18382

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella anatum* ระหว่างการหมักแหนม

(Study of using bacteriocin-producing lactic acid bacteria to control *Salmonella anatum* during Nham fermentation)

T097054

นางสาว ประโลมจิต ตันตื้อ รหัส 41044411
นางสาว สุดารัตน์ จันทร์โยธา รหัส 41044437

ปค.
ป369ศ
2545
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 27054
วัน.เดือน.ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน
ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella anatum* ระหว่างการหมักแหนม
(Study of using bacteriocin-producing lactic acid bacteria to control
Salmonella anatum during Nham fermentation)

โดย

นางสาว ประโลมจิต ตันตื้อ รหัส 41044411
นางสาว สุดารัตน์ จันทร์โยธา รหัส 41044437

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....อดิศร..... 12/ม.ย./45 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(อาจารย์ อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวประโลมจิต ตันตื้อ และนางสาวสุดารัตน์ จันทร์โยธา. : ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella anatum* ระหว่างการหมักแหนม(Studing of using bacteriocin-producing lactic acid bacteria to control *Salmonella anatum* during Nham fermentation.) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : อ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ : กรรมการอาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ . เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, อาจารย์นิตยา พิระภัทรรุ่งสุริยา : 37 หน้า

บทคัดย่อ

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นบ้าน ซึ่งนิยมบริโภคในรูปแหนมดิบ ที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อ จึงนับว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงในการบริโภคแหนม จากรายงานที่ตรวจพบซาลโมเนลลาในเนื้อดิบในปริมาณที่ค่อนข้างสูงจนมีผลในการตรวจพบเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์แหนมจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีผลในการยับยั้งซาลโมเนลลาได้ในสภาวะที่เป็นกรด เปรียบเทียบกับการหมักแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและเติมกล้าเชื้อที่ไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยจะศึกษาถึงการลดลงของค่า pH และตรวจสอบการเหลือรอดของ *Salmonella anatum* ที่เติมลงในส่วนผสมแหนม (ประมาณ100 เซล/กรัม) ก่อนทำการหมัก

จากการศึกษาการลดลงของค่า pHในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ6 จากตัวอย่างแหนมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส JCM 5885 (ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน) และเติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 (สร้างแบคเทอริโอซิน) พบว่า ค่า pH ของตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อทั้งสองชนิดลดลงเร็วกว่าตัวอย่างแหนมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ และจากการศึกษาการเหลือรอดของ *S. anatum* โดยสุ่มตัวอย่างแหนมจากวันที่ 3, 4, 5 และ 6 ของการหมัก พบว่าในตัวอย่างแหนมที่ใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* รหัส TISTR 536 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S. anatum* ได้เร็วกว่าตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ*P. pentosaceus* รหัส JCM 5885 และไม่มีการเติมกล้าเชื้อ 1 และ 2 วันตามลำดับ

จากการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* รหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมเชิงการค้าโดยทำการทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของตัวอย่างแหนม 3 ชนิด ได้แก่ ไม่เติมกล้าเชื้อ, เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* รหัส JCM 5885 และเติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 พิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัสคือ ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบรวม พบว่า ผู้บริโภคมีความชอบในด้านความเปรี้ยว และให้การยอมรับแหนมที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในด้านเนื้อสัมผัสของแหนมทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่า การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนมเชิงการค้า สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S.anatum ได้เร็วกว่าการหมักแหนมโดยวิธีทางธรรมชาติและถ้ากล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้นั้นสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ด้วยแล้ว จะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยจากเชื้อ *S.anatum* ได้เร็วยิ่งขึ้น

ประโคมจิต ตันฟื้น		.....
สุดารัตน์ จันทร์โยธา	.....	.....
ลายเซ็นนักศึกษา	ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษา	ลายเซ็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งให้คำแนะนำ ช่วยเหลือให้คำปรึกษาตลอดมา รวมทั้งดูแลเอาใจใส่ และตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และอาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คอยแนะนำและให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ให้ตลอดจนแนะนำด้านต่างๆ ขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมีต่างๆ รวมทั้งให้ความสะดวกในการปฏิบัติงาน และขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกายตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนด้านทุนทรัพย์ในการจัดทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ผู้จัดทำ
นางสาวประโลมจิต ตันตื้อ
นางสาวสุดารัตน์ จันทร์โยธา
20 มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่	
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2. วารสารปริทัศน์	3
2.1 แหนม-ความหมาย	3
2.2 ความรู้เกี่ยวกับแหนม	3
2.3 การหมักที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์แหนม	4
2.4 ปัญหาของผลิตภัณฑ์แหนม	5
2.5 เชื้อแบคทีเรียแลคติก	7
2.6 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก	9
2.7 ผลของการเติมเชื้อแลคติกต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในแหนม	12
2.8 แบคเทอริโอซิน	12
3. อุปกรณ์และการทดลอง	16
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	16
3.2 ขั้นตอนและวิธีการ	17
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
4.1 ผลการศึกษาการลดลงของ pH ในตัวอย่างแหนม	21
4.2 ผลการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *S.anatum* ที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ	22
4.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* รหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมเชิงการค้า	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 25
5.1 สรุปผลการทดลอง 25
5.2 ข้อเสนอแนะ 25
เอกสารอ้างอิง 26
ภาคผนวก ก. 29
ภาคผนวก ข. 30
ภาคผนวก ค. 34
ประวัติผู้เขียน 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงค่า pH ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	21
2. แสดงผลการตรวจสอบการเหลือรอดของเชื้อ S.anatum ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	23
3. แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงกลไกการหมักเอทิลแอลกอฮอล์กับกรดแลคติก	10
2.	แสดงกลไกการหมักกรดแลคติก	10
3.	แสดงกลไกการหมักกลูโคสแบบ Heterofermentative bacteria	11
4.	แสดงการสร้างสารประกอบพวกกรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดคาร์บอนิก	12
5.	กราฟเปรียบเทียบการลดลงของค่า pH ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แหนมเป็นอาหารหมักพื้นบ้าน ซึ่งการผลิตในอดีตจะมีสูตรที่ไม่แน่นอนแล้วแต่ความต้องการของผู้บริโภค วิธีการผลิตส่วนใหญ่จะเป็นวิธีหมักโดยธรรมชาติกล่าวคือ การหมักของแหนมขึ้นอยู่กับเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติและสามารถสร้างกรดได้ ดังนั้นจึงก่อให้เกิดปัญหาตามมาคือ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ ผู้ประกอบการมีความเสี่ยงกับการผลิตที่อาจจะได้ผลิตภัณฑ์ไม่ตรงตามความต้องการค่อนข้างสูง อายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น และที่สำคัญคือ เกิดความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภคต่อการรับประทานแหนม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมตามธรรมชาติอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจมีผลทำให้เชื้อโรคสามารถเจริญเติบโตได้และสร้างสารพิษก่อนที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกจะเจริญขึ้น อีกทั้งส่วนใหญ่ในการบริโภคแหนมในรูปแหนมดิบที่ไม่ได้ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อ จึงนับว่าปัจจุบันผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงในการบริโภคแหนม ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่โดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนมนับได้ว่าเป็นทิศทางใหม่ที่มีแนวโน้มที่ประสบผลสำเร็จสำหรับอุตสาหกรรมดังกล่าว ทั้งในแง่ทำให้คุณภาพแหนมมีความเสม่ำเสมอเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักและยับยั้งในการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคได้ (Swetwiwathana and Lotong,1999) จากการศึกษาและการทดลองโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์เป็น starter culture เพื่อการศึกษาถึงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อแหนม เนื่องจาก เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาจากแหนมไม่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และสัตว์ (Swetwiwathana and Lotong,1999) และที่สำคัญคือแบคทีเรียแลคติกมีกระบวนการเมตาบอลิซึมในการหมักอาหาร เกิดการสร้างกรดอินทรีย์จำนวนมากอย่างรวดเร็วเป็นผลให้ pH ของอาหารลดลง กระบวนการหมักดังกล่าวจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ที่มีกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสที่แตกต่างจากเดิม อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเสื่อมเสียของอาหาร ที่เกิดจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ทั้งนี้เพราะค่าความเป็นกรดของอาหารที่เพิ่มขึ้นและเมตาบอไลท์อื่นๆ จากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก เช่น แบคเทอริโอซิน มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย ผลการยับยั้งนี้จะเกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้วยที่พบมากได้แก่ เชื้อซาลโมเนลลา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหามากในอาหาร ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมเพื่อมาตรฐานชีวิตของผู้บริโภคส่วนรวม ทั้งในด้านคุณภาพและความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม
2. ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาในแหนม
3. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อแลคติก รหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมเชิงการค้าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แหนม

