ผลของกรดแลคติกและสาร PediocinPA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

EFFECTS OF LACTIC ACID AND PEDIOCIN PA-1 FROM *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ON SALMONELLAE REDUCTION IN RETAILED CUT BEEF

สมัญญา สุขพหล
SAMANYA SUKPAHON

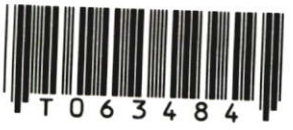
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2494-3

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของกรดแลคติกและสารPediocinPA -1จาก *Pedioicoccus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

EFFECTS OF LACTIC ACID AND PEDIOCIN PA-1 FROM *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ON SALMONELLAE REDUCTION IN RETAILED CUT BEEF



สมัญญา สุขพหล

SAMANYA SUKPAHON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....63484
วัน,เดือน,ปี 29 ส.ค. 2549

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2494-3

EFFECTS OF LACTIC ACID AND PEDIOCIN PA-1 FROM *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ON SALMONELLAE REDUCTION IN RETAILED CUT BEEF

SAMANYA SUKPAHON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-15-2494-3

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก EFFECTS OF LACTIC ACID AND PEDIOCIN PA-1 FROM *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ON SALMONELLAE REDUCTION IN RETAILED CUT BEEF

ชื่อนักศึกษา นางสาวสมัญญา สุขพหล

รหัสประจำตัว 46066602

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	
ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 15 พฤษภาคม 2549 เวลา 9.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D 2132 อาคารเจ้าคุณทหาร

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....๒๑.....**เดือน**.....พฤษภาคม.....**พ.ศ**.....๒๕๔๙.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของกรดแลคติกและสารPediocinPA-1จาก *Pedioicoccus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการลดจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก
นักศึกษา	นางสาว สมัญญา สุขพหล
รหัสประจำตัว	46066602
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกที่จำหน่ายในตลาดเขตมีนบุรี บางกะปิ ประเวศ ลาดกระบังและพระโขนง จำนวน 35 ตัวอย่างด้วยวิธีมาตรฐาน(standard conventional method) AOAC โดยใช้ Tetrathionate (TT) broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และ 43องศาเซลเซียส Rapport-Vassiliadis (RV) broth บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน selective enrichment และใช้ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar , Rambach agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และ Modified semisolid rappaport Vassiliadis (MSRV) medium บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส ในขั้นตอน selective plating พบว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (74.3 %) ประกอบด้วย 20 ซีโรวาร์ โดยพบ *Salmonella* Senftenberg (19.3 %) มากที่สุดรองลงมา คือ *S.* Anatum (15.6%) และ *S.* Weltevreden (11.0 %) ตามลำดับ ซึ่งการใช้ TT broth บ่มที่ 43 องศาเซลเซียสในขั้นตอน selective enrichment จะให้ผลการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในจำนวนตัวอย่างที่มากกว่า (73.1%) TT broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส (61.5%) และ RV broth บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส (34.6%) ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อในหลอดทดลองพบ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มตัวอย่าง คือ TSB ที่ไม่เติมสารละลายหรือกลุ่มควบคุม TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และTSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 พบว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ให้ผลในการยับยั้งและทำให้เกิดการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และเมื่อนำกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 มาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกโดยแบ่งเป็น 6 กลุ่มตัวอย่างเช่นเดียวกับ

การศึกษาในหลอดทดลอง และเก็บตัวอย่างเนื้อโคที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0 2 4 6 และ8 วัน พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 สามารถลดปริมาณเชื้อ *S.* Anatum *S.* Senftenberg และ *S.* Weltevreden ลงได้ 3.4 3.2 และ 0.4 log cfu/g ตามลำดับ และพบว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะส่งผลต่อการลดลงของค่า pH ในตัวอย่างเนื้อโคได้มากกว่าการใช้กรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวแต่จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักและค่าความสว่างของสี (L^*) ของเนื้อโคสูงกว่าตัวอย่างที่สัมผัสกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวซึ่งจะทำให้เนื้อโคดูมีสีซีดและไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามเมื่อนำเนื้อโคทั้ง 6 กลุ่มมาทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่น พบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายทั้งสองได้

Thesis	Effects of lactic acid and Pedioin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 on Salmonellae reduction in retailed cut beef
Student	Miss Samanya Sukpahon
Student ID	46066602
Degree	Master of Science
Programme	Food Science
Year	2006
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Thirty- five samples of beef marketed in retail outlets from Minburi, Bangkapi, Pravet, Ladkrabang and Prakanong markets were analysed for the prevalence of salmonellae by using standard conventional method as described by AOAC. Tetrathionate (TT) broth incubated at 37 °C and 43°C and Rappaport-Vassiliadis (RV) broth incubated at 42 °C were used as selective enrichment medium. Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, Rambach agar incubated at 37 °C and Modifiled Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium incubated at 42 °C were used as isolating medium. The results showed that salmonellae was found 26 samples (74.3 %) and 20 serovars were isolated. The predominant serovars were *S.* Senftenberg (19.3 %), *S.* Anatum (15.6 %) and *S.* Weltevreden (11.0 %), respectively. Using TT broth incubated at 43 °C (73.1%) as a selective enrichment medium gave more salmonellae positive samples than using TT broth incubated at 37 °C (61.5%) and RV broth (34.6%), respectively. In order to study the effects of lactic acid , and crude Pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 on *S.* Anatum *S.* Senftenberg and *S.* Weltevreden reduction, 6 conditions of samples were set up in an in –vitro broth using Trypticase Soy Broth (TSB). [control broth (without lactic acid and Pediocin PA-1), TSB with lactic acid 0.5%, TSB with lactic acid 0.5% and Pediocin PA-1, TSB with lactic acid 1%, TSB with lactic acid 1% and Pediocin PA-1 and TSB with Pediocin PA-1]. The results revealed that TSB with lactic acid 1% and Pediocin PA-1 could effectively reduce and speedily cause injure cells of three tested serovars of salmonellae. When applying lactic acid and Pediocin PA-1 in retailed cut beef with 3 predominant serovars of salmonellae in beef and stored at 4 ± 1 °C for 0 2 4 6 and 8 days, it implied that the mixture of

