การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักน้ำพริกน้ำ

SURVIVAL OF *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun and *S.* Ratchaburi DURING NHAM FERMENTATION

สุวรรณี ศิริวัฒนไชยกุล

SAWAN SIRIWATANACHAIYAKUL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะจุลชีววิทยา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-054-158

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

SURVIVAL OF *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun and *S.* Ratchaburi DURING NHAM FERMENTATION

สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

SARUJ VEERAWATANAYOTIN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 123750
วัน, เดือน, ปี 2 8 ก.ย. 2555

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2555

KMITL-2012-AI-M-054-158

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SURVIVAL OF *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun and *S.* Ratchaburi DURING NHAM FERMENTATION

SARUJ VEERAWATANAYOTIN

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

2012

KMITL-2012-AI-M-054-158

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสุรจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร ไสวตีวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม
นักศึกษา	นาย สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน
รหัสนักศึกษา	51608070
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2555
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ซึ่งพบครั้งแรกในประเทศไทยรวมถึง *S.* Anatum ที่พบมากในแหนม ในแบบจำลองแหนม (Nham Model Broth, NMB) โดยศึกษาที่ระดับ pH 5.5 5.0 และ 4.5 ร่วมกับแบคแทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 พบว่า แบบจำลองแหนมที่ pH 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ตลอด 48 ชั่วโมงของการทดลอง สำหรับแบบจำลองแหนมที่ระดับ pH 4.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml สามารถทำลาย *S.* Bangkok และ *S.* Lumphum ให้หมดไปได้ในเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่แบบจำลองแหนมที่ระดับ pH 4.5 ไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน ทำลายเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ให้หมดไปภายในเวลา 30 ชั่วโมง แต่แบบจำลองแหนมที่ระดับ pH 4.5 ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นระดับเดียวกันสามารถทำลาย *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ให้หมดไปภายในเวลา 30 ชั่วโมง เมื่อทำการทดลองการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม (ไนไตรท์)ในแบบจำลองแหนม พบว่า เชื้อซัลโมเนลลาที่ทำการศึกษาทั้งหมดที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ถูกยับยั้งการเจริญในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเชื้อทั้งหมดเริ่มเจริญได้ ถึง 10^8 cfu/ml ที่ 18 ชั่วโมง ในขณะที่แบบจำลองที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญขึ้นถึง 10^8 cfu/ml ที่ 12 ชั่วโมง

ในการทดลองยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ด้วยแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน (*P. pentosaceus* TISTR536) และไม่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน (*P. pentosaceus* JCM 5885) ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 cfu/ml และเติมเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ความเข้มข้น 10^4 cfu/ml พบว่าแบคทีเรียแลค ติกทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถทำลาย *S.* Ratchaburi ให้หมดไปได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมงของการทดลอง แต่เมื่อทำการทดลองการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi โดยศึกษาองค์ประกอบของแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ และไนไตรท์ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ร่วมกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 พบว่า เชื้อ *S.* Ratchaburi ถูกทำลายให้หมดไปใน NMB ได้ภายใน 30 ชั่วโมง โดยที่ NMB ที่ 30 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ 1600 Au/ml และระดับ pH 4.40 (ปริมาณกรด 0.57 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการศึกษาส่วนประกอบของแหนมร่วมกับ *P. pentosaceus* JCM 5885 พบว่า *S.* Ratchaburi ถูกทำลายให้หมดไปใน NMB ภายใน 36 ชั่วโมงโดยค่า pH ในชั่วโมงที่ 36 ของการทดลองมีค่า 4.53 (ปริมาณกรด 0.53 เปอร์เซ็นต์) การใช้ส่วนประกอบของแหนมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก เชื้อ *S.* Ratchaburi ถูกทำลายหมดไปภายใน 42 ชั่วโมงของการทดลอง โดยที่การใช้กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่เติมกล้าเชื้อและโซเดียมไนไตรท์ และชุดควบคุม พบว่า *S.* Ratchaburi ยังคงมีชีวิตอยู่ที่ชั่วโมง 48 ของการทดลอง

การศึกษาโดยการใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (*P. pentosaceus* TISTR536) และกล้าเชื้อแลคติก ที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน (*P. pentosaceus* JCM 5885) ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/g ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ระดับเชื้อซัลโมเนลลา 10^1 cfu/g ในผลิตภัณฑ์แหนม พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S.* Ratchaburi ในวันที่ 5 และวันที่ 7 ตามลำดับ แต่ตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ระดับเชื้อซัลโมเนลลา 10^4 cfu/g เชื้อซัลโมเนลลาสามารถรอดชีวิตได้ในวันที่ 7 ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก สามารถตรวจพบ *S.* Ratchaburi ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างทั้ง 10^1 cfu/g และ 10^4 cfu/g ในตลอด 7 ของการทดลองเมื่อศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระหว่างกระบวนหมักแหนมด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) พบว่าสามารถตรวจยืนยันการรอดชีวิตของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ในแหนมในวันที่ 7 โดยสุ่มจำนวนแบคทีเรียแลคติก 15 โคโลนี และเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อบริสุทธิ์ พบว่าดีเอ็นเอของเชื้อตัวอย่างจะเหมือนกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ทั้ง 15 โคโลนี ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 จำนวน 15 โคโลนีในวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่ามีความแตกต่างจากกล้าเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 2 โคโลนี ทั้งนี้ในการเปรียบเทียบแบคทีเรียแลคติก จำนวน 15 โคโลนีกับเชื้อบริสุทธิ์ ณ.วันที่ 0 ของการทดลอง พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์เหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ จากการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Survival of Salmonella Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation
Student	Mr. Saruj Veerawatanayotin
Student ID.	51608070
Program	Food sanitation
Degree	Master of Science
Year	2012
Thesis Advisor	Dr. Aphacha Jindaprasert

Abstract

A study of the survival of the bacteria *S.* Bangkok *S.* Lamphun and *S.* Ratchaburi, which was first detected in Thailand and *S.* Anatum found in Nham. By using Nham Model Broth (NMB) to study the effect under different pH (5.5 5.0 and 4.5) in addition of crude Pediocin PA-1 produced from *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536. It was revealed that The Model Broth at pH. 5.0 and 5.5 with or without Pediocin PA-1 at the concentration of 6400 AU/ml cannot inhibit the four species of *Salmonella* within 48 hours of study, but NMB at pH 4.5 with or without Pediocin PA-1 at the concentration of 6400 AU/ml can deminish *S.* Bangkok and *S.* Lumphum from the broth within 24 hours of study period. The same results were performed to *S.* Anatum and *S.* Ratchaburi in NMB at pH 4.5 with Pediocin PA-1 at the concentration of 6400 AU/ml, but NMB without pediocin PA-1 exhibited a longer time in diminishment of *S.* Anatum and *S.* Ratchaburi (within 30 hours.). Inhibitory effect of sodium nitrite (100 ppm) on those 4 species of *Salmonella* was also performed in the same NMB. The results informed that 100 ppm of sodium nitrite in NMB could inhibit the growth of all studied *Salmonella* (with initial load of 10^4 cfu/ml) within 12 hours of study period and became to grow to 10^8 cfu/ml after the period of 18 hours, while NMB without sodium nitrite all studied *Salmonella* could grow up to 10^8 cfu/ml after the period of 12 hours.

The inhibition of *S.* Ratchaburi with *P. pentosaceus* TISTR536 (Pediocin PA-1 producer) and *P. pentosaceus* JCM 5885 (nonbacteriocin producer) as starters in NMB at the concentration of bacteria 10^6 cfu/ml and *S.* Ratchaburi with concentration of 10^4 cfu/ml exhibited that these two strains of lactic acid bacteria could not eliminate *S.* Ratchaburi from the broth within 48 hours of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

study period. But when NMB contained with 5% sterilized chopped fresh garlic, 100 ppm sodium nitrite, *P. pentosaceus* TISTR536 as starter (10^6 cfu/ml) and *S.* Ratchaburi (10^4 cfu/ml), the results revealed that *S.* Ratchaburi was eliminated within 30 hours in NMB. At this 30 hour of NMB fermentation period, the concentration of Pediocin PA-1 in NMB was 1600 AU/ml and pH of the broth was 4.40 (0.57 percent acidity). When using *P. pentosaceus* JCM 5885 as starter in NMB instead of *P. pentosaceus* TISTR536, the results implied the longer period in diminishment of *S.* Ratchaburi from NMB (within 36 hour of fermentation) and pH of NMB at 36 hour period was 4.53 (0.53 percent acid). The NMB with only 5 % sterilized chopped fresh garlic and 100 ppm sodium nitrite, but without any lactic acid bacteria as starters could eliminated *S.* Ratchaburi from the broth within 42 hours. NMB which contained only 5 % sterilized chopped fresh garlic could not diminish *S.* Ratchaburi from the broth within 48 hours.

An experiment of Nham fermentation by using *P. pentosaceus* TISTR536 and *P. pentosaceus* JCM 5885 at 10^6 cfu/g as starter culture to inhibit S. Ratchaburi at 10^1 cfu/g. The *S.* Ratchburi could not be found on day 5 and day 7 respectively. With 10^4 cfu/g of S. Ratchaburi, it can be found at day 7 of fermentation period. Nham without adding lactic acid bacteria (Control samples) with initial load of both 10^1 cfu/g and 10^4 cfu/g of *S.* Ratchaburi and left to ferment for 7 days, it was informed that *S.* Ratchaburi could still be detected on day 7 of fermentation period.

The experiment on the survival of bacteria in the process of lactic acid fermentation using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), *P. pentosaceus* TISTR536 and *P. pentosaceus* JCM 5885 survive at day 7. 15 colony of lactic acid bacteria were randomly sample to compare with the DNA pattern of the original culture. The sample of *P. pentosaceus* TISTR536 are same as pure culture while 2 colony out of 15 colony of *P. pentosaceus* JCM 5885 have difference DNA from the pure culture. The comparison of the 15 sample at day 0 of the experimental, all 15 colony of both *P. pentosaceus* TISTR536 and *P. pentosaceus* JCM 5885 have the same DNA pattern as the pure culture. The results of the above experiments show that lactic acid bacteria can inhibit *Salmonella.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.อพัชชา จินคาประเสริฐ อาจารย์ผู้ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการแก้ไขปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ รวมถึงตรวจแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบรูณ์ อีกทั้งยังให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. กิตติชัย บรรจง และคณาจารย์คณะ อุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในการให้คำแนะนำและคำปรึกษาและแนวคิดตลอดในการดำเนินงานวิจัยและการจัดทำวิทยานิพนธ์ และ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งใน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ฉายรังสีอาหารและผลิตผลทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการฉายรังสีเนื้อหมูบดสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำนักงานกองสนับสุนนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนทั้งเงินทุนและอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเพื่อนนักศึกษาสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร และเพื่อนนักศึกษาคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่อำนวยความสะดวก ให้ข้อมูล คำแนะนำและช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆทุกสนับสนุนช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา ประโยชน์อันใดที่ได้จากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
กิตติกรรมประกาศ..... จ
สารบัญ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ฎ
สารบัญรูป..... ฐ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 บทนำ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3
1.3 ขอบเขตงานของวิจัย..... 3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 4
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 5
2.1 แหนม..... 5
2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแหนม..... 5
2.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแหนมและกระบวนการผลิตแหนม..... 5
2.1.3 โซเดียมไนไตรท์และผลที่เกี่ยวข้องกับแหนม..... 7
2.1.4 กระเทียมและสารออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องในแหนม..... 8
2.1.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนม..... 9
2.2 แบคทีเรียแลคติก..... 10
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก..... 10
2.2.2 การแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก..... 10
2.2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติก..... 12
2.2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid) 12
2.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซร์ (Hydrogen peroxide) 13
2.2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) 13
2.2.3.4 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)..... 13
2.2.3.5 ไดอะซิทิล (Diacetyl)..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.3.6 ริวเทอรีน (Reuterine) ……..17
2.3 เชื้อซัลโมเนลลา 17
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อซัลโมเนลลา.....17
2.3.2 การเลือกพาหะนำโรคของเชื้อซัลโมเนลลา.....19
2.3.3 เชื้อซัลโมเนลลาที่พบครั้งแรกในประเทศไทย.....20
2.3.3.1 เชื้อ *Salmonella* Bangkok.....20
2.3.3.2 เชื้อ *Salmonella* Lumphum 20
2.3.3.3 เชื้อ *Salmonella* Ratchaburi.....20
2.3.4 การเกิดโรคจากเชื้อซัลโมเนลลา.....21
2.3.4.1 ไข้เอนเทอริก (Enteric Fever).....21
2.3.4.2 กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ.....22
2.3.4.3 โลหิตเป็นพิษ.....22
2.3.5 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในอาหาร.....22
2.3.6 ปัจจัยและการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา.....24
2.3.6.1 อุณหภูมิ.....24
2.3.6.2 พีเอช.....24
2.3.6.3 ปริมาณน้ำอิสระ(Water activity a_w).....24
2.3.6.4 การใช้ปัจจัยร่วมในการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา.....24
2.4 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....25
2.4.1 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม.....25
2.4.2 การใช้กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....26
2.4.3 การประยุกต์ใช้กล้าเชื้อช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร.....26
2.4.4 การประยุกต์ใช้สารเคมีและกรดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร.....29
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....32
3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิตแหนม.....32
3.2 เชื้อจุลินทรีย์.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.1 เชื้อแบคทีเรียแลกติก....32
3.2.2 เชื้อซัลโมเนลลา....32
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์....33
3.4 สารเคมี....33
3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์....34
3.6 วิธีการทดลอง....35
3.6.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์....35
3.6.1.1 การเตรียมเชื้อซัลโมเนลลา....35
3.6.1.2 การเตรียมเชื้อแบคที่เรียแลคติก....36
3.6.2 การเตรียมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1....36
3.6.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา....36
3.6.4 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองแหนม (Nham model broth, NMB) ด้วยสภาวะในการหมักแหนม....37
3.6.4.1 การศึกษาผลของการใช้กรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม....37
3.6.4.2 การศึกษาผลของการใช้ไนไตรท์ที่มีผลต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม....38
3.6.4.3 การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม....38
3.6.4.4 การศึกษาผลของการใช้กระเทียม ไนไตรท์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ที่มีผลต่อ *S.* Ratchaburi
ในแบบจำลองการหมักแหนม.....39
3.6.5 การศึกษาการใช้แบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้าง
แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1การยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi
ในผลิตภัณฑ์แหนม.....40
3.6.5.1 การเตรียมหมูฉายรังสีเพื่อลดเชื้อจุลินทรียก่อนการหมัก
แหนม.....40
3.6.5.2 ผลของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาใน
ผลิตภัณฑ์แหนม.....40
3.6.6 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่าง
กระบวนหมักแหนมด้วยวิธี Polymerase chain reaction-
restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).....41
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....43
4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อ
การยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา.....43
4.2 การรอดชีวิตของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองแหนม
ด้วยสภาวะในการหมักแหนม.....44
4.2.1 ผลของการใช้กรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1
ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi
ในแบบจำลองการหมักแหนม.....44
4.2.2 ผลของการใช้ไนไตรท์ที่มีผลต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok
S. Lamphum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหน.....52
4.2.3 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและ
ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1
S. Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม.....57
4.2.4 ผลของการใช้กระเทียม ไนไตรท์ และ
กล้าเชื้อแลคติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1
S. Ratchaburiในแบบจำลองการหมักแหนม.....60
4.3 ผลของการใช้แบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

pediocin PA-1 ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในผลิตภัณฑ์แหนม 63
4.4 การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนหมักแหนม ด้วยวิธี PCR-RFLP 69
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ 74
5.1 สรุปผลการทดลอง 74
5.2 ข้อเสนอแนะ 75
บรรณานุกรม 76
ภาคผนวก 83
ภาคผนวก ก 84
ภาคผนวก ข 90
ภาคผนวก ค 92
ภาคผนวก ง 93
ประวัติผู้วิจัย 101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก	16
2.2	สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา	18
2.3	สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2546	23
2.4	แสดงการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	23
3.1	สูตรการผลิตแหนมหมู	41
4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1(6400 AU/ml)	48
4.2	แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1(6400 AU/ml)	49
4.3	แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Lumphum ในแบบจำลองแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 (6400 AU/ml)	50
4.4	แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 (6400 AU/ml)	51
4.5	เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมและไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม	56
4.6	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อการยับยั้งเชื้อ *S* .Ratchabur	58
4.7	จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียม โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.8 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักแหนม
ที่มีการเติม กระเทียม ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์)
และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus*TISTR536 ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi..... 62
4.9 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi
ในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียม
ร่วมและไม่ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์)
และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก..... 64
4.10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรด
ในแหนมที่เติม กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536
P. pentosaceus JCM5885 และไม่เติมกล้า
แบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน.....66
4.11 ผลของการตรวจเชื้อ *S.* Ratchaburi ในเนื้อหมูและ
ผลิตภัณฑ์แหนมสูตรต่างๆ.....67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แผนภาพกระบวนการผลิตแหนม....6

2.2 โครงสร้างสารประกอบอัลลิซิน....9

2.3 การหมักแบบ homofermentative และ heterofermentative ของแบคทีเรียแลคติก....12

4.1 ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 จากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sake*....43

4.2 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม....45

4.3 ผลของค่าpHและแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1ต่อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองการหมักแหนม....46

4.4 ผลของค่าpHและแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1ต่อ *S.* Lumphum ในแบบจำลองการหมักแหนม....46

4.5 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม....47

4.6 ผลของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ต่อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม....53

4.7 ผลของไนไตรท์ (โซเดียมไนไตรท์) ต่อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองการหมักแหนม....53

4.8 ผลของไนไตรท์ (โซเดียมไนไตรท์) ต่อ *S.* Lumphum ในแบบจำลองการหมักแหนม....54

4.9 ผลของไนไตรท์ (โซเดียมไนไตรท์) ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม....54

4.10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเชื้อ *S.* Ratchaburi ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรด ในแบบจำลองการหมักที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง....59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.11 ผลการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกและและเชื้อ *S.* Ratchaburi ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรด ในแบบจำลองการหมักที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....59
4.12 ผลการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม.....61
4.13 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติก และตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer.....70
4.14 ผลการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Hae*III ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกจากแหนมสูตรที่ 2 ที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 และเชื้อบริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer.....71
4.15 ผลการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ก และ ข) และ *Alu*I (ค) ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกจากแหนมสูตรที่ 5 ที่เติมกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* JCM 5885 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 และเชื้อบริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer.....72
ง-1 แสดงค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง.....93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แหนม เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคทั่วทุกภาคของประเทศไทย จึงมีการผลิตเพื่อการจำหน่ายเป็นจำนวนมาก และการผลิตแหนมส่วนใหญ่ผลิตจากแหล่งผลิต ที่มีการควบคุมสุขลักษณะส่วนบุคคลได้ไม่ดี กระบวนการผลิตวัตถุดิบที่สัมผัสมือ จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อโรค อาหารเป็นพิษที่สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีที่เป็นพาหะนำโรคสู่ผู้บริโภค และนอกจากนี้แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานโดยไม่ผ่านความร้อน อาจจะทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารจากเชื้อก่อโรคในกลุ่มของเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*) เช่นโรคติดเชื้อทางโลหิต ลำไส้และกระเพาะอักเสบ (อังกูร เกิดพานิช, 2549) จากผลการวิจัยพบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2546 มีการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาจากผู้ป่วย 44,087 ตัวอย่าง และในสิ่งแวดล้อม 26,148 ตัวอย่าง จากกรณีตัวอย่างผู้ป่วยพบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารที่ทำการบริโภคได้แก่ ไก่แช่แข็ง 14,559 ตัวอย่าง อาหารทะเล 1,007 ตัวอย่าง อาหารอื่นๆ 6,928 ตัวอย่าง น้ำ 984 ตัวอย่าง เป็นต้น (Bangtrakulnonth and Phan-Urai, 2004) และการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาดในกรุงเทพมหานคร พบว่ามีการตรวจเชื้อซัลโมเนลลา จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง ตรวจพบ 28 ตัวอย่าง โดยช่วง pH ของแหนมที่ตรวจพบมากที่สุดคือ 4.5-5.0 พบทั้งหมด 24 ตัวอย่าง และตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Anatum ในผลิตภัณฑ์แหนม จำนวน 13 ตัวอย่าง (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2546) จากรายงานผลวิจัยดังกล่าวทำให้ทราบถึงโอกาสการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลา เข้าสู่ผลิตภัณฑ์แหนมได้ นอกจากนี้พบว่า *S.* Anatum ที่พบในผลิตภัณฑ์แหนมสามารถทนต่อสภาวะการหมักแหนมได้ดีกว่าเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2533)

เชื้อซัลโมเมลลา เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร เชื้อซัลโมเมลลาสายพันธุ์ใหม่ที่พบรายงานครั้งแรกในประเทศไทยนั้น มีการรายงานถึงผู้ป่วยจากเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวจากผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น *S.* Bangkok ตรวจพบในผู้ป่วยที่มีการบริโภคอาหารในกรุงเทพมหานคร (Bangtrakulnonth et al., 1995), *S.* Ratchaburi ตรวจพบจากการประกอบอาหารในโรงอาหารของโรงพยาบาลที่จังหวัดราชบุรี (Bangtrakulnont et al., 1999) และ *S.* Lamphun ตรวจพบในอาหารสัตว์ที่จังหวัดลำพูน (Kusum et al., 2005) ซึ่งเชื้อซัลโมเมลลาสายพันธุ์ที่พบครั้งแรกในไทยยังไม่มีรายงานการตรวจพบในผลิตภัณฑ์แหนม อย่างไรก็ตามอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวในระหว่างการผลิตแหนมได้ ถ้าหากผู้เกี่ยวข้องในการผลิตเป็นพาหะของเชื้อ และมีการดูแล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีของผู้ผลิตในกระบวนการผลิต ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารจากเชื้อกลุ่มนี้ได้

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอาหารหมักมานาน และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ ที่มีกลิ่นและลักษณะอาหารที่ดีด้วย โดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลหรือสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก กรดแลคติก นอกจากผลิตกรดแลคติกแล้วยังสามารถผลิตสารอื่น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ไดอะซิติล (diacetyl) และริวเทอรีน (ศิพัตม์ รักษ์เผ่า, 2539) นอกจากนี้มีการศึกษาการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมที่ดี เช่น งานวิจัยของอดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ศึกษาการใช้ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม Visessanguan et al. (2006)ได้ศึกษาการเติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus. curvatus* เพื่อใช้เพิ่มอัตตาการหมักและการควบคุมคุณภาพแหนมเมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อให้ผลของค่า pH และปริมาณกรดแลคติกที่ต่ำกว่าสูตรที่เติมกล้าเชื้อ เพื่อพัฒนาการนำกล้าเชื้อในการหมักแหนม

ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ในการผลิตแหนมต่อการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาที่พบครั้งแรกในไทยได้แก่ *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi เพื่อลดโอกาสปนเปื้อนสู่ผู้บริโภค โดยศึกษาสมบัติการยับยั้งเชื้อของกรดแลคติก เกลือไนไตรท์ กระเทียม และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนม ในการศึกษาได้นำเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ในกลุ่ม pediocin PA-1 และทำการแยกมาจากผลิตภัณฑ์แหนม (Swetwiwathana, 2005) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมเพื่อควบคุมคุณภาพให้สม่ำเสมอ และอาศัยสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา (Swetwiwathana et al., 2007) มาทำการควบคุมการเจริญและยับยั้งเชื้อในกระบวนการหมักแหนม

ในการศึกษาดังกล่าวจำเป็นจะต้องลดผลกระทบต่อการศึกษาจากสภาพแวดล้อมของการหมักแหนมซึ่งมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการจากวัตถุดิบ ดังนั้นจึงศึกษาทั้งในสภาวะจำลองการหมักแหนม (Nham model broth, NMB) เพื่อควบคุมและลดการปนเปื้อนจากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าว รวมทั้งการทดสอบในผลิตภัณฑ์แหนม เพื่อการยืนยันผลของการทดลองในแบบจำลองสภาวะจำลองการหมักแหนม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา ได้ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วัตถุดิบที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยใช้เนื้อหมู ที่ได้รับการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารและจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยการฉายรังสีที่ 2-3 กิโลเกรย์ และตรวจติดตามการเจริญของกล้าเชื้อ *P. pentasaceus* TISTR 536 ในการผลิตแหนม ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อยืนยันคุณสมบัติการทนของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะการหมักในผลิตภัณฑ์แหนมเพื่อเป็นที่ยอมรับและสร้างความมั่นใจแก่ผู้บริโภคในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมต่อไปในอนาคตอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลของกรดแลคติก แบคทอริโอซิน pediocin PA-1 และไนไตรท์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

1.2.2 ศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่คัดเลือกได้ ในแบบจำลองการหมักแหนม

1.2.3 ศึกษาผลขององค์ประกอบในการผลิตแหนม เช่น กระเทียมสับ และ เกลือไนไตรท์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่คัดเลือกได้ในแบบจำลองการหมักแหนม

1.2.4 ศึกษาการใช้กล้าเชื้อแบคที่เรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่คัดเลือกได้ในผลิตภัณฑ์แหนม รวมทั้งการตรวจสอบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักแหนมด้วยวิธี PCR -RELP

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของการปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ด้วยกรดแลคติก และเกลือไนไตรท์ ร่วมกับผลของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 จากเชื้อ *P. pentasaceus* TISTR 536 เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ*S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อซัลโมเนลลาที่ทนต่อสภาวะต่างๆ และศึกษาผลของผลขององค์ประกอบในการผลิตแหนม เช่น กระเทียม เกลือไนไตรท์ ร่วมกับกล้าเชื้อแบคที่เรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลคติกที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเชื้อซัลโมเมลลาที่คัดเลือกได้ในแบบจำลองการหมักแหนมและในผลิตภัณฑ์แหนม รวมทั้งศึกษาตรวจสอบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงผลกรดแลคติก แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ไนไตรท์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองการหมักแหนม

1.4.2 ทราบถึงผลขององค์ประกอบในการผลิตแหนม และการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่สร้างสารแบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์แหนม

1.4.3 เป็นข้อมูลในการลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนมด้วยการหมักแหนมจากกล้าเชื้อแบคที่เรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน เพื่อความปลอดภัยและความมั่นใจของผู้บริโภคในการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหนม

