm และเชื้อถูกทำลายที่ 500 ppm ขึ้นไป ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ถูกยับยั้งตั้งแต่ความเข้มข้น 500 ppm และถูกทำลายที่ 1000 ppm ในเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ดังนั้นสรุปได้ว่าไคโตซานสามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดีที่สุด และความเข้มข้นของไคโตซานที่ระดับ 5000 ppm สามารถทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้จนหมดในระหว่างการหมักในแบบจำลองการหมัก (NMB) และเมื่อใช้ไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *Stap. aureus* ได้ยิ่งขึ้น โดยที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังเหลือรอด 3-4 log cfu/ml

การศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ในผลิตภัณฑ์แหนมที่มีส่วนประกอบของกระเทียมตามสูตรของโรงงาน จากนั้นเติมเชื้อ *Stap. aureus* เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง พบว่า ในตัวอย่างแหนมที่เติมเฉพาะไคโตซาน 5000 ppm มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* เล็กน้อย แต่ในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน 5000 ppm พบว่า เชื้อ *Stap. aureus* สามารถลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียว โดยเชื้อ *Stap. aureus* ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไคโตซานมีผลร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกและกระเทียมต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus* ได้ดียิ่งขึ้น และเมื่อทำการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแหนม พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ไคโตซาน 5000 ppm ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นถึง 9 log cfu/g ซึ่งไม่แตกต่างกับตัวอย่างที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม)

จากการทวนสอบสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแหนม เพื่อดูความสัมพันธ์การเจริญของกล้าเชื้อที่เติมลงในแหนม เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ยังพบเชื้อ *P. pentosaceus* อยู่ 69.09 70.77 และ 61.82 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* เหลืออยู่ 45.28 37.93 และ 26.18 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับไคโตซาน ยังพบเชื้อ *P. pentosaceus* หลงเหลืออยู่ ซึ่งไคโตซานมีผลต่อการลดลงของเชื้อ *P. pentosaceus* เพียงเล็กน้อย และเมื่อศึกษาผลของไคโตซาน 5000 ppm ต่อคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม พบว่า ไคโตซาน 5000 ppm ไม่มีผลต่อสี รสชาติ และความชอบโดยรวม ($p>0.05$) อีกทั้งคะแนนด้านกลิ่นมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมไคโตซาน (ชุดควบคุม) อีกด้วย ($p\leq0.05$) การศึกษานี้สรุปได้ว่าไคโตซานเป็นสารที่มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตแหนม และอาหารหมักประเภทเนื้ออื่น ๆ อีกหลายชนิด ทั้งนี้เพื่อช่วยในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

5.2 ข้อเสนอแนะ

การประยุกต์ใช้ไคโตซานในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นับเป็นงานที่น่าสนใจและมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่นการทำเป็นไบโอฟิล์มเคลือบ หรือเป็นส่วนประกอบของบรรจุภัณฑ์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมต่อคุณสมบัติของไคโตซาน (ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล น้ำหนักมวลโมเลกุล และค่าความเป็นกรด-ด่าง) อีกทั้งสามารถต่อยอดเพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* ในแหนมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จรูญ คำนวณตา .2509. **"การค้นคว้าเรื่องแหนมไทยตอนที่หนึ่งว่าด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในแหนม."** วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาลี .2544. "ไคติน-ไคโตซาน สารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ." **LAB TODAY**. 1(2) ตุลาคม:12-20.

นงคราญ เรืองประพันธ์ และ นิตยา พันธ์บัว. 2535. "การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของแหนมและหมูยอที่ผลิตในจังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย." **อาหาร** 2: 31-39.

นิภา โชคสัจจะวาที. **"การประเมินหาความเสี่ยงและการควบคุมกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมในงานประชุมวิชาการประจำปี 2552."** [Online]. Available: http://www.vcharkarn.com/vblog/60253. 2552.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2526. **ชีววิทยาเบื้องต้นของเซลล์** .สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ .กรุงเทพฯ.

บุญศรี จงเสรีจิตต์, ผุสดี นาคพลายพันธุ์ และ สุวบุญ จิรชาญชัย. 2547. "การยับยั้งแบคทีเรียในอาหารโดยไคโตซาน." **วารสารวิทยาศาสตร์.** 58, 2 (มี.ค.-เม.ย.), 88-95.