lactic acid 1% and Pediocin PA-1 was the most effective to reduce *S.* Anatum (3.4 log cycle reduction) *S.* Senftenberg (3.2 log cycle reduction) and *S.* Weltevreden (0.4 log cycle reduction), respectively. Using the mixed solution of lactic acid and Pediocin PA-1 exhibited lower pH in cut beef but the mixture revealed higher weight loss and colour brightness (L^*) in cut beef samples than using lactic acid or Pediocin PA-1 alone . However the results from sensory evaluation showed that panelists can not define the different among samples using lactic acid, crude Pediocin PA-1, and the mixture of broth lactic acid and crude Pediocin PA-1.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ผศ. ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ และ ผศ. เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ทำให้งานวิทยานิพนธ์สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และเจ้าหน้าที่ WHO *Salmonella – Shigella* center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้ความรู้ความอนุเคราะห์ในการนำเชื้อซัลโมเนลลาไปตรวจยืนยันซีโรวาร์ และคุณจารุรัตน์จากสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติที่ให้ความรู้และให้ความอนุเคราะห์ในการส่งตัวอย่างการส่งตัวอย่างเนื้อโคไปฉายรังสี ขอขอบคุณความมีน้ำใจของพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆนักศึกษาปริญญาตรีและปริญญาโทที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า พี่ชาย และน้องสาวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

สมัญญา สุขพหล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....X

สารบัญภาพ.....XII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....1

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์.....3

2.2 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา.....5

2.2.1 ความสำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา.....5

2.2.2 แหล่งที่พบเชื้อซัลโมเนลลา.....5

2.2.3 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์.....6

2.3 การใช้แบคเทอริโอซินในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์.....9

2.3.1 แบคเทอริโอซิน.....9

2.3.2 แบคทีเรียแลคติก.....9

2.3.3 Pediocin PA-1.....17

2.4 การใช้กรดแลคติกในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์.....19

2.4.1 กรดแลคติก.....20

2.4.2 กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยใช้กรดแลคติก.....21

2.4.3 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์เมื่อใช้กรดแลคติก.....22

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....25

3.1 อุปกรณ์.....25

3.1.1 เนื้อโคที่ใช้ในการทดลอง.....25

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง.....25

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....25

สารบัญ (ต่อ)

3.1.4 เครื่องมือ....26

3.2 วิธีดำเนินงาน....26

3.2.1 ศึกษาปริมาณและซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ, เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี....26

3.2.2 ศึกษาการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาจากการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวในหลอดทดลอง (*In vitro* test)....27

3.2.2.1 การเตรียม crude Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536....27

3.2.2.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน....28 PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสม

3.2.2.3 ศึกษาการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาจากการใช้กรดแลคติกและ Pediocinของสารละลายดังกล่าว ต่อการยับยั้งการเจริญและการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S.* Senftenberg *S.* Weltevreden *S.* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)....28

3.2.3 ศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaseus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก....29

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโค....29

3.2.3.2 การวางแผนการทดลอง....29

3.2.4 ศึกษาผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการสูญเสียน้ำหนักเนื้อโค....30

3.2.5 ศึกษาด้านคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคที่ผ่านการสัมผัสกรดแลคติก และสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว....31

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ....31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....32
4.1 ศึกษาปริมาณและซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสด จากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ, เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิ และเขตมีนบุรี.....32
4.2 ศึกษาการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาจากการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....35
4.2.1 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....36
4.2.2 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....38
4.2.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....40
4.3 ศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....44
4.3.1 ผลของของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ในเนื้อโคชำแหละ จำหน่ายปลีก.....44
4.3.2 ผลของของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในเนื้อโคชำแหละ จำหน่ายปลีก.....46

สารบัญ (ต่อ)

4.3.3 ผลของของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโคชำแหละ จำหน่ายปลีก....48

4.4 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อค่า pH ของเนื้อโค....51

4.5 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อค่าความสว่างของสี (L^*)ของเนื้อโค....54

4.6 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ของเนื้อโค....57

4.7 ผลของกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค ชำแหละจำหน่ายปลีก....60

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง....62

ข้อเสนอแนะ....64

บรรณานุกรม....65

ภาคผนวก....77

ประวัติผู้เขียน....87

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 List of resently characterized bacteriocins.....10

2.2 Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria.....13

2.3 ค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ.....20

4.1 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อวัว ชำแหละจำหน่ายปลีก โดยวิธีมาตรฐานจากขั้นตอน selective enrichment.....32

4.2 จำนวนเซโรวาร์ต่างๆ ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ตรวจพบจากเนื้อโค ชำแหละจำหน่ายปลีก.....33

4.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....37

4.4 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....39

4.5 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test).....41

4.6 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Anatum ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....45

4.7 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....47

4.8 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....49

4.9 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อค่า pH ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....52

4.10 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อค่าสี (L^*) ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก.....55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

4.11 ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อโคที่ผ่านการจุ่มสารละลายในกลุ่มต่างๆ ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส.....58

4.12 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค.....60

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 General model for mechanism of pore formation by bacteriocins.....12

2.2 Proposed model of cell killing by pore-forming bacteriocin.....12

2.3 Schematic representation for bacteriocin and membrane interactions.....16

4.1 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1
ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevredenใน
หลอดทดลอง (*In vitro* test).....37

4.2 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1
ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatumใน
หลอดทดลอง (*In vitro* test).....39

4.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1
ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Senftenbergใน
หลอดทดลอง (*In vitro* test).....41

1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Hektoen Enteric (HE) agar.....84

2. ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Modified
Semi-solid Rappaport-Vassiladis (MSRV).....84

3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Rambach agar.....85

4. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร
Xylose Lysine Sodium Deoxycholate (XLD) agar.....85

5. ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลาที่แสดงในอาหาร
Triple Sugar Iron (TSI) agar และ Lysine Indole
Motility (LIM) medium ในขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี.....86

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ในปัจจุบันโรคอุจจาระร่วงเป็นโรคหนึ่ง ที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของวงการแพทย์และวงการสัตวแพทย์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สำคัญในโรคนี้ คือ เชื้อซัลโมเนลลา โดยเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ในคนและสัตว์ การได้รับเชื้อนี้โดยบริโภคเอาอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปทำให้เกิดอาการท้องร่วง ดังได้มีรายงานการศึกษาวิจัยการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารหลายชนิด เช่น รายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในไก่สดและเครื่องในไก่ (Jerngklinchan *et al.*, 1994) ในไข่ไก่ (Saitanu *et al.*, 1994) ในเนื้อหมูที่จำหน่ายในท้องตลาด (อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ, 2548)