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแหนม

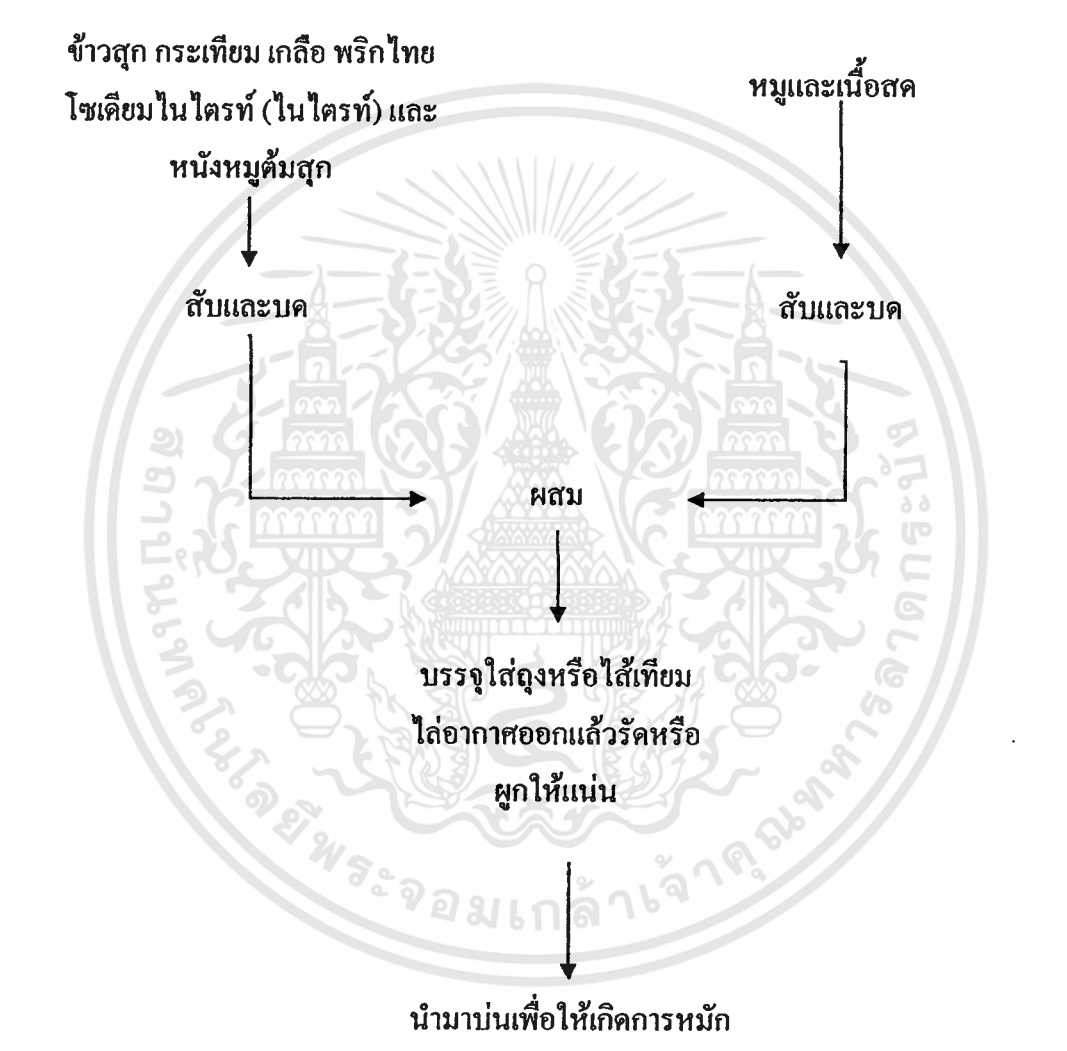
แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อส่วนที่แยกไขมันและเอ็นออก อาจผสมส่วนประกอบอื่น เช่น หนัง หรือเอ็น เติมเกลือ ข้าวเจ้าสุก กระเทียม ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำตาล พริกสด ห่อเป็นมัดหรือบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม หมักจนมีรสเปรี้ยว สำหรับคุณลักษณะของแหนมนั้นต้องมีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ ไม่มีโพรงอากาศ และมีน้ำที่เกิดจากการหมักได้เล็กน้อย มีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ มีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น รสขม ลักษณะเนื้อต้องแน่น ไม่ยุ่ย และต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดินทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์ หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหารให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้ โซเดียมไนไตรท์หรือโพแทสเซียมไนไตรท์ (คำนวณเป็นโซเดียมไนไตรท์ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก (เกลือ : เกลือไนไตรท์ในสัดส่วนร้อยละ 94 : 6) ต้องไม่เกิน 2 กรัมต่อกิโลกรัม และฟอสเฟตในรูปของโมโน-ไค- และโพลิของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกัน (คำนวณเป็น P_2O_5 จากฟอสฟอรัสทั้งหมด) ต้องไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และความเป็นกรดด่าง (pH) ต้องไม่เกิน 4.6 ทางด้านจุลินทรีย์ต้องไม่พบเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*) ในตัวอย่าง 25 กรัม เชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ยีสต์และราต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากนั้นบรรจุแหนมเนื้อในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2546)

2.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแหนมและกระบวนการผลิตแหนม

การผลิตแหนมนั้นจะใช้เนื้อบริเวณสะโพก ข้าวเจ้าหุงสุก กระเทียมปอกเปลือก เกลือป่น โซเดียมไนไตรท์ และหนังหมูต้มสุก โดยนำเนื้อสะโพกมาหั่นเป็นชิ้นขนาดกว้าง 2-3 นิ้ว นำเนื้อที่ได้ไปบดด้วยเครื่องบด เตรียมเครื่องปรุงตามสูตรจากนั้นผสมเครื่องปรุงทั้งหมดลงในเนื้อบดแล้วนวดเครื่องปรุงกับเนื้อบดให้เข้ากันจนส่วนผสมเหนียว ใช้เวลาประมาณ 5 นาที ถ้านวดนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกินไปแหนมที่ได้จะร่วนไม่ยึดติดกัน เนื่องจากอุณหภูมิของเนื้อร้อนเกิน 15 องศาเซลเซียส นำส่วนผสม ที่ได้ไปบรรจุลงในถุงพลาสติกตามขนาดและน้ำหนักที่ต้องการ เช่น ในหลอดพลาสติกขนาด 100 กรัม หรือบรรจุลงในถุงพลาสติกขนาด 4×6 นิ้ว บรรจุแหนมน้ำหนัก 20 กรัม การบรรจุต้องไล่อากาศภายในหลอดหรือถุงออกให้หมด ถ้ามีอากาศเหลืออยู่แหนมจะเน่าได้ เก็บแหนมไว้ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จนแหนมเปรี้ยวแล้วจึงนำไปรับประทาน ควรปรุงสุกก่อนการรับประทาน เก็บแหนมไว้ในตู้เย็นดังรูปที่ 2.1 (ดัดแปลงจาก Warawut Krusong, 2004)



รูปที่ 2.1 แผนภาพกระบวนการผลิตแหนม

ที่มา: ดัดแปลงจาก Warawut Krusong (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 โซเดียมไนไตรท์และผลที่เกี่ยวข้องกับแหนม

โซเดียมไนเตรตและไนไตรท์ทั้งในรูปของเกลือโปแตสเซียม หรือเกลือโซเดียม ช่วยให้เกิดสีชมพูหรือสีชมพูแดง (reddish pink) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ไนไตรท์ยังมีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยลดการเกิดกลิ่นหืน (oxidative rancidity) ในผลิตภัณฑ์และสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายถึงชีวิต (Botulism) สำหรับการใช้เกลือไนเตรตมักจะใช้ร่วมกับเกลือไนไตรท์ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 (2547) กำหนดให้ใช้เกลือไนไตรท์ในปริมาณไม่เกิน 125 พีพีเอ็ม (ppm) โดยคำนวณเป็นปริมาณโซเดียมไนไตรท์และการใช้เกลือไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนื้ออยู่ที่ปริมาณไม่เกิน 500 พีพีเอ็ม (ppm) สำหรับในประเทศไทยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนแหนมหมู (2548) กำหนด โซเดียมไนไตรท์หรือโพแทสเซียมไนไตรท์ (คำนวณเป็นโซเดียมไนไตรท์) ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก (เกลือ : เกลือไนไตรท์ ในสัดส่วน 94.6 เปอร์เซ็นต์) ต้องไม่เกิน 2 กรัมต่อเนื้อสัตว์ / กิโลกรัมหากใช้เกินกำหนดจะมีโอกาสเสี่ยงต่อปัญหาของการตกค้างในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากไนไตรท์ที่ตกค้างนี้จะทำปฏิกิริยากับกลุ่มเอมีน (amines) ในเนื้อสัตว์และเปลี่ยนเป็นสารไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง สารนี้มักพบในผลิตภัณฑ์เนื้อแบบใช้การหมัก (curing) ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงๆ เช่น การปิ้งหรือการย่าง ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อ มีการใช้เกลือไนไตรท์ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2552) นอกจากนี้ Human Health Fact Sheet Nitrate and Nitrite มีคำแนะนำโดย Environmental Protection Agency (US EPA) ถึงปริมาณบริโภคของไนเตรทและไนไตรท์ที่ไม่มีผลต่อการก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง พบว่าปริมาณบริโภคของไนเตรทต่อวันอยู่ที่ 1.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไนไตรท์ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการขับถ่ายและระบบเมตาบอลิซึมของผู้บริโภคที่จะสามารถขับสารที่ตกค้างได้ ถ้าในกรณีความสามารถในการขับของเสียไม่ดีอาจจะก่อให้เกิดมะเร็งจากสารไนโตรซามีนได้ โดยมีการศึกษาการใช้เชื้อ *Micrococcus varians* ในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ เพื่อลดการตกค้างของสารและเพิ่มสีของผลิตภัณฑ์แหนม โดยในช่วงแรกของการหมักเชื้อ *M. varians* ทำการรีดิวส์ไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และเมื่อแหนมมีค่าความเป็นกรดมากไนไตรท์จะสลายตัวเป็นไนตริกออกไซด์ และทำการรีดิวส์รวมตัวกับเมทไมโอโกบินจะได้ผลิตผลของการออกซิเดชั่นเป็นไนโตรโซไมโอโกบินและให้สีชมพูแก่แหนม ซึ่งสีดังกล่าวเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของแหนมว่ามีการเน่าเสียหรือไม่ งานวิจัยดังกล่าวเชื้อ *M. varians* ช่วยในการลดการตกค้างจากสารดังกล่าวได้ดีกว่าการที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อดังกล่าว (ไพโรจน์ วิริยจารีและคณะ , 2538; 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 กระเทียมและสารออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องในแหนม

กระเทียม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. เป็นพืชในตระกูล Amaryilliaceae เป็นพืชล้มลุก ลำต้นมีลักษณะเป็นหัวอยู่ใต้ดิน ภายในหัวมีกลีบย่อยหลายกลีบเบียดเรียงราย เนื้อในมีสีขาวนวล กลิ่นฉุน รสเผ็ดร้อน แต่มีกระเทียมบางชนิดที่เป็นหัวเดียวโดยไม่มีการแบ่งกลีบเรียกว่ากระเทียมโทน ใบกระเทียมมีสีเขียว ยาวแบน ส่วนปลายจะแหลม ข้างในกลวง ดอกกระเทียมจะมีสีอมเหลือง หรือ ชมพูอมม่วง กระเทียมเป็นพืชที่ใช้ในการประกอบอาหารและเป็นพืชสมุนไพรรักษาโรคได้หลายชนิด ประเทศที่ปลูกกระเทียมได้มากคือ สาธารณรัฐประชาชนจีน เกาหลีใต้ และอินเดีย พื้นที่ปลูกในไทยจะอยู่แถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (กระเทียม, 2554)

ประโยชน์ของกระเทียมยังช่วยในระบบการย่อยอาหารและขับถ่ายในร่างกายให้มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีสารอัลลิซิน (allicin) สามารถรวมตัวกับวิตามินบีหนึ่งและโปรตีนได้จึงช่วยในการดูดซึมสารอาหารที่ลำไส้ และยังช่วยในการลดคลอเรสเตอรอลในเลือดอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีสารประกอบของกำมะถันที่มีส่วนช่วยในการขับโลหะหนักได้อีกด้วย (พันทิพา สุวรรณรัตน์, 2550)

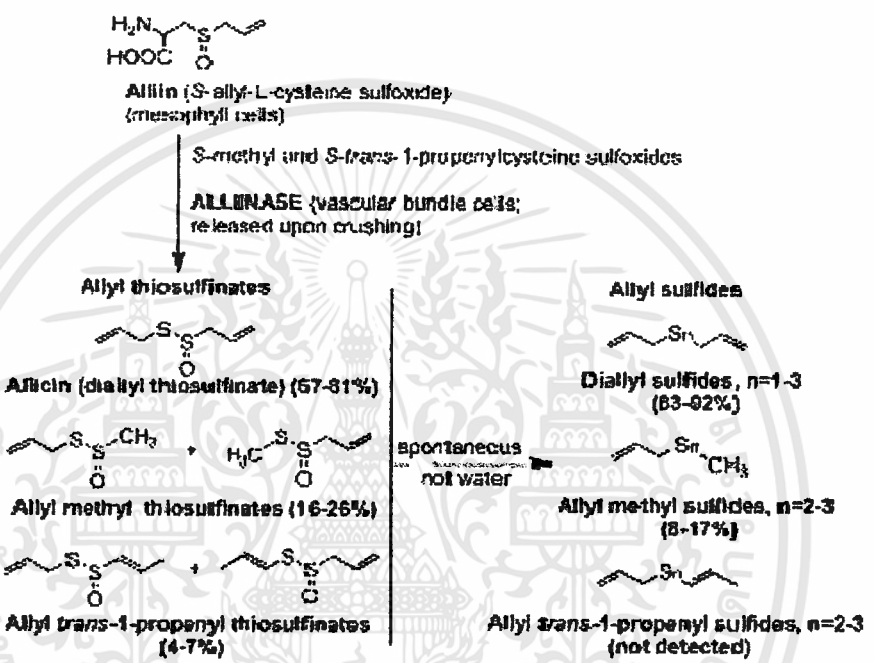
ประโยชน์และสรรพคุณทางยาของกระเทียม ประกอบด้วย (พันทิพา สุวรรณรัตน์, 2550)

1. ลดระดับไขมันในเลือดและลดระดับคลอเลสเตอรอล
2. ต้านการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด ป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในร่างกาย
3. ป้องกันหัวใจเต้นผิดจังหวะ
4. ลดความดันโลหิต
5. ลดระดับน้ำตาลในเลือด
6. ต้านการเกิดเนื้องอก มะเร็งและต้านการก่อการกลายพันธุ์
7. ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียดื้อยา ไวรัส โปรตัวซัว และพยาธิไส้เดือน
8. ต้านการเกิดออกซิเดชั่น
9. ลดอาการพิษที่เกิดจากตะกั่ว

สารยับยั้งจุลินทรีย์ในกระเทียม กระเทียมมีสารอัลลิซิน (allicin) สารอัลลิซินเป็นสารให้กลิ่นนั้นเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลลิเนส (allinase) เปลี่ยนอัลลิอิน (alliin) ให้เป็นอัลลิซิน (allicin) ดังภาพที่ 2.2 สร้างดังกล่าวจะถูกทำลายได้โดยความร้อนและด่าง แต่จะไม่ถูกทำลายในกรด ซึ่งสารดังกล่าวสามารถยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซน์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phophatase) ยูรีเอส (urease) ซัลซินิคดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase) โคลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) โคลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นออกซิเดส (choline oxidase) ไกลออกซอเลส (lyoxylase) โดยเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจของเชื้อจุลินทรีย์หรือการเจริญเติบโตของเชื้อ เป็นผลทำให้หยุดการเจริญและถูกทำลาย สำหรับเอนไซม์ที่ถูกทำลายโดย อัลลิซินส่วนมากจะมี หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group,-SH) อยู่ด้วย หมู่ SH นี่จะสามารถรวมกับ S-O-S- ในโครงสร้างของอัลลิซิน ได้อย่างรวดเร็ว จึงมีผลให้เกิดปฏิกิริยาที่โดยเอนไซม์ถูกทำลาย โดยหมู่ SH มีผลต่อจุลินทรีย์อย่างมาก เพราะเป็นตัวกระตุ้นจำเพาะต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ (Talia et al., 2001)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสารประกอบอัลลิซิน

ที่มา: Lawson and Gardner (2005)

2.1.5 จุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแหนม

ในการหมักแหนมเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยในระยะแรกของการหมักจะมีจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างกรดได้ดี และเติบโตในที่มีอากาศน้อย ได้แก่ homofermentative cocci เช่น *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เติบโตไปพร้อมกับ heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus brevis* หลังจากการหมัก 3 วัน homofermentative cocci จะใช้น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง ต่อมาการหมักในวันที่ 4 จะพบเชื้อ heterofermentative lactobacilli คือ *Lb. plantarum* สร้างกรดออกมา ในขณะที่ *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้น้อย จะเจริญช้าลงและหยุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญในที่สุด ในระยะนี้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 4.5 มีผลทำให้จุลินทรีย์บางชนิด คือโคลิฟอร์ม (Coliforms) และเชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella*) ตายเกือบหมด (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

2.2 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) มีบทบาทในการหมักอาหารหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักผลไม้ดอง ไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมร่วมกับยีสต์ในการหมักเต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว สุราและผลิตภัณฑ์แป้งหมักได้ ดังนั้นบทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียจึงได้แก่ การผลิตกรด ทำให้เกิดกรด ทำให้เกิดรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมของสารต่างๆ และยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์ (นภา โล่ทอง, 2537)

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนหรือกลม ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase negative) ไม่ต้องการอากาศ การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้เป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ จะเกิดขึ้นในกระบวนการไกลโคไลซีสของแบคทีเรียกรดแลคติก (Erkkila, 2001)

2.2.2 การแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกได้ถูกจำแนกไว้ทั้งหมด 12 สกุลด้วยกัน ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

การแบ่งตามลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติก (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

1. เชื้อรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*

2. เชื้อรูปร่างกลม โดยมีการแบ่งเซลล์ 2 ระนาบเป็น 4 เซลล์ *Aerococcus Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

3. เชื้อรูปร่างกลม เป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus Enterococcus Lactococcus Vagococcus* และ *Leuconostoc*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

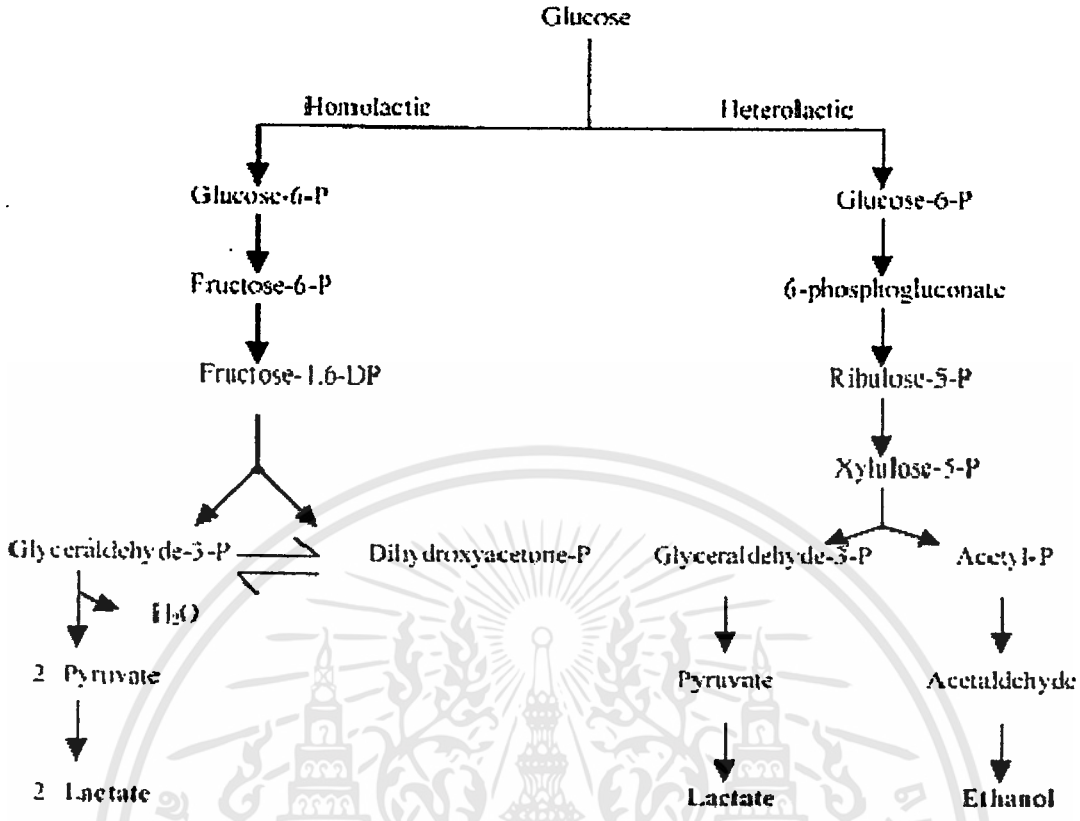
1. Homofermentative เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคส โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวต และอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน glycolysis (Embden-Meyerhof Parnas pathway : EMP) ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delrueckii*

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคส 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัล-3-ฟอสเฟต (glyceroldehydl-3-p) (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2โมเลกุลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ ถูกใช้ไปในการออกซิเดชั่นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอตเฟต ดังภาพที่ 2.3

2. Heterofermentative เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25เปอร์เซ็นต์ กรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติกและเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์โดยผ่าน phosphoketolase pathway ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Lauconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *Lb. plantarum, Lb. casei* และ *Lb. brevis*

กระบวนการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตหลายชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก กรดแลคติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดย ผ่าน phosphoglyconate หรือ phosphoketolase pathway กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชั่น (oxidation) และดีคาร์บอกซิลเลชั่น (decarboxylation) ร่วมด้วยน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอนถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอตเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และอะซิทิลฟอตเฟต (acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phophoketolase enzyme) กลีเซอรัลดีไฮด์ ฟอตเฟต (glyceroldehyde phosphate) จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (lactate) เช่นเดียวกับการเกิดไลโคไลซิสในการหมักแบบ homofermentative แต่เนื่องจากการหมักแบบ heterofermentative มีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1โมเลกุล จึงเกิด ATP 1 โมเลกุล ดังภาพที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การหมักแบบ homofermentative และ heterofermentative ของแบคทีเรียแลคติก
ที่มา: อัจฉรา เพิ่ม (2549)

2.2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกได้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับอาหารหมักมานาน และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ ที่มีกลิ่นและลักษณะอาหารที่ดีด้วย โดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลหรือสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก กรดแลคติกที่ผลิตขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นโดยสามารถสร้างขึ้นในปริมาณมากและปล่อยออกนอกเซลล์ นอกจากผลิตกรดแลคติกแล้วยังสามารถผลิตสารอื่นขึ้นมาได้แต่ผลิตได้ในปริมาณน้อย เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ไดอะซิติล (diacetyl) และริวเทอรีน (ศิพัฒม์ รักษ์เผ่า, 2539)

1. กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สำคัญที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดแลคติก ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เกิดการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์แลคแตสดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) และเมื่อมีการสะสมมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง จึงมีสภาพเป็นกรดมากเกินไปไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ส่งผลให้สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย พบว่ากรดแลคติกจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกออกและเอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ หรือกรดแลคติกอาจแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้โดยตรง และเข้าไปอยู่ในส่วนของไซโตรพลาสซึม (cytoplasm) ที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า ดังนั้นจึงเกิดการปลดปล่อยโปรตอนออกมานอกเซลล์เพื่อรักษาสมดุลของความเป็นกรดด่าง จึงทำให้เกิดการทำลายแรงขับเคลื่อนโปรตอน และทำลายกระบวนการเคลื่อนย้ายสารอาหารต่างๆ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (De Vuyst, L. and E.J Vandamme, 1994)

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ความเป็นพิษของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจเป็นผลมาจากการเกิดออกซิเดชันที่เยื่อหุ้มเซลล์ไขมันซึ่งจะแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้น มีผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยมีการจับออกซิเจนไว้ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ในสภาวะไร้อากาศจึงไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้และยังทำลายโครงสร้างโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกและเซลล์โปรตีน (De Vuyst, L. and E.J Vandamme, 1994)

3. คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide)

Caplice and Fitzgerald (1999) รายงานว่า คาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลคติกแบบ heterofermentative ได้โดยตรงในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนและเป็นพิษต่อจุลินทรีย์อื่นที่ใช้ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ด้วยกลไกการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจน ส่งผลให้ความเป็นกรดด่างทั้งภายในและภายนอกเซลล์จึงทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

4. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2550) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินหมายถึง สารที่เป็นพันธะเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซมและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด และแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่นคือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (cluster) ในโอเปอรอน ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 กลุ่ม (class) ซึ่งส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน class I และ class II

1. Class I

มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว จะเข้ารวมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเทอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมธิลแลนไธโอนีน (methyllanthionine; MeLan) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก (lantibiotics) แลนติไบโอติกมักแบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลัก คือ type A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ type B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอซาซิดิน (mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ อย่างไร ก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้ คือ ไนซิน (nisin) อีพิเดอมิน (epidermin) สเตรปติน (streptin) เปป 5 (pep 5) แลคติซิน 481 (lacticin 481) เมอซาซิดิน (mersacidin) แอลทีเอ็นเอ 2 (LtnA 2) ไซโตไลซิน (cytolysin) แลคโตซิน เอส (lactocin S) ซินนามัยซิน (cinnamycin) และ ซับแลนซิน (sublancin)

2. Class II

มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ปัจจุบันที่พบมากมี 2 subclass คือ subclass IIa มีชื่อว่า pediocin -like (หรือเรียกว่า *Listeria*-active) และ subclass IIb หรือ แบคทีริโอซินที่มี 2 องค์ประกอบ (two-component bacteriocins) ใน class IIa ตัวที่มีการ ศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับ ของกรดอะมิโน 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) ubclass IIa ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร subclass IIb หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มี แอคติวิตีหรือมีแอคติวิตีเหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (lactococcin G) นอกจากนี้ยังมี subclass IIc (*sec*-dependent bacteriocins) ตัวอย่างเช่น อะซิโดซิน B (aidocin B) ไดเวอจิซิน A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(divergicin A) แบคเทอริโอซิน 31 (bacteriocins 31) และเอนเทอโรซิน P (enterocin P) และ subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่น ตัวอย่างเช่น แลคโตคอกซิน A และ B ไดอะเซติน บี (diacetin B) อะซิโดซิน 8912 (acidocin 8912) เป็นต้น

3. Class III

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class Iและ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A)

4. Class IV

Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิค (glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วยนอก เหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคทีริโอซินกลุ่มนี้ เช่น ลิวโคซิน S (leucocin S) และ แลคโตซิน 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือมีเซ็นเทอริซิน 52 (mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550)

สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งในสภาพเซลล์ปกติและสปอร์ โดยจะเข้าไปมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินจะถูกดูดซึมเข้าไปทางผนังเซลล์และมีผลทำให้มีการสูญเสียองค์ประกอบที่สำคัญจำพวก ATP จากเซลล์ทำให้เซลล์ถูกย่อยสลายไป ส่งผลให้มีการเคลื่อนย้าย อิออนอย่างอิสระและสูญเสียแรงเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force; PMF) จึงทำให้ความต่างศักย์ลดลงและไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้น ดังนั้นเมื่อเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่น้ำสามารถไหลเข้าพร้อมกับการไหลออกของสารโมเลกุลขนาดเล็ก จึงทำให้เซลล์เกิดการแตกจากแรงดันออสโมติก (Sahl et al., 1995) นอกจากนี้ยังไปมีผลยับยั้งการทำงานของหมู่ (sulphydryl group) บนโปรตีนใน (cytoplasmic membrane) ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ สำหรับการยับยั้งสปอร์ โดยจะมีผลไปยับยั้งสปอร์ในกระบวนการงอกของสปอร์ ส่งผลให้สปอร์ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้มทำให้มันกลายสภาพไปเป็นเซลล์ปกติ ซึ่งสามารถยับยั้งสปอร์ของ *Clostidium botulinum* และ *Bacillus cereus* (ศิพัตม์ รักษ์เผ่า, 2539)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์มีการผลิตแบคเทอริโอซินแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.1 เทคโนโลยีใหม่ที่ใช้ในการเพิ่มความปลอดภัยของอาหารโดยการพัฒนานำแบคเทอริโอซินเพื่อตัวควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น ไนซิน (nisin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของไนซิน (nisin) ขึ้นอยู่กับ receptor ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ปัจจุบันแบคเทอริโอซินได้รับอนุญาตให้มีการใช้ในอาหารในหลายประเทศ ซึ่งใช้เป็นสารเพื่อป้องกันการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ (Hampikyan and Ugur, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก

สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก	ชนิดของแบคเทอริโอซิน
Lactococcus (*Lc.*)	
Lc. lactis subsp. *lactis*	
e.a. ATCC 11454	ไนซิน (nisin) A
e.a. NIZO 22186	ไนซิน (nisin) Z
CNRZ 481	lacticin 481
Lc. lactis subsp. cremoris	
e.a. 346	Diplococcin
LMG 2130	lactococcin A
Lactobacillus (*Lb.*)	
Lb. acidophilus	
2181	Acidolin
TK 8912	acidocin 8912
N 2	lactacin B
Lb. sake	
Lb 706	sakacin A
L 45	lactocin S
Pediococcus (*P.*)	
P. pentosaceus	
e.a. FBB-61, L-7230	pediocin A
N5p	pediocin N5p

ที่มา : ดัดแปลงจาก De Vuyst, L. and E.J Vandamme (1994)

5. ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิลได้ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซิทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเตรท (citrate) โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผ่านไพรูเวตไปเป็นสารไดอะซิทิล และอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์ คือ อะซิโตอิน (acetoin) (Caplice and Fitzgerald, 1999)

ไดอะซิทิลเป็นสารให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด ความเข้มข้นของไดอะซิทิลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดอะซิทิลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป (วรายุทธ สุระนรากุล, 2549)

6. ริวเทอรีน (Reuterine)

ริวเทอรีน ผลิตได้ในระหว่างระยะ stationary phase โดยแบคทีเรียชนิด *Lb. reuteri* ที่มีการเจริญแบบไม่ต้องการออกซิเจน สร้างจากกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์ สามารถยับยั้งกิจกรรมไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเตส (ribonucleotide reductase) เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต่อต้านไวรัส ราและโปรโตซัว (Caplice and Fitzgerald, 1999)

2.3 เชื้อซัลโมเนลลา (*Salmonella* spp.)