บุษกร อุตรภิชาติ .2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา .425 หน้า.

พงศ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. "แบคเทอริโอซินจากกรดแลคติกในโรงงานอุตสาหกรรม." **อาหาร.** 33(3): 173-180.

พรรณทิพา จันทร์ทัง. 2553. **"การแยกและศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารปลาหมักในประเทศไทย."** ปริญญานิพนธ์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. "การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิส." ใน **การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม.** พฤษภาคม 2542. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาวดี เมธะคานนท์, อัศรา เฟื่องฟู และก้องเกียรติ คงสุวรรณ .2543. "ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน." **เอ็มเทค เทคโนโลยีวัสดุ** .ฉบับที่ 19 .(เม.ย.-มิ.ย), 69-75.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2547. แหนม มอก .1219/2547. 13 หน้า.

เยาวภา ไหวพริบ .2536. "การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซานในอุตสาหกรรมอาหาร." **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา** .1(2) กรกฎาคม-ธันวาคม: 81-85.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ .2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร . คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. **"ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum."** ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระพงษ์ ลุลิตานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2551. **"พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction."** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุกานดา วนิชวัฒนะ. 2538. "การผลิตสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์." **วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.** 23: 60-71.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และธเนศ ชิดเครือ. 2544. **"รายงานการวิจัย การเฝ้าระวังจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม เพื่อลดเชื้อ *Salmonella* ในการผลิตไก่กระทงแช่แข็งเพื่อการส่งออก."** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร, คณะวิทยาศาสตรและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ. 470 หน้า.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. **"ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม."** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. "ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหาซัลโมเนลลาในแหนม." **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34 30 ม.ค.-1 ก.พ.** กรุงเทพฯ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272-279.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ .2539. "เปรียบเทียบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคทางการค้า บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่บ่มในสภาพบรรยากาศต่างๆ." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 16(2) พฤษภาคม – สิงหาคม. 15-22.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ .2542. "ผลของน้ำกระเทียมสกัดต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อ และโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแหนม (ในหลอดทดลอง)." **อาหาร .** 29(2): 109-115.

อรวินทร์ เลาหรัชนันท์ .2532. "สารกันเสียจากอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก." **อาหาร .**19(3): 16.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **แบคทีเรียแลคติก**. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. สงขลา.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, ชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์ และ ปฐม สวรรค์ปัญญาวงเลิศ 2546. "การระบาดของ *Salmonella* serovars ในคน สัตว์ และอาหารในประเทศไทย (ระหว่างปี พ.ศ. 2536-2545)." **วารสารการประชุมวิชาการครั้งที่ 1 พันธมิตรร่วมใจเพื่อการสร้างสุขภาพใหม่ 1-2 พ.ค.** กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. หน้า 74.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aleksandra, B.R., Anna, W.R., Pilarczyk, B., Ramisz, A. and Laurans, L. 2005. "Antibacterial and antifungal activity of chitosan." **12th International Society for Animal Hygiene.** 4-8 September 2005. Warsaw, Poland. 2: 406-408.

Ananou, S., Maqueda, M., Bueno, M. M., Galvaz, A. and Valdivia, E. 2005. "Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48." **Meat Sci.** 71: 549-556.

Association of Official Analytical Chemists. 1984. Official Methods of Analysis 14th ed. Association of official analytical chemists. Arlington, Virginia, USA. 1,140 p.

Axelsson, L. 1993. **Lactic Acid Bacteria: classification and physiology.** In Lactic acid Bacteria. Marcel Dekker : New york. 1-64.

Axelsson, L. 2004. **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** Marcel Dekker : New york.

Baird-Parker, A. C. 1962. "An improved diagnostic and selective medium for isolatingcoagulase-positive staphylococci." **J. Appl.Bacteriol.** 25:12-19.

Barnwart, G.J. 1979. **Basic Food Microbiology**. AVI Publishing Company, Inc. New York.

Basurto C., Chi, S., Zivanovic, S., Davidson, P. M. and Weiss, J. 2003. **Molecular weight and concentration influences antimicrobial activity of chiosan in oil-in-water emulsions.** Department of Food Science and Technology, The University of Tennessee.