เนื้อโคเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญและได้รับความนิยมในการบริโภคมากขึ้นทุกปี เนื่องจากมีรสชาติถูกปากและยังเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ แต่ในเนื้อโคดิบมักมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งพวกก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารและพวกที่ก่อให้เกิดโรคต่อผู้บริโภคอยู่เสมอ โดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลา ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษมากที่สุดเชื้อหนึ่ง (Collin, 1995; Rose *et al.*,2002) ทั้งนี้เนื่องจากการจัดการภายในโรงฆ่าสัตว์ โรงงานตัดแต่ง และกระบวนการในการขนย้ายเนื้อโคในประเทศไทยยังไม่ได้มาตรฐาน ทำให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อโคมีปริมาณสูง จากประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) เรื่องข้อกำหนดสุขลักษณะของอาหารทั่วไป ได้กำหนดว่า ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อดิบควรพบจำนวนจุลินทรีย์รวมต่อกรัมต้องมีปริมาณไม่เกิน 1 X 10^6 โคโลนี/กรัม *Escherichia coli* น้อยกว่า 50 MPN/g และเชื้อโรคปนพิษได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* และ *Vibrio parahaemolyticus* ต้องพบน้อยกว่า 200 cfu/g *Salmonella* และ *Vibrio cholerae* ต่อ 25 กรัมต้องตรวจไม่พบ แต่เนื่องจากว่ายังคงมีรายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อโคสดจากตลาดสดและซุปเปอร์มาเก็ตในประเทศไทย (สุมาลี บุญมา และคณะ,2539) ดังนั้นจึงได้มีผู้สนใจทำการการศึกษาหาวิธีการลดจำนวนจุลินทรีย์ให้มีปริมาณน้อยลง โดยที่เนื้อโคยังมีคุณภาพดี ปลอดภัย เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค อีกทั้งเพิ่มอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานขึ้น

วิธีการลดจำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์มีหลายวิธีด้วยกัน แต่วิธีการหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปคือการใช้สารเคมีที่มีสมบัติในการทำลาย และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค สารเคมีที่นิยมใช้ คือ กรดแลคติกซึ่งได้รับการอนุญาตจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐ (FDA) ให้ใช้ในการผลิตอาหาร แต่การใช้กรดแลคติกความเข้มข้นสูงในการชุบเนื้อโคจะมีผลต่อสีของเนื้อคือทำให้เนื้อสีซีดไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยจากการ

รายงานของ Snijders และคณะ (1985) พบว่าการใช้กรดแลคติกที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1% จะทำให้เนื้อโคมีสีซีดจางลง นอกจากกรดแลคติกจะมีผลต่อสีของเนื้อสัตว์แล้วยังพบว่ามีผลต่อกลิ่นรสของเนื้ออีกด้วย โดยพบว่าการใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 1% จะส่งผลให้เนื้อโคมีกลิ่นรสดีขึ้น (Hamby *et al.*, 1987; Prasai *et al.*, 1991.) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการนำ Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (Swetwiwathana, 2005) มาใช้ร่วมกรดแลคติกเพื่อลดการใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติก เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาคาดว่าจะเป็นทางเลือกใหม่ของผู้ประกอบการในการเลือกสารถนอมอาหารที่มาจากธรรมชาติและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่พบในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกจากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ, เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี
2. ศึกษาการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่พบมากที่สุด 3 สายพันธุ์ด้วยการใช้กรดแลคติก Pediocin PA-1และสารผสมของสารดังกล่าวในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกที่ปราศจากเชื้อด้วยการฉายรังสี
3. ศึกษาผลของกรดแลคติก Pediocin PA-1 และสารผสมของสารดังกล่าวต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

ตามปกติเนื้อที่ได้จากสัตว์มีสุขภาพดี ไม่เป็นโรค จะปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมักเป็นผลมาจากการปนเปื้อนในระหว่างฆ่า ชำแหละ ล้าง เลาะกระดูก เคลื่อนย้าย และเก็บรักษา จุดวิกฤติที่ต้องเฝ้าระวังมิให้มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงมากนัก ประกอบด้วย

1) **มีดที่ใช้แทงสัตว์** มีดต้องสะอาด ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ต้องไม่มีเลือดปนเปื้อน เพราะจะทำให้แบคทีเรียแพร่กระจายไปยังเนื้อส่วนอื่นๆ

2) **ขนและร่างกายของสัตว์** จุลินทรีย์มักอยู่ตามขนและซอกมุมอับต่างๆตามร่างกายสัตว์ เช่น ใต้ปีก ขาพับ เป็นต้น ในขณะที่ใช้มีดแทง จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผ่านเข้าไปสู่ภายในของเนื้อสัตว์ ในขณะถอนขนหรือล้าง จุลินทรีย์บริเวณขนและซอกมุมอับจะแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆของซากเนื้อได้โดยง่าย ด้วยเหตุนี้จึงต้อง ใช้สารฆ่าเชื้อในการล้างซากเนื้อหลังฆ่า

3) **ทางเดินอาหารของสัตว์** จุลินทรีย์อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ตามธรรมชาติ ผู้ชำแหละเนื้อที่ไม่ชำนาญ จะทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสแพร่กระจายสูง เป็นผลให้ยากแก่การควบคุม ดังนั้นวิธีชำแหละ จึงเป็นจุดวิกฤติจุดหนึ่งที่ต้องทำการเฝ้าระวัง

4) **มือผู้ชำแหละ** เป็นแหล่งที่นำไปสู่การแพร่กระจายที่สำคัญอีกจุดหนึ่ง แม้ว่าผู้ชำแหละจะสวมถุงมือ แต่มิได้หมายความว่าจะสามารถตัดวงจรการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ลงได้ โดยเฉพาะการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์จากสัตว์ตัวหนึ่งไปยังตัวอื่นๆ โดยผ่านมือหรือถุงมือของผู้ชำแหละ