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อซัลโมเนลลา

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ (2545) กล่าวว่าเชื้อซัลโมเนลลา เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าที่ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิเหมาะสม แต่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้บ่มเพาะเชื้อในขั้น selective enrichment เพราะที่อุณหภูมินี้ เชื้อซัลโมเนลลา สามารถเจริญแข่งกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดี ช่วงความเป็นกรดด่างในการเจริญเท่ากับ 4.0-9.0 และไม่ทนต่อแรงดันออสโมติก ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือแกงที่มีความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์และเกลือไนไตรท์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา ได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างลดลง สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา ดังตารางที่ 2.2 นอกจากนี้ซัลโมเนลลา ยังเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางด้านอาหารเนื่องจากเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ติดต่อผ่านการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเท่านั้น ส่วนใหญ่จะพบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่างๆ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อหมู และเนื้อวัว เป็นต้น และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยการปนเปื้อนมาจากอากาศ เครื่องมือและอุปกรณ์ในระหว่างการผลิต ความสามารถในการทนความร้อนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ และสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโต เชื้อซัลโมเนลลาอาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร ลำไส้ของสัตว์ต่าง ๆ เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง คน และบางทีก็พบในแมลง โดยแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์ เชื้อซัลโมเนลลาอาจพบในน้ำ โดยเฉพาะในน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ และในอาหารที่มีแมลงวันตอม เมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำ ที่มีเชื้อนี้เข้าไปจะแสดงอาการป่วยออกมา ในกรณีที่ไม่แสดงอาการของโรคทำให้เป็นพาหะนำโรค (carrier) โดยสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง พบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
123750

สูงสุด 15.38 เปอร์เซ็นต์ อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อซัลโมเนลลาสูงสุดในฤดูร้อน และต่ำสุดในฤดูฝน เชื้อซัลโมเนลลาในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม ปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทาง ซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่ง ถ้านำสัตว์ที่มีเชื้อซัลโมเนลลา มาใช้เป็นอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา

Biochemical test	Reaction
Glucose	+
Lactose	-
Sucrose	-
Catalase reaction	+
Oxidase reaction	-
Nitirte reduction	+
Lysine decarboxylase	+
Arginine dehydrolase	+ w / o H_2S
Ornithine dehydrolase	+ w / o H_2S
Indole	-
Citrate	+/ -
MR	+
VP	-
Phenylalanine	-
Urease	-
Gelatin	-
G+C (mole% of DNA)	50-53

ที่มา: อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การเลือกพาหะนำโรคของเชื้อซัลโมเนลลา

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ (2545) กล่าวถึงการเลือกพาหะนำโรคของเชื้อซัลโมเนลลาไว้ดังนี้

1. เชื้อซัลโมเนลลาที่อาศัยคนเป็นโฮสต์ เชื้อซัลโมเนลลาในกลุ่มนี้เป็นโรคติดต่อ ในคนเท่านั้นได้แก่ *S.* Typhi ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (Typhoid fever) เป็นสปีชีที่มีอันตราย รุนแรงมากที่สุด ส่วน *S.* Paratyphi A, *S.* Paratyphi B และ *S.* Paratyphi C ทำให้เกิดโรคไข้ รากสาดน้อย (paratyphoid fever) ซึ่งมีอาการคล้ายกับอาการของไข้ไทฟอยด์ แต่รุนแรง น้อยกว่าไข้รากสาดน้อยเป็นโรคติดต่อในคนเช่นเดียวกับอาการของไข้ไทฟอยด์ มีระยะเวลา ฟักตัวนาน ผู้ป่วยมีอุณหภูมิของร่างกายสูงมาก มีผลทำให้อัตราการตายสูง และอาจตรวจ พบเชื้อ *S.* Typhi ในเลือด ในอุจจาระและในปัสสาวะของผู้ป่วยด้วย

2. เชื้อซัลโมเนลลาที่ปรับตัวตามโฮสต์ เชื้อซัลโมเนลลาในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่แพร่จากสัตว์ ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะมาสู่คน เนื่องจากอาศัยอยู่ในสัตว์ เมื่อนำสัตว์มาใช้เป็นอาหารก็จะแพร่มาสู่คน และทำ ให้คนเป็นโรคได้ ตัวอย่างเช่น *S.* Gallinarum และ *S.* Pullorum ซึ่งอาศัยเป็ดไก่เป็นโฮสต์ *S.* Dublin อาศัยวัวเป็นโฮสต์ *S.* Abortus-equi อาศัยม้าเป็นโฮสต์ *S.* Abortus-ovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ *S.* Choleraesuis อาศัยสุกรเป็น โฮสต์ และ *S.* Enteritidis พบมากในไข่และในสัตว์ปีกที่มีชีวิต เป็นต้น

3. เชื้อซัลโมเนลลาที่ไม่เลือกโฮสต์ เป็นเชื้อซัลโมเนลลานอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว สามารถแพร่จากคนและสัตว์เป็นโรค รวมทั้งอาหาร น้ำ ดิน และสิ่งแวดล้อมได้แก่ เชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นับเป็นซัลโมเนลลาที่มีความสำคัญ และจะต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการสุขาภิบาลอาหารที่ดี เพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายของโรค เชื้อในกลุ่มนี้เรียกว่า non typhoidal salmonellosis ทำให้เกิดโรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้เกิดอาการทางลำไส้และบางเซโรวาร์เท่านั้นที่บุกรุกเข้ากระแสโลหิตและทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบอื่นๆ ซัลโมเนลโลซิสมิใช่โรคติดเชื้อร้ายแรงที่ส่วนใหญ่ต้องรับการรักษาโดยปัจจุบันทันด่วน ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจมีอาการไม่มากแต่ก็มีผล กระทบต่อสุขภาพโดยทั่วไปและต่อประสิทธิภาพของการทำงาน ซึ่งมิสามารถคำนวณออกมาเป็นค่าของการสูญเสียที่ชัดเจน สถานการณ์ปัจจุบันในประเทศไทยที่ยังขาดการบริการ ทางห้องปฏิบัติการที่จะช่วยให้สามารถวินิจฉัยโรคซัลโมเนลโลซิส ได้ถูกต้องสวนทางกับการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์และอาหารสำเร็จรูปที่เห็นความสำคัญของการควบคุมคุณภาพด้านจุลินทรีย์มากน้อยต่างกัน ตลอดจนการเคลื่อนตัวของประชากรเข้าสู่เมืองใหญ่ๆ และการเกิดธุรกิจการจำหน่ายอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งปรากฏให้เห็นอยู่โดยทั่วไป เหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรจะคาดคะเนได้ว่าหากยังไม่สามารถลดการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในเครื่องอุปโภคของคนแล้วการติดเชื้อจากซัลโมเนลลาจะมีแต่การเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 เชื้อซัลโมเนลลาที่พบครั้งแรกในประเทศไทย

ในประเทศไทย มีรายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา สายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยพบในที่ใดมาก่อน ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลา สายพันธุ์ใหม่ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 เป็นต้นมา มีรายละเอียดของแต่ละเชื้อดังนี้

2.3.3.1 *Salmonella* Bangkok

ในปี พศ. 2515 Bangtrakulnonth and Phan-Urai (1995) ได้พบเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ใหม่ซึ่งเป็นเซโรวาร์ (serovar) ที่ตรวจพบครั้งแรกในกรุงเทพ จากหนูบ้านและในปี พ.ศ. 2516 พบเชื้อในคนไข้ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 2 ราย คนแรกเป็นทารกหญิง อาศัยอยู่ในกรุงเทพ มีอาการอุจจาระร่วงและตรวจพบเชื้อในเลือด รายที่ 2 เป็นชายอายุ 45 ปี จาก จ. สุพรรณบุรี ซึ่งเป็นแผลในกระเพาะเนื่องจากพยาธิปากขอ ต่อมามีการตรวจพบเซโรวาร์ (serovar) นี้ 1-2 ครั้งต่อปี ทั้งจากคนและแหล่งอื่นๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2515 ถึงปี พ.ศ.2536 มีการตรวจพบโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รวม 29 ตัวอย่าง จากคน 14 ตัวอย่าง จากอาหาร 8 ตัวอย่าง จากน้ำ 5 ตัวอย่าง และจากสัตว์ 2 ตัวอย่างและชื่อสายพันธุ์คือ *Samonella* Bangkok Group P

2.3.3.2 *Salmonella* Lumphun

Kusum *et al.* (2006) ได้ค้นพบเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ใหม่จากในอาหารสัตว์ที่จังหวัดลำพูน ในปี ค.ศ. 2003 ยังไม่มีการรายงานว่ามีการติดสู่คนและสัตว์จนถึงปี ค.ศ. 2005 และชื่อสายพันธุ์คือ *Salmonella* Lumphun โดยอยู่ใน group E antigen 6, 8 :y:1, 2 เมื่อทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ ampicillin (10 มิลลิกรัม), chloramphenicol (30 มิลลิกรัม), cefotaxime (5 มิลลิกรัม), gentamicin (10 มิลลิกรัม), kanamycin (30 มิลลิกรัม), nalidixic acid (30 มิลลิกรัม), norfloxacin (10 มิลลิกรัม), trimethoprim-sufamethoxazole (25 มิลลิกรัม), และ tetracycline (30 มิลลิกรัม)โดยวิธี disc diffusion ให้ผลของการยับยั้ง เชื้อ 30.7, 19.1, 0.7, 8.6, 5.4, 39.3, 0.4, 28.7 และ 49.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและทำการวิเคราะห์น้ำหนักของดีเอ็นเอ (DNA) ทั้งหมด 11 ลำดับเบส ด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) มีน้ำหนัก 48, 65, 77, 105, 110, 170, 244, 330, 337, 453 และ 1,135 กิโลเบส (kbp.) ตามลำดับ

2.3.3.3 *Salmonella* Ratchaburi

เมื่อวันที่ 8-17 มิถุนายน พ.ศ. 2542 WHO National Salmonella and Shigella Center (NSSC) ได้รับเชื้อซัลโมเนลลา จากโรงพยาบาลศูนย์ราชบุรีจำนวน 18 สายพันธุ์ ซึ่งแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยเด็กเพศชาย 5 ราย เพศหญิง 5 ราย ผู้ป่วยชาย 1 ราย และเจ้าหน้าที่โรงครัวเพศหญิง 7 ราย มาทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามวิธี Edwards and Ewing และทดสอบคุณสมบัติทางซีโรวิทยาโดย Gard Technique ผลการศึกษา พบว่าเชื้อซัลโมเนลลา ทั้ง 18 สายพันธุ์จัดอยู่ใน Species I (enterica) และ subspecies I (enterica) อยู่ใน group E มี O antigen 3 และ 10 มี H antigen Phase I คือ z_{35} และ Phase II คือ 1, 6 สรุปมีโครงสร้าง *Salmonella* I. 3, 10 : z_{35} : 1, 6 เมื่อตรวจสอบจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่มือ Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars (1997) ไม่พบว่ามีเซโรวาร์ใดที่มีโครงสร้างเช่นนี้ และเมื่อได้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ 15 ชนิด ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 18 สายพันธุ์นี้ดื้อต่อ streptomycin และ erythomycin แต่ไม่ดื้อต่อยาอีก 13 ชนิดเหมือนกัน ได้ส่งเชื้อไปทดสอบที่ WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella (Institute Pasteur) ประเทศฝรั่งเศส ได้ผลการทดสอบเหมือนกับ NSSC และทาง Institute Pasteur ได้ส่งเชื้อนี้ไปที่ Atlanta USA และ Humburg Germany ผลการทดสอบตรงกันทั้ง 3 แห่งและได้มีมติว่าเป็น เชื้อซัลโมเนลลาเซโรวาร์ ใหม่ของโลก (Bangtrakulnonth *et al.*, 1999) ทางกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้เสนอชื่อว่า *Salmonella* Ratchaburi และได้ตีพิมพ์ใน WHO Collaborating Center for Salmonella

2.3.4 การเกิดโรคจากเชื้อซัลโมเนลลา

อังกูร เกิดพาณิช (2549) กล่าวว่าโรคจากเชื้อซัลโมเนลลา มีสาเหตุจากสารพิษ 2 ชนิดที่สร้างโดยแบคทีเรีย คือ เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) และไซโตทอกซิน (cytotoxin) โดยที่เอนเทอโรทอกซินจะมีผลต่อ adenylate cyclase system ทำให้ปริมาณ (cAMP) ในลำไส้เพิ่มขึ้นและชักนำให้เกิดการสะสมของของเหลวภายในเซลล์ของลำไส้ ส่วนไซโตทอกซินจะไปทำลายเซลล์บุผนังลำไส้ทำให้เชื้ออื่นๆ เข้าทำลายเยื่อบุผนังลำไส้ได้ง่าย ทำให้ลำไส้อักเสบ เยื่อบุผนังลำไส้ถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น การได้รับเชื้อซัลโมเนลลา เป็นสาเหตุของการเกิดโรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) ซึ่งทำให้เกิดอาการของกลุ่มโรคได้ 3 ลักษณะ คือ

2.3.4.1 ไข้เอนเทอริก (Enteric fever)

ไข้ไทฟอยด์และไข้พาราไทฟอยด์เกิดจากเชื้อ *S.* Typhi และ *S.* Paratyphi A, B และ C ตามลาดับ มีอาการคล้ายกัน แต่อาการไข้พาราไทฟอยด์มีอาการอ่อนกว่าไข้ไทฟอยด์ เชื้อ *S.* Typhi ที่ปนเปื้อนกับอาหารเข้าไปจะผ่านลำไส้เล็กแล้วเข้าสู่กระแสเลือดเกิดอาการโลหิตเป็นพิษและกระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ เกิดการติดเชื้อทั่วร่างกาย ผู้ป่วยจะมีอาการอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ มีอาการไข้สูงหลายวัน ไอ เบื่ออาหาร ท้องผูกหรือท้องเดิน ปวดท้อง ตับและม้ามโต คลื่นไส้ อาเจียน มีเลือดกาเดาไหล เลือดออกเป็นจุดๆ ใต้ผิวหนัง บริเวณหน้าอกและลาตัว เหงื่อออกมาก รู้สึกหนาว ตัวสั่น มึนงง และถ้าอาการรุนแรงจะถ่ายเป็นเลือด หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ ปวดกล้ามเนื้อ ไข้จะขึ้นสูงตลอด (39.5-40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วลดลงในสัปดาห์ที่ 3 หรือ 4 ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 2 สัปดาห์ หรือ 7-28 วันหลังจากได้รับเชื้อ ปริมาณเชื้อที่ได้รับจะต้องมากกว่า 10 เซลล์ต่อกรัม จึงจะทำให้เกิดโรคได้ จากสถิติทั่วโลกในปี พ.ศ.2543 มีคนเป็นไข้ไทฟอยด์ถึง 21 ล้าน คนและมีคนตายมากถึง 216,500 คน (มากกว่า 100 คนต่อประชากร 100,000 คน) ส่วนพาราไทฟอยด์พบเพียง 5.4 ล้านคนเท่านั้นในพื้นที่ที่มีโรคนี้เป็นปัญหาอยู่มักพบในเด็กอายุ 5-19 ปี และส่วนใหญ่จะอยู่ในประเทศกำลังพัฒนาและ ระบบสาธารณะสุขยังไม่ดีพอ ส่วนในกรณีของประเทศที่ระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาธารณสุขดีจะไม่เป็นปัญหา ในประเทศไทยจะพบในช่วงอายุ 1-5 ปี เป็นส่วนใหญ่ในเช่นเดียวกับบังคลาเทศ เวียดนาม และอินโดนีเซีย

2.3.4.2 กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis)

เป็นอาการของโรคที่พบได้บ่อยที่สุด ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ nontyphoidal Salmonella หลังจากรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา เข้าไปจะเริ่มมีอาการให้เห็นได้เร็วที่สุด ประมาณ 6-72 ชั่วโมง อาการเฉพาะที่ เช่น ปวด ท้อง บางครั้งอาจจะรุนแรงมากจนคิดว่าเป็นไส้ติ่งอักเสบได้ นอกจากนี้จะมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้อ่อนเพลีย ปวดศีรษะหรือปวดเมื่อย ตามตัว อาการเหล่านี้หายเองได้ภาย ใน 1 สัปดาห์ แม้จะไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ผู้ใหญ่อาการท้องเสียเป็นอยู่นานไม่เกิน 3 -7 วัน และหายเองได้ ถ้ามีไข้ร่วมด้วยไข้จะหายไปภายใน 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีอาการท้องเสียนานกว่า 10 วันให้ คิดถึงสาเหตุอื่นเพราะไม่น่าจะใช่จากเชื้อซัลโมเนลลา ยกเว้นในรายที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง อังกูร เกิดพาณิช, (2549)

2.3.4.3 โลหิตเป็นพิษ (septicemia)

เชื้อซัลโมเนลลาเช่น *S.* Typhi *S.* Choleraesuis *S.* Paratyphi *S.* Typhimurium *S.*Dubin *S.* Enteritidis *S.* Heidelberg และ *S.* Newport พบว่าเมื่อมีการติดเชื้อเกิดขึ้นแล้วมักจะมีการรุกล้ำเข้าไปในกระแสโลหิต (bacteremia) ทำให้มีไข้อาจมีอาการหนาวสั่นปวดเมื่อยตามตัวเบื่ออาหาร น้ำหนักลด ร่วมด้วยอาการเหล่านี้อาจเป็นอยู่ได้นานหลายวันหรือหลายสัปดาห์ ส่วนอาการท้องเสียที่เกิดขึ้นนั้น ไม่จำเป็นว่าต้องมีมาก่อนที่จะมีอาการไข้ และในบางครั้งการตรวจเพาะเชื้อจากอุจจาระอาจจะตรวจไม่พบเชื้อได้ คนปกติทั่วไปที่มีอาการท้องเสียจากเชื้อ ซัลโมเนลลา สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตได้ เช่น ในเด็กทารกและคนแก่ แต่ตัวเลขอัตราการเกิดที่แท้จริงในเด็กทารกแรกเกิดอาจจะพบการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้สูง ในเด็กบางครั้งอาจจะมีอาการท้องเสียโดยที่ไม่มีไข้แต่ตรวจพบว่ามีการติดเชื้อในกระแสโลหิตร่วมด้วย เด็กอาจตรวจพบเชื้ออยู่ในกระแสโลหิตได้นานหลายวันโดยที่เชื้อไม่รุกล้ำไปยังอวัยวะอื่นซึ่งต่างจากผู้ใหญ่เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสโลหิตแล้วมักจะมีการติดเชื้อไปที่อวัยวะ อื่นๆร่วมด้วยและอัตราการตายจะสูงกว่าในเด็กมาก

2.3.5 การปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในอาหาร

การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารส่วนใหญ่เกิดจากการควบคุมสุขาภิบาลทั้งในส่วนบุคคลและในระหว่างการผลิตที่ไม่ดี และในปี พ.ศ. 2537-2546 มีการรายงานถึงการพบเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 พบว่าสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในประเทศไทย คือ *S.* Weltevreden *S.* Entrritidis และ*S.* Anatum จำนวน 12.5 11.4 และ 7.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากรายงานผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าที่เชื้อซัลโมเนลลา สามารถมีโอกาสปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ เช่น ในอาหารทะเลแช่แข็ง ไก่แช่แข็ง อาหารอื่นๆ และน้ำ (Bangtrakulnonth et al., 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2546

ที่มา	ผู้ป่วย	ไก่แช่แข็ง	อาหารทะเลแช่แข็ง	อาหารอื่นๆ	น้ำ
จำนวน	44087 (100 เปอร์เซ็นต์)	14559 (100 เปอร์เซ็นต์)	1007 (100 เปอร์เซ็นต์)	6928 (100 เปอร์เซ็นต์)	984 (100 เปอร์เซ็นต์)
S. Weltevreden	12.5	-	26.3	6.6	14.5
S. Entrritidis	11.4	19.9	1.4	4.5	2.2
S. Anatum	7.4	-	2.0	17.0	11.5
S. Derby	6.6	-	2.0	5.3	7.2
S. typhimurium	5.3	-	1.2	2.9	-
S. Rissen	5.3	-	2.1	10.3	9.5
S. Stanley	3.8	-	2.0	-	-
S. Panama	3.3	-	-	3.7	4.8
S. Agona	2.7	3.1	-	3.9	4.0
S. Hardar	-	9.3	2.1	6.3	2.7
S. Virchow	-	5.9	-	3.6	-

ที่มา : Bangtrakulnonth et al. (2004)

นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เชื้อที่พบ	อาหารที่ตรวจพบ	จำนวนผู้ป่วย	ประเทศ
S. Typhimurium DT124	Salami sticks	101	England (1989)
S. Typhimurium	Fermented pork Bologna-style sausage	17	Netherland (1986)
S. Typhimurium PT193	Salami	83	Italy (1998)
Salmonella	Dry Ferment sausage	-	Netherland (1987)

ที่มา: Moore (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา

อนุชา มุมอ่อน และคณะ (มปป) กล่าวว่าปัจจัยและการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลามีหลายองค์ประกอบด้วยกันแต่มีปัจจัยที่สำคัญดังนี้

2.3.6.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิ (Temperature) เชื้อซัลโมเนลลาเป็นกลุ่มแบคทีเรีย mesophiles ที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส แต่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 5-45 องศาเซลเซียส โดยที่อุรหภูมิ 2-3 องศาเซลเซียสและเชื้อจะหยุดการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิระหว่าง -2 ถึง -5 องศาเซลเซียส เชื้อจะเริ่มตายเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น เพราะเซลล์ไม่สามารถรักษาสภาวะสมดุลที่เป็นสภาวะปกติไว้ได้ เนื่องจากเกิดความเสียหายของไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีน โดยเฉพาะเอนไซม์ของเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์รั่วและการสังเคราะห์โปรตีนต้องหยุดชะงักโดยเชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงสุด ที่เคยมีรายงานว่าเจริญเติบโตได้คือ ที่ 54 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลามีระบบตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบเฉียบพลัน (heat shock response) โดยเชื้อซัลโมเนลลามีระยะเวลาที่ทำลายเชื้อแบคทีเรียใช้ลดลงได้ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ เรียกกว่า Decimal reduction time (D_t) หรือ D-value เป็นค่าจำเพาะสำหรับเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อในกระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน

2.3.6.2 พีเอช

ค่า (pH) เชื้อซัลโมเนลลาเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH ระหว่าง 6.5-7.5 แต่ pH ที่เชื้อเจริญเติบโตได้ คือ pH 4.5-9.5 เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ ค่า pH มากกว่า 9 ส่วนค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใช้ปรับความเป็นกรดด่าง เช่น ถ้าใช้กรดไฮโดรคลอริคส์ และกรดซิตริกเป็นตัวปรับความเป็นกรดด่าง ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตได้อยู่ที่ 4.05 แต่ถ้าใช้กรดอะซิตริกและกรดแลคติกเป็นตัวปรับความเป็นกรดด่าง ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อจะเจริญเติบโตได้อยู่ที่ 5.5 ถ้าสภาวะ pH ไม่เหมาะสม เช่น pH ภายนอกเซลล์ต่ำกว่าช่วง pH ที่เชื้อจะเจริญเติบโตได้ ก็จะเกิดการเหนี่ยวนำให้เชื้อปรับตัวให้ทนต่อกรดในสิ่งแวดล้อม จึงเกิดปัญหาโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารที่เป็นกรดขึ้นได้

2.3.6.3 ปริมาณน้ำอิสระ (Water activity a_w)

น้ำใช้ได้ ปริมาณน้ำในอาหารที่เชื้อซัลโมเนลลานำไปใช้ในการ เจริญเติบโตอยู่ที่ไม่ต่ำกว่า 0.93-0.95 เชื้อจะไม่เจริญเติบโตในอาหารที่มีเกลือแกงเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ และในสภาวะที่ pH ลดลง จะทำให้เกลือไนไตรท์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้มากขึ้น

2.3.6.4 การใช้ปัจจัยร่วมในการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา

การใช้ปัจจัยร่วมคือการนำจุดดีของการใช้ปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นมาใช้ในการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาเช่น การปรับสภาวะค่า pH ให้เหมาะสมร่วมกับการควบคุมค่า a_w ด้วยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสารเคมีเช่น โซเดียมไนไตรท์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมนอกจากนี้การใช้สารแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารที่เป็นผลผลิตของแบคทีเรียแลคติก เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อย่อมจะมีผลที่ดีกว่าการใช้ปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งอย่างเดียว นอกจากนี้การควบคุมเชื้อยังมีวิธีที่ได้ผลแต่อาจจะไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคใน ผลิตภัณฑ์อาหารเช่นการใช้รังสีเพื่อควบคุมโดยใช้รังสีแกมม่า ฉายที่ระดับความเข้มของรังสีที่ 2 กิโลเกรย์ เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม

2.4 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม

ขวัญทวี พ่อค้าทอง (2543) มีการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนมรวมทั้งจัดทำเกณฑ์คุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์แหนมโดยทำการตรวจผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีจำนวน 60 ตัวอย่างพบเชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อน 17เปอร์เซ็นต์

เวณิกา เบ็ญจพงษ์ และคณะ (2547) กล่าวว่า มีรายงานการตรวจเชื้อซัลโมเนลลาปนเปื้อนในแหนม หมูยอ และกุนเชียงที่จังหวัดเชียงรายและพะเยา โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปี พ.ศ. 2543 พบว่ามีการปนเปื้อนจากการตรวจตัวอย่าง 130 ตัวอย่างพบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม 17.1เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์การแพทย์อุบลราชธานี ปี พ.ศ. 2545 พบว่าในอาหารตัวอย่างได้แก่ แหนม หมูยอ และกุนเชียงมีการปนเปื้อนของเชื้อในแหนมจำนวน 77 เปอร์เซ็นต์ และในปีพ.ศ. 2545การตรวจสอบคุณภาพของแหนม โดยสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดลและ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข โดยพบเชื้อซัลโมเนลลา ปนเปื้อนในแหนมจากจำนวน 20ตัวอย่าง พบเชื้อปนเปื้อน 6 ตัวอย่างคิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมด

สุรีย์ นานาสมบัติ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารที่มีค่าแอ็คติวิตี้สูงและอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอ็คติวิตี้ต่ำ โดยทำการตรวจตัวอย่างแหนมจำนวน 39 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาจำนวน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 38.5 เปอร์เซ็นต์ โดยพบเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ *S.* Agona, *S.* Anatum, *S.* Derby และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ

อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม 56 ตัวอย่าง พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสิ้น 16 เซโรไทป์ โดยเซโรไทป์ที่พบมาก ได้แก่ *S.* Derby และ *S.* Anatum เป็นเชื้อที่ทนต่อการถูกทำลายในขณะหมักแหนมได้ดีที่สุด