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านในประเทศไทยประเภทหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทางภาคเหนือ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน เชียงราย เป็นต้น เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีลักษณะกึ่งแห้ง (semi – dry fermented sausage) โดยทำจากเนื้อหมูและหนังหมูเป็นหลัก แล้วผสมกับส่วนประกอบต่างๆ เช่น เกลือแกง ข้าวสุก และเครื่องเทศอื่นๆ บรรจุในถุงพลาสติกหลายรูปแบบหรือบรรจุในถุงพลาสติกธรรมดาและหุ้มต้มด้วยใบตองหลายๆ ชั้น มัดให้แน่นโดยให้มีอากาศน้อยที่สุด ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 วัน ให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง จะได้แหนมที่มีรสเปรี้ยวนิยมนำมาบริโภคโดยไม่ผ่านการทำให้สุก (อรนุช, 2530)

2.2 ความรู้เกี่ยวกับแหนม

2.2.1 การผลิตภัณฑ์แหนม

แหนมหรือที่เรียกกันสากลว่า Fermented pork sausage เป็นผลิตภัณฑ์ที่ปกติผลิตมาจากเนื้อหมูสดที่ผ่านการคัดเลือกตรวจสอบมาแล้วจากโรงฆ่าสัตว์ ลอกเอาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกรวมทั้งไขมันด้วย นำมาบดกับส่วนผสมต่างๆ เช่น เกลือแกง ข้าวเจ้าสุก บรรจุถุงพลาสติกหลายรูปแบบ เช่น บรรจุในถุงพลาสติกรูปทรงกระบอก บรรจุในถุงพลาสติกในลักษณะเป็นตุ้มบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกธรรมดาและหุ้มด้วยใบตอง จากมาตรฐานอุตสาหกรรม มอก. 1219-2537 ระบุว่า อาจมีการใช้หูหมู หรือจมูกหมูแทนส่วนของหนังหมูและอาจมีการฉายรังสีด้วยก็ได้ การผลิตแหนมจะขึ้นอยู่กับโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการสามารถปนเปื้อนเข้าสู่ระบบมากหรือน้อยเพียงไร ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถควบคุมปริมาณได้เท่ากันทุกครั้งของการผลิต ระยะเวลาการผลิตจะใช้เวลานาน 3-5 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาลผลิต (ไพโรจน์, 2537)

2.2.2 วัตถุเจือปนอาหารที่ใช้ในแหนม

ในการผลิตแหนมผู้ประกอบจะมีการเติมสารประกอบประเภทไนเตรท ไนไตรท์ ในการผลิต ทั้งนี้เพื่อให้สารดังกล่าวไปจับตัวกับรงควัตถุ (เม็ดสี) ในเนื้อแหนม ช่วยให้เนื้อยังมีสีชมพูแดง นอกจากนั้นไนไตรท์ยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ (เช่น เชื้อ Clostridium) มีผลช่วยชะลอการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเมื่อนำมาเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรดของแหนมจะทำให้สารประกอบดังกล่าวสลายตัวไป ดังนั้นจึงควรบริโภคแหนมเมื่อเปรี้ยวเท่านั้น

2.2.3 คุณลักษณะที่ดีของแหนม

คุณลักษณะของแหนมที่ดีต้องมีเนื้อแน่น คงรูป ส่วนประกอบต่างๆ ต้องผสมรวมกันอยู่อย่างทั่วถึง มีสีชมพูแดงตามธรรมชาติของแหนมที่พร้อมบริโภค อาจจะสังเกตจากสีของพริกหรือสีของแหนม ถ้าแหนมที่ผลิตเสร็จใหม่จะมีสีแดงสดเหมือนหมูสด ซึ่งลักษณะดังกล่าวแสดงว่าแหนมยังไม่เกิดการหมัก จะยังไม่มีรสเปรี้ยว ถ้าสีของหมูเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและพริกมีสีซีดลง นั่นแสดงว่าเกิดการเปรี้ยวแล้ว แต่ถ้าแหนมมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือเริ่มเขียวแสดงว่าแหนมเริ่มหมดอายุแล้ว กลิ่นรสที่ดีของแหนมต้องเปรี้ยว ปราศจากกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่นเหม็นอับและต้องปราศจากกลิ่นแปลกปลอมอื่นๆ เช่น ผม ขน กระดูก ยกเว้นขนที่อยู่ในหนังหมูและกระดูกอ่อนของใบหู แหนมควรมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 22 และไขมันไม่เกินร้อยละ 8

2.2.4 สุขลักษณะ

แหนมที่มีสุขลักษณะที่ดีเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์จะต้องไม่ตรวจพบเชื้อ Salmonella ในตัวอย่างแหนม 25 กรัม *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม พยาธิ *Trichinella spirallus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม ส่วนเชื้อราต้องน้อยกว่า 10 โคโลนี ตัวอย่างแหนม 1 กรัม (มอก. 1219-2537)

2.3 การหมักที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์แหนม

ด้วยแหนมถูกบรรจุด้วยถุงพลาสติกปิดหัวท้าย ทำให้ภายในแหนมมีอากาศน้อย การกำหนดบรรยากาศเช่นนี้ทำให้จุลินทรีย์บางประเภทเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ในสูตรการผลิตยังมีเกลือแกงเป็นองค์ประกอบ ซึ่งก็เป็นการคัดเลือกหรือกำหนดให้ จุลินทรีย์บางประเภทที่ทนเกลือแกงและทนต่อสภาพไม่มีอากาศสามารถเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ประเภทแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก ในระหว่างการหมักช่วงแรก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างทั้งที่เป็นแท่งและรูปทรงกลม ทั้งที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบที่สามารถผลิตกรดได้ (เตชะภิญญาวัฒน์, 2518) แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ได้ในกระบวนการหมักจะถูกใช้โดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียประเภท heterofermentative lactobacilli เช่น *Lactobacillus brevis* และประเภท homofermentative lactobacilli เช่น *Lactobacillus plantarum* และประเภท homofermentative cocci เช่น *Pediococcus cerevisiae* , *Pediococcus pentosaceus* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus acidilactici จุลินทรีย์ดังกล่าวข้างต้นสามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและมีผลทางอ้อมต่อกลิ่นรสชาติและลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.5-1.0 (คิดเทียบกรดแลคติก) และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4.45 – 4.55 โสมะฐิติ (2535) ได้รายงานว่าปริมาณโคลิฟอร์มในแหนมช่วงต้นของการผลิตและการหมักจะมีปริมาณสูง แต่จะลดลงโดยมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากผ่านการหมักไปได้ 5 วัน กระบวนการหมักแหนมแบบพื้นบ้านนี้ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์เริ่มต้นที่อยู่ในวัตถุดิบ เครื่องมือและสภาพสิ่งแวดล้อมของกระบวนการผลิต ซึ่งมีผลทำให้เกิดความผันแปรไม่แน่นอนในชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ ที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตแหนมแบบพื้นบ้าน อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์แหนมสุดท้ายจะมีลักษณะของกลิ่นเหมือนไส้กรอกแบบตะวันตกที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ประเภท pediococcus

2.4 ปัญหาของผลิตภัณฑ์แหนม

2.4.1 คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ

คุณภาพของผลิตภัณฑ์มีความผันแปรจากชุดหนึ่งไปยังอีกชุดหนึ่งและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักไม่สามารถคาดคะเนได้เพราะการหมักของแหนมขึ้นอยู่กับเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติกในวัตถุดิบแต่ละแห่งจะมีปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ นอกจากนี้อาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่ต้องการซึ่งล้วนแต่มีผลต่อคุณภาพแหนม แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเด่นในการผลิตกรด บางสายพันธุ์ผลิตสารให้กลิ่นรส ซึ่งมีความแตกต่างของชนิดของเชื้อจะทำให้แหนมมีความแตกต่างด้านคุณภาพ ดังนั้นผู้ประกอบการอุตสาหกรรมการผลิตแหนมจึงมีความเสี่ยงต่อการผลิตและอาจจะไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามคุณภาพที่ต้องการในแต่ละรุ่นที่ผลิต