5) **ภาชนะและอุปกรณ์** ภาชนะและอุปกรณ์ที่มีการสัมผัสกับเนื้อสัตว์ต้องล้างให้สะอาดก่อนที่จะนำมาใช้ การใช้ซ้ำโดยไม่ผ่านการล้างทำความสะอาดเป็นการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนข้าม สายพานลำเลียงเนื้อสัตว์เป็นจุดหนึ่งที่ต้องรักษาความสะอาด เพื่อมิให้เป็นแหล่งแพร่กระจายจุลินทรีย์ต่อไปในผลิตภัณฑ์

6) **การเคลื่อนย้ายและการเก็บรักษา** ต้องปฏิบัติตามกรรมวิธีการผลิตที่ดี เช่น การควบคุมอุณหภูมิขณะเคลื่อนย้ายและเก็บรักษา มีการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมและจากการปนเปื้อนข้าม

7) **ท่อน้ำเหลือง** ตามปกติในท่อน้ำเหลืองจะมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ท่อน้ำเหลืองแทรกอยู่ตามเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์ ถ้าวิธีการชำแหละไม่เหมาะสม ท่อน้ำเหลืองแตกกระจาย ก็จะแพร่กระจายเชื้อไปยังส่วนอื่นๆของเนื้อสัตว์

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตนั้น แม้ว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องควบคุม และก่อให้เกิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้แก่ *Salmonella* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* เชื้อเหล่านี้อาจปนเปื้อนมาจากตัวสัตว์และในระหว่างกระบวนการผลิต

นอกจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแล้ว การเน่าเสียของเนื้อสัตว์เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ก็เกิดเนื่องจากเนื้อสัตว์มีค่าความเป็นกรดด่าง , ปริมาณความชื้น และสารอาหารเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหน้าของเนื้อจะเน่าเสียก่อนส่วนอื่นสืบเนื่องจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ จีนัสที่พบมาก คือ *Pseudomonas, Alcaligenes, Acetobacter, Morexella* และ *Aeromonas*

เนื้อก้อนโต การเน่าเสียจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอบๆกระดูกก่อน ทำให้เนื้อเปรี้ยว เรียกว่า bone taint หรือ sours แบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุ ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* และ *Enterococcus* สำหรับเนื้อบดการเน่าเสียมักเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศเป็นสำคัญ ก่อนที่เนื้อจะเน่าเสีย จะพบจุลินทรีย์ที่สร้างเม็ดสี (pigment) เป็นจำนวนมาก ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแบคทีเรียจำพวกสร้างสปอร์ แต่หลังจากเนื้อเน่าเสียแล้วจะพบแบคทีเรียที่ไม่สร้างเม็ดสี แบคทีเรียท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ และเจริญที่อุณหภูมิต่ำ แต่ถ้านำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ จะเจริญสู้แบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas, Acinetobacter* และ*Morexella* ไม่ได้ จึงไม่ปรากฏบนจานเพาะเชื้อ นอกจากจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามและเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการจึงจะพบการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เนื้อที่หั่นเป็นชิ้นๆ เช่น สเต็ก หรือเนื้อก้อนเล็กๆสำหรับนำไปทำเป็นเนื้ออบ การเน่าเสียมักเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของชิ้นเนื้อ ถ้ามีความชื้นเหมาะสมและปราศจากสารยับยั้ง หรือมีวัตถุกันเสียอันมีผลทำให้แบคทีเรียเจริญไม่ดี กรณีนี้อาจพบเชื้อราและยีสต์ได้ และเมื่อเนื้อเริ่มเน่าแล้ว บริเวณผิวจะลื่นเพราะเกิดเมือกขึ้น Ayres (1960) พบว่าเนื้อจะเริ่มมีกลิ่นผิดปกติ เมื่อตรวจพบจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศบนผิวหน้าได้ประมาณ 7.0-7.5 log cfu/cm^2 และเนื้อจะเริ่มเกิดเมือกเมื่อตรวจนับจุลินทรีย์บนผิวหน้าได้ 7.5-8.0 log cfu/cm^2 การเกิดเมือกบนเนื้อสดเป็นปัญหาการเน่าเสียของเนื้อที่เก็บในตู้เย็นมากที่สุด

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่มักพบในเนื้อสัตว์ได้แก่ *Pseudomonas* spp. , *Acinetobacter* spp., *Micrococcus* spp. , *Enterobacteriaceae, Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียโดยทำการเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนในเนื้อทำให้เกิดรสเปรี้ยวและ เนื้อมีสีเขียวคล้ำนอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Streptococcus* spp. *Aeromonas* spp., *Corynebacterium* spp.

และ *Clostridium* spp. และยังมีเชื้อราที่มักเจริญบนเนื้อสัตว์ เช่น *Mucor* spp., *Geotrichum* spp., *Sporotrichum* spp. และ *Cladosporium* spp.

2.2 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonellae)

2.2.1 ความสำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา

ซัลโมเนลลาอยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคเทอริซิอี (Family Enterobacteriaceae) เช่นเดียวกับแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์มและ *E.coli* ดังนั้น จึงคาดเดาได้ว่าซัลโมเนลลาจะมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา ยกเว้นสายพันธุ์ *S.* Gallinarum และ *S.* Pullorum ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อซัลโมเนลลาเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลาง แม้ว่าที่ 37 °C จะเป็นอุณหภูมิเหมาะสม แต่ที่ 42 °C เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการบ่มเพาะเชื้อในขั้นซีเลคทีฟเอนริชเมนต์ (Selective Enrichment) เพราะที่อุณหภูมินี้ เชื้อซัลโมเนลลาเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆได้ดีกว่า ซัลโมเนลลาเป็นแบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรงและซึ่งได้มีการค้นพบมาเป็นเวลากว่า 100 ปีแล้ว ซึ่งเชื้อซัลโมเนลลาได้ก่อให้เกิดโรคที่มีความรุนแรงตั้งแต่ไม่รุนแรงมากจนถึงก่อให้เกิดการเสียชีวิตได้ โดยโรคที่สำคัญคือการเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า salmonellosis ซึ่งยังคงเกิดโดยทั่วไปในหลายประเทศทั่วโลก และเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่ระบาดสูงเป็นอันดับหนึ่งในหลายๆประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ เป็นต้น รวมถึงทำให้ประชากรเสียชีวิตสูงสุด โดยเฉพาะ *S.* Enteritidis พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในอังกฤษโดยมีปริมาณการระบาดเพิ่มขึ้น 17 เท่าในช่วง 11 ปี (1981-1991) (Threlfall and Chart, 1993) ในประเทศฝรั่งเศสพบว่าการระบาดเพิ่มขึ้น 7 เท่าในระหว่างปี ค.ศ. 1986-1990 และ 10 เท่าในสเปนระหว่างปี ค.ศ. 1983-1987 เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 51% ต่อปี ในประเทศ สวิสเซอร์แลนด์ ระหว่างปีค.ศ. 1984-1989 (Binkin *et al.*, 1993) นอกจากนั้นในปี 1993 The Ministry of Health ของประเทศญี่ปุ่นได้จัดอันดับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เป็นปัญหาสำคัญและพบมากในประเทศญี่ปุ่น 3 อันดับแรก คือ *Salmonella* spp., *Vibrio parahemolyticus, Staphylococcus aureus* คิดเป็น 30.9% , 23.8%, และ 13.2% ตามลำดับ (Kusunoki *et al.*, 1995)