Bergdoll, M.S. 1973. **The Microbiological Safety of Food**. Academic press: New York.

Cadirci, B.H. and Citak, S. 2005. "A comparison of two method used for measureing antagonistic activity of lactic acid bacteria." **Pakistan J. Nutrition.** 4(4): 237-241.

Carr, J. and Jeff, H. **"Drug-Resistant Bacteria Are Emerging."** [Online]. Available : http://www.koshland-science-museum.org/exhib_infectious/antibiotics_02.jsp . 2011.

Chen, Y.S., Wu, H. C. and Yanagida, F. 2010. "Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan." **Brazilian J. Microbiol.** 41: 916-921.

Cho, Y.W., Jang, J., Park, C.R. and Ko, S. W. 2000. "Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins." **Biomacromolecules**. 1: 609-614.

Concon, J.M. 1988. **Food Toxicology part II**. Marecel Dekker: New York.

Coyne, V.E., James, M.D., Reid, S.J. and Rybicki, E.P. 2001. **Standard PCR Molecular Biology Techniques Manual. Third Edition.** Department of Molecular and Cell biology, The University of Cape Town.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Darmadji, P. and Izumimoto, M. 1994. "Effect of chitosan in meat preservation." **Meat Sci.** 38: 243–254.

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg , H. S. and Wood, W. B. 1968. **Microbiol**. Hoeber Medical Division. New York.

Edward, G.F. 1980. **Acetic acid. In. Antimicrobial Food Additive.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg: New York. 167-174.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocin : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Reviews.** 24: 85-106.

Felt, O., Buri, P. and Gurny, R. 1998. "Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery." **Drug Dev. Ind. Pharm.** 24: 979-993.

Food Info. **"Overview of food-borne bacteria."** [Online]. Available : http://www.food-info.net/uk/bact/salm.htm. 2011.

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. "Dietary modulation of the human colonic microbiota - Introducing the concept of prebiotics." **J. Nutrition.** 125: 1401-1412.

Gibthai Traning Center. **"ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์."** [Online]. Available : http://www.dld.go.th/biologic/research/techni_pcr.pdf. 2011.

Gil, G., Monaco, S., Cerrutti, P. and Galvagno, M. 2004. "Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacteria and brewing yeasts." **Biotechnol Letters.** 26: 569-574.

Hadwiger, L.A., Fristensky, B. and Riggleman, R.C. 1984. **Chitin Chitosan and Related Enzymes.** Academic Press, Inc. 291-302.

Hans, G. S. and Bendas, G. 2008. **Chitosan as an antimicrobial compound : Modes of action and resistance mechanisms.** Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat Bonn.

Hasegawa, M., Isogai, A., Onabe , F. and Usuda, M. 1992. "Dissolving states of cellulose and chitosan in trifluoroacetic acid." **J. Appl. Polym. Sci.** 45: 1857-1863.

Hawkins, T. **"The Microscopy Facility."** [Online]. Available : http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm. 2011.

Helander, I.M., Lassila, E.L.N., Ahvenainen, R., Rhoades, J. and Roller, S. 2001. "Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria". **J. Food Microbiol.** 71: 235-244.

Hobbs, B.C. and Gilbert, R. J. 1978. **Food Poisoning and Food Hygiene**. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hui, L., Yumin, D., Xiaohui, W. and Sun, L. 2004. "Chitosan kills bacteria through cell membrane damage". **Int. J. Food. Microbiol.** 95: 147-155.

Huys, G, Haene, K.D. and Swings, J. 2002. "Influence of the culture medium on antibiotic susceptibility testing of food-associated lactic acid bacteria with the agar overlay disc diffusion method." **Letters in Appl. Microbiol**. 34: 402-406.

Jindapraasert, A., Jirajaroenrat, K. and Swetwiwathana, A. 2011. "Characterization of lactic acid bacteria in Thai traditional fermented sausage during fermentation and storage." **4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products.** August 29-31 2011. Khon Kaen, Thailand.

Kanatt, S. R., Chander, R. and Sharma, A. 2008. "Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products." **Food Chem.** 107: 845-852.

Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bur khlueng hot spring in Thailand." **J. Basic Microbiol.** 44: 430-444.

Klypradit, W., Chabra , P. and Huang, Y. W. 2003. "Face of Salmonella in nutrient broth and on the surface of raw oysters." **Center for Food Safety.** University of Georgia, Griffin.

Kopermsub, P and Yunchalard, S. 2010. "Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaa-som, a traditional fermented fish product of Thailand." **J.Food Microbiol.** 138: 200-204.

Koo, F.C.W and Peterson, J.W. 1983. "Cell-free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells." **Toxicon**. 21: 309-320.

Koupal, L.P. and Diebel, R.H. 1975. "Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*." **Infect. Immun**. 11: 14-22.

Kumar, M. N. V. R. 2000. "A review of chitin and chitosan applications." **React. Funct. Polym.** 46: 1-27.

Majeti, N.V.RK. 2000. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**. 46: 1-27.

No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H. and Meyers, S.P. 2002. "Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights." **Int. J. Food Microbiol.** 74: 65-67.

No, H.K, Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. 2007. "Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of food : A Review". **J. Food science.** 72: R87-R99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pearson, A.M. and Dutson, T.R. 1990. **Meat and Health Advances in Meat Research.** vol 6. Elsevier science: New York.

Robinson, R.K., Balt, C.A. and Patel, P.D. 2000. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press: New York.

Roller, S. and Covill, N. 2000. "The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-base shrimp salad." **J. Food Prot.** 63: 202-209.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker Inc: New York.

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

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y. J. 1999. "Food application of chitin and chitosans." **Trends in Food Sci. and Tech.** 10: 37-51.

Soultos, N., Tzikas, Z., Abrahim, A., Georgantelis, D. and Ambrosiadis, I. 2008. "Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sauages." **Meat Sci.** 80: 1150-1156.

Swetwiwathana, A. 2005. **"Microbiological quality enhancement of Thai fermented meat product (Nham) using Nham-associated pediocin-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)."** Ph.D. Thesis of Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu Univ., Japan.

Swetwiwathana, A., Leutz, U. and Fischer, A. 1998. "Wirkung von knoblauch auf das wachstum und die milchsaeureproduktion von starterkulturen. (Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures)." **Fleischwirtschaft.** 78(4): 294-298, 334.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N. and Fischer, A. 1999. "Controlling the growth of *Salmonella* Anatum in nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic." **Fleischwirtschaft.** 79(9): 124-128.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. "Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in nham (Traditional thai fermented meat)." **49th International Congress of Meat Science and Technology 2th Brazillian Congress of Science and Technology.** 31th August-5th September 2003. Soa Paulo, Brazil.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2004. "Effect of garlic and nitrite in pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth *Salmonella* Anatum is stimulated nham fermentation." **Proceeding of the 1th KMITL International Conference on Intergration of Science and Technology Sustainable Development.** Ausgust 25-26 2004. Bangkok, Thailand.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2007. "Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria associated with thai fermented meat-rice sausage." **Proceedings of the 53rd International Congress of Meat Science and Technology.** 6-10 August 2007. Beijing, China. 59-60.

Torriani, S., Oris, C. and Vescovo, M. 1997. "Potential of *Lactobacillus casei*, cu lture permeate and lactic acid to control microorganisms in ready-to-use vegetables." **J. Food Prot.** 60(15): 64-156.

Tsai, G.J. and Su, W.H. 1999. "Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli.*" **J. food Prot.** 62(3): 239-243.

Wang, G. 1992. "Inhibition and inactivation of fivespicies of foodborne pathogens by chitosan." **J. food Prot.** 55: 916-919.

William, C.F and Dennis, C.W. 1988. **Food Microbiol.** McGraw-Hill, Inc: New York.

Willis, E.D. 1956. "Enzyme inhibition by allin, the active principle of garlic." **J. Biochemical.** 63: 514-519.