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ (2539) ทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลา ในแหนมที่จำหน่ายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มากถึง 30 ตัวอย่าง (75 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2546) ทำการตรวจตัวอย่างแหนมเพื่อศึกษาศึกษาผลของพีเอชต่อเชื้อซัลโมเนลลาโดยทำการตรวจตัวอย่างจำนวน 55ตัวอย่างจากตลาดในกรุงเทพและปริมณฑล พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลา 28 ตัวอย่างคิดเป็น 50.9 เปอร์เซ็นต์

2.4.2 การใช้กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2533) ศึกษาการใช้ผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* spp. รหัส P_{55} และกล้าเชื้อผสมระหว่างรหัส P_{55} และ *Pediococcus* ssp. รหัส L_1 ในการหมัก จะให้ผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลาในขณะหมักได้ดีที่สุดและได้พบว่าการหมักแหนมโดยมีการเติมกล้าเชื้อจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากเชื้อ เมื่อใช้เวลาในการหมัก 5 วัน ขณะที่การหมักโดยธรรมชาติต้องใช้ระยะเวลา 6 วัน เมื่อทำ การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค โดยใช้แหนมที่มีแบคทีเรียแลกติกเป็นกล้าเชื้อผสมระหว่างเชื้อรหัส L_1 และเชื้อรหัส P_{55} ผู้บริโภคพอใจมากที่สุด

Nassu et al. (2002) ได้ทำการศึกษาไส้กรอกหมักที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ต่างชนิดกัน คือ (1) *Stap. xylosus* และ *P. pentosaceus* (2) เชื้อผสมของ *Pediococcus* 2 สายพันธุ์ในอัตราส่วน 50:50 (3) *Lb. farciminis, Stap. aureus* และ *S. carnosus* ในระหว่างการหมักเพื่อดูความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าไส้กรอกที่ใช้เชื้อกลุ่มที่ 1 มีค่าความเป็นกรดด่างและค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water activity, A_w) ลดลงช้ากว่าและมีปริมาณกรดแลคติกน้อยกว่ากลุ่มอื่น เมื่อพิจารณาทางด้านจุลินทรีย์พบว่าเชื้อทั้งสองกลุ่มสามารถลดปริมาณของ *Stap. aureus* ได้ จึงสามารถนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้

Visessanguan et al. (2006) ได้ศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *Lb. curvatus* ปริมาณ 10^4 และ 10^6 cfu/g เติมลงในแหนม พบว่าแหนมมีอัตราการหมักสูงขึ้นกว่าแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ โดยวัดจากค่า pH และปริมาณกรดแลกติก และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. curvatus* ปริมาณ 10^4 cfu/g พบว่ามีรสชาติ ความเปรี้ยว เค็ม และลักษณะสัมผัสของเนื้อดีขึ้น แต่ในแหนมที่เติมปริมาณ 10^6 cfu/g พบว่ามีกลิ่นที่ไม่น่ารับประทาน ดังนั้นการเติมกล้าเชื้อ *Lb. curvatus* ในปริมาณมาก อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติแย่ลง

2.4.3 การประยุกต์ใช้กล้าเชื้อช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล (2539) ทำการศึกษาการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น คือ *Micrococcus varians, Lb. plantarum* และ *P. cerevisiae* เพื่อลดปริมาณ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบการลดลงของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในระยะเวลาต่างๆ ในอาหาร MRS broth และในการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมของ *M. varians, Lb. plantarum* และ *P. cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า *Lb. plantarum* ที่ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ยับยั้งและทำลายเชื้อซัลโมเนลลา ได้ในชั่วโมงที่ 9 และ 18 ขณะที่ MRS broth มี ค่า pH เท่ากับ 5.07-5.13 และ 3.89-3.93 ตามลำดับ *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ml ให้ผลในการทำลายและยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเวลาเดียวกันกับ *P. cerevisiae* ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/ml และเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมของ *M.varians, Lb. plantarum* และ *P. cerevisiae* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 10^3 และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในชั่วโมงที่ 15 ขณะที่ MRS broth มีค่า pH ในช่วง 5.69-6.18 การทำลายเชื้อซัลโมเนลลาปริมาณเริ่มต้น 10^2 และ 10^3 cfu/ml เกิดในชั่วโมงที่ 28 และ 32 ของการบ่มเพาะเชื้อ ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.18-4.44 และ 4.03-4.33 ตามลำดับ ส่วนในแหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมสามารถลด *S.* Typhimurium ปริมาณเริ่มต้น 460 และ 2400 MPN/g จนหมดในวันที่ 3 และ 4 ของการหมัก โดยมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.60 และ 4.45 ปริมาณกรดแลคติก 0.94 และ 1.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และลด *S.* Anatum ปริมาณเริ่มต้น 330 และ 2800 MPN/g จนหมดในวันที่ 4 และ 5 ของการหมัก โดยมีค่า pH 4.44 และ 4.37 ปริมาณกรดแลคติก 1.12 และ 1.39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการผลิตแหนมที่หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะได้แหนมที่มีความปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนมาได้

ศิพัตม์ รักษ์เผ่า (2539) ศึกษาการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนม 3 ชนิด คือ *Lb. plantarum*, *P. cerevesiae* และ *M. varians* เพื่อลดปริมาณ *Stap. aureus* ในแหนมเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ากล้าเชื้อ *Lb. plantarum* เพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพในการทำลาย *S. aureus* ได้ดีกว่าเชื้อบริสุทธิ์ชนิดอื่นๆ ส่วนการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับสารเคมี คือ โซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับไนเตรท 0.05 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.01 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการทำลาย *Stap. aureus* ได้ดีกว่ากล้าเชื้อ *Lb. plantarum* และ *P. cerevesiae* เพียงชนิดเดียว และพบว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับโซเดียมไนเตรท 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไนไตรท์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการทำลาย *S. aureus* ได้ดีกว่าการใช้โซเดียมไนไตรท์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับโซเดียมไนเตรทและโซเดียมไนไตรท์ จะให้ประสิทธิภาพในการทำลาย *Stap. aureus* ได้ดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นเพียงอย่างเดียวและเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นร่วมกับโซเดียมคลอไรด์

โสภา สีชอล์ค (2541) ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น 2 ชนิด คือ *Lb. plantarum* ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ml และ *P. cerevisiae* ปริมาณเริ่มต้น 10^6 cfu/ml เพื่อ ลดปริมาณ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมต่อการลดปริมาณ *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นต่างกัน พบว่า *Lb. plantarum* หรือ *P. cerevisiae* และเชื้อผสม *Lb. plantarum* กับ *P. cerevisiae* มีประสิทธิภาพใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำลาย *S.* Typhimurium และ *S.* Anatum ได้เท่าเทียมกัน โดยใช้ระยะเวลา 28 ชั่วโมงในการทำลายซัลโมเนลลา ทั้งสองที่ปริมาณเริ่มต้น 10^2 cfu/ml และใช้ระยะเวลา 32 ชั่วโมงในการทำลาย ซัลโมเนลลา ที่ปริมาณเริ่มต้น 10^3 cfu/ml

พรพิมล เทียนทอง (2548) ทำการศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 กึ่งแห้งและแบบปรกติที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลา โดยพบว่าเชื้อ S. Anatum พบมากที่สุดจากเวลาหมักแหนม 0-3 วัน โดยพบว่าในแบบจำลองแหนมเชื้อซัลโมเนลลาลดลงจาก 10^4 cfu/ml จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายใน 48 ชั่วโมงในการทดสอบผลของการหมักแหนมกึ่งแห้งและแบบปรกติที่มีผลต่อเชื้อซัลโมเนลลาพบว่า การเติมเชื้อบริสุทธิ์จะทำให้สามารถตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาได้ 66 เปอร์เซ็นต์แตกต่างกับแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อยังสามารตรวจพบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปอบแห้งในระยะเวลาต่างกัน 2, 4, 6 และ8 ชั่วโมงพบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาได้

Kaban and Kaya (2005) ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* โดยเติมเชื้อ *Stap. aureus* ลงในแหนมเท่ากับ 10^6 cfu/g แบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแรกเติมกล้าเชื้อ *P. acidilactici, Lb. curvatus* และ *S. xylosus* กลุ่มที่ 2 เติมกล้าเชื้อ *Lb. sakei* และ *S. carnosus* และกลุ่มควบคุม ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก, *S. aureus, Micrococcus, Staphylococcus, Enterobacteriaceae* ในระหว่างการบ่ม จากการทดลองพบว่าจำนวน *S. aureus* ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ลดลงจาก 10^6 cfu/g เหลือ 10^4 cfu/g เมื่อการหมักแหนมผ่านไป 3 วัน แต่ในกลุ่มควบคุมกลับพบว่า เมื่อกระบวนการหมักแหนมผ่านไป 48 ชั่วโมง จำนวน *Stap. aureus* กลับเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 10^8 cfu/g ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวนถึง 10^8 cfu/g ในวันที่ 3 และวันที่ 1 ของการหมัก และ *Micrococcus/Staphylococcus* ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวน 10^3 cfu/g และ 10^2 cfu/g ในวันที่ 3 ของการหมักตามลำดับ

Swetwiwathana et al. (1999) ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Lb. curvatus, Lb. sakei* และ *Pediococcus* spp. ร่วมกับ ไนเตรท ไนไตรท์ และกระเทียม ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ในแหนม พบว่าเมื่อใช้ โซเดียมไนเตรท 125 ppm, กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น (starter culture) จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Anatum ได้ แต่ใช้ร่วมกับ *Lb. sakei* จะให้ผลในการยับยั้งดีที่สุด

Swetwiwathana and Lotong (1999) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหนม มี 3 สายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. คือ TISTR 419, 530, 536 และสายพันธุ์จาก *Lactobacillus* spp. คือ TISTR 543 พบว่าสายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. เท่านั้นที่มีผลในการยับยั้ง *Lis. innocua* ที่ใช้เป็น เชื้อ indicator ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chiwprasertphol et al. (2002) ได้นำสายพันธุ์ BCC 11499 ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* มาใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักแหนมเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากล้าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้มากใน 12-24 ชั่วโมงแรก และสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลกติกได้ในชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านค่าความเป็นกรด-ด่าง ลักษณะสัมผัส ปริมาณกรดรวม สี และลักษณะสัมผัสที่มีต่อผลิตภัณฑ์ เมื่อเทียบกับแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อเช่นกัน

Noonpakdee et al. (2003) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในแหนมเพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินโดยแยกเชื้อได้หลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ *Lb. lactis* WNC 20 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นแล้วยังยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารหมักซึ่งประกอบด้วย *Lis. monocytogenes, Cl. perfringens, B. cereus* ได้ *Lb. lactis* WNC 20 จึงมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของอาหารหมัก

Swetwiwathana et al. (2003) ได้ศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกในแหนม พบว่ามีแบคเทอริโอซิน ที่ถูกสร้าง 14 สายพันธุ์ และใน 6 สายพันธุ์ คือ N10 , N39 , N60 , N100 , N190 และ TISTR 536 เป็นสารที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็น indicator ได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ N100 และ N190 จะให้ผลการยับยั้งพวกแกรมบวกที่เป็น pathogen ในอาหาร เช่น *Lis. monocytogenes* , *Stap. canosus* ซึ่ง *Stap. canosus* มักนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในไส้กรอกหมักหลายชนิดของชาวยุโรป เนื่องจากจะช่วยเพิ่มเรื่องของกลิ่น และสีในผลิตภัณฑ์

Swetwiwathana et al. (2007) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แรกที่ผลิตสาร pediocin PA-1 ที่แยกได้จากแหนม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาถึงผลของกระเทียม และไนไตรท์ที่มีผลต่อการผลิต pediocin PA-1 ของ *P. pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ *S.* Anatumในสภาวะการหมักแหนมจำลอง พบว่ากระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เจริญได้ดีทั้งในที่มีไนไตรท์ และไม่มีเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้ใส่กระเทียม และเมื่อใช้กระเทียมสด 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท์ 125 ppm และ *P. pentosaceus* TISTR 536 และสามารถลดจำนวนของ *S.* Anatum ได้ภายใน 30 ชั่วโมง

2.4.4 การประยุกต์ใช้สารเคมีและกรดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

สมัญญา สุขพหล (2549) ทำการวิจัยผลของการใช้กรดแลคติกและสาร pediocinPA-1 จาก *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยนำมาใช้ในการลดการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโค โดยทำการตรวจตัวอย่างเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกที่จำหน่ายในตลาดมีนบุรี บางกะปิ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พระโขนง จำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนซัลโมเนลลาจำนวน 26 พบว่ามีทั้งหมด 20 ซีโรวาร์ โดยพบ *S.* Senftenberg มากที่สุดรองลงมาคือ *S.* Anatum และ *S.* Weltevreden โดยนำเชื้อทั้ง 3สายพันธุ์มาทดสอบการยังยั้งด้วยกรดแลคติกและสาร pediocin PA-1 จาก *P. pentosaceus* TISTR 536 การทดลองในหลอดทดลองพบว่าในหลอดทดลองที่มีการเติมกรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารpediocin PA-1 มีผลในการยับยั้งเชื้อและทำให้เชื้อได้รับบาดเจ็บจำนวนที่สูงสุด จึงนำมาทดสอบในเนื้อโคชำแหละและจำหน่ายปลีกพบว่ากรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร pediocin PA-1 มี สามารถลดจำนวนได้ดีที่สุดในการทดลอง

พิมพิกา สายสวาสดิ์ (2554) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* และแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในระหว่างการหมักแหนม พบว่าเมื่อทำการทดลองในแบบจำลองการหมักแหนม โดยมีเชื้อเริ่มต้น 6.5 log cfu/ml พบว่าไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่ำ (100 ppm) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Stap. aureus* และ *S.* Anatum รวมทั้งที่ความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้ง *S.* Derby ตามลำดับ ส่วนไคโตซานที่มีความเข้มข้นสูง (5000 และ 10000 พีพีเอ็ม) สามารถฆ่าเชื้อ *Stap. aureus* ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง แต่เชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Derby เพียงถูกยับยั้งการเจริญเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นของไคโตซานในระดับที่สูงลดปริมาณของแบคทีเรียแลกติกที่ใช้ในการศึกษาได้ โดยที่เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* ATCC 14917 ในระหว่างการหมัก รวมทั้งยังพบว่ากระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองชนิดฟื้นตัว เมื่อใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 5000 พีพีเอ็ม ในระหว่างการหมัก ดังนั้นจึงได้ศึกษาการใช้ไคโตซาน 5000 ppm ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และกระเทียม พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *Stap. aureus* ที่ระยะเวลาการหมัก 42 ชั่วโมง ส่วนการทดลองในผลิตภัณฑ์แหนม พบว่า ตัวอย่างที่เติมไคโตซาน 5000 พีพีเอ็ม เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลต่อการลดลงของเชื้อ *Stap. aureus* แต่เมื่อใช้ร่วมกับกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 พบว่า เชื้อ *Stap. aureus* ลดลง เมื่อระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งดีกว่าการใช้ไคโตซานหรือกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เพียงอย่างเดียวอย่างไรก็ตามไคโตซานไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม โดยยังสามารถตรวจพบเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

จักรารัตน์ ติโลกวิชัย (2555) ศึกษาผลของการใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินและกลูต้าไธโอน ต่อการยับยั้งการเจริญและการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *Stap. aureus E. coli* และ *S.* Anatum ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่ากลุ่มที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร plantaricin W ความเข้มข้น 51,200 AU/ml ที่เติมและไม่เติม สารกลูต้าไธโอน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยใช้เวลาการยับยั้งได้เร็วกว่าการเติมสารละลายกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสาร pediocin PA-1 ความเข้มข้น 3,200 AU/ml ที่เติมและไม่เติมกลูต้าไธโอน การใช้กรดแลคติก สาร plantaricin W และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ต่อการยับยั้งเชื้อ *Staph. aureus* และเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อโค พบว่า เนื้อโคที่สัมผัสกรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสาร plantaricin W ความเข้มข้น 51,200 AU/ml จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Stap. aureus* และเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อโคได้ดีที่สุดในวันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิตแหนม

3.1.1 เนื้อหมูส่วนสะโพก (ตลาดมหาสิน เขตบางนา, กรุงเทพมหานคร)

3.1.2 ข้าวสาร (ข้าวเสาไห้ ตราเกษตร, ไทยฮา, นครปฐม)

3.1.3 กระเทียมจีนกลีบกลาง (ตลาดมหาสิน เขตบางนา, กรุงเทพมหานคร)

3.1.4 เกลือ (ตราชาวนา, อาหารสากลกรุงศรีอยุธยา, กรุงเทพมหานคร)

3.1.5 น้ำตาล (ตรามิตรผล, น้ำตาลมิตรผลจำกัด, สุพรรณบุรี)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้รับจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังนี้

3.2.1.1 *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 (Swetwiwathana et al., 2004b)

3.2.1.2 *Pediococus pentosaceus* JCM 5885

3.2.1.3 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS broth เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และใช้ MRS agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate เป็นอาหารแข็งสำหรับเก็บเชื้อแบบ deep tube ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 เชื้อซัลโมเนลลา ได้รับความอนุเคราะห์จาก FAO/WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ดังนี้

3.2.2.1 *Salmonella* Anatum

3.2.2.2 *Salmonella* Ratchaburi

3.2.2.3 *Salmonella* Bangkok

3.2.2.4 *Salmonella* Lumphum

เก็บรักษาเชื้อในอาหารแข็ง trypticase soy agar (TSA) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว trypticase soy broth (TSB) เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 Antiserum O group B, C, D, E (S&A Reagent Lab, Thailand)

3.3.2 Agar powder (Merck, Germany)

3.3.3 Beef extract (Scharlau, Germany)

3.3.4 Calcium carbonate (Scharlau, USA)

3.3.5 DHL agar acc. to SAKAZAKI (Merck, Germany)

3.3.6 Glucose (Merck, Germany)

3.3.7 KOVAC's indole reagent (Merck, Germany)

3.3.8 Lysine indole motility (LIM) medium (Difco, USA)

3.3.9 MRS broth (Merck, Germany)

3.3.10 Nutrient agar (NA) (Merck, Germany)

3.3.11 Phytone peptone (Soytone) (Merck, Germany)

3.3.12 Peptone from meat (Criterion, USA)

3.3.13 Salmosyst broth base (SB) (Merck, USA)

3.3.14 Salmosyst selective supplement tablet (SBST) (Merck, Germany)

3.3.15 Salmonella-Shigella (SS) agar (Merck, Germany)

3.3.16 Triple sugar iron (TSI) agar slant (Merck, Germany)

3.3.17 Trypticase soy agar (TSA) slant, plate (Merck, Germany)

3.3.18 Trypticase soy broth (TSB) (Merck, Germany)

3.3.19 Trypticase peptone (Tryptone) (Merck, Germany)

3.3.20 Xylose-lysine-desoxycholate (XLD) agar (Merck, Germany)

3.4 สารเคมี

3.4.1 กรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ (Merck, Germany)

3.4.2 กรดอะซีติก (Labscan, Thailand)

3.4.3 กลีเซอรอล (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.4 คลอโรฟอร์ม (Labscan, Thailand)

3.4.5 โซเดียมไนไตรท์ (Merck, Germany)

3.4.6 โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.7 โซเดียมแอสคอเบส (Fluka, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8 โซเดียมคลอไรด์ (Merck, Germany)

3.4.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, USA)

3.4.10 น้ำมันพาราฟิน (Metha Group Trading, Thailand)

3.4.11 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Merck, Germany)

3.4.12 ฟีนอล (Merck, Germany)

3.4.13 ฟีนอฟทาลีน (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.14 แมกเนเซียมคลอไรด์ (Merck, USA)

3.4.15 สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (SM0328, Fermentas, USA)

3.4.16 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ซีนิธ ไซเอนซ์, ประเทศไทย)

3.4.17 ไอโซโพรพานอล (AnalaR NORMAPUR, France)

3.4.18 อะกาโรส (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.19 Absolute ethanol 99.5 เปอร์เซ็นต์ (Merck, Germany)

3.4.20 Deoxyribonucleotide triphophate (dNTP) (Fermentas, USA)

3.4.21 1 mM Ethylendiaminetetraacetic Acid (EDTA) (Fisher Scientific, UK)

3.4.22 10 mg/ml Ethidium bromide (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.23 Forward primer และ Reverse primer (Fermentas, USA)

3.4.24 50 mg/ml Lysosyme (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.25 1x Loading dye buffer (Fermentas, USA)

3.4.26 20 mg/ml Protease K (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.27 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.28 10 mM Tris-HCl (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.29 Trizma base (Vivantis Biochemical, USA)

3.4.30 Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA)

3.4.31 Restriction enzyme *Alu*I (Fermentas, USA)

3.4.32 Restriction enzyme *Hael*II (Fermentas, USA)

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.5.1 เครื่องวัดค่าพีเอช (Inolab pH Level I, Germany)

3.5.2 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Genie G-560E, USA)

3.5.3 เครื่องปั่นอาหารแบบแห้ง (AAW9 Moulinex, China)

3.5.4 เครื่องตีป่นผสมอาหาร (SM-65, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5 เครื่องบดเนื้อ (JBL, Thailand)

3.5.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Eppendorf biophotometer, Germany)

3.5.7 เครื่องตรวจนับโคโลนี Funke Gerber (รุ่น colony-star, Germany)

3.5.8 เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ (Pico, Thermo Electron Corporation, Germany)

3.5.9 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัดชั่ง 3100 กรัม (Dragon 3002, USA)

3.5.10 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดชั่ง 210 กรัม (EJB-FE, Jewery, USA)

3.5.11 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Cosmo Bio, Japan)

3.5.12 เตาไฟฟ้า (Lucky Flame, Thailand)

3.5.13 ตู้อบลมร้อน (Heraeus, Germany)

3.5.14 ตู้แช่แข็ง (-18 องศาเซลเซียส) (SF- 647 GYN, Sanyo, Thailand)

3.5.15 ตู้ปลอดเชื้อ (Boss tech, USA)

3.5.16 ตู้บ่มเชื้อ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany)

3.5.17 ไมโครเวฟ (Microwave oven) (R-351, Sharp, Thailand)

3.5.18 ไมโครปิเปต ขนาด 10-100, 20-200, 1000 ไมโครลิตร (BioRad, Poland)

3.5.19 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร (Labsystems, UK)

3.5.20 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (SS-245, Tomy, Japan)

3.5.21 ห้องแช่เย็น (4 องศาเซลเซียส)

3.5.22 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

3.5.23 เครื่องแก้วและเครื่องมือที่จำเป็น

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.6.1.1 การเตรียมเชื้อ *Salmonella*

นำเชื้อซัลโมเนลลาได้แก่ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphum และ *S.* Ratchaburi จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูป ลงใน TSB ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 20 ชั่วโมง แล้วทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ให้มีปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 10^7 cfu/ml เพื่อใช้ในการเติมลงในแบบจำลองแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 และ JCM 5885 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 1.0 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-22 ชั่วโมง โดยทำต่อเนื่องกันสองครั้งและทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 0.5 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6.2 การเตรียมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (Swetwiwathana et al., 2003)

เลี้ยง *P. pentosaceus* TISIR 536 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุใน ฟลาสก์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ บ่มในตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge) ที่ใช้ แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีดล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใส่ที่ได้โดยใช้หลอดฉีดยาที่ฆ่าเชื้อแล้ว ฉีดผ่านตัวกรอง ขนาด 0.2 ไมครอน (μm) ลงในหลอดทดลอง ขนาด 160 X 80 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำ crude แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่เตรียมได้ มาทำการทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการทำการทดลองการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา

3.6.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา (Swetwiwathana et al., 2003)

เลี้ยง *Lb. sakei* จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดเชื้อ *Lb. sakei* ด้วยไมโครปิเปต 10 ไมโครลิตร ลงใน MRS broth + 0.5 เปอร์เซ็นต์ agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เตรียมไว้รอให้แห้ง จึงทำการเจือจาง crude แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 จากข้อ 3.6.2 ที่ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน : น้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:0 - 1:128 นำมาหยดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการตีช่องไว้โดยไล่ตามลำดับการเจือจางจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน candle jar ตรวจสอบโซนใส (clear

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

zone) ที่เกิดจากการยับยั้งตามความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน หาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมตามวิธีในภาคผนวก ง. เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.6.4 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อซัลโมเนลลา ในแบบจำลองแหนม (Nham model broth, NMB) ด้วยสภาวะในการหมักแหนม

3.6.4.1 การศึกษาผลของการใช้กรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหนม (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร จำนวน 24 ขวด ในขวดทนความร้อนฝาเกลียว นำไปปรับค่าความเป็นกรดด้วยกรดแลคติก90 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH ที่ 5.5 5.0 และ 4.5 ค่าความเป็นกรดละ 8 ขวด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาใส่ส่วนผสมตามสูตรด้านล่างนี้ โดยเติมเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi จากข้อ 3.6.1.1 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อซัลโมเนลลา ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 cfu/ml และเติมแบคเทอริโอซินจากข้อ 3.6.2 จำนวน 4 มิลลิลิตรต่อแบบจำลองแหนมที่ปริมาตร 196 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน 2 เปอร์เซ็นต์ และหาความเข้มข้นแบคเทอริโอซินตามการทดลองที่ 3.6.3

ขวดที่ 1-4 NMB pH 4.5 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml
+ แบคเทอริโอซิน
ขวดที่ 5-8 NMB pH 4.5 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml
ขวดที่ 9-12 NMB pH 5.0 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml
+ แบคเทอริโอซิน
ขวดที่ 13-16 NMB pH 5.0 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml
ขวดที่ 17-20 NMB pH 5.5 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml
+ แบคเทอริโอซิน
ขวดที่ 21-24 NMB pH 5.5 + เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml

โดยบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับเชื้อซัลโมเนลลา ด้วยวิธี pour plate ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 20 ชั่วโมง และทำการนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำผลการนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา (Swetwiwathana et al., 2007) โดยทำการสุ่มเลือกโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นสามารถนับได้จากระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องสงสัยว่าจะเป็นเชื้อซัลโมเนลลา จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร TSA} - \text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร XLD}}{\text{จำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร TSA}} \times 100$$

3.6.4.2 การศึกษาผลของการใช้ไนไตรท์ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหนม ปริมาณ 198 มิลลิลิตร จำนวน 8 ขวด ในขวดทนร้อนฝาเกลียว นำไปปรับค่าความเป็นกรดด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH ที่ 6.0 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) (ภาคผนวก ข) ปรับความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)ในแบบจำลองการหมักแหนมที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม และทำการเติมเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphum และ *S.* Ratchaburi จากข้อ 3.6.1.1 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^4 cfu/ml ผสมตามสูตรด้านล่างนี้

ขวดที่ 1-4 NMB +เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml

ขวดที่ 5-8 NMB +เชื้อซัลโมเนลลา $1.0x10^4$ cfu/ml+ 100 พีพีเอ็ม $NaNO_2$

บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับเชื้อซัลโมเนลลาด้วยวิธี pour plate ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD ในข้อ 3.6.4.1

3.6.4.3 การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแลกติคที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

จากการทดลองในข้อ 3.6.4.1 และ 3.6.4.2 ทำให้ทราบถึงความสามารถในการทนต่อสภาวะการหมักของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองด้วยสภาวะต่างๆกันโดยเชื้อ *S.* Ratchaburi มีความทนต่อสภาวะได้ดีกว่า *S.* Bangkok และ *S.* Lamphum และใกล้เคียงกับเชื้อ *S.* Anatum ดังนั้นจึงทำการเลือกมาทำการศึกษาสภาวะการหมัก ดังนี้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหนม ปริมาณ 200 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ในขวดทนความร้อนฝาเกลียว นำไปปรับค่าความเป็นกรดด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH ที่ 6.0 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเติมเชื้อ *S.* Ratchaburi จากข้อ 3.6.1.1 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^4 cfu/ml และ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 จากข้อ 3.6.1.2 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ระดับความเข้มข้นที่ 10^6 cfu/ml ส่วนประกอบตามข้อข้างล่างนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดที่ 1 NMB+ *S.* Ratchaburi 1.0x10^{4}cfu/ml+ *P. pentosaceus* TISTR 536 1.0x10^6 cfu/ml