2.2.2 แหล่งที่พบเชื้อซัลโมเนลลา

แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของเชื้อซัลโมเนลลา คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง หรือเชื้อซัลโมเนลลาอาจพบอยู่ตามร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จากลำไส้แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจายสู่

สิ่งแวดล้อม เข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหาร สู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักร การขนส่งสัตว์และอาหารระหว่างประเทศทำให้เชื้อกระจายไปทั่วโลก

2.2.3 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์

คนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแห่งแรก (primary habitat) ของเชื้อซัลโมเนลลาการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า salmonellosis เกิดได้ทั้งในคนและสัตว์จะพบได้ในเนื้อสัตว์สืบเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร

เนื้อสัตว์ดิบมักปนเปื้อนด้วยเชื้อซัลโมเนลลาซึ่งมักก่อให้เกิดการระบาดด้วยโรค salmonellosis การปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณในชั้นกล้ามเนื้อและบริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์ โดยการปนเปื้อนเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจากอุจจาระมาสู่เนื้อสัตว์ในระหว่างการฆ่า ในสัตว์ใหญ่ เช่น แกะ โค และกระบือ การปนเปื้อนมักเกิดในขั้นตอนการฆ่า ผ่าซาก ชำแหละ ตัดแต่งและการขนย้ายเนื้อสัตว์ ข้อกำหนดมาตรฐานอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) ระบุว่าอาหารประเภทเนื้อดิบ และผลิตภัณฑ์เนื้อต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม แต่ยังคงมีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ทั้งในและต่างประเทศอยู่มาก ดังรายงานต่อไปนี้

สุมาลี บุญมา และคณะ (2539) ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อวัว ได้แก่ ลูกชิ้นเนื้อวัวและเนื้อแดดเดียว จำนวน 40 ตัวอย่างพบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลา 67.5% และในปี 2540 ยังได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ และเนื้อสุกร อันได้แก่ ไส้กรอก ลูกชิ้น แหนม กุนเชียง ไก่ยอ และหมูยอ รวมทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายตามห้างสรรพสินค้า และตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดนนทบุรีพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา 32 ตัวอย่าง (16%) โดยเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ 8 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสุกร 24 ตัวอย่าง โดยสายพันธุ์ที่พบได้แก่ *S.* Heidelberg, *S.* Anatum, *S.* Rissen, *S.* Hadar, *S.* Panama,,*S.* Enteritidis, *S.* Amsterdam, *S.* Newport, *S.* London, *S.* Tennessee และ *S* .Livington

รายงานประจำปี 2542 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2543) ได้รายงานถึงข้อมูลการสำรวจอาหารพร้อมปรุงบรรจุโฟม ที่จำหน่ายใน ซุปเปอร์มาร์เก็ตจากพื้นที่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และปทุมธานี จำนวน 173 ตัวอย่าง จากซุปเปอร์มาร์เก็ต 34 แห่ง พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 105 ตัวอย่าง (60.69%) จากซุปเปอร์มาร์เก็ต 33 แห่ง (97.05%) เชื้อที่พบมากที่สุด คือ *Salmonella* spp. 100 ตัวอย่าง รองลงมาได้แก่ *Clostridium perfringens* 36 ตัวอย่าง และ *Staphylococcus aureus* 31 ตัวอย่าง สำหรับเซโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่พบมาก 5 อันดับ ได้แก่ *S.* Anatum 42 ตัวอย่าง, *S.* Rissen 18 ตัวอย่าง, *S.* Typhimurium 10 ตัวอย่าง, *S.* Panama 8 ตัวอย่าง และ *S.* London 7ตัวอย่าง

Bangtrakulnoth และคณะ(1994) พบเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อสุกรที่ขายตามตลาดสดจังหวัดชลบุรี 45 เปอร์เซ็นต์ โดยประกอบด้วย 13 สายพันธุ์ ได้แก่ *S.* Derby *S.* Krefeld *S.* Agona *S.* Rissen *S.* Cerro *S.* Lexington *S.* Stanley *S.* Anatum *S.* London *S.* Enteritidis *S.* Panama *S.* Albany และ *S.* Bovismorbificans

Arumugaswamy และคณะ (1995) ได้ทำการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอาหารสดและอาหารพร้อมรับประทาน 219 และ 112 ตัวอย่าง พบว่า 22% ของอาหารสดและ 17% ของอาหารพร้อมรับประทานพบเชื้อจุลินทรีย์ ในส่วนของอาหารสดพบเชื้อซัลโมเนลลา ในเนื้อไก่ (39%), ตับไก่ (35%) และกึ๋นไก่ (44%) นอกจากนี้ยังตรวจพบใน เนื้อโคสดและกุ้งสด และในส่วนของอาหารพร้อมรับประทานสะเต๊ะจะพบเชื้อ*Salmonella* มากที่สุด จากการทดลองพบซัลโมเนลลาทั้งหมด 20 เซโรวาร์ โดยพบ *S.* Blockley มากที่สุดตามมาด้วย *S.* Enteritidis, *S.* Chincol ตามลำดับ