Woojin, L., Shin, T. S., Ko, S. and Oh, H. 2010. "Control of Dongchimi fermentation with chitosan deacetylated by alkali treatment to prevent over-ripening." **J. Food Sci.** 75(5): M308-M316.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีตัวอย่างแหนม

1. วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984)

ชั่งตัวอย่างแหนม 10 กรัม บดให้ละเอียดเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO_2 20 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองนำน้ำใสที่ได้เติมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH จนกระทั่งถึงจุด end point เกิดสีชมพู คำนวณหาปริมาณกรดแลคติกตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรดแลกติก (\%)} = \frac{\text{NxVx 90.01 x 100}}{\text{1000 x มล. ตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

V = ปริมาตรของสารละลาย 0.1 NaOH ที่ใช้มนการไตเตรท (มล.)

2. การวัดค่าพีเอช (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984)

นำตัวอย่างแหนม 20 กรัม มาบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน วัดด้วยเครื่องวัด pH

ก.2 วิธีวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *Staphylococcus aureus*

1. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร

2. ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Stap. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มเชื้อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3. ดูด Rabbit plasma ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อ BHI broth บ่มเพาะเชื้อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

4. อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *Stap. aureus* สร้างขึ้น

รูปที่ ก.1 การแข็งตัวของ plasma อันเนื่องจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *Stap. aureus* สร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก

1. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกจาก stock culture มาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MRS) broth ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

2. การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Coyne และคณะ, 2001)

1. นำเซลล์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปหมุนเหวี่ยง 10,000 rpm จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ

2. เติม TE buffer ปริมาตร 467 ไมโครลิตร ทำให้ตะกอนแตกออกให้หมด

3. เติมสารละลาย SDS 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไป vortex นาน 1 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก

4. เติม Proteinase K ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไป vortex นาน 1 นาที เพื่อย่อยโปรตีนตรงบริเวณผนังเซลล์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. เติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน เขย่าหลอดกลับไปกลับมานาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่

6. เติม 0.1 M Sodium chloride 1/10 เท่า เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่เหลือ

7. เติม Absolute ethanol ลงไป 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์กลับไปมา 3-4 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง

8. ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที

9. เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้ง หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ

10. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไป spin down ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย

11. วิเคราะห์หาขนาดดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซีส (ดัดแปลงจากภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

1. เตรียมถาดเจลสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

2. เตรียมสารละลายอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

3. ละลายอะกาโรสโดยใช้ความร้อน เขย่าเพื่อให้อะกาโรสละลายจนหมด

4. ตั้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส หยดสารละลายเอธิดียมโบรไมด์เล็กน้อยเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสให้พอดี เท 0.5×TAE buffer ให้ท่วมเจล

6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 6x ปริมาตร 2 ไมโครลิตร รวมเป็น 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงไปที่ช่องในแผ่นเจลแต่ละช่องปริมาตร

7. ดูดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงช่องในแผ่นเจล เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

8. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดเครื่อง ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 25 นาที

9. จากนั้นนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแน่นอน (marker) ทำให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอที่นำมาศึกษา แล้วถ่ายรูปและบันทึกด้วยเครื่อง Gel documentation

4. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ดัดแปลงจากภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่ระดับการเจือจาง 100 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) สำหรับดีเอ็นเอ และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับโปรตีน คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประมาณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัด ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-2.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ มีดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ng/µl) = 50 (ng/µl) × Dilution factor ×A_{260}

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Jindaprasert และคณะ, 2011)

นำสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA gene แบบทวีคูณในหลอดทดลอง โดยใช้ primer REVB (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) และ primer BEF (5′-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′) (Kanokratana และคณะ. 2004) โดยการเตรียมสารต่างๆในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

	สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1.	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile water)	19
2.	10×Taq buffer	2.5
3.	50 mM $MgCl_2$	0.75
4.	10 mM dNTP	0.5
5.	10 µM primer REVB	0.5
6.	10 µM primer BEF	0.5
7.	5U/µl Taq DNA Polymerase	0.25
8.	DNA template (100 ng/ µl)	1
	รวม	25

เตรียม PCR mixture โดยนำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างต้นใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycle) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

การทำปฏิกิริยา PCR

Preheat	95 องศาเซลเซียส	3 นาที
รอบที่ 1	94 องศาเซลเซียส	3 นาที
รอบที่ 2-35	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
	50 องศาเซลเซียส	1 นาที
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที
รอบสุดท้าย	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วพักปฏิกิริยาที่ 15 หรือ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก

6. การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 5 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hae*III โดยปฏิกิริยาของการตัดมีปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดังนี้

	ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1.	10× Buffer	2
2.	PCR product	10
3.	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	17
4.	Restriction enzyme	1
	รวม	30

สภาวะที่ใช้ในการตัดผลผลิตพีซีอาร์และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นดังนี้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	สภาวะที่ใช้ในการตัดเอนไซม์	สภาวะในการหยุดปฏิกิริยา
*Alu*I	37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง	65 องศาเซลเซียส 20 นาที
*Hae*III	37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง	80 องศาเซลเซียส 20 นาที

จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งใช้ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ 30 ไมโครลิตร ที่เติม 6× loading dye ปริมาณ 2 ไมโครลิตร โดยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที (Jindaprasert และคณะ, 2011) แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยนำไปถ่ายรูปภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกภาพเจล เพื่อนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก และคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker agar (ดัดแปลงจาก Baird-Parker, 1962)

1.1 การเตรียม egg yolk solution

1.1.1 นำไข่ไก่สดมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นจึงนำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.1.2 นำมาวางในบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองรองปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหยไปหมด

1.1.3 ตอกไข่ในตู้ปลอดเชื้อทำการแยกไข่ขาวออกให้หมดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกส่วนที่เป็นไข่แดงลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ เติมไข่แดงลงในขวดดูแรนขนาดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ 140 มิลลิลิตร ใส่ไข่แดงจนมีปริมาตร 200 (ผสมในอัตราส่วน น้ำเกลือ 0.85% 5 ส่วน + ไข่แดง 5 ส่วน) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.2 การเตรียม 1% potassium tellurite

1.2.1 ชั่ง Potassium tellurite 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แก้ว ใส่น้ำกลั่นทำการคนจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

1.2.2 นำ Potassium tellurite ที่ปรับปริมาตรแล้วเทใส่บีกเกอร์แก้วทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรองปลอดเชื้อ ใส่ลงในขวดดูแรนปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.3 การผสม egg yolk – tellurite emulsion

1.3.1 นำ egg yolk solution ที่เตรียมไว้มาผสมกับ 1% Potassium tellurite ที่กรองแล้ว โดยนำ 1% Potassium tellurite วัดปริมาตร 40 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงปลอดเชื้อ ผสมลงในขวดดูแรน egg yolk solution

1.3.2 ทำการเขย่าให้เข้ากัน จะได้ egg yolk tellurite 240 มิลลิลิตร เก็บในขวดดูแรนปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

1.4 การเตรียม Baird Parker medium

1.4.1 ใช้กระบอกตวง ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เทน้ำกลั่นเพียง 200 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร

1.4.2 ชั่ง Baird Parker agar 63 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นในบีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนให้ผงอาหารกระจายในน้ำกลั่น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นที่เหลือทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 นำไปต้มให้วุ้นละลาย นำมาเทใส่ขวดรูปชมพู่ 285 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แล้วกำจัดเชื้อโดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส

1.4.4 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่ 55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติม egg yolk tellurite ลงไปในขวดรูปชมพู่ปลอดเชื้อขวดละ 15 มิลลิลิตร

1.4.5 เขย่าเบาๆให้ไข่แดงละลายทั่วขวด แล้วจึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อจานละ 15-20 มิลลิลิตร

รูปที่ ก.2 ลักษณะโคโลนีของ *Stap. aureus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker + egg yolk tellurite agar

ก.5 การยืนยันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษโดยวิธี spot technique

ทำการยืนยันเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยการขีดเป็นตารางขนาด 1×1 เซนติเมตร บน plate TSA จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ่ายเชื้อทุกโคโลนีบนอาหาร TSA มาแตะเพาะเชื้อตรงตำแหน่งเดียวกันบน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะซึ่งขีดเป็นตารางขนาด 1×1 เซนติเมตร ไว้เช่นกัน