ขวดที่ 2 NMB+ *S.* Ratchaburi 1.0x10^{4}cfu/ml+ *P. pentosaceus* JCM 5885 1.0x10^{6}cfu/ml

ทำการตรวจนับเชื้อซัลโมเนลลา ด้วยวิธี pour plate ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD ตามวิธีในข้อ 3.6.4.1 และเก็บตัวอย่างแบบจำลองการหมักแหนม ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกๆ 6 ชั่วโมง และใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติก เก็บในช่องแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาวัดค่า pH วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกด้วยการไตเตรท (ภาคผนวก ค) และทดสอบความเข้มข้นแบคเทอริโอซิน ตามวิธีการในข้อ 3.6.3 ของ Swetwiwathana et al. (2003)

3.6.4.4 การศึกษาผลของการใช้กระเทียม ไนไตรท์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้าง และไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแหนม ปริมาณ 198 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ในขวดทนความร้อนฝาเกลียว นำไปปรับค่าความเป็นกรดด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่า pH ที่ 6.0 จำนวน 10 ขวด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *S.* Ratchaburi เติมเชื้อจากข้อ 3.6.1.1. ให้มีความเข้มข้นของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นที่ 10^4 cfu/ml และ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ JCM 5885 จากข้อ 3.6.1.2 ระดับความเข้มข้นที่ 10^6 cfu/ml และทำการเติมกระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ของปริมาตรแบบจำลองการหมักแหนมและเติมโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) (ภาคผนวก ก) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ตามส่วนประกอบตามสูตรด้านล่างนี้

ขวดที่ 1 NMB + *S.* Ratchaburi 1.0x10^4 cfu/ml

ขวดที่ 2 NMB + *S.* Ratchaburi 1.0x10^{4}cfu/ml กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

ขวดที่ 3 NMB+ *S.* Ratchaburi 1.0x10^{4}cfu/ml กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + 100 พีพีเอ็ม $NaNO_2$

ขวดที่ 4 NMB + *S.* Ratchaburi 1.0x10^4 cfu/ml กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + 100 พีพีเอ็ม $NaNO_2$ + *P. pentosaceus* TISTR 536 1.0x10^6 cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดที่ 5 NMB + *S.* Ratchaburi $1.0x10^4$ cfu/ml กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ + 100 พีพีเอ็ม $NaNO_2$+ *P. pentosaceus* JCM 5885 $1.0x10^6$ cfu/ml

ทำการตรวจนับเชื้อซัลโมเนลลา ด้วยวิธี pour plate ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD ตามวิธีในข้อ 3.6.4.1 และเก็บตัวอย่างแบบจำลองการหมักแหนม ปริมาตร 30 มิลลิลิตรทุกๆ 6 ชั่วโมง และใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติก เก็บในช่องแข็งอุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส นำมาวัดค่า pH วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกด้วยการไตเตรท (ภาคผนวก ค) และทดสอบความเข้มข้นแบคเทอริโอซินตามวิธีการในข้อ 3.6.3 ของ Swetwiwathana et al. (2003)

3.6.5 การศึกษาการใช้แบคทีเรียแลคติกสร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ในการยับยั้งเชื้อ S. Ratchaburi ในผลิตภัณฑ์แหนม

3.6.5.1 การเตรียมหมูฉายรังสีเพื่อลดเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการหมักแหนม

นำเนื้อหมูที่ผ่านการตัดแต่งและทำความสะอาด มาทำการบดด้วยเครื่องบดและเก็บในช่องแช่แข็งที่ 4 องศาเซลเซียส และก่อนนำไปฉายรังสี บรรจุเนื้อหมูใส่ถุงพลาสติกจำนวน 2 ชั้น ในกล่องโฟมที่บรรจุด้วยน้ำแข็งแห้งจำนวน 5 กิโลกรัม เพื่อรักษาอุณหภูมิตลอดการฉายรังสี และส่งตัวอย่างที่ศูนย์ฉายรังสีอาหารและผลิตผลทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) โดยทำการฉายรังสีเนื้อหมูด้วยความเข้มของรังสีที่ 2-4 กิโลเกรย์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจจะปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบ จากนั้นนำเนื้อหมูที่ผ่านการฉายรังสีแล้วมาทำการทดลองหมักแหนม

3.6.5.2 ผลของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม

เตรียมส่วนผสมการผลิตแหนมหมูตามสูตรในตารางที่ 3.1 จากนั้นแบ่งส่วนผสมออกเป็น 7 สูตร ที่มีการเติม S. Ratchaburi จากข้อ 3.6.1.1 ให้มีความเข้มข้นของเชื้อซัลโมเนลลาที่ 10^2 cfu/ml และ 10^4 cfu/ml และเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 จากข้อ 3.6.1.2 ให้มีความเข้มข้นที่ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนกล้าเชื้อ 1 มิลลิลิตร / 1 กิโลกรัม ดังนี้

สูตรที่ 1 แหนมเนื้อหมู

สูตรที่ 2 แหนมเนื้อหมู + *P. pentosaceus* TISTR 536 $1.0x10^6$ cfu/ml

สูตรที่ 3 แหนมเนื้อหมู+*P.pentosaceus*TISTR 536 $1.0x10^6$cfu/ml + S. Ratchaburi $1.0x10^4$cfu/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่ 4 แหนมเนื้อหมู+*P. pentosaceus* TISTR 536 $1.0x10^6$cfu/ml
+ S. Ratchaburi $1.0x10^2$ cfu/ml
สูตรที่ 5 แหนมเนื้อหมู + *P. pentosaceus* JCM 5885 $1.0x10^6$ cfu/ml
สูตรที่ 6 แหนมเนื้อหมู + *P. pentosaceus* JCM 5885 $1.0x10^6$ cfu/ml
+ S. Ratchaburi $1.0x10^4$ cfu/ml

สูตรที่ 7 แหนมเนื้อหมู + *P. pentosaceus* JCM 5885 $1.0x10^6$ cfu/ml
+ S. Ratchaburi $1.0x10^2$ cfu/ml

ตารางที่ 3.1 สูตรการผลิตแหนมหมู

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมู	1000
ข้าวสุก	60
กระเทียม	50
เกลือ	25
น้ำตาล	5
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส	3
โซเดียมแอสคอเบส	0.5
โซเดียมไนไตรท์	0.100

ที่มา: พรพิมล เทียนทอง (2548)

นำส่วนผสมทั้งหมดไปบรรจุโดยมัดเป็นตุ้ม ให้แต่ละตุ้มมีน้ำหนักประมาณ 25 กรัม จากนั้นรีดเอาอากาศออกมัดให้แน่น นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างแหนม ในช่วงก่อนการหมักและเก็บตัวอย่างแหนมในระหว่างการหมักทุกๆวัน เป็นเวลา 7 วัน มาทำการวัดค่า pH และวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ด้วยการไตเตรท (ภาคผนวก ค) และการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984) และการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ISO 15214, 2007) (ภาคผนวก ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนหมักแหนมด้วยวิธี polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

ทำเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในระหว่างกระบวนการผลิตแหนม จากตัวอย่างแหนมสูตรที่ 2 ประกอบด้วยแหนมเนื้อหมูที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $1.0x10^6$ cfu/ml และสูตรที่ 5 ประกอบด้วยแหนมเนื้อหมูที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 $1.0x10^6$ cfu/ml ในข้อ 3.6.5.2 โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ภายหลังการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมักแหนมวันที่ 0 และวันที่ 7 จำนวน 15 โคโลนีต่อสูตรการหมัก ถ่ายเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดียว และทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยวิธีการย้อมแกรม ตามวิธีการของ (WHO, 1980) (ภาคผนวก ง) จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ตามวิธีการของ Jindaprasert et al. (2011) โดยนำโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนมมาทำการสกัดดีเอ็นเอ ทำการตรวจวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซีส วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัตตราไวโอเลท จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hae*III และทำการตรวจสอบขนาดและรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส ใน 1×TAE buffer ที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยนำไปถ่ายรูปภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกภาพเจล ตามวิธีการในภาคผนวก ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา

การทดสอบหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่เตรียมได้จากเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 โดยนำ crude แบคเทอริโอซินที่ได้มาทำการทดสอบหาความเข้มข้นด้วยการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* โดยแบ่งตามระดับการเจือจางของแบคเทอริโอซิน:น้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:0 - 1:128 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดโซนใสในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* เพื่อหาหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เหมาะสม ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิ pediocin PA-1 จากเชื้อ*P. pentosaceus* TISTR536 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 พบว่าการเกิดโซนใสในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* เริ่มจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินมากที่สุดที่ 1:0 จากนั้นการเพิ่มระดับการเจือจางสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้จนถึงระดับการเจือจางของแบคเทอริโอซิน : น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ 1:64 ส่วนที่ระดับความเจือจางที่ 1:128 ไม่พบการยับยั้งเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทดสอบ ซึ่งการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* ของแบคเทอริโอซินเนื่องจากแบคเทอริโอซินจะเข้าไปจับกับสารประกอบจำพวกไขมัน (anioin lipids) ที่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเซลล์ (cytoplasmic membrane) เกิดรูที่ผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่มีความเสถียรภายในเซลล์และในระดับของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และทำให้สารอื่นๆที่มีผลต่อเซลล์สามารถเข้าไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรียได้ (Chen and Hoover, 2003) และเมื่อคำนวณความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินจากสมการในภาคผนวก ง. พบว่าระดับความเจือจางของแบคเทอริโอซิน: น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* ได้ คือ 1:64 ซึ่งมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ 6400 AU/ml จากข้อมูลดังกล่าวจึงนำมาใช้ในการทดลองในข้อ 4.2 ต่อไป

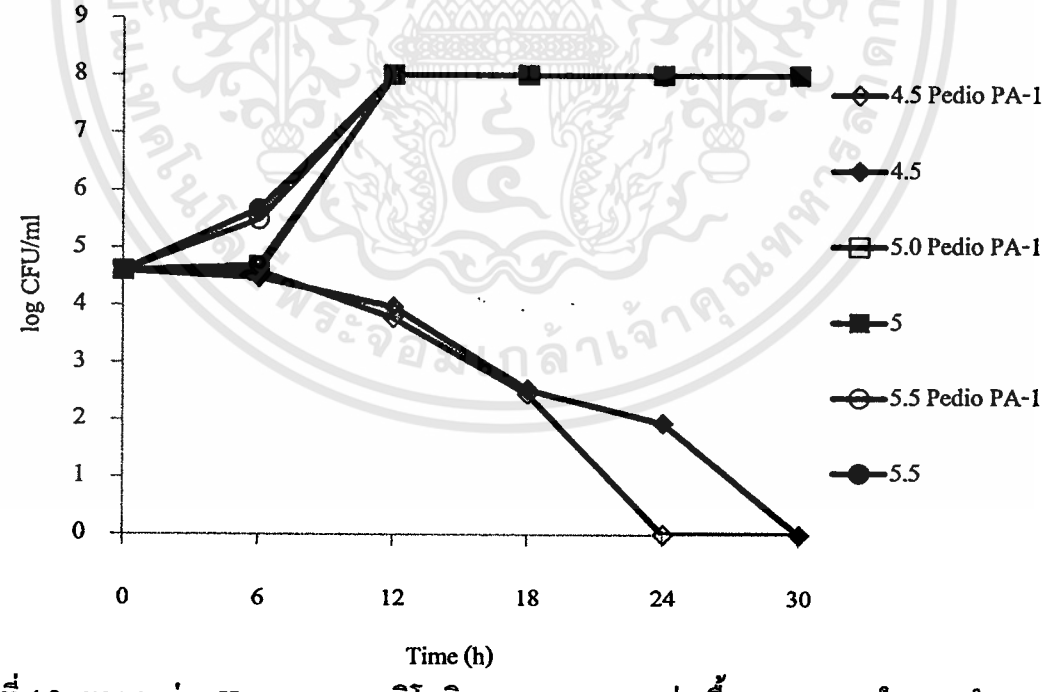
4.2 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองแหนม (Nham Model Broth, NMB) ด้วยสภาวะในการหมักแหนม

4.2.1 ผลของการใช้กรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

การทดลองการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา S. Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ด้วยกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักแหนม โดยปรับค่า pH ของแบบจำลองการหมักแหนมด้วยกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดสอบการทนต่อสภาวะการหมักแหนมของเชื้อซัลโมเนลลาโดยปรับสภาวะที่ค่า pH 4.5 5.0 และ 5.5 และทำการเติมแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml ที่ได้จากผลการทดสอบในข้อ 4.1 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 – 4.5 พบว่าแบบจำลองการหมักแหนมที่ pH 4.5 ร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มของซัลโมเนลลาจากเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ 10^4 cfu/ml ค่อยลดจำนวนลงในชั่วโมงที่ 6 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 โดยเชื้อ *S.* Bangkok และ *S.* Lumphun ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยอาหาร TSA ในสภาวะที่มีการปรับ pH ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน แตกต่างกับเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ที่ปรับค่า pH 4.5 ร่วมกับแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 24 ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ แต่ในกรณีของการปรับค่า pH เพียงอย่างเดียวไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ในชั่วโมงที่ 30 แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดแลคติกที่ปรับ pH 4.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ภายใน 24 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ สอดคล้องกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Swetwiwathana et al. (2007) ที่กล่าวว่าการใช้กรดแลคติกที่ pH 4.5 และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ 25600 AU/ml สามารถในการยับยั้ง *S.* Anatum ได้ โดยตรวจไม่พบเชื้อที่ 12 ชั่วโมง เนื่องจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ใช้ในการทดลองมีค่าความเข้มข้นที่ 6400 AU/ml น้อยกว่าในงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Swetwiwathana et al. (2007) ที่ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินอยู่ที่ 25600 AU/ml จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ช้ากว่า นอกจากนี้ยังพบว่าแบบจำลองการหมักแหนมที่ปรับค่า pH 5.0 และ 5.5 ด้วยกรดแลคติกและร่วมกับแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้น 6400AU/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มของซัลโมเนลลาที่ใช้ในการทดลองได้ โดยค่า pH 5.0 และ 5.5 เชื้อจะค่อยๆ เพิ่มจำนวนจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^4 cfu/ml เป็น 10^8 cfu/ml ภายใน 12 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 -4.5) แตกต่างจาก Swetwiwathana et al. (2007) พบว่าการใช้กรดแลคติกที่ pH 5.0 และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ 25600 AU/ml ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *S.* Anatum แต่เชื้อลดลงจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^5 cfu/ml จนถึง 10^3 cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 30 แต่ในกรณีของ pH 6.0 ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เชื้อ *S.* Anatum เพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาของการทดลองผ่านไป 12 ชั่วโมง จนถึง 10^8 cfu/ml ดังนั้นสรุปได้ว่าการปรับค่า pH ด้วยกรดแลคติก มีผลต่อการเจริญและการยับยั้งเชื้อ ซัลโมเนลลาที่ใช้ในการทดสอบ และการใช้ร่วมกับแบคเทอริโอซินจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่าการไม่ใช้แบคเทอริโอซิน

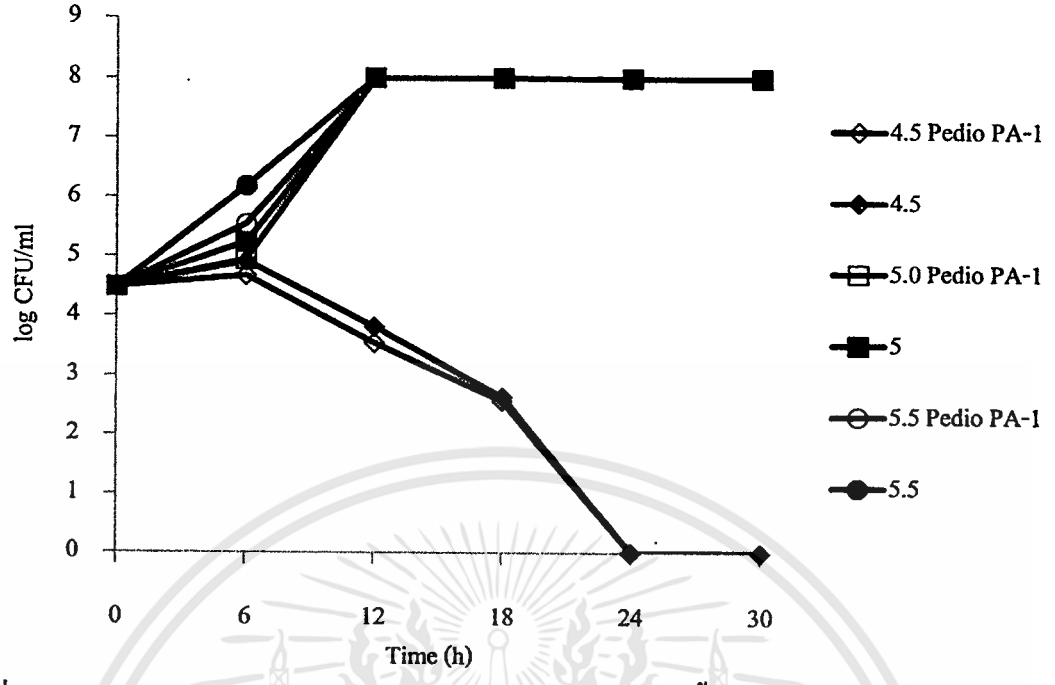


รูปที่ 4.2 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ 4.5 5.0 5.5 หมายถึง ค่า pH ของแบบจำลองแหนม

Pedio PA-1 หมายถึง แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400AU/ml)

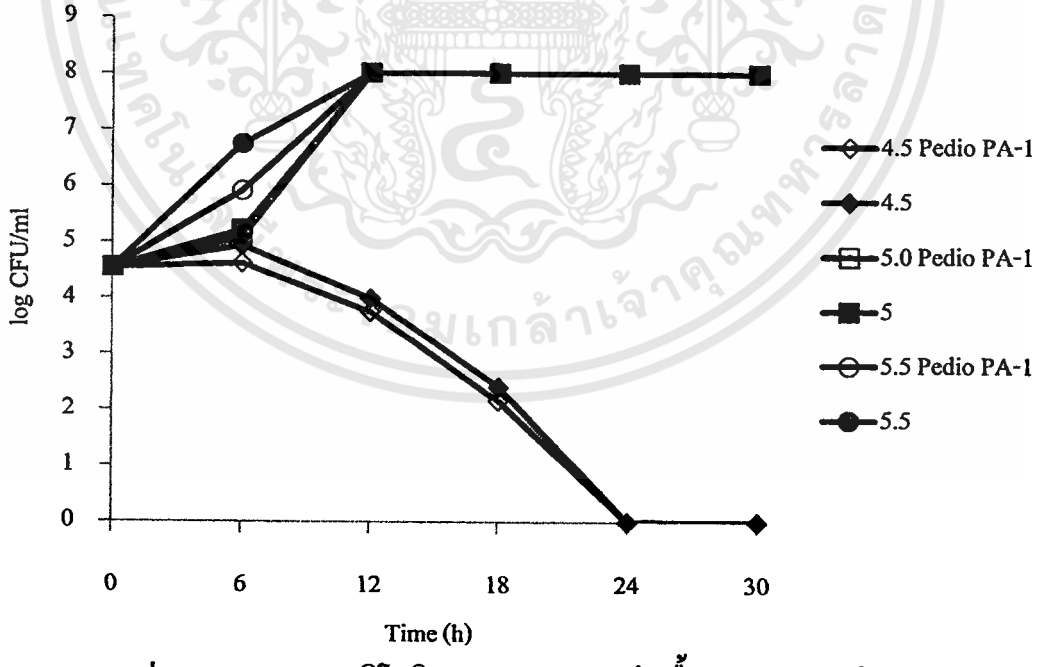
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ 4.5 5.0 5.5 หมายถึง ค่า pH ของแบบจำลองแหนม

Pedio PA-1 หมายถึง แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400AU/ml)

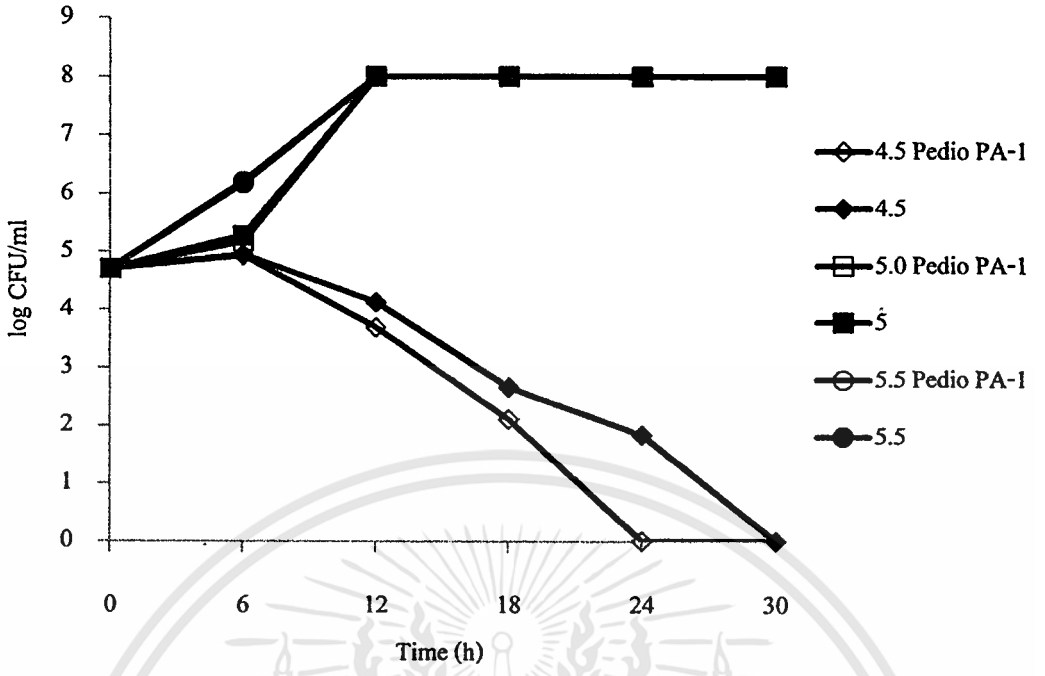


รูปที่ 4.4 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Lumphun ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ 4.5 5.0 5.5 หมายถึง ค่า pH ของแบบจำลองแหนม

Pedio PA-1 หมายถึง แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400AU/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของค่า pH และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ 4.5 5.0 5.5 หมายถึง ค่า pH ของแบบจำลองแหนม

Pedio PA-1 หมายถึง แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400AU/ml)

จากตารางที่ 4.1 - 4.4 แสดงผลเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi มีผลเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บสูงที่ค่า pH 4.5 แต่ในกรณีของค่า pH ที่ 5.5 และ 5.0 พบเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บที่ต่ำกว่า เนื่องจากเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลาสามารถปรับเข้ากับสภาวะการหมักแหนมได้ดีที่ค่า pH ที่สูงกว่า 4.5 ดังนั้นสภาวะในการหมักที่ค่า pH 4.5 จึงไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา ทำให้เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดในสภาวะการหมักแหนมได้ที่ค่า pH 4.5 แต่สามารถอยู่รอดได้ที่ค่า pH 5.5 และ 5.0 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา (สุรีย์ นานาสมบัติ, 2549) จากตารางพบว่าการปรับค่า pH ร่วมกับการใช้แบคเทอริโอซินทำให้เชื้อซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับค่า pH เพียงอย่างเดียว และผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องงานวิจัยของสมัญญา สุขพหล (2549) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S.* Senftenberg *S.* Weltevreden และ *S.* Anatum โดยการปรับสภาวะด้วยกรดแลคติก 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 พบว่ามีอัตราการบาดเจ็บที่สูงกว่าการปรับสภาวะด้วยกรดแลคติคที่ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน โดยพบเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการใช้แบคเทอริโอซินที่ 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกรด 0.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมและไม่ร่วมกับการใช้แบคเทอริโอซิน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 ชั่วโมง ดังนั้นการใช้กรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองการหมักแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400 AU/ml)

ค่า pH ในแบบจำลองหมักแหนม	*S.* Bangkok ในแบบจำลองแหนมไม่เติม pediocin PA-1				*S.* Bangkok ในแบบจำลองแหนมเติม pediocin PA-1		
	ชั่วโมงการบ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
4.5	0	30000	28900	3.60	30000	28900	3.60
	6	30000	23600	83.70	30000	17900	86.46
	12	17750	5050	71.54	19700	2050	89.59
	18	800	0	100	450	0	100
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG
5.0	0	30000	28900	3.60	30000	28900	3.60
	6	115000	51500	55.21	105000	35000	66.66
	12	890000	568000	36.17	360000	175500	51.25
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG
5.5	0	30000	28900	3.60	30000	28900	3.60
	6	455000	144000	68.35	310000	90000	70.96
	12	0	0	NG	0	0	NG
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG

หมายเหตุ Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึงค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Lumphun ในแบบจำลองการหมักแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400 AU/ml)

ค่า pH ในแบบจำลองหมักแหนม	*S.* Lumphun ในแบบจำลองแหนมไม่เติม pediocin PA-1				*S.* Lumphun ในแบบจำลองแหนมเติม pediocin PA-1		
	ชั่วโมงการบ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
4.5	0	35000	32100	8.28	35000	32100	8.28
	6	60500	22500	62.80	24000	8000	66.66
	12	17750	5650	68.16	9850	2050	79.18
	18	243.5	0	100.00	143.5	0	100.0
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	HG
5.0	0	35000	32100	8.28	35000	32100	8.28
	6	120000	60000	50.00	90000	30000	66.66
	12	1150000	895000	22.17	300000	161000	46.33
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG
5.5	0	35000	32100	8.28	35000	32100	8.28
	6	500000	126000	74.80	400000	73500	81.62
	12	0	0	NG	0	0	NG
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG

หมายเหตุ Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึงค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่ปรับค่า pH ที่ 4.5 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 (6400 AU/ml)

ค่า pH ในแบบจำลองหมักแหนม	*S.* Ratchaburi ในแบบจำลองแหนมไม่เติม pediocin PA-1				*S.* Ratchaburi ในแบบจำลองแหนมเติม pediocin PA-1		
	ชั่วโมงการบ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
4.5	0	50000	48500	3.00	50000	48500	3.00
	6	67500	11000	83.70	66500	9000	86.46
	12	300	42	86.0	258	12	95.53
	18	174	12	92.44	127	0	100.0
	24	68	0	100	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG
5.0	0	50000	48500	3.00	50000	48500	3.00
	6	30000	23650	21.16	30000	16250	45.83
	12	2100000	1850000	11.90	1500000	920000	38.66
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG
5.5	0	50000	48500	3.00	50000	48500	3.00
	6	30000	23000	23.33	30000	8900	70.33
	12	0	0	NG	0	0	NG
	18	0	0	NG	0	0	NG
	24	0	0	NG	0	0	NG
	30	0	0	NG	0	0	NG

หมายเหตุ Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึงค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับแบคเทอริโอซินจะทำให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาสูงกว่าการปรับกรดเพียงอย่างเดียว