Escartin และคณะ (1999) ได้ศึกษาหาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างไส้กรอกหมูที่จำหน่ายในสองเมืองในประเทศเม็กซิโกคือ 60 ตัวอย่างจากร้านขายเนื้อและตลาดสดในเมือง Guadalajara และ อีก 80 ตัวอย่างจาก ร้านขายเนื้อและร้านขายของชำในเมือง Queretaro ผลที่ได้พบว่า 88%ของตัวอย่างเนื้อในเมือง Guadalajara ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* และในเมือง Queretaro 78% ของตัวอย่างไส้กรอกจากร้านขายเนื้อ และ 5% จากร้านขายของชำปนเปื้อน *Salmonella* โดยเซโรวาร์ที่พบมากห้าอันดับแรก คือ *S.* Derby, *S.* Anatum, *S.* Infantis, *S.* Typhimurium และ *S.* Brandenburg

Medden และคณะ (2001) ได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในซากโคในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* 0157:H7, *Listeria innocua, Listeria seeligeri* และพบเชื้อ*Salmonella* สองสายพันธุ์ คือ *S.* Thompson และ *S.* Mbandaka

Mrema และคณะ(2004)ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวสด 122 ตัวอย่าง , ไส้กรอก 120 ตัวอย่าง และเบอร์เกอร์ 58 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างจากร้านค้าใน Gaborone ประเทศ Botswana จากการตรวจสอบพบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา 20% โดยพบเชื้อซัลโมเนลลา Group B มากที่สุด ตามมาด้วย group C , group E และ group G ตามลำดับ และ ในปี 1988 Forsythe and Hayes ได้รายงานว่าผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ คือ พายเนื้อ, ไส้กรอก, เบคอน, แฮมและ แซนวิช ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจะช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อซัลโมเนลลา

อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ (2548) ได้รายงานการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างเนื้อหมูสดที่จำหน่ายในตลาดและห้างสรรพสินค้าของบริเวณเขตลาดกระบัง นนทบุรีและปทุมธานี จำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยวิธีมาตรฐาน AOAC และ USFDA พบว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 44 ตัวอย่าง (88.0%) มีเชื้อรวม 19 ซีโรวาร์ โดยพบ *S.* Anatum มากที่สุด (32.3%) รองลงมาได้แก่ *S.* Rissen (20.8%) *S.* Panama และ *S.* Stanley (เชื้อละ 9.4%) ตามลำดับ

Orji และคณะ (2005) ได้ทำการสำรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่ 120 ตัวอย่าง, เนื้อโคสด 96 ตัวอย่าง, ผ้ากันเปื้อนของคนขายเนื้อ 96 ตัวอย่าง และเขียงที่ใช้ในร้านขายเนื้อ 96 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าพบ *S.* Paratyphi A จากมูลไก่ 12.5%, 4.2%จากเนื้อสด และ 2.1%, 4.2% จาก ผ้ากันเปื้อนและเขียงเนื้อตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่นๆอีก คือ *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Gallinarum, *S.* Pullorum, *S.* Typhi และ *S.* Agona

Cardinale และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ*Salmonella* และ *Campylobacter* ในอาหารไก่พร้อมรับประทานพื้นเมืองที่จำหน่ายทั่วไปตามรายทาง 148 ร้าน ทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคม 2003-เมษายน 2004 ในเมือง Dakar ประเทศ Senegal ผลที่ได้พบว่าพบเชื้อ *Salmonella* 20.1% จากร้านอาหารและ 10.1% จากตัวอย่างไก่ เซโรวาร์ที่พบมากคือ *S.* Hadar, *S.* Enteritidis และ *S.* Brancaster ส่วนเชื้อ *Campylobacter jejuni* พบเพียง 3 ร้านและ 3 ตัวอย่างไก่ ในการศึกษายังพบอีกว่าผักที่ไม่ได้ปอกเปลือกและล้างทำความสะอาด ส่วนผสมอื่นๆ ในระหว่างการปรุง เสื้อผ้าของพนักงาน อาหารที่นำมาอุ่นใหม่ และอุปกรณ์ทำครัวก็เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* การใช้ความร้อนในการทำอาหารอย่างพอเพียงจะสามารถลดการปนเปื้อนลงได้

Van Nierop และคณะ (2005) ได้รายงานการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิด คือ *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. ในเนื้อไก่สดและเนื้อไก่แช่แข็งจากร้านขายเนื้อ, ซุปเปอร์มาร์เก็ต และ แผงขายเนื้อในเมือง Gauteng ประเทศ South Africa ผลที่ได้พบว่าพบการปนเปื้อน 60.6% โดยแบ่งเป็น *Salmonella* spp. 19.2%, *Listeria monocytogenes* 19.2% และ *Campylobacter* spp. 32.3% นอกจากนั้นยังพบอีกว่าเนื้อไก่สดจากร้านขายเนื้อจะพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. มากที่สุด และเนื้อไก่สดจากซุปเปอร์มาร์เก็ตจะปนเปื้อนเชื้อ *Campylobacter* spp. มากที่สุด ส่วนการปนเปื้อนจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* จะคล้ายกันในเนื้อไก่จากทั้งสามแหล่ง

จากข้อมูลข้างต้นทำให้เราได้ทราบว่าเชื้อซัลโมเนลลายังคงปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ได้ในปริมาณสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเชื้อในระหว่างกระบวนการผลิตและการแปรรูปเนื้อสัตว์ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งในขั้นตอนการฆ่าและการตกแต่งเนื้อสัตว์ แม้ว่าการลวก และการล้างซากจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาบนซากเนื้อสัตว์ได้ แต่เชื้อก็สามารถเจริญและปนเปื้อนบนซากได้จากอุปกรณ์ในการกำจัดขน และจากลำไส้ระหว่างการชำแหละ (Gill and Brayant, 1993) จากการศึกษาของ Forsythe และ Hayes (1998) พบว่าหลังการฆ่าสัตว์จะมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อซัลโมเนลลา ที่บริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์เนื่องจากการตัดแต่ง และเมื่อนำไปส่งต่อที่ร้านค้าต่างๆพบว่ามีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นถึง 20% นอกจากนี้สุขลักษณะส่วนบุคคลของบุคลากรที่อยู่ในโรงงานก็เป็นอีกสาเหตุที่สำคัญที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่เนื้อสัตว์ โดยอรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ (2545) ได้ทำการสำรวจผู้เป็นพาหะโดยทำการตรวจเชื้อซัลโมเนลลา