2.4.2 ความปลอดภัยของผู้บริโภคต่อการรับประทานแหนม

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักแหนมตามธรรมชาติอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ก่อนที่แบคทีเรียแลคติกจะเจริญมาภายหลัง อีกทั้งส่วนใหญ่การบริโภคแหนมโดยไม่ผ่านความร้อน ดังนั้นการควบคุมคุณภาพเพื่อให้มีความปลอดภัยสูง จึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อผู้นิยมบริโภคแหนมในลักษณะดังกล่าว

ก. แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วัตถุดิบ จุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบมีทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ ขึ้นอยู่กับว่าจะได้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดมาและมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากน้อยเพียงใด เช่น เนื้อหมูมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดเป็นพิษ เช่น Salmonella เป็นต้น

- ภาชนะเครื่องมือเครื่องใช้และอากาศและการผลิตแหนมในสภาพที่ไม่ถูกหลักสุขาภิบาลอาหาร

- ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในการหมักแทนธรรมชาติอาจจะไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ได้ ซึ่งทำให้แบคทีเรียชนิดเป็นพิษที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบนั้นสามารถเจริญและสร้างสารพิษก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

- พนักงานผู้ผลิต

- พฤติกรรมการบริโภคแหนม นิยมบริโภคแหนมในรูปแหนมดิบที่ไม่ผ่านความร้อนทำให้ไม่สามารถทำลายหรือลดจำนวนแบคทีเรียชนิดที่เป็นพิษปนเปื้อนในแหนมได้

ข. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคแหนม

เสวตวิวัฒน์ (2533) ตรวจหาเชื้อ Salmonella ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างแหนมตามธรรมชาติที่ทำการหมักโดยเติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสม (LP) พบว่าแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อก่อนทำการหมักจะตรวจไม่พบเชื้อ Salmonella ในวันที่ 6 ของการหมัก ส่วนแหนมที่เติมกล้าเชื้อผสม LP จะตรวจไม่พบเชื้อ Salmonella ในวันที่ 5 ของการหมัก แสดงว่าแหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อ Salmonella ได้ดีกว่าแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ Salmonella ที่ตรวจพบในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักจะเป็น *S. anatum* ซึ่งทนต่อการทำลายของสารยับยั้งต่างๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติคได้ดีในขณะเกิดกระบวนการหมัก และจากการทดลองตรวจหาเชื้อ Salmonella ตามธรรมชาติในตัวอย่างแหนม พบว่าตรวจพบเชื้อ Salmonella ได้ถึง 16 เซโรไทป์ โดยที่ *S. derby* เป็นเซโรไทป์ที่ตรวจพบมากที่สุด รองลงมาคือ *S. anatum* และ *S. krefeld* ตามลำดับ

2.4.3 อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์แหนมมีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้นประมาณ 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เพราะมีความเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการหมัก หากเก็บไว้นานกว่านี้จะเกิดรสเปรี้ยวขึ้นจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเก็บแหนมไว้ในที่อุณหภูมิต่ำจะยืดอายุการเก็บรักษาได้ แต่โดยปกติผลิตภัณฑ์แหนมมักจะเก็บที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นตลาดของผลิตภัณฑ์นี้ต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 กระบวนการหมักแหนมไม่สามารถควบคุมได้

เนื่องจากขาดความรู้และเทคโนโลยีในการจัดการเกี่ยวกับกระบวนการหมัก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการควบคุมกระบวนการหมัก เพื่อให้มีค่าความเป็นกรด - ด่างเหมาะสมสามารถบริโภคได้และเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสม่ำเสมอ

2.5 เชื้อแบคทีเรียแลคติก

เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีบทบาทในอาหารหมักหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผัก ผลไม้ดอง ไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งพวก Homofermentative เปลี่ยนเป็นกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส ดังนั้นบทบาทสำคัญของอาหารหมักดองที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติกได้แก่ การผลิตกรดทำให้เกิดรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมของสารต่างๆ และยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่แตกต่างกันไปตามผลิตภัณฑ์ (กิตติชัย, 2541)

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั่วไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ไม่สร้างสปอร์และไม่ส่งผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส คุณลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรียคือ ทนกรดและไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่าๆ กับสภาวะไร้อากาศ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแลคติก จึงถูกจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการสารอากาศในการเจริญเติบโต และทนต่อออกซิเจน แบคทีเรีย-แลคติคจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae แต่เดิมจัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติคเพียง 4 สกุล ได้แก่ Pediococcus, Leuconostoc, Streptococcus และ Lactobacillus (Frazier และ Westhoff, 1988) ปัจจุบันเพิ่มสกุลของแบคทีเรียแลคติกรวมแล้ว 8 สกุล ได้แก่ Camobacterium, Enterococcus, Lactococcus และ Vagococcus โดยที่ Camobacterium จัดเป็นสมาชิกในกลุ่ม Lactobailli ส่วนสามสกุลหลังที่ได้เพิ่มนั้นเดิมเป็นสมาชิกในกลุ่ม Streptococcus

2.5.1 Pediococci

จัดเป็น Homofermatative มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบกลุ่ม กลุ่มละ 4 (Tetrads) แบ่งเป็น 2 ระนาบ บางครั้งอาจพบเซลเดี่ยว เซลเรียงกันเป็นคู่ๆ หรือเป็นสายสั้นๆ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (Micro aerophillic bacteria) สามารถเจริญที่อุณหภูมิประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญได้ในน้ำเกลือ ซึ่งเข้มข้นไม่เกิน 5.5% แต่จะเจริญได้ดีหรือไม่สามารถเจริญได้ในน้ำเกลือ ที่มีความเข้มข้น 6-10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus มักพบในอาหารประเภทผักผลไม้ หรือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว

2.5.2 Stretococci

จัดเป็น Homofermentative รูปร่างกลมจัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายเจริญได้ทั้งสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Facutative anaerobe) Streptococcus บางชนิดก่อให้เกิดโทษกับมนุษย์และสัตว์ (Pathogenic bacteria) แบคทีเรียในสกุล Streptococcus มีบทบาทสำคัญในการผลิตเนยแข็ง เนยบางชนิด และผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่นๆ ได้แก่ *S.thermophillus S.diacetlactic, S.lactis* และ *S.cremoris* เป็นต้น (Westhoff, 1998 ; George, 1983)

2.5.3 Leuconostoc

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างกลม จัดเรียงตัวกันเป็นคู่ หรือต่อตัวกันเป็นสาย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ Streptococcus แต่จัดเป็น Heterofermentative สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล เช่น *L. mesenteroides* สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของน้ำตล 55-60% แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งประกอบด้วยไดอะเซทิลและอะซิโตอิน ทำให้เกิดปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็วกว่าแบคทีเรียแลคติก หรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องชนิดอื่นๆ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค (Nonpathogenic bacteria) พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช

เชื้อ *Leuconostoc* spp. เชื้อ *L. mesenteroiders* มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์กระหล่ำปลีดองและแตงกวาดอง นอกจากนี้ยังร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์นมหมักอีกด้วย

2.5.4 Lactobacilli

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างยาว เรียงต่อกันเป็นสายเกือบทุกสายพันธุ์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตในปริมาณที่น้อยมาก (Microaerophillic bacteria) หรือบางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนเลย (strict anaerobes) เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล Lactobacillus มีองค์ประกอบของดีเอนเอแตกต่างกันมาก แต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน บางชนิดจัดเป็น Homofermentative และบางชนิดจัดเป็น Heterofermentative lactobacilli สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่า แบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5 ดังนั้นโดยทั่วไปในการหมักแลคติกตามธรรมชาติ Lactobacilli จึงสามารถดำเนินปฏิกิริยาการหมักต่อไปเมื่อค่าพีเอชลดลงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ จะเจริญได้ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค พบอยู่ตามพื้นผิวของพืชปุ๋ยจากมูลสัตว์และน้ำนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacilli ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ *L. bulgaricus* , *L. acidophilus* และ *L. brevis* เป็นต้น

และอีก 4 ชนิด เนื่องจากมีองค์ประกอบทาง DNA ที่แตกต่างกัน แต่ละสายพันธุ์จึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงถูกแยกออกมาจากกลุ่ม Lactobacilli และกลุ่มของ Streptococi

2.5.5 Cambacterium

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจาก Lactobacilli เช่น *C. divergens, C. mobile*