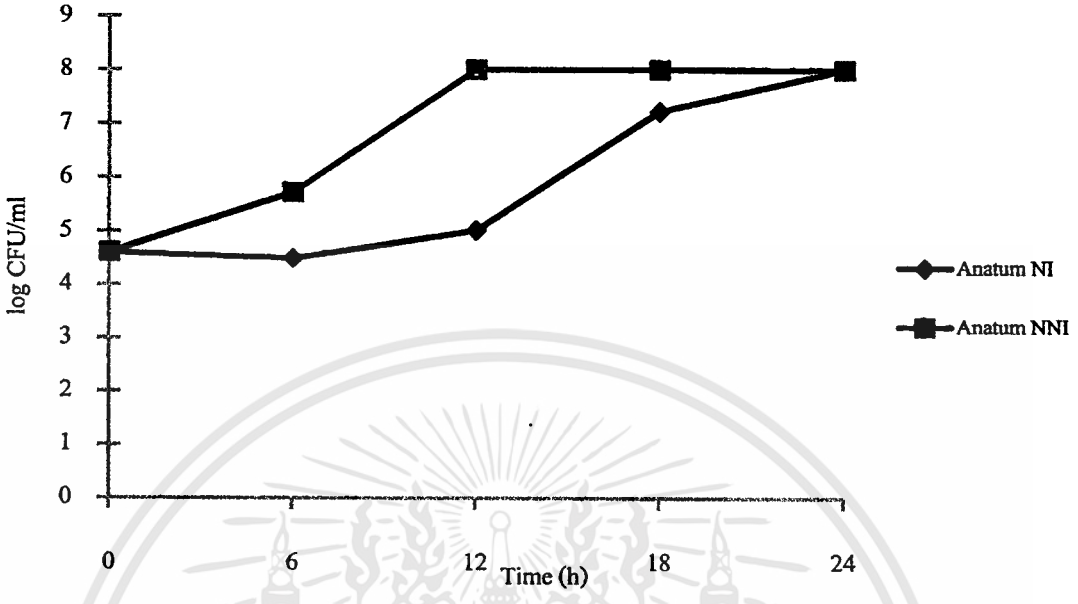
เชื้อ *S.* Anatum มีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อต่ำกว่าของเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่นๆ ในทุกสภาวะการทดลอง โดยที่เชื้อซัลโมเนลลาที่มีค่าการบาดเจ็บใกล้เคียงกับ *S.* Anatum คือ *S.* Ratchaburi รองลงมาคือ *S.* Bangkok และ *S.* Lumphun ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้การปรับค่า pH ร่วมกับแบคเทอริโอซินในสภาวะการหมักแหนม สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่มีความสามารถทนต่อสภาวะการหมักแหนมได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *S.* Anatum ที่พบมากในผลิตภัรฑ์แหนม มาใช้ในศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.2.2 ผลของการใช้โซเดียมไนไตรท์ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์แหนม (เลขที่ มผช 145/2546) กำหนดให้สามารถเติมโซเดียมไนไตรท์ ได้ไม่เกิน 125 พีพีเอ็ม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2546) นอกจากนี้ Swetwiwathana et al. (2007) พบว่าโซเดียมไนไตรท์เป็นสารที่สามารถช่วยในการลดอัตราการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนมได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาในแบบจำลองการหมักแหนมโดยควบคุมปริมาณโซเดียมไนไตรท์ ที่ 100 พีพีเอ็มต่อปริมาตรของแบบจำลองแหนมที่ 200 มิลลิลิตร

จากรูปที่ 4.6-4.9 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lamphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่าในช่วง 0 -12 ชั่วโมงของสภาวะการหมักแหนม โซเดียมไนไตรท์มีผลช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์ หลังจากนั้น พบว่าในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ในทุกชุดของการทดสอบ เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ดีจนถึง 10^8 cfu/ml ที่ 24 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการทดลองไม่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ เชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญได้ดีกว่าจากเชื้อเริ่มต้นที่ 10^4 cfu/ml ถึง 10^8 cfu/ml ที่ 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ Swetwiwathana et al. (1999) รายงานความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) 125 พีพีเอ็ม ในแบบจำลองแหนม ทำให้เชื้อ *S.* Anatum เจริญได้ช้าจากเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml จนถึง 10^8 cfu/ml ที่ 48 ชั่วโมง โดยโซเดียมไนไตรท์เป็นสารที่ให้ผลในการช่วยลดอัตราการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา โซเดียมไนไตรท์จะแตกตัวเป็นไนตริกออกส์ไซด์ (nitric oxides) หรือกรดไนตรัส (nitrous acid) ทำให้เกิดความเป็นพิษและรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรีย (Sindelar et al., 2012) แตกต่างจากงานวิจัยของ Gill and Holley (2003) ทำการทดสอบโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 180 พีพีเอ็ม ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Hear infusion (BHI) และ ATP Broth ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา *S.* Typhimurium ในการทดลองได้

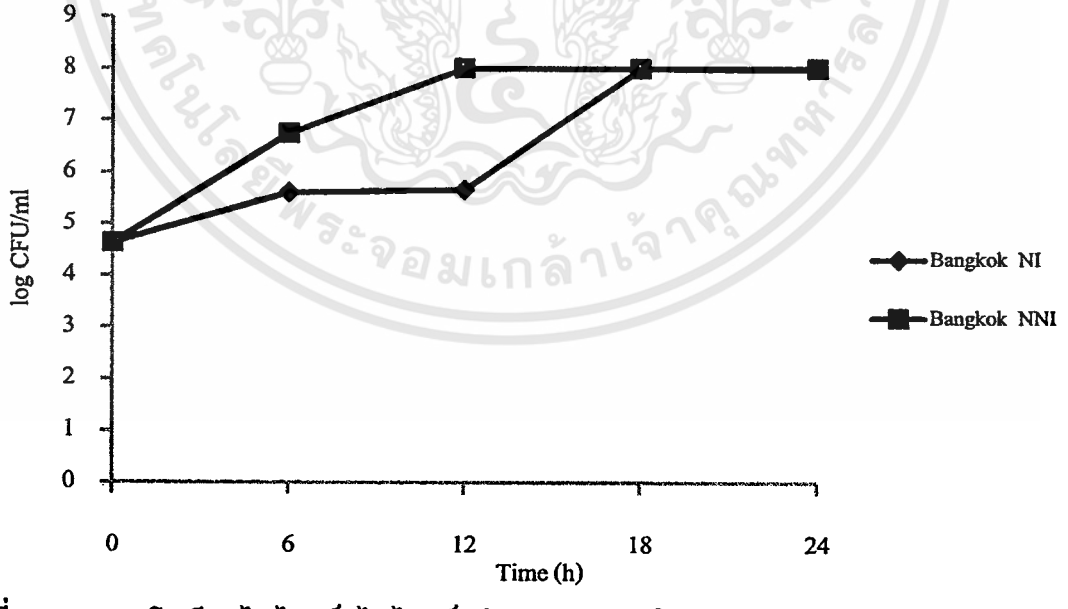
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ผลของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ต่อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ Anatum NI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

Anatum NNI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์

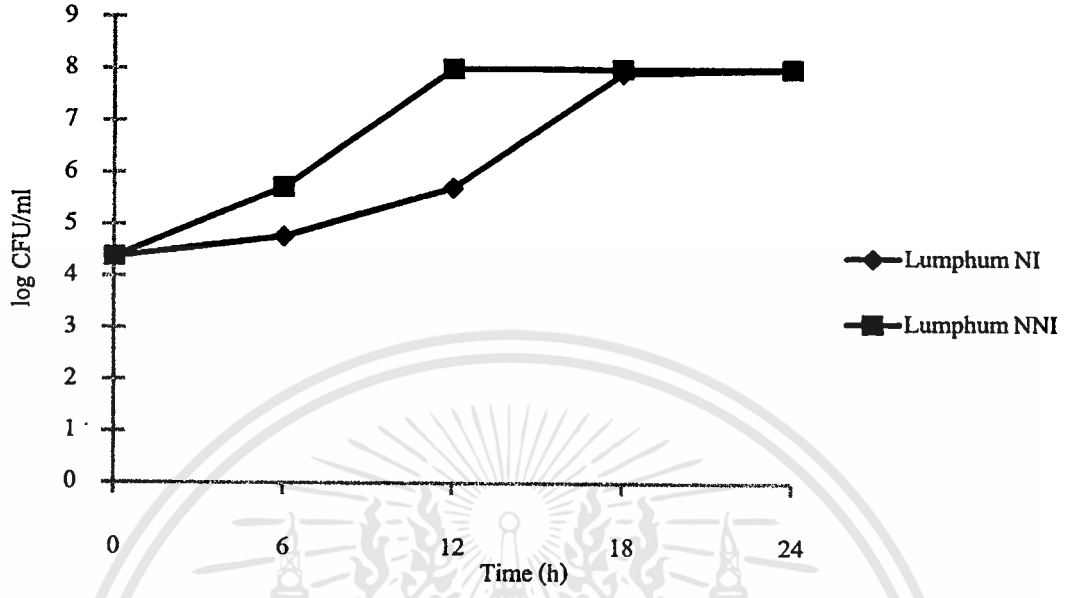


รูปที่ 4.7 ผลของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ต่อ *S.* Bangkok ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ Bangkok NI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

Bangkok NNI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์

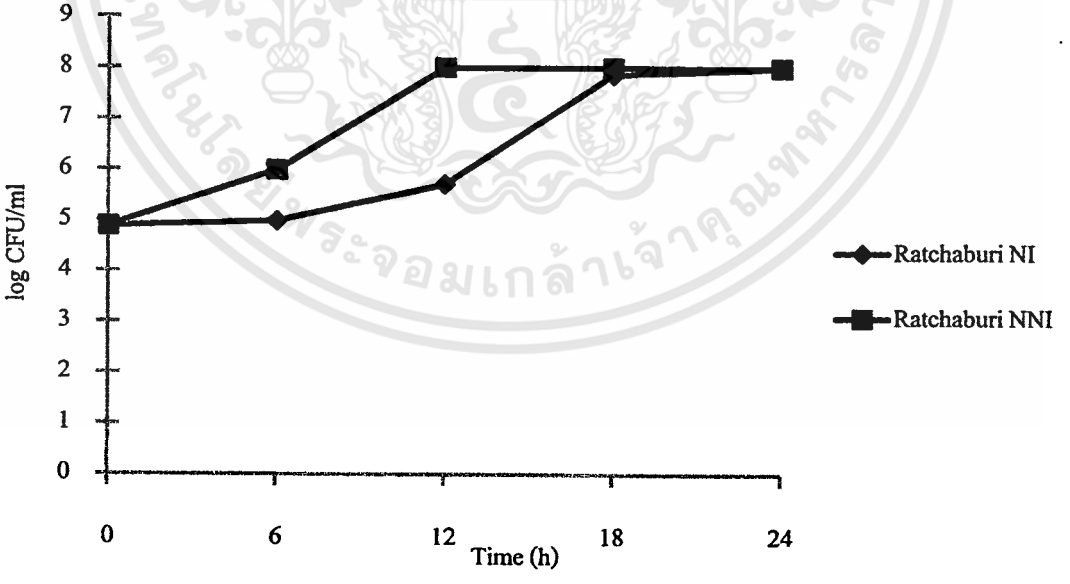
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ผลของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ต่อ *S.* Lumphun ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ Lumphun NI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

Lumphun NNI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์



รูปที่ 4.9 ผลของโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ Ratchaburi NI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

Ratchaburi NNI หมายถึง แบบจำลองแหนมที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาทุกสายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ พบว่าการบาดเจ็บของเชื้อในสภาวะที่มีการเติมสารโซเดียมไนไตรท์จากชั่วโมงที่ 0 ของเชื้อ *S.* Anatum มีค่าเท่ากับ 1.86 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มขึ้นที่ 12 ชั่วโมง เป็น 22.00 เปอร์เซ็นต์ และลดลงที่ 18 ชั่วโมง 11.33 เปอร์เซ็นต์ ก่อนที่เชื้อจะเจริญจนถึง 10^8 cfu/ml แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum ในสภาวะที่ไม่เติมสารโซเดียมไนไตรท์พบว่า เชื้อมีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บเพิ่มขึ้นที่ ชั่วโมงที่ 6 ที่ 28.57 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Bangkok ในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ขณะที่ *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi พบว่ามีค่าการบาดเจ็บของเชื้อเพิ่มขึ้นในช่วง 0-6 ชั่วโมง และ 0 –12 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นพบการบาดเจ็บของเชื้อลดลงตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลามีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะการหมักได้ดี ทำให้ไม่พบการบาดเจ็บเกิดขึ้น เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ พบว่าการบาดเจ็บในช่วง 0-6 ชั่วโมง ของเชื้อ *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากนั้นไม่พบการบาดเจ็บของเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลาตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง สอดคล้องกับงานวิจัยของสิริพร พงษ์วุฒิประพันธ์ (2553) ทำการทดลองยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองแหนม ที่เติมโซเดียมไนไตรท์ 100 พีพีเอ็ม พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่ 10^8 cfu/ml ใน 24 ชั่วโมง จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าโซเดียมไนไตร์ทำให้เชื้อซัลโมเนลลาได้รับบาดเจ็บแต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้

จากผลการทดลองในข้อที่ 4.2.1 และ 4.2.2 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะจำลองการหมักแหนม พบว่าเชื้อ *S.* Ratchaburi มีความสามารถทนต่อสภาวะการหมักแหนมได้ใกล้เคียงกับเชื้อ *S.* Anatum ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงทำคัดเลือก *S.* Ratchaburi ซึ่งคาดว่าจะมีโอกาสปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์แหนม มาศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น การเติมกล้าเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน pepdiocin PA-1 เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อที่ไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ยังทำการทดลองร่วมกันของหลายปัจจัยซึ่งเป็นหลักการของเฮอร์เดิลเทคโนโลยี (hurdle) โดยปัจจัยต่างๆ ที่ทำการทดลองเป็นปัจจัยที่เป็นส่วนประกอบของแหนม เช่น กระเทียม โซเดียมไนไตรท์ และการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมและไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

เชื้อซัลโมเนลลา	แบบจำลองแหนม ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์)				แบบจำลองแหนม เติม โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์)		
	ชั่วโมงการบ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
S. Anatum	0	41666	40890	1.86	41666	40890	1.86
	6	70000	50000	28.57	30000	28000	6.66
	12	-	-	NG	300000	234000	22.00
	18	-	-	NG	17800000	15800000	11.23
	24	-	-	NG	-	-	NG
S. Bangkok	0	483333	459000	5.00	483333	459000	5.00
	6	4900000	4800000	28.57	120000	100000	16.66
	12	-	-	NG	5600000	4800000	14.28
	18	-	-	NG	14800000	11800000	20.27
	24	-	-	NG	-	-	NG
S. Lumphun	0	26333	24500	6.96	26333	24500	6.96
	6	1200000	1000000	16.66	300000	243000	19.00
	12	-	-	NG	3400000	2900000	14.70
	18	-	-	NG	52000000	48000000	7.69
	24	-	-	NG	-	-	-
S. Ratchaburi	0	76666	69700	9.08	76666	69700	9.08
	6	1300000	1300000	NG	300000	287000	4.33
	12	0	0	NG	3000000	2340000	22.0
	18	0	0	NG	95000000	88000000	7.36
	24	-	-	NG	-	-	NG

หมายเหตุ Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึงค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้าง แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

จากการทดลองในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ทำให้ทราบว่าเชื้อ *S.* Ratchaburi สามารถทนต่อสภาวะการหมักในแบบจำลองแหนมได้ใกล้เคียงกับ เชื้อ *S.* Anatum จึงนำมาศึกษาผลของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อดูอัตราการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาเมื่ออยู่ในสภาวะจำลองการหมักแหนม

จากรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่สร้างแบคเทอริโอซิน พบเชื้อ *S.* Ratchaburi สามารถเจริญได้ดีในช่วง 0-18 ชั่วโมงแรก จากเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml จนถึง 10^7 cfu/ml ซึ่งค่า pH ในแบบจำลองการหมักลดลงจาก 6.0 (ปริมาณกรด 0.24 เปอร์เซ็นต์) จนอยู่ที่ 4.67 (ปริมาณกรดแลคติกที่ 0.48 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ จากนั้นเชื้อมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดจนถึงชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 42 ซึ่งพบมีปริมาณเชื้อที่เหลือรอดอยู่ที่ 10^4 cfu/ml ซึ่งแตกต่างกับแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน ดังรูปที่ 4.11 พบว่าเชื้อ *S.* Ratchaburi มีการเพิ่มจำนวนจากเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml จนถึง 10^8 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 18 และมีปริมาณลดลงที่ 10^6 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 42 ค่า pH ลดลงจาก 6.0 (ปริมาณกรด 0.24 เปอร์เซ็นต์) จนถึง pH 4.80 (ปริมาณกรด 0.49 เปอร์เซ็นต์) ในชั่วโมงที่ 18 และ pH 4.63 (ปริมาณกรด 0.51 เปอร์เซ็นต์) ในชั่วโมงที่ 24 ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 48 สามารถตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาที่ 10^5 cfu/ml

การยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม เป็นผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการสร้างกรดทำให้เปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นและค่า pH ลดลงในช่วง 4.5 เป็นผลให้ยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ และการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์การสร้างแบคเทอริโอซินของ *P. pentosaceus* TISTR536 พบว่ามีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 3200 AU/ml ในชั่วโมงที่ 30 ทำให้สามารถควบคุมเชื้อ *S.* Ratchaburi แต่ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อ S. Ratchaburi ได้ทั้งหมด จึงสามารถรอดชีวิตได้ในการทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.2.1 ผลการใช้กรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ในแบบจำลองการหมักแหนม ที่กล่าวว่าค่า pH 4.5 ที่ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซินความเข้มข้น 6400 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ และสอดคล้องกับรายงานของ Swetwiwathana (2005) พบว่าเชื้อ *S.* Anatum เจริญได้ช้าในช่วงแรกของแบบจำลองการหมักแหนมและลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจาก 6 ชั่วโมงแรกจนถึง 48 ชั่วโมง ค่า pH ลดลงจาก 6.5 จนถึง 4.4 และแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 มีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 51,200 AU/ml ในชั่วโมงที่ 30 ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

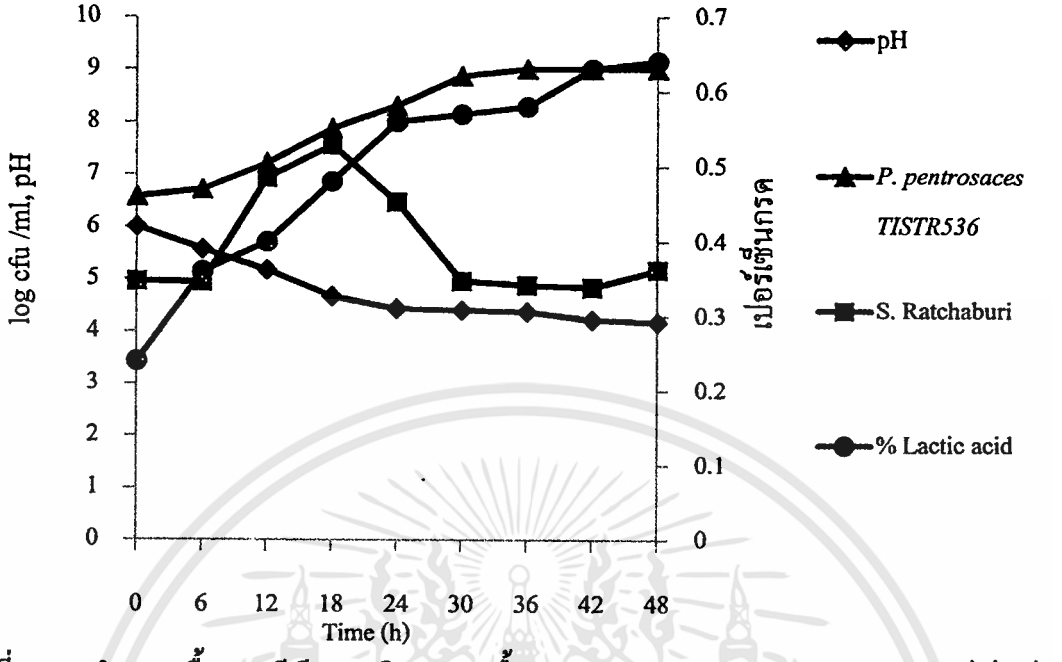
แบบจำลองการหมักแหนม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของพรพิมล เทียนทอง (2548) ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนมร่วมกับ *P. pentosaceus* TISTR536 ได้ แต่สามารถลดเชื้อ *S.* Anatum เชื้อเริ่มต้นที่ 10^4 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเหลือที่ 10^3 cfu/ml ในชั่วโมงที่ 48 ที่ค่า pH ลดลงจาก 6.0 (ปริมาณกรด 0.23 เปอร์เซ็นต์) จนถึง pH 4.2 (ปริมาณกรด 0.45 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 4.6 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi

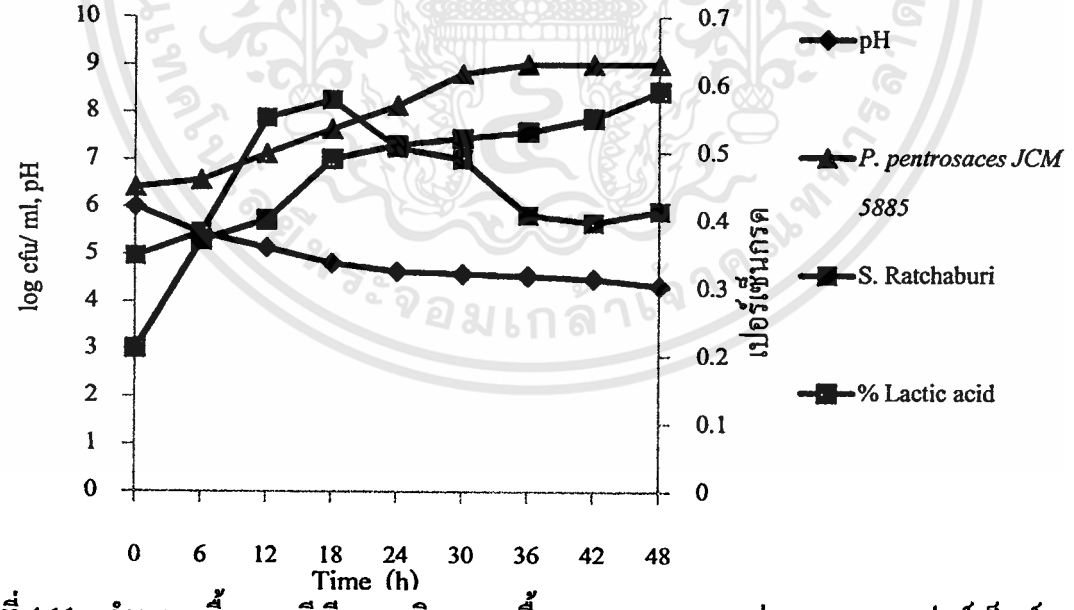
ชั่วโมงที่	ค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)
0	0
6	100
12	400
18	800
24	1600
30	3200
36	1600
42	1600
48	1600

จากการทดลองดังกล่าว จะเห็นได้ว่าปัจจัยในการช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม ไม่สามารถใช้ปัจจัยใดปัจจัยเดียวได้ในการยับยั้งหรือลดอัตราการเจริญของเชื้อดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจำเป็นจะต้องทำการทดลองรวมกันหลายปัจจัย เช่น การใช้กระเทียมร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ และการเติมกล้าเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซินได้ และทำการเปรียบเทียบกับการไม่เติมบางปัจจัย เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองการหมักแหนมและในผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเชื้อ *S.* Ratchaburi ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดในแบบจำลองการหมักที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.11 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเชื้อ *S.* Ratchaburi ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดในแบบจำลองการหมักที่มีการเติมเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

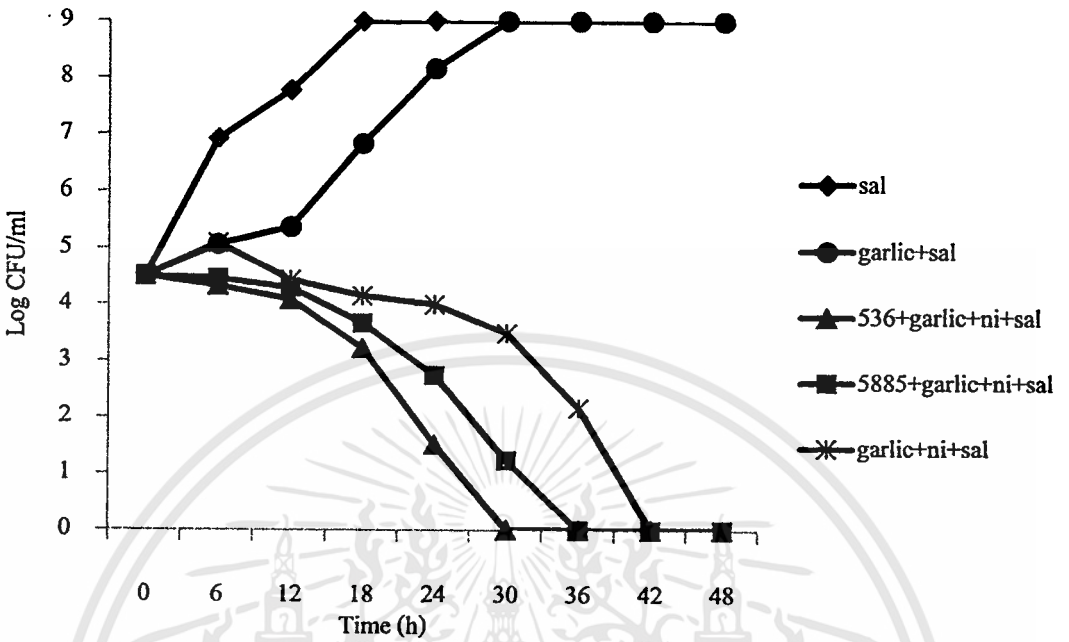
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลของการใช้กระเทียม โซเดียมไนไตรท์ และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติคที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ต่อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

จากการทดลองในข้อ 4.2.1-4.2.3 แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดแลคติก แบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 และโซเดียมไนไตรท์ มีผลช่วยในการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ ดังนั้นจึงทำการทดสอบการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองการหมักแหนมโดยใช้การใช้องค์ประกอบของแหนมเช่น กระเทียม ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่สามารถสร้างและไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 เพื่อควบคุมเชื้อซัลโมเนลลา

จากรูปที่ 4.12 แสดงว่ากระเทียมไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. Ratchaburi ที่เชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml ในสภาวะจำลองการหมักแหนม โดยลดการเจริญในช่วง 6-12 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นเชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญจนถึง 10^8 cfu/ml ได้ที่ 24 ชั่วโมง และคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง ผลของการใช้กระเทียมปลอดเชื้อและโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ที่ 42 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโซเดียมไนไตรท์สามารถลดการเจริญของเชื้อ *S.* Ratchaburi เริ่มต้นของการหมักได้ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.2.2 แต่เมื่อใช้ร่วมกับกระเทียมซึ่งมีสารอัลลิซินที่มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Talia et al., 2001) ส่วนการใช้กระเทียมปลอดเชื้อและโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ที่ 30 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในสภาวะการหมักแหนม เป็นผลมาจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดแลคติก ทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้น และค่า pH ลดลงจาก 6.00 (ปริมาณกรด 0.25 เปอร์เซ็นต์) ถึง 4.17 (ปริมาณกรด 0.64 เปอร์เซ็นต์) และ 4.33 (ปริมาณกรด 0.59 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.7) ส่งผลให้ยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้เช่นกัน แต่การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ดีกว่า เนื่องจาก *P. pentosaceus* TISTR536 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ได้ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 3,200 AU/ml ในชั่วโมงที่ 42 และ 48 (ตารางที่ 4.8) ผลการทดลองสอดคล้องจากงานวิจัยของ Swetwiwathana (2005) และสิริพร พงษ์วุฒิประพันธ์ (2553) รายงานว่าการใช้กับกระเทียมเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม และกระเทียมร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

หมายเหตุ sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

garlic หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม ที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์

536+garlic+ni+sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่การเติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม และกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR536