และวิบริโอในอุจจาระของพนักงานในกลุ่มของโรงงานผลิตอาหารแช่แข็งจำนวน 9,465 ตัวอย่าง พบผู้เป็นพาหะเชื้อซัลโมเนลลาเฉลี่ยร้อยละ 8.88

2.3 การใช้แบคเทอริโอซินในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1 แบคเทอริโอซิน(Bacteriocin) คือสารประกอบโปรตีนที่แบคทีเรียหลายสายพันธุ์สร้างขึ้นเองตามธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic Acid Bacteria (LAB) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน ทั้งในรูปการยับยั้งการเจริญหรือการทำลาย และสามารถสลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์ เช่น ทริปซิน อัลฟา-ไคโมทริปซิน โปรติเอส เป็นต้น จึงไม่มีผลตกค้างหลังบริโภค ปัจจุบันแบคเทอริโอซินกำลังได้รับความสนใจเนื่องจากในผู้บริโภคได้หันมาให้ความสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น ต้องการผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์ อีกทั้งต้องการผลิตภัณฑ์ที่เป็นปราศจากสารปรุงแต่ง (additive-free) เพื่อเป็นการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ผู้ผลิตจึงต้องพยายามหาทางเลือกใหม่ๆในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารจึงถือเป็นมิติใหม่ของการถนอมอาหาร ที่ให้ข้อดีทั้งในแง่ของการควบคุมคุณภาพอาหารและป้องกันการระบาดของอาหารเป็นพิษ แบคเทอริโอซิน มีกิจกรรมยับยั้งทั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ทำให้สามารถใช้ได้อย่างเหมาะสมในอาหารที่เสื่อมเสียง่าย เช่น เนื้อสัตว์ และ ผลิตภัณฑ์นม การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เนื่องจากกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินสามารถถูกลดทอนลงได้ตามสภาพแวดล้อมที่เป็นจริง

2.3.2 แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria) คือ แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญในการผลิตอาหารหมักหลายประเภท มีรายงานพบว่าแบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์ที่พบในอาหารหมักสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ สารแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน Bacteriocin มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดรวมไปถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* ทำให้ Bacteriocin มีความสามารถในการเป็นสารถนอมอาหาร ปัจจุบันแบคเทอริโอซิน แบ่งออกเป็น 4 ประเภท (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

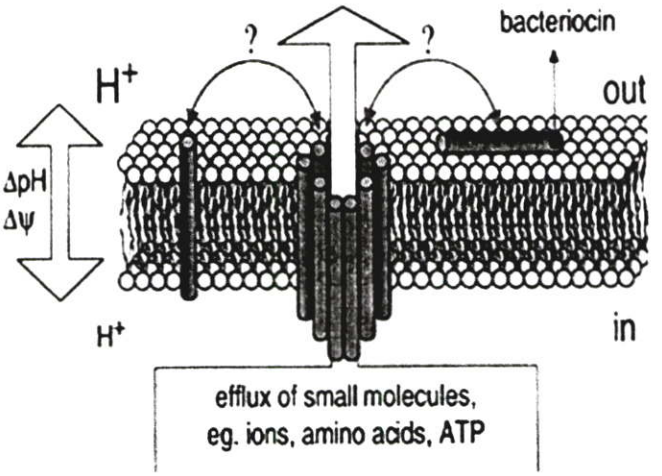
ตารางที่ 2.1 List of recently characterized bacteriocins

Source and producer strain	Bacteriocin
Sausage	
Lc. lactis	Nisin
E. casseliflavus	Enterocin 416 kl
E. faecium	Enterocin A, B and P
	Enterocin L50A & B
P. acidilactici	Pediocin AcM
Lb. platarum	Plantaricin A, D & 35d
Lb. sakei	Sakacin K
Le. carnosum	Leucosin F10
Fish	
C. divergens	Diversin V41
	Divergicin M35
C. piscicola	Piscicolin VI
E. faecium	Enterocin NKR-5-3A & B
Dairy products	
Lc. lactis	Lactococcin
E. faecium	Enterocin
	Enterocin AS-48RJ
E. faecalis	Enterococcin EFS2
	Enterocin 4
	Enterocin AS-48
Lb. acidophilus	Acidophilicin
	Acidocin D 20079
Lb. helveticus	Helveticin
S. thermophilus	Thermophilin

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

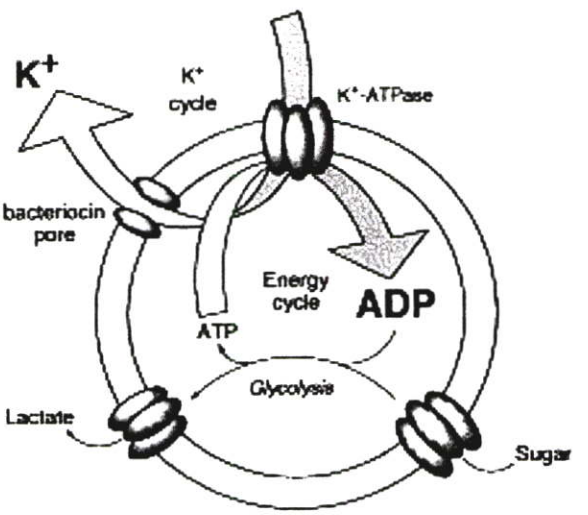
Source and producer strain	Bacteriocin
Fruits and vegetables	
Lc. lactis	Lactocin, Nisin, Lactococcin K
Lb. plantarum	Plantaricin C19
Le. mesenteroides	Leucocin BC2
Leuconostoc sp. J2	Leuconocin J
P. parvulus	Pediocin PA-1
E. faecium	Enterocin 900 and A
E. mundtici	Mundticin
Grass and silage	
E. faecalis	Enterocin SE-K4
E. faecium	Enterocin ON-157
E. mundtici	Mundticin
Lb. salibarius	Salivacin 140
Lc. lactis	Lactocin 3147
Other fermented foods and beverages	
Lb. amylovorus	Lactobin A
Lb. plantarum	Plantaricin 423, S and ST31
Lb. sakei	Bavaricin A, Sakacin P, 5x and ST
Le. mesenteroides	Leucocin A and C
	Mesentericin Y105
E. faecalis	Enterocin RJ-1
P. damnosus	Pediocin PD-1
P. pentosaceus	Pediocin ST18

ที่มา: Jack *et al.* (1995), Ennahar *et al.* (2000) and Van Belkum and Stiles (2000)



ภาพที่ 2.1 General model for mechanism of pore formation by bacteriocins

ที่มา : McAuliffe *et al.* (2001)



ภาพที่ 2.2 Proposed model of cell killing by pore-forming bacteriocin

ที่มา : Jack *et al.* 1995.