การยืนยันเชื้อ *Salmonella* โดยนำโคโลนีจากบนอาหาร TSA มาถ่ายเพาะเชื้อบนอาหาร XLD Agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีบนอาหาร XLD Agar ที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำ ส่วนการยืนยันเชื้อ *Stap. aureus* โดยจิ้มโคโลนีจากบนอาหาร TSA ลงบนอาหาร BP + egg yolk tellurite Agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีบนอาหาร BP Agar ที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำ และมี opaque zone ล้อมรอบ ดังรูปที่ ก.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.6 วิธีการย้อมแกรม (Gram staining) (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2526)

1. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด

2. ใช้ลูป (loop) แตะโคโลนีของเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้

3. เกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

4. ตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านไปอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง

5. หยดสีคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ทั่ว ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง

6. หยดสารละลายลูกอลไอโอดีน (Lugol' iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายทิ้ง สารละลายไอโอดีนจะทำหน้าที่เป็น มอแดนท์ (mordant) ช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ขึ้น

7. ล้างสีออกด้วย เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

8. หยดสีซาฟรานิน (Safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 15-30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สูตรแบบจำลองการหมักและแบบทดสอบความชอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 สูตรอาหารในการเตรียมแบบจำลองการหมักแหนม (Nham Model Broth, NMB)

1.1 Meat extract	10 กรัม
1.2 Tryptone	10 กรัม
1.3 Sodium ascobate	0.5 กรัม
1.4 Sodium tri- polyphosphate	3 กรัม
1.5 Glucose	10 กรัม
1.6 Sodium chloride	25 กรัม
1.7 Sodium nitrite	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ใช้กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวปรับค่า a_w ให้มีค่าเท่ากับ 0.97

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรด HCl ให้มีค่า 6.0

ที่มา : Swetwiwathana และคณะ (1999)

ข.1.1 วิธีการเตรียมแบบจำลองการหมักแหนม

ละลายส่วนประกอบอาหารจากข้อ 1.1-1.6 ด้วยน้ำกลั่นลงในขวด duran จากนั้นเติมกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายทั้งหมด และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดคลอริก ให้มีค่า 6.0 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายไนไตรท์ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ และค่อยๆเทน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้หนา 1 เซนติเมตร

ข.1.2 วิธีการเตรียมแบบจำลองการหมักแหนม (แบบไม่เติมไนไตรท์)

ละลายส่วนประกอบอาหารจากข้อ 1.1-1.6 ด้วยน้ำกลั่นลงในขวด Duran จากนั้นเติมกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายทั้งหมด และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดคลอริก ให้มีค่า 6.0 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมน้ำมันพาราฟินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้หนา 1 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข.1 ตัวอย่างแบบจำลองการหมักแหนม (NMB)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 แบบทดสอบความชอบ (5-point hedonic scale)

ชื่อผลิตภัณฑ์ แหนม **วันที่ทำการทดสอบ**

ชื่อผู้ทดสอบ.....

กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวา และให้คะแนนความชอบตามระดับคะแนนที่ท่านคิดว่าเหมาะสม ในระหว่างการชิมกรุณาบ้วนน้ำเพื่อชิมตัวอย่างต่อไป

ระดับคะแนน

1 ไม่ชอบที่สุด
2 ไม่ชอบเล็กน้อย
3 เฉยๆ
4 ชอบเล็กน้อย
5 ชอบมากที่สุด

ความชอบ	รหัสตัวอย่าง			
สี (color)				
กลิ่น (odor)				
รสชาติ (flavor)				
เนื้อสัมผัส (texture)				
ความชอบโดยรวม (overall liking)				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบคุณอย่างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพิมพิกา สายสวาสดิ์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2525
ที่อยู่	457 ม. 9 ต. ชมพู ถ.ลำปางแม่ทะ อ.เมือง จ. ลำปาง 52100
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีการศึกษา 2547 และศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีพ.ศ 2549 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2554
ประวัติการทำงาน	
มิถุนายน พ.ศ. 2550	หัวหน้าแผนกสโตร์ บริษัท อินเตอร์ แปซิฟิก มารีน โปรดักส์ จำกัด
การนำเสนอผลงาน	P. Saisawart, A. Jindaprasert, W. Krusong and A. Swetwiwathana. 2010. "Effect of chitosan on associated bacterial pathogens in Nham (traditional Thai fermented meat) model broth." **56th International Congress of Meat Science and Technology.** August 15-20 2010. Jeju, Korea.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้