5885+garlic+ni+sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburiในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม และกล้าเชื้อ *P.pentosaceus* JCM 5885

gal+ni+garlic หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม ที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียม โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	แบบจำลองการหมักแหนมเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536			แบบจำลองการหมักแหนมเติมเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885		
	แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	แบคทีเรียแลคติก (log cfu/ml)	pH	เปอร์เซ็นต์กรด
0	6.766	6.00±0.00	0.25±0.01	6.710	6.00±0.00	0.23±0.05
6	7.210	5.57±0.07	0.36±0.10	7.163	5.43±0.05	0.37±0.20
12	7.707	5.17±0.02	0.40±0.01	7.612	5.13±0.12	0.40±0.10
18	8.070	4.67±0.20	0.48±0.36	8.032	4.80±0.17	0.49±0.09
24	8.205	4.43±0.20	0.56±0.12	8.125	4.63±0.05	0.51±0.10
30	8.662	4.40±0.11	0.57±0.16	8.399	4.57±0.04	0.52±0.16
36	9.000	4.37±0.07	0.58±0.44	9.000	4.53±0.08	0.53±0.62
42	9.000	4.22±0.09	0.63±0.41	9.000	4.47±0.14	0.55±0.37
48	9.000	4.17±0.07	0.64±0.59	9.000	4.33±0.10	0.59±0.55

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียมร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi

ชั่วโมงที่	ค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)
0	0
6	100
12	400
18	800
24	1600
30	1600
36	1600
42	3200
48	3200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ดังตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะการหมักแหนมที่มีกระเทียม ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บสูงกว่าในสภาวะการหมักแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536 ที่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 มีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อสูงกว่ากล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่ไม่สร้างสร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 โดยพบเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน สามารถทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ 67 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 6 ส่วนเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่ ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเชื้อที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 6 แต่ไม่สามารถตรวจพบ *S.* Ratchaburi ได้ที่ชั่วโมงที่ 30 และ 36 ตามลำดับ จากผลการทดลองในแบบจำลองสภาวะการหมักแหนม แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆที่ใช้เป็นองค์ประกอบของแหนมได้แก่ กระเทียม โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์แหนมต่อไป

4.3 การศึกษาการใช้แบคทีเรียแลกติกที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในผลิตภัณฑ์แหนม

การทดลองในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาเริ่มต้นในการทดลองคือ 10^4 cfu/ml ดังนั้นจึงทำการทดลองในผลิตภัณฑ์แหนม ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแหนม โดยนำเนื้อหมูผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการฉายรังสี มาผสมกระเทียมสับ ข้าวสุก โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และส่วนประกอบอื่นๆ แล้วทำการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 และกล้าเชื้อแลกติค *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 จากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้น *S.* Ratchaburi ที่ 10^1 cfu/ml และ 10^4 cfu/ml ตามลำดับ ทำการหมักแหนมที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำเก็บตัวอย่างแหนมทุกๆวัน เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียแลคติกและเชื้อซัลโมเนลลา และทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์กรดและวัดค่า pH

ผลการทดลองตารางที่ 4.10 พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นในแหนมชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อมีค่าเริ่มต้นที่ 10^5 cfu/g แตกต่างกับแหนมที่ทำการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 10^6 cfu/g เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการเพิ่มปริมาณเป็นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-2 วันแรกของการหมัก จากนั้นลดจำนวนลงตลอดระยะเวลาการหมัก pH ลดลงและเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียม ร่วมและไม่ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ชนิดการทดลอง	ชั่วโมงที่บ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
Sal	0	16100	13400	11.25
	6	239	203	15.00
	12	233	194	16.73
	18	0	0	0
	24	0	0	0
Galic	0	16100	13400	11.25
	6	129	114	11.62
	12	233	204	12.44
	18	245	201	17.95
	24	176	165	6.25
	30	0	0	0
	36	0	0	0
	42	0	0	0
	48	0	0	0
Gal+ni+sal	0	16100	13400	11.25
	6	179	123	31.28
	12	141	69	51.06
	18	143	67	53.14
	24	100	20	80.00
	30	32	6	81.25
	36	7	0	100
	42	NG	NG	NG
	48	NG	NG	NG

หมายเหตุ sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

gal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์

gal+ni+sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

TISTR536 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536

JCM 5885 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* JCM 5885

Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึง ค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่มีการเติมกระเทียม ร่วมและไม่ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) และเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ชนิดการทดลอง	ชั่วโมงที่บ่ม	TSA (cfu/ml)	XLD (cfu /ml)	เปอร์เซ็นต์บาดเจ็บ
TISTR536	0	16100	13400	11.25
	6	119	39	67.22
	12	57	18	68.42
	18	57	0	100
	24	6	0	100
	30	NG	NG	NG
	36	NG	NG	NG
	42	NG	NG	NG
	48	245	NG	NG
JCM 5885	0	16100	13400	11.25
	6	287	228	20.55
	12	199	106	46.73
	18	31	3	74.19
	24	18	2	88.88
	30	3	0	100
	36	NG	NG	NG
	42	NG	NG	NG
	48	NG	NG	NG

หมายเหตุ

sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม

gal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์

gal+ni+sal หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

TISTR536 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR536

JCM 5885 หมายถึง แบบจำลองการหมักแหนมที่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* JCM 5885

Trypticase soy agar (TSA) และ Xylose-lysine-desoxycholate agar (XLD) (cfu/ml) หมายถึง ค่าการตรวจนับเชื้อจากอาหารเลี้ยงทั้งสองชนิด

เปอร์เซ็นบาดเจ็บ (%) หมายถึง ค่าการบาดเจ็บที่คำนวณจากผลการตรวจนับเชื้อ

วิธีการคำนวณ = $\frac{\text{TSA- XLD}}{\text{TSA}} \times 100$ เปอร์เซ็นต์

NG หมายถึง ไม่พบเปอร์เซ็นต์บาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมกล้าเชื้อ โดย *P. pentosaceus* TISTR536 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ใกล้เคียงกับกัน *P. pentosaceus* JCM5885 ในช่วงวันที่ 2 วันแรกของการหมัก แต่หลังจากนั้นเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 มีการผลิตกรดที่ช้ากว่าเนื่องจากการปรับตัวต่อสภาวะการหมักที่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียแลคติกตามธรรมชาติอยู่อาจทำให้ไม่สามารถผลิตกรดได้ดีเท่ากับ *P. pentosaceus* TISTR536 ซึ่งเชื้อนี้ได้คัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์แหนม แต่เมื่อกล้าเชื้อสามารถปรับตัวและเพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น ในวันที่ 5 ของการหมัก ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 อีกครั้ง ซึ่งต่างจากการไม่เติมกล้าเชื้อที่ค่า pH และ เปอร์เซ็นต์กรดมีค่าต่ำกว่าตลอดการหมักทั้ง 7 วัน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เกิดตามธรรมชาติของสภาวะการหมัก ซึ่งทำให้แบคทีเรียแลคติกต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนและผลิตกรดแลคติกมากขึ้น

ตารางที่ 4.10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดในแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 *P. pentosaceus* JCM5885 และไม่เติมกล้าแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลา (วัน)	แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ)			แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536			แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885		
	LAB	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	LAB	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	LAB	pH	เปอร์เซ็นต์กรด
0	5.63	5.98±0.01	0.37±0.01	6.52	5.98±00.01	0.38±0.01	6.48	5.98±0.01	0.36±0.05
1	7.17	5.78±0.16	0.39±0.07	8.18	5.50±0.07	0.43±0.10	7.71	5.53±0.05	0.39±0.20
2	6.76	5.63±0.21	0.39±0.2	7.98	5.11±0.017	0.54±0.09	7.82	5.07±0.12	0.48±0.09
3	6.69	5.22±0.14	0.48±0.07	7.51	4.91±0.2	0.64±0.36	7.41	4.98±0.17	0.48±0.08
4	6.38	4.86±0.07	0.48±0.09	6.89	4.69±0.20	0.88±0.12	7.35	4.84±0.05	0.69±0.09
5	5.98	4.74±0.14	0.6±0.07	6.76	4.51±0.11	0.99±0.16	6.27	4.64±0.04	0.9±0.16
6	5.98	4.61±0.06	0.78±0.23	6.76	4.36±0.07	1.2±0.43	5.97	4.42±0.08	1.03±0.62
7	5.46	4.49±0.04	0.78±0.21	6.84	4.26±0.09	1.2±0.41	5.72	4.35±0.14	1.2±0.36

หมายเหตุ LAB หมายถึงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ตรวจนับจากตัวอย่างแหนมจำนวน 25 กรัม ในหน่วย log cfu/ml

ผลการตรวจเชื้อ *S.* Ratchaburi ดังตารางที่ 4.11 ในผลิตภัณฑ์แหนม พบว่าผลจากการฉายรังสีที่เนื้อหมูเมื่อทำการเก็บตัวอย่างเนื้อหมูสดจำนวน 25 กรัม ที่ผ่านการฉายรังสี ตรวจไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา ทั้งก่อนนำเนื้อหมูผสมกับส่วนผสม และหลังผสมกับส่วนผสมในการทำแหนม ในสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อพบว่า *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM5885 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 cfu/ml ในวันที่ 5 และในวันที่ 7 (สูตรที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลของการตรวจเชื้อ *S.* Ratchaburi ในเนื้อหมูและผลิตภัณฑ์แหนมสูตรต่าง ๆ

ระยะเวลาการหมักแหนม (วัน)	เนื้อหมูเริ่มต้น	เนื้อหมูหลังคลุกเคล้าส่วนผสม	ผลิตภัณฑ์แหนม					
			สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
1	N	N	P	P	P	P	P	P
2			P	P	P	P	P	P
3			P	P	P	P	P	P
4	N	N	P	P	P	P	P	P
5			P	P	N	P	P	P
6			P	P	N	P	P	P
7	N	N	P	P	N	P	N	P

หมายเหตุ
สูตรที่ 1 หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi 2.18 $\times 10^1$ cfu/ml ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย
สูตรที่ 2 หมายถึง เชื้อ *S.* Ratchaburi 4.43 $\times 10^4$ cfu/ml ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย
สูตรที่ 3 หมายถึง เชื้อ *P. pentosaceua* TISTR 536 6.59 $\times 10^6$ cfu/ml และ *S.* Ratchaburi 2.18 $\times 10^1$ cfu/ml
สูตรที่ 4 หมายถึง เชื้อ *P. pentosaceua* TISTR 536 6.59 $\times 10^6$ cfuU/ml และ *S.* Ratchaburi 4.43 $\times 10^4$ cfu/ml
สูตรที่ 5 หมายถึง เชื้อ *P. pentosaceua* JCM 5885 6.36 $\times 10^6$ cfu/ml และ *S.* Ratchaburi 2.18 $\times 10^1$ cfu/ml
สูตรที่ 6 หมายถึง เชื้อ *P. pentosaceua* JCM 5885 6.36 $\times 10^6$ cfu/ml และ *S.* Ratchaburi 4.43 $\times 10^4$ cfu/ml
P หมายถึง การตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม
N หมายถึง การตรวจไม่พบเชื้อซัลโมเนลลาในแหนม

และ 5) ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่าแบคทีเรียแลคติกที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นไปตามผลการทดลองในข้อ 4.2.4 ที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ภายใน 24 ชั่วโมง แต่เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ที่ 30 ชั่วโมง ในแบบจำลองการหมักแหนม ผลการทดลองยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/g (สูตรที่ 6) ส่วนสูตรแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่เชื้อเริ่มต้นที่ 10^1 cfu/ml และ 10^4 cfu/g (สูตรที่ 1 และ 2) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Swetwiwathana et al. (2007) รายงานผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISTR 536 และ *P. pentosaceus* JCM 5890 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum เริ่มต้นที่ 10^1 cfu/g ในวันที่ 4 และวันที่ 5 ของการหมักแหนม

เชื้อ *S.* Ratchaburi สามารถรอดชีวิตในแหนมได้ จากผลการทดลองในข้อ 4.2.1 ในแบบสภาวะจำลองแหนม พบว่าค่า pH ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้นั้นอยู่ที่ 4.5 แต่ค่า pH ของแหนมซึ่งพบว่าในช่วงวันที่ 0-5 มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.51-5.98 (ตารางที่ 4.10) จึงทำให้เชื้อซัลโมเนลลามีโอกาสเจริญได้ดีในช่วงแรกของการหมัก จนกระทั่งค่า pH ลดลงอยู่ในช่วง 4.5 จึงสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^1 cfu/ml ได้ แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของ *S.* Ratchaburi เริ่มต้นในแหนมสูง 10^4 cfu/g เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างและไม่สร้างสารแบคเทอริโอซินจึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ดังนั้นถ้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการปรับตัวกับสภาวะการหมักแหนมที่ช้าและผลิตกรดแลคติกที่ช้าและความเข้มข้นที่ต่ำจากแบคเทอริโอซิน ทำให้เชื้อซัลโมเนลลาสามารถเจริญและรอดชีวิตได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chaowaree Ruengwilysup (2005) ใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lb. plantarum* (ATCC 14917) *Lb. sakei* (ATCC 15521) *Leu. mesenteroids* (ATCC 43201) *P. acidilactici* (ATCC 25470) และ *P. pentosaceus* (ATCC 35150) ที่ไม่สร้างและสร้างสารแบคเทอริโอซินในการควบคุมเชื้อ *S.* Typhimurium ในแหนมโดยทำการลดปริมาณเชื้อจากเชื้อเริ่มต้นที่ 4.86 log cfu/g ที่ 0 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่า 2.9 log cfu/g ที่ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าเชื้อซัลโมเนลลาสามารถรอดชีวิตจากการหมักแหนมได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้กล้าเชื้อ Lactacel 115 ร่วมกับกระเทียมสกัด 1.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ กระเทียมผง 1.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และกระเทียมสับ 3 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา ได้ที่ 48 ชั่วโมงโดยลดเชื้อจาก 4.86 log cfu/g เหลือที่ 1.48 cfu/g ที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nightingale et al. (2005) ทำการควบคุมเชื้อ *S.* Enteritidis ในซาลามี ในระยะการหมักช่วง 72 ชั่วโมง พบเชื้อซัลโมเนลลาในซาลามีสามารถรอดชีวิตจากสภาวะการหมักที่ค่า pH ลดลง 4.4 ภายใน 24 ชั่วโมง และสามารถรอดชีวิตจากการกระบวนการทำแห้งในกระบวนการผลิตซาลามีได้ ผลการทดลองแสดงว่าเชื้อซัลโมเนลลาสามารถรอดชีวิตจากการหมักผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อได้

จากผลการทดลองดังกล่าวมาข้างต้นนั้น ทำให้ทราบว่ามีปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา โดยในผลิตภัณฑ์แหนมอาศัยหลักของ เฮอร์เดิลเทคโนโลยี (hurdle) ยับยั้งเชื้อโดยอาศัยกรดแลคติกจากการผลิตของแบคทีเรียแลคติกร่วมกับการสร้างแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ยังต้องอาศัยการปรับตัวที่เร็วของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีการปนเปื้อนหรือทำการเติมกล้าเชื้อลงในแหนมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ ร่วมกับการช่วยลดอัตราการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารจากเครื่องเทศ เช่น กระเทียมที่มี สารอัลลิซิน ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นมีผลต่อยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์แหนมมีการเติม โซเดียมไนไตรท์และสารเคมีอื่นๆ เพื่อช่วยยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้อีกด้วย ดังนั้นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์แหนมได้

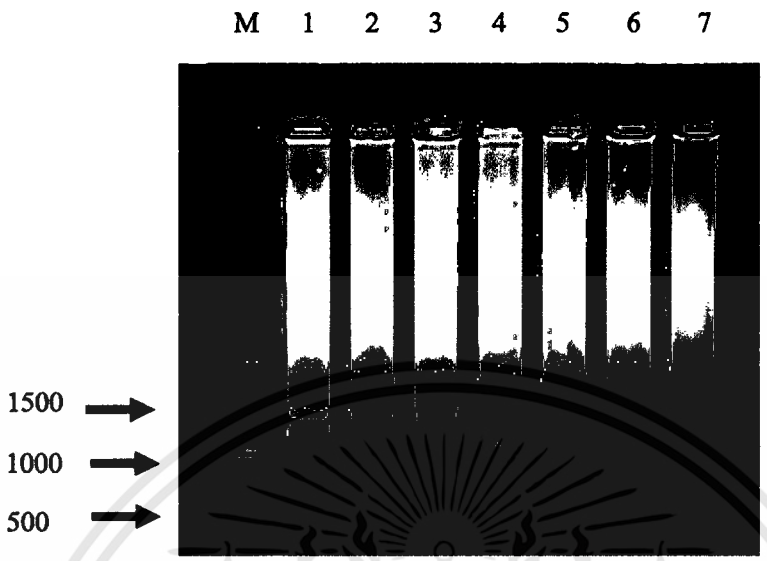
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นอยู่กับผู้ผลิตมีการควบคุณวัตถุดิบและสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดีก็จะช่วยให้การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารลดลงได้ด้วย ในการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน จำเป็นจะต้องมีการศึกษาถึงความสามารถในรอดชีวิตจากสภาวะการหมักแหนม เพื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวไปใช้ในการศึกษางานวิจัยอื่นๆต่อไป ดังนั้นจึงทำได้ทำการตรวจหาเชื้อ *P. pentosaceua* TISTR536 และ *P. pentosaceua* JCM5885 โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อให้มีความมั่นใจว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการทดลอง สามารถลดเชื้อซัลโมเนลลาได้จริงและมีการรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้ออื่นๆ ในกระบวนการหมักแหนม

4.4 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในระหว่างกระบวนหมักแหนมด้วยวิธี PCR-RFLP

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ได้ ดังนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate จากแหนมเนื้อหมูที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในวันที่ 0 เท่ากับ $6.52x10^4$ cfu/g และวันที่ 7 เท่ากับ $6.63x10^6$ cfu/g และจากแหนมหมูที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในวันที่ 0 เท่ากับ $6.22x10^4$ cfu/g และวันที่ 7 เท่ากับ $6.02x10^4$ cfu/g แบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ส่วน เลือกโดยสุ่มลักษณะโคโลนีที่มีโซนใสของการละลายของ calcium carbonate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar + 1 เปอร์เซ็นต์ calcium carbonate จำนวน 15 โคโลนีต่อตัวอย่าง และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำการตรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยวิธีย้อมแกรมเชื้อ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 16s rDNA ของแบคทีเรียแลคติกในการหมักแหนม จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) มาทำการวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานด้วย 100 bp DNA ladder (SM0321, Fermentus, U.S.A) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาด 1500 bp ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ ดังรูปที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16s rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ของแบคทีเรียแลคติก และตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

Lane M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)
Lane 1 กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536
Lane 2 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 วันที่ 0
Lane 3-4 เชื้อแบคทีเรียแลคติก จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 วันที่ 7
Lane 5 เชื้อแบคทีเรียแลคติก จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 วันที่ 0
Lane 6 เชื้อแบคทีเรียแลคติก จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 วันที่ 7
Lane 7 น้ำกลั่นบริสุทธิ์

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 1500 bp ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก มาทำการตรวจยืนยันสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในระหว่างการหมักแหนมวันที่ 0 และ 7 โดยการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Hae*III ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้บนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 3.0 เปอร์เซ็นต์ใน 0.5×TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วจึงนำเจลมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับขนาดและรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังรูปที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 พบว่ามีรูปแบบและขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเหมือนกัน แสดงว่ามีการตรวจพบเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 จากการสุ่มตัวอย่างในแหนมจริง โดยผลจากการสุ่มโคโลนีในวันที่ 0 จำนวน 15 โคโลนี พบว่ามีจำนวนโคโลนีที่สุ่มมาเหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 15 โคโลนี และวันที่ 7 จำนวน 15 โคโลนี พบว่ามีจำนวนโคโลนีที่สุ่มมาเหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 15 โคโลนี ตามลำดับ การตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ในระหว่างการหมักแหนม ซึ่งสุ่มตัวอย่างจากแหนมจำนวน 15 โคโลนี พบว่ามีรูปแบบและขนาดของแถบดีเอ็นเอเหมือนกับเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 10 โคโลนีแตกต่างจำนวน 2 โคโลนี ในวันที่ 0 และ7 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.15 เมื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *P .pentosaceus* JCM 5885 ในแหนมมีความแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์แหนมทำให้มีการปรับตัวเข้ากับแหล่งอาหารและสภาวะการหมักได้ดีกว่า ทำให้อัตราการรอดสูงกว่าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ที่มีชนิดเดียวกันและไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน ทำให้พบในอัตราการรอดที่ต่ำกว่า ซึ่งเชื้อดังกล่าวทนต่อสภาวะการหมักแหนมได้ไม่ดี จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการตรวจพบเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ได้ต่ำกว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536

รูปที่ 4.14 ผลการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Hae*III ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกจากแหนมสูตรที่ 2 ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 และเชื้อบริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

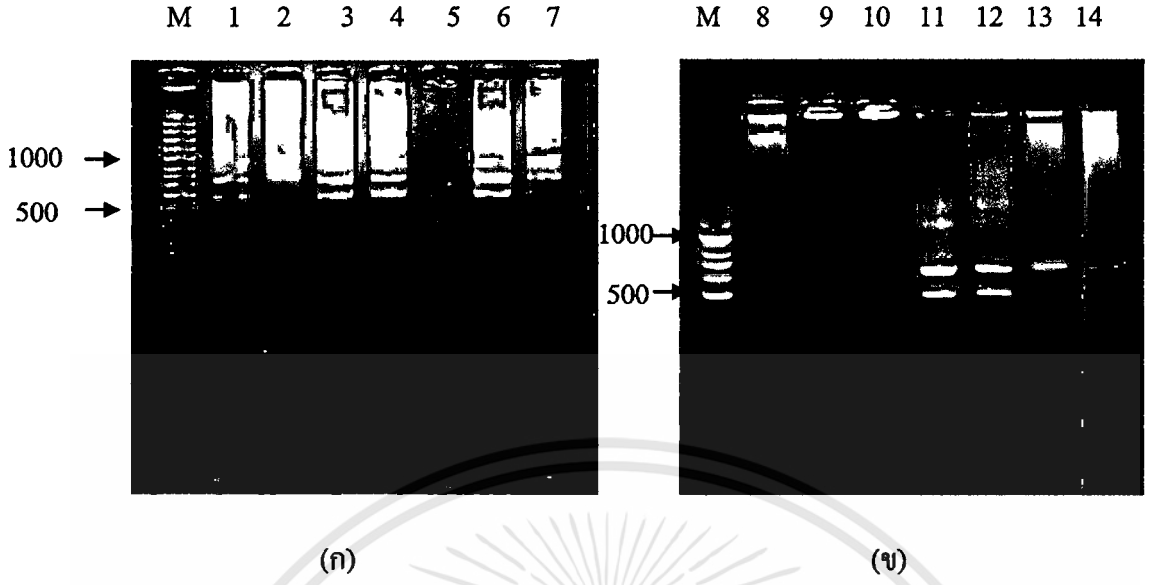
Lane M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

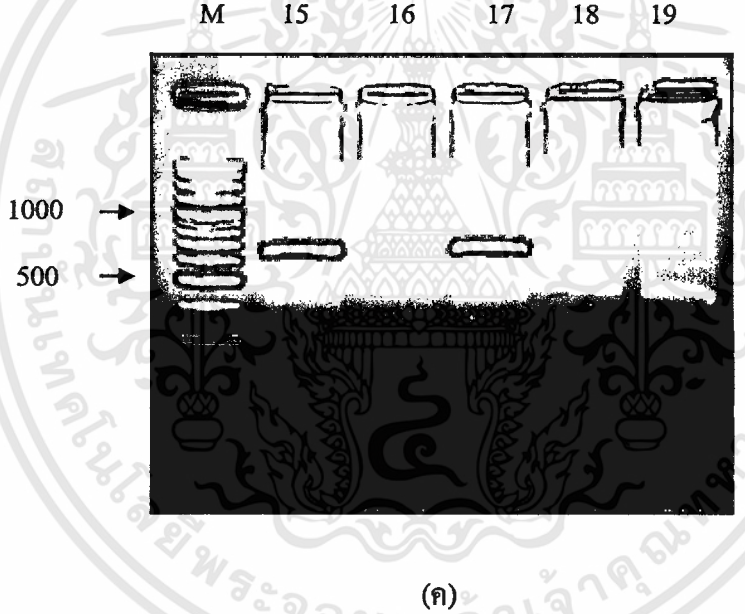
Lane 1 *P. pentosaceus* TISTR 536

Lane 2-6 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 0

Lane 7-11 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ 4.15 ผลการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ก และ ข) และ *Alu*I (ค) ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกจากแหนมสูตรที่ 5 ที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* JCM 5885 ในวันที่ 0 และวันที่ 7 และเชื้อบริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบบนอะกาโรสเจลอิโทรโฟเรซิส 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5×TAE buffer

Lane M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

Lane 1 *P. pentosaceus* JCM 5885

Lane 2-7 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 0

Lane 8-14 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ วันที่ 7

Lane 16-17 เชื้อแบคทีเรียแลคติก จากตัวอย่าง เติมกล้าเชื้อ วันที่ 0

Lane 18-19 เชื้อแบคทีเรียแลคติก จากตัวอย่าง เติมกล้าเชื้อ วันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในแหนม พบว่า *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 รอดชีวิตจากสภาวะการหมักแหนมได้ สามารถลดเชื้อซัลโมเนลลาและมีการรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้ออื่นๆในกระบวนการหมักแหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาผลของการรอดชีวิตของเชื้อซัลโมเนลลาในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่าเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi ไม่สามารถรอดชีวิตที่ pH 4.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ความเข้มข้นประมาณ 6400 AU/ml ที่ 24 ชั่วโมง และแบบจำลองการหมักแหนมที่มี *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ปรับค่า pH 4.5 ไม่ร่วมแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อได้ที่ 30 ชั่วโมง แต่การปรับค่า pH ที่ 5.0 และ 5.5 ร่วมและไม่ร่วมกับแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลา

2. โซเดียมไนไตรท์ที่ 100 พีพีเอ็ม ในแบบจำลองการหมักแหนม ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphum และ *S.* Ratchaburi ในเวลา 24 ชั่วโมง

3. การใช้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่สร้างและไม่สร้างแบคเทอริโอซิน pediocin PA-1 ที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่ 10^4 cfu/ml ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ในแบบจำลองการหมักแหนม

4. องค์ประกอบของแหนม เช่น กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับไนไตรท์ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม และเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่าเชื้อ *S.* Ratchaburi ไม่สามารถรอดชีวิตได้ที่ 30 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน ที่ 30 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ 1600 Au/ml และ pH 4.40 (ปริมาณกรด 0.57 เปอร์เซ็นต์) และการใช้องค์ประกอบของแหนมร่วมกับ *P. pentosaceus* JCM 5885 พบว่า *S.* Ratchaburi ไม่สามารถรอดชีวิตได้ที่ 36 ชั่วโมงโดยค่า pH ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการทดลอง 4.33 (ปริมาณกรด 0.56 เปอร์เซ็นต์) การใช้องค์ประกอบของแหนมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก เชื้อ *S.* Ratchaburi ไม่สามารถรอดชีวิตที่ 42 ชั่วโมง นอกจากนี้การใช้กระเทียมปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ที่ชั่วโมง 48 และเชื้อซัลโมเนลลาในชุดควบคุม (ไม่มีการเติมส่วนประกอบของแหนมและเชื้อแบคทีเรียแลคติก) เจริญได้ที่ 10^8 cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 12

5. ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์แหนม ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่เชื้อเริ่มต้น 10^1 cfu/g ในวันที่ 5 และวันที่ 7 ของการหมัก การเติมเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885 ที่ 10^6 cfu/g ในการหมักแหนมที่มีการเติมเชื้อ *S.* Ratchaburi ที่เชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/g พบเชื้อซัลโมเนลลาสามารถรอดชีวิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในระหว่างกระบวนหมักแหนมด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่าสามารถตรวจยืนยันการรอดชีวิตของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 และ *P. pentosaceus* JCM 5885

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย พบว่าผลิตภัณฑ์แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ ดังนั้นสำหรับผู้บริโภค ก่อนการบริโภคแหนมควรปรุงให้สุกหรือควรบริโภคแหนมที่ผ่านการหมักอย่างน้อย 4-7 วัน หรือสังเกตจากลักษณะสีที่ผลิตภัณฑ์แหนมที่มีสีชมพูตามธรรมชาติและมีกลิ่นเปรี้ยวของกรดแลคติก

ในการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน pediocin-PA1 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม จำเป็นจะต้องมีการเพิ่มจำนวนเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อเพิ่มโอกาสในอยู่รอดและการควบคุมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร รวมทั้งควบคุมวัตถุดิบและสุขลักษณะส่วนบุคคลในโรงงานผลิตที่ดี นอกจากนี้ควรจะทำการศึกษาถึงความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเหมาะสมในการเติมและคงเหลือในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากในบางประเทศมีข้อมูลว่าสามารถเติมโซเดียมไนไตรท์ได้ถึง 200 พีพีเอ็ม ตามกำหนดในการควบคุมการใช้โซเดียมไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมผลิตแหนมในการเติมกล้าเชื้อ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ความสม่ำเสมอของการผลิต และการควบคุมเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์แหนมได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระเทียม. 2554. กลุ่มยุทธศาสตร์และสารสนเทศ สำนักงานส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่ เข้าถึงได้จาก http://www.ndoae.com/Data_plant/garlic2010.htm (20 ธันวาคม 2554)

ขวัญทวี พ่อค้าทอง. 2543. การจัดทำเกณฑ์คุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์แหนม. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTEC)

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ . 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. อมรินทร์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

จักรารัตน์ ติโลกวิชัย. 2555. ผลของแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลคติกต่อการลด *Staphylococcus aureus* บนผิวเนื้อโค. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ไพโรจน์ วิริยจารี ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ สุชาดา อนุตรกุล. 2538. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 6. ผลของโซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ และ เชื้อ *Micrococus varians* ต่อสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์. วารสารเกษตร 11(1) : 60 – 61.