2.5.6 Vagococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ Strepcocci เช่น *V. luvialis, V. salmoninarm*

2.5.7 Lactococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ Streptococci

2.5.8 Enterococcus

แยกมาจากกลุ่มของ Streptococci

2.6 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นและยาวไม่มีสปอร์ รูปร่างกลมเดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ หรือวางเรียงกันเป็นสายและในบางกรณีอาจมีเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ เนื่องมาจาก Lactic acid bacteria มีรูปร่างกลมและมีรูปร่างแท่งขนาดสั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงทำได้ค่อนข้างยากและรูปร่างของเซลล์ยังเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ไม่สามารถสังเคราะห์ฮีม ไม่มีเอนไซม์ catalase ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี และกรมอะมิโน ต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดที่ใช้ในการหมักได้ มีโคโลนีขนาดเล็กมีความสามารถในการทนกรดได้ดี ชอบอาศัยอยู่ในแหล่งที่สารอาหารที่ใช้ในการหมัก เช่น พืช สัตว์ นมและผลิตภัณฑ์ และสิ่งปฏิกูล เป็นต้น

Lactic acid bacteria สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.6.1 Homofermentative

2.6.2 Heterofermentative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 Homofermentative

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดแลคติกได้ประมาณ 90% เช่น *Lactobacill casei, L. bulgalicus, L. plantarum, Pediococcus spp. , Streptococcus sp.*

Homofermentative vacteria มักชี้ให้เห็นว่าขั้นตอนเริ่มต้นในการหมักของกรดแลคติกมีลักษณะเหมือนกันกับการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ ฟอสเฟตที่ใส่ในข้าวหมักผสมน้ำร้อนเพื่อให้เป็นเบียร์จะเร่งการหมักให้เร็วขึ้น การขจัดโคเอนไซม์จาก Lactic acid bacteria จะทำให้การหมักช้าลงหรือเป็นสาเหตุที่ทำให้สิ้นสุดกระบวนการหมัก *L. delbrueckii* มีความสามารถเปลี่ยน hexosediphosphate เป็น methylglyoxol เช่นเดียวกับปริมาณ methylglyoxol เป็น recemic lactic acid (ภูริวัฒน์, 2539)

กรดแลคติกอาจเพิ่มขึ้นทันทีที่ผ่าน methylglyoxol โดยกลไกที่คล้ายคลึงกันนั้นของการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ ดังสมการ

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3COCHO + 2H$

Glucose — Methylglyoxol

$CH_3COCHO + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH$

Methylglyoxol — Lactic acid

ภาพที่ 1 : แสดงกลไกการหมักเอทิลแอลกอฮอล์กับกรดแลคติก

ผลรวมของการเปลี่ยนแปลงแสดงดังสมการนี้

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,CH_3COCHO + 2\,H_2O$

Glucose — Lactic acid

ภาพที่ 2 : แสดงกลไกการหมักกรดแลคติก

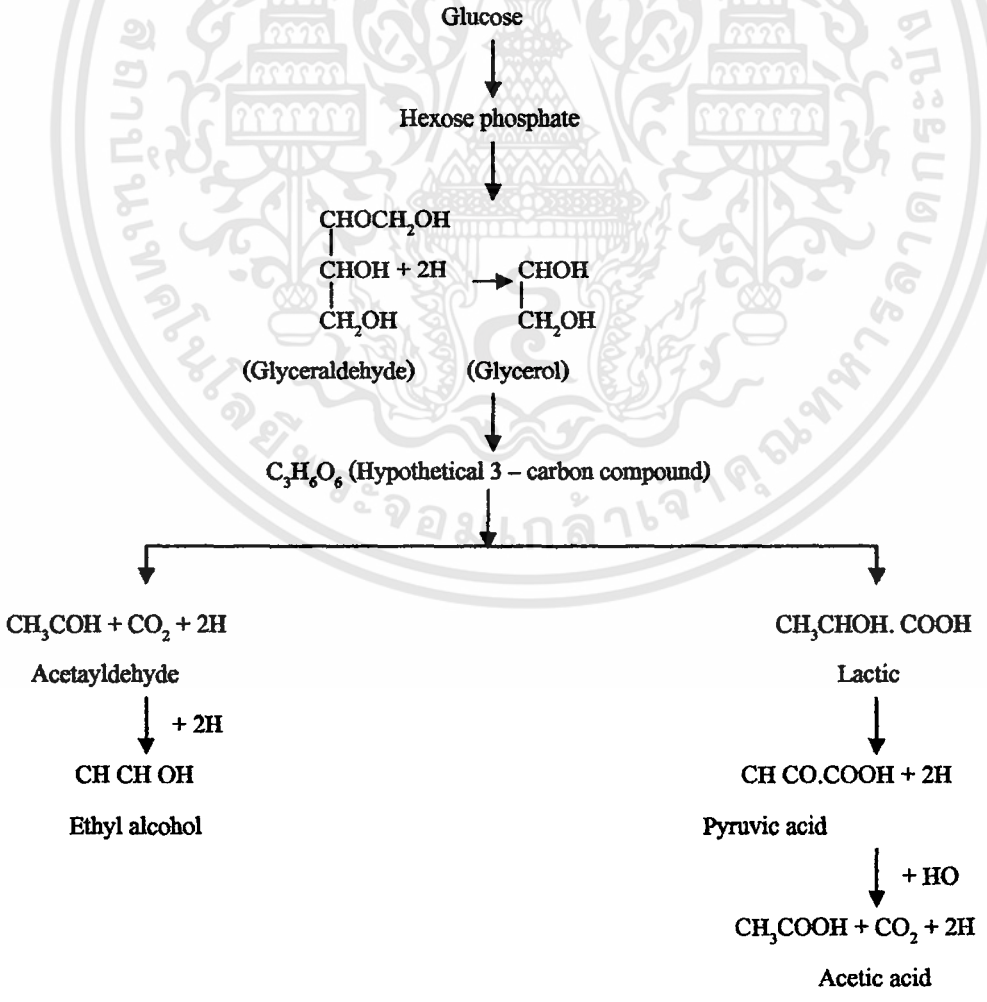
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 Heterofermentative

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณต่ำและมีสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก แบคทีเรียที่มีอยู่ในประเภทนี้ เช่น *Lactobacillus vaccinosterus , L. brevis , Leuconostoc sp.*

ในการกำหนด dissimulation จะใช้สารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria โดยใช้ glucose 20% , peptone 1% , yeast extract 0.3% , KH_2PO_4 0.6% pH = 6.2 ทำการสเตอริไลซ์ โดยใช้เวลา 20 นาที ภายใต้ความดันไอ 20 ปอนด์ ก่อนการเติมหัวเชื้อลงไป ซึ่ง mesh ถูกบ่มภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจน ไนโตรเจนอิสระ ที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับช่วงเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์

Nelson และ Werkman เสนอแนะแผนการทดลองสำหรับการ dissmulation จากกลูโคส โดยพวก Heterofermantative bacteria ดังขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 3 : แสดงกลไกการหมักกลูโคสแบบ Heterofermentative bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนดังกล่าว acetaldehyde และ pyruvic ซึ่งเป็น intermidiate ที่สำคัญ เมื่อ acetaldehyde หรือ acetylmethylcarbinol ถูกเติมเพิ่มเข้าไปเพื่อหมักกลูโคส จะทำให้การเพิ่มปริมาณของกรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่จะลดปริมาณของเอทานอล กรดแลคติก

acetaldehyde มักจะเติมระหว่างการหมักเพื่อที่ไปลดเอทานอล ซึ่งพบว่า กรดไพรูวิกซึ่งหมักได้ โดยเชื้อ *L.lycopersici* จะสร้างสารประกอบพวกกรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดคาร์บอนิกในปริมาณที่เท่าๆ กัน

$$CH_3\,CO.COOH + H_2O \rightarrow CH_3\,C.OH.OH.COOH \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 2H$$

Pyruvic acid — Hydrated pyruvic acid — Acetic acid

$$CH_3\,CO.COOH + 2H \rightarrow CH_3CHOH\,COOH$$

Pyruvic acid — Lactic acid

ภาพที่ 4 : แสดงการสร้างสารประกอบพวกกรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดคาร์บอนิก

2.7 ผลของการเติมเชื้อแลคติกต่อการยังยั้งจุลินทรีย์ในแหนม

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซาลโมเนลลา แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และอัตราส่วนของเชื้อแลคติกแบคทีเรียกับเชื้อซาลโมเนลลา นอกจากนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการหมัก ระดับและสัดส่วนของการผลิตกรด ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อในทางการค้าที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นประเภทแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะเป็นการลดระยะเวลาการหมักลง และจะเป็นการจำกัดการอยู่รอดของซาลโมเนลลา ขณะที่มีการหมักแบบปกติพื้นบ้านการอยู่รอดของซาลโมเนลลาจะมีมากกว่า ได้มีการวิจัยมากมายที่มุ่งชี้ว่าถ้ามีการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยใช้ Lactobacillus หรือไม่ก็ใช้ Pediococcus จะทำให้จำนวนซาลโมเนลลาลดลงในระยะเวลาการหมัก (Baran and Stevenso , 1975 Smith และคณะ, 1975 (a) , (b)) รวมถึงผลิตภัณฑ์แหนม (อดิศร , 2533 ; Swetwiwathana และคณะ, 1999)