ไพโรจน์ วิริยจารี ลักขณา รุจนะไกรกานต์ สุขยา บุญถนอม วิวรรธน์ วรรณมัจจริยา และ อิศรพงษ์ หงส์ศิรกุล. 2538. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมการพัฒนาสีชมพูแดงในผลิตภัณฑ์ . วารสารเกษตร 11(1) : 83 – 101.

พรพิมล เทียนทอง. 2548. ผลการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในระหว่างการผลิตแหนมแบบดั้งเดิมและการผลิตแหนมกึ่งแห้ง วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

พันทิพา สุวรรณรัตน์. 2550. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และการหืนของกระเทียมอบแห้งในระหว่างการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

พิมพิกา สายสวาสดิ์. 2554. ผลของไคโตซานต่อแบคทีเรียบางชนิดที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมักแหนม วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

นภา โล่ทอง. 2537. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต.พิมพ์ครั้งที่ 3. พันนี่ พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิส.ในการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. วันที่ 24 พฤษภาคม 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. แหนม มผช. 145/2546. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เวณิกา เบ็ญจพงษ์ เรณู ทวิชาติวิทยากุล เนตรนภิส ธนนิเวศน์กุล นฤมล ปิ่นประไพ. 2547. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (เล่มที่ 1) การศึกษาสถานการณ์และระบบจัดการความปลอดภัย ด้านอาหารกลุ่มสัตว์บกและผลิตภัณฑ์. สถาบันคลังสมองของชาติ

วรายุทธ สุระนรากุล. 2549. คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศิพัตม์ รักษ์เผ่า. 2539. ผลของเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสภา สีชอล์ค. 2541. ผลของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้น โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท และโซเดียมไนไตรท์ต่อการลดลงของ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์แหนม (มอก. 1219-2547). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2539. การเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar และ MSRV agar กับ differential medium ชนิดอื่นๆ สำหรับการตรวจหา เชื้อซัลโมเนลลา ในอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอ็คติวิตี้สูงและอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอ็คติวิตี้ต่ำ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2549. ผลของการปรับตัวต่อกรดของเชื้อ *Salmonella* ต่อความอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

สมัญญา สุขพหล. 2549. ผลของกรดแลคติกและสาร pediocinPA-1 จาก *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

สิริพร พงษ์วุฒิประพันธ์. 2553. ผลของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อคุณภาพแหนมที่ผลิตจากเนื้อโคไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2547. ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 6 พฤศจิกายน 2547. เข้าถึงได้จาก http://www.fda.moph.go. th/fda-net/html/product/food/ntf/DirtyFood3Attach.html (12 มกราคม 2553)

อรุณ บ่างตระกูลนนท์ สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และชัยวัฒน์ พูลศรีกาญจน์. 2545. โรคซัลโมเนลโลซิส (*Salmonellosis*). เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/files/Salmonella1.pdf (20 ธันวาคม 2554)

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. ผลการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อซัลโมเนลลาในการหมักแหนม วิยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2539. ประสิทธิภาพของ Salmosyst กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar ต่อการตรวจหา *Salmonella* ในแหนม. ใน การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 34. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 272-279.

อดิศร เสวตวิวัฒน์.2546. การศึกษาผลของพีเอชต่อการตรวจพบซาลโมเนลลาในแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

อังกูร เกิดพาณิช. 2549. บทความ ฟื้น วิชา Salmonella Infections. เวชสารแพทย์ทหารบก. 59 (4) ตุลาคม-ธันวาคม: 231-245.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. หจก. ภาพพิมพ์, กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์มศว. 23 (2) : 145-160.

อนุชา มุมอ่อน วสันต์ เคยเหล่า สุดารัตน์ เคยเหล่า. มปป. แนวทางการควบคุมเชื้อซัลโมเนลลาในขั้นตอนการผลิตเนื้อไก่ในโรงฆ่าและชำแหละไก่เพื่อการส่งออก. สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) .1984. *Salmonella*, *Salmonella* in food preparation of culture media and reagents final action. Available: http://www.aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/04A06.pdf (December 15, 2011)

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) .1984. Official Methods of Analysis 14thed. Association of official analytical chemists. Arlington, Virginia, USA.

Gill O. A. and A. R. Holley. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°C. International Journal of Food Microbiology. 80:251– 259

U.S. Food and Drug Administration .2001. Bacteriological Analytical Manual **BAM** (R 11) Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water. Available: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm061208.htm (December 15, 2011)

Bangtrakulnonth, A. and R. Phan-Urai 1995. Salmonellosis due to *Salmonella* Bangkok. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 26: 777-780.

Bangtrakulnonth A., S. Pornruangwong, P. Warachit and A. Swetwiwathana. 1999. Incidence of new *Salmonella* serovar (*S.* ratchaburi) in Thailand. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 30 (4): 776-778.

Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong, C. Pulsrikarn, P. Sawanpanyalert, R. S. Hendriksen., A. M. Danilo, L. F Wong. and F. M. Aarestrup. 2004. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993–2002. Emerging Infectious Diseases. 10 (1) : 131-136. Caplice, E. and G.F. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: role of microorganism in food product and preservation. International Journal of Food Microbiology. 50: 131-149.

Coyne, V.E., M.D. James, S.J. Reid and E.P. Rybicki. 2001. Standard PCR Molecular Biology Techniques Manual. 3th edition. Department of Molecular and Cell biology, The University of Cape Town.

Chen, H. and D H. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews International Food Science And Food Safety. 2: 83-110.

De Vuyst, L. and E.J Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. *In* De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. (ed.). Bacteriocins of lactic acid bacteria - Microbiology, Genetics and Applications. Chapter and Hall, New York.

Erkkilä, S., M.L. Suihko, S. Earola, E. Petäjä and T. Mattila-Sandholm. 2001. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. International Journal of Food Microbiology. 64: 205-210.

Human Health Fact Sheet Nitrate and Nitrite. 2005. Argonne National Laboratory. USA. Available: http://www.ead.anl.gov/pub/doc/nitrate-ite.pdf (January 27, 2011)

Hampikyan, H. and M. Ugur. 2007. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks). Meat Science. 76 : 327-332.

IS0 15214. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria colony count technique Available: http://www.condalab.com/pdf/1433.pdf (December15, 2011)

Jindaprasert, A., K. Jirajaroenrat and A. Swetwiwathana. 2011. Characterization of lactic acid bacteria in Thai traditional fermented sausage during fermentation and storage. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khon Kaen, Thailand.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Review. 12:39-85.

Krusong, W. 2004. Industrialization of Thai nham: Fermented pork or beef. *In* Steinkraus, K.H. (ed) Industrialization of Indigenous Fermented Foods. 2nd ed. Revised and expanded. Marcel Dekker. New York.

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

Komkhae, P. 2006. Purificaton and characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology). Graduate School, Kasetsart University. Thailand.

Kusum, M., A. Bangtrakulnonth, C. Pulsrikarn and F.M. Aarestrup. 2006. . *Salmonella* Lamphun : Isolated new *Salmonella* serovar in Thailand.. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 37 Suppl 3: 149-152.

Kaban, G. and M. Kaya. 2005. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. Meat Science. 17 : 797 - 801.

Lawson, L. D. and C. D. Gardner. 2005 Composition, stability and bioavailability of garlic product used in clinical trial; Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 6254-6261.

Moore, J. E. 2004. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. Meat Science. 67: 565–568.

Talia M, I. Shin, G. Feigenblat, L. Weiner, D. Mirelman, M. Wilchek, and A. Rabinkov. 2001. A spectrophotometric a say for allincin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. Analytical Biochemistry. 307: 76–83.

Nassu, R.T., L.A.G. Goncalves and F.J. Beserra. 2002. Use of different starter culture in processing of goat meat fermented sausages. Ciencia-Rural. Santa Maria.. 32 (6): 1051-1055.

Nightingale, K.K., H. Thippareddi, R.K. Phebus, J.L. Marsden and A.L. Nutsch. 2005. Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 69 (4): 794–800.

Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactobacillus lactis* WNC 20 strain fron Nham, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology. 81(2) :137-145.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ruengwilysup, C .2005. Controlling *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O15:H7 *Yersinia Enterocolitica* and *Listeria Monocytogenes* in Nham a Thai style pork sausage by lactic acid bacteria . Doctor of Philosophy Food Science Graduate Program College of Agriculture Kansas state University. Manhattan, Kansas USA.

Sahl, H.G., R.W. Jack and G. Bierbaum. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modification. European Journal of Biochemistry. 230 : 827-853.

Sindelar J. J. and A. L. Milkowski. 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. Nitric Oxide. 26; 259–266.

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

Swetwiwathana, A. and N. Lotong, 1999. Selection of bacteriocin producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat).Proceeding of International Conferences on ASIAN Network on Microbial Researchers. November 29 – December 1, 1999. Chiang mai, Thailand. PIII/16:543-548.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama, A. K. Sonomoto, and T. Zendo. 2003. Screening of bacteriocin-producing bacteria associated in nham (traditional Thai fermented meat). 49th International Congress of Meat Science and Technology 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology August 31 – September 5, 2003.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama, T. Zendo, and K. Sonomoto. 2004. Identification of Pediocin PA-1 producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from nham (Thai fermented meat).The 50th International Congress of Meat Science and Technology. August 8-13, 2004. Helsinki, Finland.

Swetwiwathana, A. 2005. Microbiological quality enhancement of Thai Ferment meat product (Nham) asocial pediocim-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536). Ph.D. Thesis of Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University, Japan.

Swetwiwathana, A., N. Lotong, J. Nakayama, and K. Sonomoto. 2007. Maturation of Nham – a Thai fermented meat product : Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella* Anatum during nham fermentation. Fleischwirtschaft International. 3: 46 – 49.

Visessanguan, W., S. Benjakul, T. Smitinonta, C. Kittikuna, P. Thepkasikula. and A. Panya.2006. Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. LWT - Food Science and Technology 39 : 814-826.

WHO. 1980. Manual of basic techniques for a health laboratory Available: http://www.searo.who.int/en/ Section10/ Section17/Section53/Section482_1781.htm (December15, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก-1 อาหารเลี้ยงเชื้อ DHL agar acc. to SAKAZAKI (Merck, Germany)

Peptone from casein	10.0	กรัม
Peptone from meat	10.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
L-cysteinium chloride	0.2	กรัม
Sodium citrate	1.0	กรัม
Sodium deoxycholate	1.5	กรัม
Sodium thiosulfate	2.0	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	1.0	กรัม
Neutral red	0.03	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 63.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้ออาจตกตะกอน ไม่มีผลต่อการทำงาน ห้ามนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

ก-2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine indole motility (LIM) medium (Difco, U.S.A.)

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine hydrochloride	10.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 16.52 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้ส่วนผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) (Merck, Germany)

Peptone from casein	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-4 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth (Merck, Germany)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Triammonium citrate	2.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D(+)glucose	20.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบ 52.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยการต้มให้เดือด นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella-Shigella (SS) agar (Merck, Germany)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
OX bile	8.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium citrate	10.0	กรัม
Sodium thiosulfate	8.5	กรัม
Ammonium iron (III) citrate	1.0	กรัม
Brilliant green	0.0003	กรัม
Neutral red	0.025	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้ออาจตกตะกอน ไม่มีผลต่อการทำงาน ห้ามนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

ก-6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple sugar iron (TSI) agar (Merck, Germany)

Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	15.0	กรัม
Proteose peptone	5.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Phenol red	12.0	มิลลิลิตร
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 76.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้ส่วนผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 3.5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)

Casein peptone	17.0	กรัม
Soymeal peptone	3.0	กรัม
D (+) Glucose	2.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium chloride	5.0	กรัม
Di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อTSB 30 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) (Merck, Germany)

Casein peptone	15.0	กรัม
Soymeal peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar (Merck, Germany)

Yeast extract	3.0	กรัม
L-Lysine	5.0	กรัม
Xylose	3.65	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้ออาจตกตะกอน ไม่มีผลต่อการทำงาน ห้ามนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก-10 สูตรอาหารในการเตรียมแบบจาลองการหมักแหนม (Nham model broth, NMB)

(Swetwiwathana et al., 1999)

Beef extract	10.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Sodium ascobate	0.5	กรัม
Sodium tri-polyphosphate	3.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Sodium chloride	25.0	กรัม
Sodium nitrite	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ ใช้กลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวปรับค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) ให้มีค่าเท่ากับ 0.97 ในขวดปรับปริมาณ ปรับค่าพีเอชด้วย กรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าเท่ากับ 6.0, 5.0, 4.5

ก-11 น้ำยาเจือจาง Buttlefield's phosphate buffered (BAM R11, 2001)

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล (N) และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้าฆ่าฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตวงใส่ขวดปริมาตร 450 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 กรัม) หรือ ตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) และดูด 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-12 Salmosyst Broth Base (Merck, USA)

Peptone from casein	5.0	กรัม
Peptone from meat	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Calcium carbonate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายสารประกอบโดยรวม 25 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นำเข้านึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-13 Salmosyst Selective Supplement (Merck, Germany)

Potassium tetrathionate	0.2	กรัม
OX bile	0.08	กรัม
Brillant green	0.0007	กรัม
Calcium carbonate	0.1	กรัม

การเตรียม Preliminary Enrichment

นำตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในอาหาร Salmosyst Broth Base ที่เตรียมไว้ 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นและบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6-8 ชั่วโมง

การเตรียม Selective Supplement

ดูดสารละลาย Preliminary Enrichment มา 10 มิลลิลิตร เติม Salmosyst Selective Supplement tablet 1 เม็ด เขย่า 30 นาที นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจในขั้นตอน selective plating ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

ข-1 การเตรียมกระเทียมปลอดเชื้อ

เลือกกระเทียมที่มีมีจุดและไม่มีเชื้อรา ชั่งน้ำหนักกระเทียมตามจำนวนที่ต้องการ แล้วนำเข้าตู้เขี่ยเชื้อ และทำการปลอดกระเทียมโดยที่ไม่ให้ผิวกระเทียมได้รับความเสียหาย ด้วยมีดปลอดเชื้อและปากคีบ หลังจากนั้นนำมาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จึงนำมาหั่นและสับให้ได้ขนาดแล้วเติมลงในแบบจำลองการหมักแหนม

ข-2 การเตรียมไนไตรท์ปลอดเชื้อ 100 พีพีเอ็ม

ชั่งโซเดียมไนไตรท์ 0.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตรนำสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (ไนไตรท์) ในขวดปรับปริมาตรกรองผ่าน filter membrane 0.2 ไมครอนเติมในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาและห่อด้วยกระดาษฟรอยเพื่อป้องกันแสง แล้วจึงนำไปแช่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปเติมลงในแบบจำลองแหนม

ข-3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มัล

เตรียมได้จากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม เติมน้ำในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดแก้วสีชา

ข-4 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

ข. 4.1 TE buffer (10 mM Tris-HCl 1mM EDTA)

ผสม Stock solution ของ Tris-HCl 1.0 M pH 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ stock solution ของ EDTA 0.5 M pH 8.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

หมายเหตุ

Stock solution ของ Tris-HCl 1.0 M pH 7.5 ละลาย Tris base 12.11 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 โดยกรด HCl 1.0 M แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stock solution ของ EDTA 0.5 M pH 8.0 ละลายไดโซเดียมเอทิเลียนไดเอมีนเททราเอซิเตท (disodiummethlenediaminetetra acetate.2H_2O) หรือ EDTA 18.612 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer และค่อย ๆ เติมสารละลายด่างความเข้มข้น 1.0N NaOH ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 (เกลือไดโซเดียมของ EDTA จะไม่กลายเป็นสารละลายจนกระทั่งมีการปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 8.0 โดยการเติม 1.0 N NaOH) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ข 4.2 SDS 20% (Sodium dodecyl sulphate)

สารละลาย SDS อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis-grade) 20 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร วางบน hot plate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยในการละลายจากนั้นวางไว้จนเย็น และปรับพีเอชให้เป็น 7.2 โดยเติมสารละลายกรด 1.0 N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ ให้ใส่หน้ากากเมื่อชั่ง SDS ทำความสะอาดเครื่องชั่งและบริเวณที่ชั่ง เพราะผลึกที่ละเอียดของ SDS กระจายง่าย

ข 4.3 Proteinase K 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลาย Proteinase K 0.2 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 200 µl แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ข 4.4 Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

ตวงสารละลาย Chloroform:Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ผสมให้เข้ากันใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ที่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ข 4.5 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

ตวง Alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 736.84 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

ข 4.6 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile water)

ตวงน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการลงในขวดดูแรน และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข 4.7 50x TAE buffer

Tris	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	กรัม
0.5 M EDTA , pH 8.0	100	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี

ค-1 การตรวจวัดปริมาณกรดแลคติกด้วยวิธีการไตเตรท ตามวิธีการ Tritration method ของ (ดัดแปลงจาก AOAC., 1984)

การเตรียมสารเคมี

1. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (น้ำกลั่นต้มเดือด 20 นาที พักให้เย็น)
2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล

เตรียมได้จากละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม เติมน้ำในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดแก้วสีชา

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก

ปิเปตตัวอย่างที่ละลายแล้ว 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นต้มที่ทิ้งให้เย็นโดยมีการปิดฝาเพื่อป้องกัน CO_2 20 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร และเติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุด end point เกิดสีชมพูคำนวณหาปริมาณกรดแลกติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1{,}000 \times \text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

N = ความแข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท

หมายเหตุ กรณีของตัวอย่างของแข็ง เช่น ตัวอย่างแหนมต้องทำการบดตัวอย่างจำนวน 5 กรัมกับน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตรก่อนจะทำการไตเตรทตัวอย่างน้ำที่ได้

ค-2 การวัดค่าพีเอช (ดัดแปลงจาก AOAC., 1984)

โดยนำตัวอย่างมาละลายแล้วปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรใส่บิกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดด้วย เครื่องพีเอชมิเตอร์

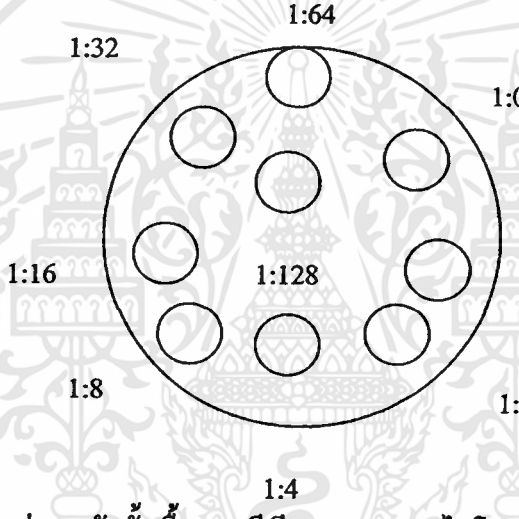
หมายเหตุ ในกรณีของตัวอย่างเป็นของแข็งเช่น ตัวอย่างแหนมต้องนำตัวอย่างจำนวน 3 กรัมมาทำการบดกับน้ำกลั่นปริมาตร5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการวัดค่าพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

ง-1 คำนวณหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสังเกตได้จากค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (clear zone) ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จากส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ x 100 (Komkhae, 2006)



ภาพผนวกที่ ง-1 แสดงค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง

เช่น ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = $\frac{64}{1} \times 100$ AU/ml

= 6,400 AU/ml

ง-2 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลาที่อาจปนเปื้อนจากแหนม

นำตัวอย่างแหนมมาตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา ที่เติมลงไปในการทดลอง (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984) ตามแผนผังแสดงวิธีการ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำตัวอย่างแหนม 25 กรัม บรรจุลงในถุงปลอดเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmosyst Broth Base ปริมาณ 225 มิลลิลิตร

↓

ตีปั่นให้ส่วนผสมเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อและเติม Salmosyst tablet จำนวน 1 เม็ด เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

เขี่ยเชื้อจากหลอดตัวอย่างเชื้อ จำนวน 1 ลูป ขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ DHL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะกลม ขอบเรียบ ใส มีหรือไม่มีจุดสีดำตรงกลางของการเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสงสัยว่าเป็นเชื้อซัลโมเนลลาจากอาหารแข็ง XLD และ DHL อย่างละ 5 โคโลนี

↓

เสียบ (stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและขีด ลงบนผิวหน้าอาหาร (streak) ลงในหลอดอาหารเอียง TSI

เสียบ(stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM

↓

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

หยดสารสารละลายโคแวค (KOVAC's indole reagent) ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM และตรวจสอบผลเชื้อซัลโมเนลลา ตามตาราง ค-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-1 ตารางเทียบผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อซัลโมเนลลา

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

ตรวจสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI

K = alkaline ปลายหลอด (slant) ของ TSI จะมีสีแดงหรือสีชมพูบานเย็น

A = acid ก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S + = ในหลอด TSI จะเกิดตะกอนสีดำของก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะต้องให้ผล +

H_2S - = ไม่เกิดตะกอนสีดำในหลอด TSI เนื่องจากไม่เกิดการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

gas + = มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและก๊าซเพียงเล็กน้อย

gas - = ไม่พบฟองอากาศในหลอด TSI (มีบางเซโรวาร์ให้ผล -)

ตรวจสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM

lysine + = หลอดอาหารจะมีสีม่วงทั้งหลอด เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลามีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อ lysine มีความเป็นด่างมากขึ้นมีผลทำให้ bromcresol purple ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ในอาหารดังกล่าวและมีสีม่วงซึ่งมี pH เป็นกลาง เปลี่ยนเป็นมีสีม่วงมากขึ้น ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์ตัวนี้

lysine - = หลอดอาหารจะมีสีเหลือง เนื่องจากเชื้อที่ทำการทดสอบไม่มีเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่มีเอนไซม์ lysine deaminase ซึ่งจะไปย่อย lysine ทำให้ pH ของอาหารต่ำลง มีผลทำให้ bromcresol purple เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

indole + = จะมีสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากหยดน้ำยาโคแวค

indole - = ไม่เกิดสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังหยดน้ำยาโคแวค ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาจะไม่มีเอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับน้ำยาโคแวค

motile + = หลอดอาหาร LIM จะขุ่นทั้งหลอด เนื่องจากเชื้อซัลโมเนลลาส่วนใหญ่จะมีแฟรกเจลลา ใช้ในการเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อทำการ stab เชื้อลงในอาหาร LIM แล้วบ่มเพาะเชื้อโดยเชื้อซัลโมเนลลาที่เจริญจะเคลื่อนที่ออกจากรอย stab ไปทุกทิศทุกทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

motile - = หลอดอาหาร LIM จะมีรอยเชื้อเจริญเฉพาะบริเวณรอย stab เท่านั้น ส่วนอาหารอบรอย stab จะใส เพราะเชื้อไม่มีแฟรกเจลลาในการเคลื่อนที่

ง-3 การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก (ISO 15214 ,2007)

1. เตรียมตัวอย่างแหนม 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ
2. เทน้ำยาเจือจางจากการเตรียมใน 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher
3. ทำการเจือจางตัวอย่าง 7 ระดับการเจืองจางตามความเหมาะสมด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. ดูดตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางหยดลงบน MRS agar+0.5% calcium carbonate ความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ จานละ 0.1 มิลลิลิตร
5. ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (L) ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับการเจือจาง
6. บ่มเพาะเชื้อทั้งหมดใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. ตรวจนับโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) จากความเจือจางที่เหมาะสม

ง- 4 วิธีการย้อมแกรม (Gram staining) (WHO 1980)

1. หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด
2. ใช้ลูป (loop) แตะโคโลนีของเชื้อจากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
3. เกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ไม่ให้หนาแน่นมากจนเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)
4. ตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านไปอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง
5. หยดสีคริสตอลไวโอเลต (Crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ทั่ว ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเททิ้ง
6. หยดสารละลายไอโอดีน (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

ง-5 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก

5.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก

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

5.2 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Coyne และคณะ, 2001)

1. นำเซลล์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโคร เซนตริฟิวจ์ 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 เขย่าหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ กลับไปมา 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

ง-6 การวิเคราะห์ขนาดและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซีส (ดัดแปลงจากภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

1. เตรียมถาดเจลสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เตรียมสารละลายอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ใน ใน 1×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 1x ปริมาตร 2 ไมโครลิตร รวมเป็น 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงไปที่ช่องในแผ่นเจลแต่ละช่องปริมาตร

7. ดูดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ไมโครลิตร แล้วใส่ลงช่องในแผ่นเจลเพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

8. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดเครื่อง ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 25 นาที

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

ง-7 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

สูตรคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ มีดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน 16s rDNAของแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิคพีซีอาร์

(Jindaprasert et al., , 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 et al.,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

แล้วพักปฏิกิริยาที่ 15 หรือ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส ใน 1×TAE buffer เพื่อทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง-9 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 โดยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส ใน 1×TAE buffer ที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยนำไปถ่ายรูปภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกภาพเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นาย สรุจน์ วีรวัฒนโยธิน
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2525
ที่อยู่	849/37 ซอยปุณณวิถี 45 ถนนสุขุมวิท 101 บางจาก พระโขนง กรุงเทพมหานคร 10260
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2551 และศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีพ.ศ 2551 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2555
การนำเสนอผลงาน	Veerawatanayotin, S., A. Jindaprasert, K. Pilasombut, J. Sethakul and A. Swetwiwathana. 2010. "Effect of pediocin PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and *S.* Ratchaburi in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth " 56th International Congress of Meat Science and Technology. August 15-20 2010. Jeju, Korea.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 **เดือน** ตุลาคม **พ.ศ.** 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การอยู่รอดของเชื้อ *Salmonella* Anatum *S.* Bangkok *S.* Lumphun และ *S.* Ratchaburi ระหว่างการหมักแหนม

Survival of *Salmonella* Anatum, *S.* Bangkok, *S.* Lumphun and *S.* Ratchaburi during Nham fermentation

ชื่อนักศึกษา นายสรุจน์ วีรวัฒนโยธิน

รหัสประจำตัว 51608070

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 18 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร. จรรณา ตั้งเจริญชัย)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้