2.8 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน คือ สารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็วเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (Antimicrobial subtrance) มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะ และมีฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะ แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติการยับยั้ง จุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแง่ของการทำลายกลไกทางการทำงานและสมบัติที่แตกต่างกัน

แบคเทอริโอซิน ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum* , *L.helviticus* , *L.acidophilus* , *P. pentosaceus* เป็นต้น ซึ่งมีผลยังยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคเทอริโอซิน แบ่งเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial spectrum)

แบบที่ 1 มีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน เช่น กลุ่มแบคทีเรียแลคติก และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เป็นต้น

แบบที่ 2 มีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้างกว่า โดยการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติกที่ต่างสายพันธุ์จะสร้างแบคเทอริโอซินที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างในการยับยั้งจุลินทรีย์ การแบ่งชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มต่างๆ ได้แก่

1. กลุ่ม Leuconostoc

เริ่มใช้ในช่วงยับยั้งครั้งแรก ค.ศ. 1930 โดยใช้ในหัวเชื้อของการผลิตเนยแข็งในอุตสาหกรรม พบว่า มีผลการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย Lactococcus ได้แก่ ไนซิน (Nisin) , Diplococcin และ Lactostrepcins

Mattic and Hirsch (1974) เป็นผู้ตั้งชื่อ ไนซิน ที่เดิมมาจากคำว่า N – inhibitor substance เป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L.lastis ssp.* Lactis สามารถใช้ผลิตในทางการค้าในช่วงปี ค.ศ. 1950 และใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin สารประกอบของไนซิน สามารถแยกได้ 5 ชนิด คือ Nisin A,B,C,D และ E Nisin A จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดและมักผลิตในทางการค้า

2. กลุ่ม Pediococcus

Pediococcus pentosaceas FBB – 61 ที่แยกได้จากแตงกวาดอง จะสร้างแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า Pediocin A มีคาวมสามารถในการยับยั้ง Pediococcus sp. , S.aureus Cl. Sporogenes , Lb. brevis , Lb. Plantarum , Lb. lactis ssp. Lactis ATTC 11454 (Klenhammer , 1985) ขณะที่ Pediocin PA – 1 สามารถได้จาก *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ pronase , papain , pepsin และ Alpha – chymotripsin แต่มีความคงตัวที่ความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pediococcus , Lactobacillus บางชนิดและ *L.mesenteroides spp.* Dextranicum แต่ไม่มีผลต่อ Lactococcus (Gonzales และ Kunk , 1987) ส่วน Pediocin ACH เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *P.acidilactici* H มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน และถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ trypsin , chymotrypsin , fisin และ papain สามารถนึ่งฆ่าเชื้อไคดีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และทนต่อสารละลายอินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ดีที่ pH 2.5 – 9.0 (Bhunia และ คณะ , 1987) และสามารถยับยั้ง *Listeria spp.* ได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Motlagh และคณะ , 1991)

ต่อมาได้มีการรายงานผลการศึกษาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *P.acidilactici* ที่แยกจากการผลิตแหนมพบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสียหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Listeria monocytogenas L.inocua , L.ivanovii, Enterococcus faecalis , Cl. Perfringens , Staphylococcus aureus , Bacillus cereus* และ แบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella enteritidis* และ *S.derby*

3. กลุ่ม Leuconostoc

สามารถยับยั้งที่แบคทีเรียกลุ่ม Leuconostoc สร้างขึ้นมา ได้แก่ กรดแลคติก , กรดอะซิติก และไดอะเซทิล นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacterocin – like - substance) Orberg และ Sandine (1984) ได้ทำการทดลองพบว่า *Leuconos sp.* PO 184 สามารถยับยั้ง *Strepcococcus cremoris* U 134 ได้ แต่ไม่มีผลต่อ *S.lactic* ATTC 11454 นอกจากนี้ Sandine (1987) ยังพบการถ่ายทอดดีเอนเอโดยวิธีคอนจูเกชั่นของ *S.lactic* 7962 กับ *L.dextranicum* ผลการทดลองพบว่า คอนจูแกนท์ของเชื้อผู้รับ *L.dextranicum* จะสามารถสร้างไนซินได้ดีกว่า Strepcococcus ถึง 1,000 เท่า

Orberg และ Sandine (1984) สารประกอบที่คล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยว่า *Leuconostoc sp.* PO 184 สามารถยับยั้ง *Strepcococcus cremoris* U 134 แต่ไม่ยับยั้ง *Strep.lactic* (สามารถไนซิน) ขณะที่ *Leuconostoc sp.* สายพันธุ์ UAL ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินที่ไม่ทราบชื่อสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* จำนวน 8 สายพันธุ์

สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหาร อาจจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ หรือทำลายจุลินทรีย์ ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพ อาจแบ่งได้เป็น

1. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (Permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เสียความสามารถในการทำงาน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต่อต้านของสารจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะจำกัดการเจริญของแบคทีเรีย แกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดนี้ สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ ในชั้น lipolysaccaride ได้ง่าย

2. ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้

3. ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ผิดไปจากเดิม

อย่างไรก็ตาม ได้มีความสนใจนำแบคทีเรียไปใช้อาหารสำหรับมนุษย์มากกว่าแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ ได้มีการนำสารโมเลกุลใหญ่ดังกล่าวไปใช้ในวิชาวิทยาศาสตร์และการถนอมอาหาร และกระบวนการทางเป้าหมายของส่วนแบ่งทางเศรษฐกิจ และเป็นทางเลือกใหม่แทนสารเคมีถนอมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

1. กระเทียม
2. ข้าวสุก
3. หมูบด
4. หนังหมูหั่นขนาด 2*20 มม.

3.1.2 อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. จานเพาะเชื้อ
3. เข็มเขี่ยเชื้อ
4. ลูปเขี่ยเชื้อ
5. candle jar
6. ถุง stomacher
7. ปิเปต
8. บีกเกอร์
9. ถุงร้อน
10. ยางรัดของ
11. มีดและเขียง
12. หม้อสแตนเลส
13. กะละมังสแตนเลส
14. ขวดแก้ว

3.1.3 เครื่องมือ

1. เครื่อง stomacher
2. ตู้บ่ม 37 องสาเซลเซียส
3. เตาแก๊ส
4. หม้อหุงข้าว
5. เตาอบไมโครเวฟ
6. ตู้อบลมร้อน
7. autoclave

3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ไอโอดีน
2. TSB (Trypicase Soy Broth)
3. Tetrathionate Broth
4. Selenite Cystine Broth
5. Hextoen
7. TSI (Triple Sugar Iron Agar)
8. MIL Agar
9. Antiserum
10. MRS Broth
11. MRS Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. XLD
12. PCA (Plate Count Agar)
13. น้ำยา Kovac
17. น้ำตาล
14 . 70% Alcohol
18. STPP
15. น้ำยาฆ่าเชื้อ
19. โซเดียมแอสคอเบต
16. เกลือแกง
20. โซเดียมไนไตรต์

3.2 ขั้นตอนและวิธีการ

3.2.1 การศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งซาลโมเนลลาในแหนม

3.2.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาและการเก็บเชื้อ

ก *Salmonella anatum* ได้จากกองพยาธิวิทยา กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข โดยเลี้ยงเชื้อบน Trypicase Soy Agar (TSA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 2-5°ซ โดยทำการถ่ายเพาะเลี้ยงเชื้อทุกเดือน

ข. แบคทีเรียแลคติก จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* รหัส JCM 5885 และ *Pediococcus pentpsaceus* รหัส TISTR 536 มาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี deep tube culture บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 2-5°ซ โดยทำการถ่ายเพาะเลี้ยงเชื้อทุกเดือน

3.2.1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใส่ในตัวอย่างแหนม

ก. เชื้อซาลโมเนลลา ถ่ายเชื้อเก็บไว้บน TSA slant ลงในอาหารเหลว Trypicase Soy Broth (TSB) 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี dilution plate count โดยใช้ PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. แล้วคำนวนหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่จะนำไปใช้

ข. นำแบคทีเรียแลคติกมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี dilution plate count โดยใช้ MRS Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่จะนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
97054

การเตรียมตัวอย่างแหนม

ส่วนผสม

1.	หมูบด	650	กรัม
2.	หนังหมูหั่นขนาด 2*20 มม.	350	กรัม
3.	ข้าวสุก	60	กรัม
4.	กระเทียมสับ	50	กรัม
5.	เกลือ	25	กรัม
6.	น้ำตาล	5	กรัม
7.	STPP	3	กรัม
8.	โซเดียมแอสคอร์เบต	0.5	กรัม
9.	โซเดียมไนเตรต	0.125	กรัม

วิธีทำ

1. ลวกหนังหมูในน้ำเดือด 5 นาที ตักขึ้นพักไว้
2. นำส่วนผสมทั้งหมดคลุกให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ชั่งส่วนผสมที่ได้ใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็กขนาด 4.5*7 นิ้ว ถุงละ 25 กรัม จำนวน 48 ถุง
4. แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติก (วัดค่า pH) ซึ่งจะประกอบด้วย 3 treatment (treatment ละ 8 ถุง)

treatmant ที่ 1 ไม่เติมกล้าเชื้อ (control)

treatment ที่ 2 เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส JCM 5885

treatmant ที่ 3 เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus*รหัส TISTR 536

กลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแลคติกในการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลา ซึ่งประกอบด้วย 3 treatment (treatment ละ 8 ถุง)

treatment ที่1 เติมเชื้อ *Salmonella anatum* (control + Salmonella)

treatment ที่ 2 เติมเชื้อ *Salmonella anatum* และ *Pediococcus pentosaceus* รหัส JCM 5885

treatment ที่ 3 เติมเชื้อ *Salmonella anatum* และ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536

โดยใช้เชื้อ *Salmonella anatum* และ LAB ที่เตรียมจากข้อ ข.2 โดยให้มีปริมาณ 10^2, 10^3-10^4 เซลล์ต่อกรัม ตามลำดับ

5. คลุกเคล้าเชื้อให้กระจาย โดยการขยำจากนอกถุงพลาสติก อัดให้แน่นด้วยยางรัดของแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.4 การเก็บตัวอย่างและการวัดค่า pH

ขั้นตอนที่ 1 สุ่มตัวอย่างจากตัวอย่างแหนม 3 treatment (ที่ไม่มีการเติมซาลโมเนลลา) มา 10 กรัม ในช่วงการหมักวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6

ขั้นตอนที่ 2 เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วบีบให้เข้ากัน

ขั้นตอนที่ 3 นำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH- meter บันทึกและเปรียบเทียบผลการทดลอง

3.2.1.5 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์เชื้อซาลโมเนลลา

ขั้นตอนที่ 1 สุ่มตัวอย่างแหนมในช่วงการหมักวันที่ 3,4, 5 และ 6 โดยนำตัวอย่างแหนมของแต่ละวันมาตัวอย่างละ 25 กรัม (จากแหนม 2 ถุง) ใส่ในถุง stomacher

ขั้นตอนที่ 2 เติม TSB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 225 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 3 บีบตัวอย่างเพื่อให้ส่วนผสมของแหนมและ TSB เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะได้ Pre-enrichment medium

ขั้นตอนที่ 4 เขย่า Pre-enrichment medium ให้เข้ากัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากแต่ละถุง ถุงละ 1 มิลลิลิตรลงใน Tetrathionate Broth 9 มิลลิลิตร และ Selenite Cystine Broth 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 5 นำแต่ละหลอดมาเขี่ยเพาะเชื้อ (streak) ลงบน XLD และ HEX บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 6 สังเกตว่ามีโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลาหรือไม่ซึ่งโคโลนีดังกล่าวมีลักษณะกลมใสหรือมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ตรงกลางโคโลนี แล้วจึงถ่ายเชื้อจากโคโลนีดังกล่าวลงใน TSI Agar และ MIL Agar เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางเซโรโลยี (Serological Test)

ขั้นตอนที่ 7 นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาโดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

3.2.2 ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อแลคติกรหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมในเชิงการค้า

ศึกษารสชาติที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัสคือ ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบรวมของแหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentpsaceus* รหัส TISTR 536 โดยใช้วิธี Hedonic Test ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนและชอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริโภคแหนมจำนวน 20 คน วางแผนการทดลองแบบ Random Complete Block Design (RCBD) คำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 90 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18382

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการลดลงของ pH ในตัวอย่างแหนม

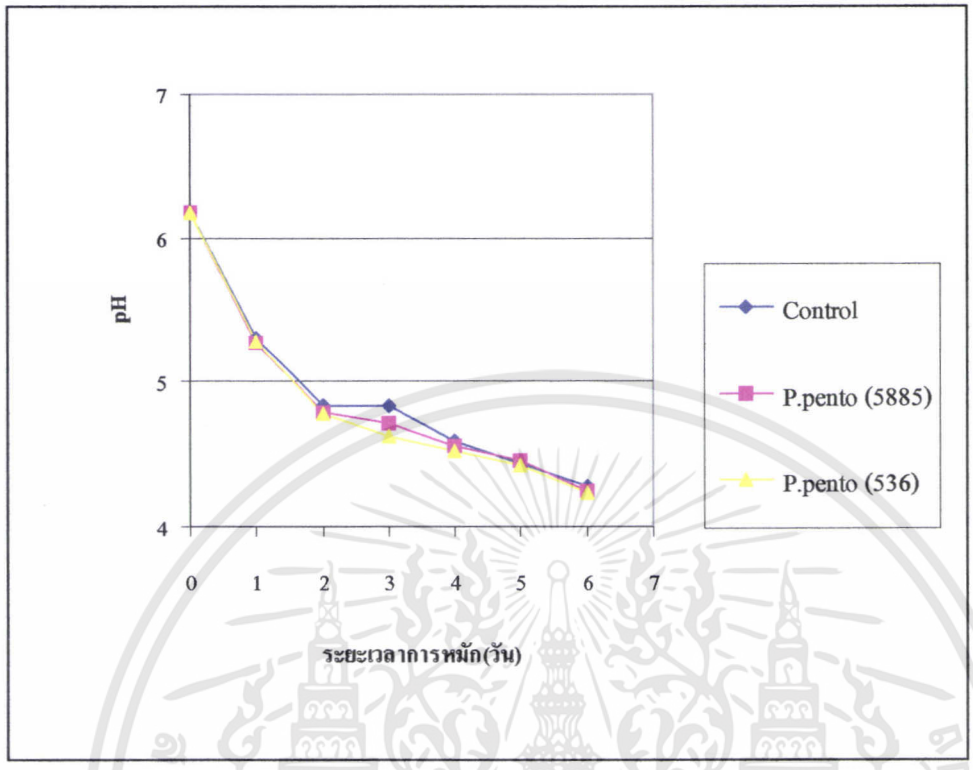
จากการตรวจวัดค่า pH ในตัวอย่างแหนม พบว่า จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาของการหมักเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.18, 5.31, 4.84, 4.84, 4.59, 4.44 และ 4.28 ในตัวอย่างแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (control) มีค่าเท่ากับ 6.18, 5.27, 4.79, 4.71, 4.56, 4.46 และ 4.25 ในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 และมีค่าเท่ากับ 6.18, 5.28, 4.78, 4.62, 4.52, 4.42 และ 4.23 ในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 วันตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแนวโน้มการลดลงของค่า pH ในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ*P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 และตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 ไม่มีความแตกต่างกันเท่าใดนัก จึงกล่าวได้ว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตกรดได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อ จะพบว่า ตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อจะมีอัตราการลดลงของค่า pH เร็วกว่าตัวอย่างแหนมที่ไม่มีเติมกล้าเชื้อเล็กน้อย ในช่วง 2 วันแรกของการหมัก ซึ่งการลดลงของ pH ที่เร็วกว่านี้ อาจมีผลเนื่องมาจากกรดแลคติกที่กล้าเชื้อที่เติมลงไปสร้างขึ้น

วันที่ / Treatment	0	1	2	3	4	5	6
Control	6.18	5.31	4.84	4.84	4.59	4.44	4.28
P.pento (5885)	6.18	5.27	4.79	4.71	4.56	4.46	4.25
P.pento (536)	6.18	5.28	4.78	4.62	4.52	4.42	4.23

ตารางที่ 1 : แสดงค่า pH ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ภาพที่ 5 : กราฟเปรียบเทียบการลดลงของค่า pH ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

4.2 ผลการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *S.anatum* ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

จากการตรวจสอบการเหลือรอดของเชื้อ *S.anatum* ในตัวอย่างแหนม พบว่า ในตัวอย่างแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ยังตรวจพบเชื้อ *S.anatum* ในวันที่ 6 ของการหมัก ในตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 ตรวจไม่พบเชื้อ *S.anatum* ในวันที่ 6 ของการหมัก และในตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 ตรวจไม่พบเชื้อ *S.anatum* ในวันที่ 5 ของการหมัก (ดังแสดงในตารางที่ 2) โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแหนมทั้ง 3 ชนิดจะเห็นได้ว่าตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อ *S.anatum* ได้เร็วกว่า ตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 และตัวอย่างแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ 1 และ 2 วันตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสัมพันธ์กับการทดลอง 4.1 กล่าวคือเมื่อค่า pH ในตัวอย่างแหนมลดต่ำลงเร็วขึ้นปริมาณกรดแลคติกน่าจะมีมากขึ้น ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่มากขึ้นนี้จะมีผลทำให้เซลของเชื้อซาลโมเนลลาที่เติมลงไปนั้นมีการบาดเจ็บมากขึ้น จึงทำให้เซลของเชื้อซาลโมเนลลาถูกยับยั้งได้เร็วขึ้น โดยเฉพาะสายพันธุ์ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน สารแบคเทอริโอซินจากสายพันธุ์ดังกล่าวจะส่งผลให้เซลซาลโมเนลลาที่บาดเจ็บถูกทำลายได้เร็วกว่าสายพันธุ์ *P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 และ control ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วันที่ / Treatment	Control	Control+S.	*P.pento*(5885)+S	*P.pento*(536)+S.
3	-	+	+	+
4	-	+	+	+
5	-	+	+	-
6	-	+	-	-

+ : พบเชื้อซาลโมเนลลา

- : ไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา

ตารางที่ 2 : แสดงผลการตรวจสอบการเหลือรอดของเชื้อ *S.anatum* ในตัวอย่างแหนมที่ระยะเวลาการหมักต่าง ๆ

4.3 ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมเชิงการค้า

ปัจจัย / Treatment	Control	*P. pento*(5885)	*P. pento*(536)
ความเปรี้ยว	3.05^{b}	3.60^{a}	3.55^{a}
เนื้อสัมผัส	3.25^{a}	3.65^{a}	3.60^{a}
ความชอบรวม	3.00^{b}	3.75^{a}	3.55^{a}

a = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

b = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 : แสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

จากตารางประเมินผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของแหนมโดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ Random Complete Block Design (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT พบว่าในด้านความเปรี้ยวและความชอบรวม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส JCM 5885 และตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* รหัส TISTR 536 แต่จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ส่วนด้านเนื้อสัมผัสพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างแหนมทั้ง 3 ชนิด

จากผลการทดลอง แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ จะได้รับการยอมรับด้านความชอบรวม และด้านความเปรี้ยวมากกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (หมักโดยธรรมชาติ) เนื่องจากแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะมีการสร้างกรดแลคติกได้มากกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ จึงถือว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตเชิงการค้าสำหรับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เพื่อทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณภาพแหนมให้เป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภคได้เร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตแหนมเชิงการค้ามีความเป็นไปได้สูง ทั้งนี้เนื่องจาก เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค อันเนื่องมาจากการผลิตกรดที่เร็วกว่าการหมักแบบธรรมชาติ นอกจากการใช้กล้าเชื้อในการผลิตแหนมทำให้ผลิตภัณฑ์ปลอดภัยจาก *S.anatum* ได้เร็วกว่าการหมักแหนมที่หมักโดยธรรมชาติ และถ้ากล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้นั้นสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ด้วยแล้ว จะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยจากเชื้อ *S.anatum* ได้เร็วยิ่งขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการลวกหนังหมู หลังจากลวกเสร็จแล้วควรผึ่งหนังหมูให้แห้ง เพื่อไม่ให้มีน้ำในตัวอย่างแหนมมากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติชัย โหบาง. 2541. การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติก. สัมมนา ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 4-7.

ไพโรจน์ วิริยะจารี และคณะ. 2537. โครงการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์แหนม. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญู. 2539. กรดแลคติกในอุตสาหกรรม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สิรินธิดา คันธจันทร์. 2544. สัมมนาการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุขใจ โสมฐิติ. 2525. การสำรวจเชื้อโรคลำไส้บางชนิดในแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

สุพินชา ทิพม่อม และอังศุธร โยธา. 2543. ปัญหาพิเศษผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกการเตรียมเนื้อและลักษณะการบรรจุต่อการยับยั้งฟีคัลโคลิฟอร์มในแหนม. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม. 2527. แหนม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มอก. 1219-2537 พี.เอ็น.เซ็นเตอร์เพรส กรุงเทพมหานคร. 8 น.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อดิศร เสวตวิวัฒน์และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อRambatch agar ต่อการตรวจหาซาลโมเนลลาในแหนม. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 30 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ 2539 อาคารอินทรีย์จันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำกระเทียมสกัดต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแหนม(ในหลอดทดลอง อาหาร ปีที่ 29 (2). 109-115.

อรนุช อุดรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซาลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Adisorn Swetwiwathana, และคณะ. 2001. Potential for Use of Isolate Bacteriocin-Producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from Nham (Thai Fermented Meat) to Control the Growth of *Salmonella anatum*. Proceeding of The 47th International Congress of Meat Science and Technology. VolumeII. August 26th-31th, 2001 Krakow, Poland. P.18-19.

Bhunea, A.K., John M.C., Ray, B. 1987. Direction detection of an antimicrobial peptind of *Pediococcus aciddilactici* in Sodium dodicyl sulfate polyacrylamind gel electroresis. J. Ind. Micromial. 2:319.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. 1984. Biological of microorganism. 4th ed. New Jersey : Prentice-Hall,Inc. 847 pp.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservative. Food technology. 43:164.

Frazier, W.C., Westhoff, D.C. 1988. Food Microbiology. 4th ed. Singapore : McGraw-Hill Co.539pp.

George, J. 1983. Basic Food Microbiology. USA : Saybrook Press, Inc. 781pp.

Gonzales, C.F. and Kunka, B.S. 1987. Plamid-associated bacteriocin producing production and Sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. App. Env. Microbial. 53:2534-2538.

Mattict, A.T.S. ,and Hirsch. , A. 1974. Future observation on an inhibitor(nisin)from lactic Streptococci. Lancet. 2:5.

Motlagh, A.M. , Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Viality loss of foodoorne pathogens by Starter Culture metabolies. J. Food prot. 54 : 873-878.

Orberg, P.K., and Sandine, W.E. 1984. Common occurrence of Plasmid DNA and Vancomycin Resistance in *Leuconostoc spp*. App. Env. Microbial. 48:1129.

Sandine, W.E., 1987. Looking Backward and forward at the Practical Applications of Genatic Researches on Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbial Rev. 46:205-220.

Swetwiwathana, A.and N Lotong. 1999. Selection of Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented Meat. Processing of International, 1999. Chaingmai, Thailand. PIII/: 543-548.

Swetwiwathana, A. และคณะ. 1999. Controlling the Groth of *Salmonella anatum* in Nham. Fleisch Wirtschaft International. 9:P124.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

<u>ตัวอย่าง</u> แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์ แหนม

ชื่อผู้ทดสอบ _____ วันที่ _____

กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนดังนี้

1 = ไม่ชอบ **3 = ชอบมาก**

2 = ชอบน้อย **4 = ชอบมากที่สุด**

3 = ชอบปานกลาง

ปัจจัย	รหัส_____	รหัส_____	รหัส_____
ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส ความชอบรวม			

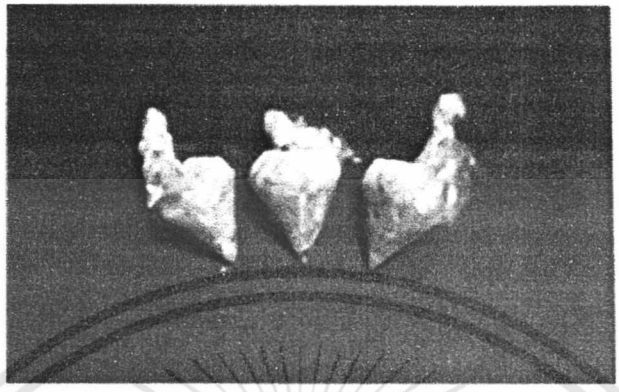
ข้อเสนอแนะ

_____

_____

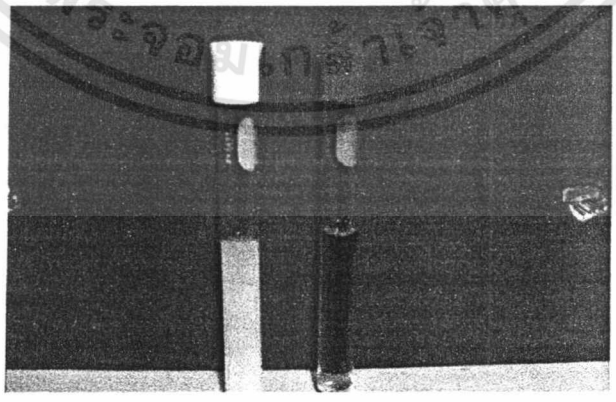
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



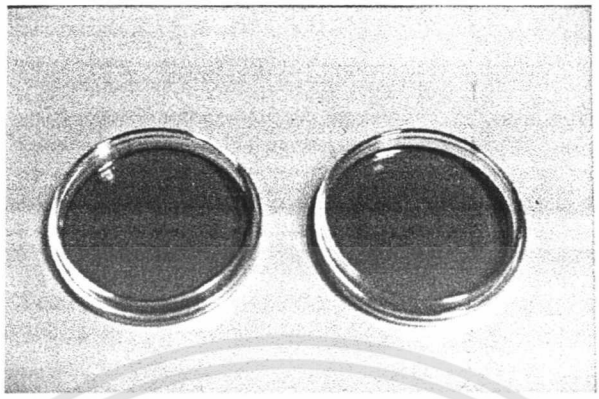
ภาคผนวก ข.1 : ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนม

ภาคผนวก ข.2 : อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB



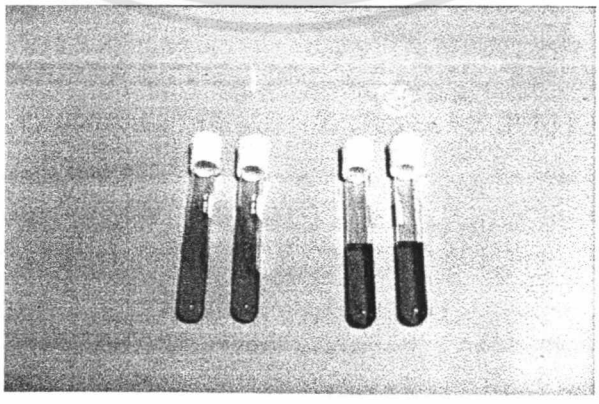
ภาคผนวก ข.3 : อาหารเลี้ยงเชื้อTetrathionate broth และ Selenite cystine broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



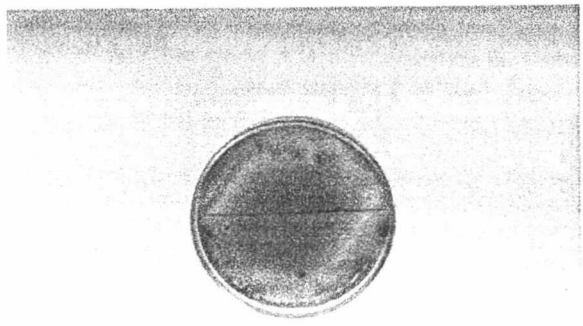
ภาคผนวก ข.4 : อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ Hextoen

ภาคผนวก ข.5 : แสดงการstreak เชื้อ บนอาหารวุ้น



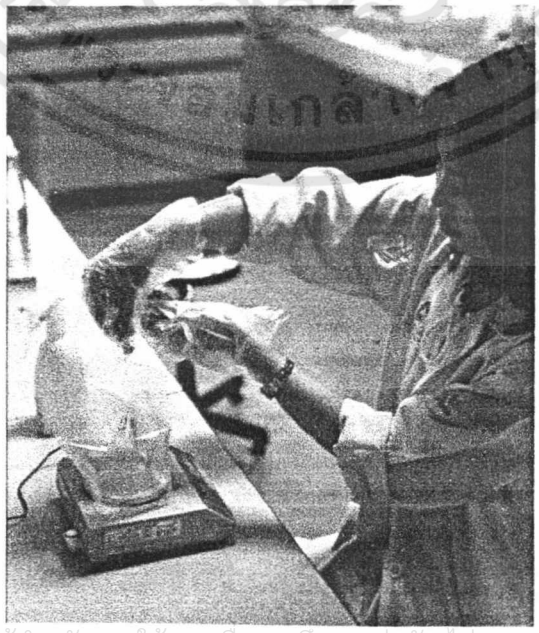
ภาคผนวก ข.6 : อาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ LIM agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



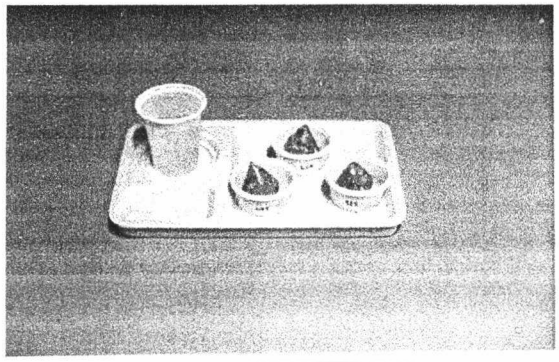
ภาคผนวก ข.7 : แสดงโคโลนีที่น่าสงสัยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD

ภาคผนวก ข.8 : แสดงโคโลนีที่น่าสงสัยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Hextoen



ภาคผนวก ข.9 : แสดงการสุ่มตัวอย่างแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข.10 : แสดงชุดทดสอบทางประสาทสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: sour

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	32.100	21	1.529	1.917	.040
Intercept	693.600	1	693.600	869.861	.000
BLOCK	28.400	19	1.495	1.875	.049
FORMULAR	3.700	2	1.850	2.320	.112
Error	30.300	38	.797		
Total	756.000	60			
Corrected Total	62.400	59			

a R Squared = .514 (Adjusted R Squared = .246)

sour

	FORMULAR	N	Subset 1	Subset 2
Duncan	1.00	20	3.0500	
	3.00	20		3.5500
	2.00	20		3.6000
	Sig.		1.000	.860

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .797.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b Alpha = .10

ภาคผนวก ค.1 : ตารางแสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ด้านความเปรี้ยว) โดยศึกษาการใช้กล้าเชื้อ*P.pentosacus* รหัส TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: texture

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26.233	21	1.249	1.650	.088
Intercept	735.000	1	735.000	970.915	.000
BLOCK	24.333	19	1.281	1.692	.083
FORMULAR	1.900	2	.950	1.255	.297
Error	28.767	38	.757		
Total	790.000	60			
Corrected Total	55.000	59			

a R Squared = .477 (Adjusted R Squared = .188)

texture

		N	Subset
FORMULAR			1
Duncan	1.00	20	3.2500
	3.00	20	3.6000
	2.00	20	3.6500
	Sig.		.178

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .757.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b Alpha = .10

ภาคผนวก ค.2 : ตารางแสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ด้านเนื้อสัมผัส) โดยศึกษาการใช้กล้าเชื้อ*P.pentosacus* รหัส TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: over all

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	35.750	21	1.702	2.833	.003
Intercept	700.417	1	700.417	1165.657	.000
BLOCK	29.917	19	1.575	2.620	.006
FORMULAR	5.833	2	2.917	4.854	.013
Error	22.833	38	.601		
Total	759.000	60			
Corrected Total	58.583	59			

a R Squared = .610 (Adjusted R Squared = .395)

over all

	FORMULAR	N	Subset 1	Subset 2
Duncan	1.00	20	3.0000	
	3.00	20		3.5000
	2.00	20		3.7500
	Sig.		1.000	.314

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .601.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

b Alpha = .10

ภาคผนวก ค.3 : ตารางแสดงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ด้านความชอบรวม) โดยศึกษาการใช้กล้าเชื้อ*P.pentosacus* รหัส TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาว ประโลมจิต ตันตื้อ เกิดเมื่อวันที่ 5 สิงหาคม 2522 จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี 2540 จากโรงเรียนนารีรัตน์ จังหวัดแพร่ และจบการศึกษาจากภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

นางสาว สุดารัตน์ จันทร์โยธา เกิดเมื่อวันที่ 15 มิถุนายน 2522 จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย เมื่อปี 2540 จากโรงเรียนสาธิตแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้