ตารางที่ 2.2 Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria

Class	Characteristics and subclasses
I. Lantibiotics :	Ribosomally produced peptides that undergo extentive post-translational modification Small (<5kDa) peptides containing lanthionine and β-methyl lanthionine Ia. Flexible molecules compared to Ib Ib. Globular peptides with no net charge or net negative charge
II. Nonlantibiotics:[a]	Low-molecular-weight (<10 kDa) , heat stable peptides Formed exclutively by unmodified amino acids Ribosomally synthesized as inactive prepeptides that are activated by post-translational cleavage of the N-terminal leader peptide IIa. Anti-listerial single peptides that contain YGNGVXC amino acid motif near their N-terminal IIb. Two-peptide bacteriocins IIc. Bacteriocins produced by the cell's general *sec*-pathway (Nes et al., 1996)
III. Nonlantibiotics :	High-molecular-weight (>30kDa), heat-labile proteins
IV[b]	Complex bacteriocins carrying lipid or carbohydrate moieties

[a]Nonlantibiotics have recently been re-subdivided by van Belkum and Stiles (2000) according to the bacteriocins that they resemble rather than to their method of excretion from cell.

[b]This category has been excludes from Nes' Classfication (Nes *et. al.*, 1996).

ที่มา : Garneau *et al.* (2002)

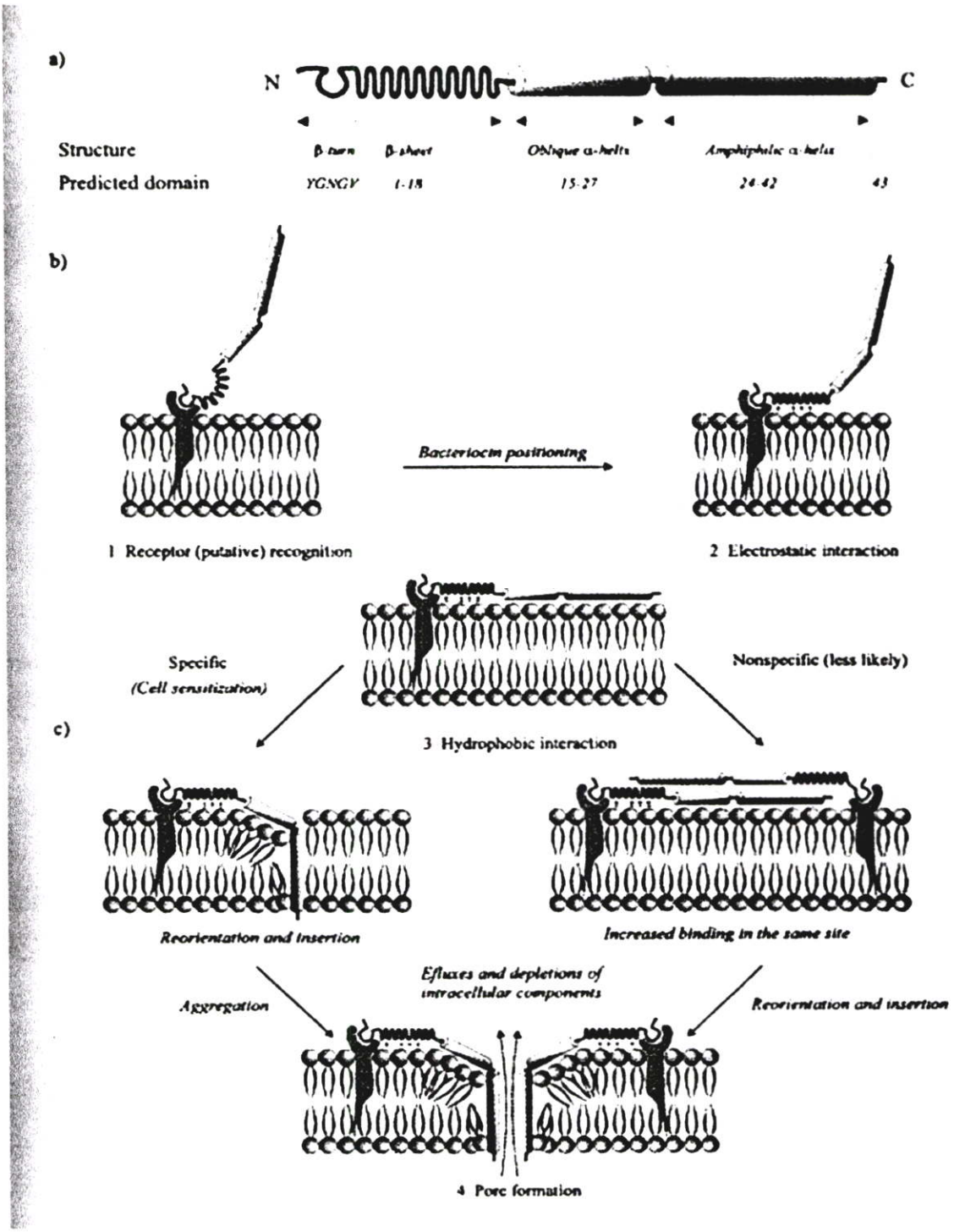
แบคทีเรียแลคติกที่ต่างสายพันธุ์กันจะสร้างแบคเทอริโอซินที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างในการยับยั้งจุลินทรีย์ การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารอาจเป็นไปได้ทั้งในรูปแบบของการผลิตที่พบอยู่แล้วหรือการนำไปเติมในอาหารระหว่างกระบวนการผลิต จึงเป็นที่น่าสนใจว่าแบคเทอริโอซินนั้นเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นมาตามธรรมชาติเพื่อยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันโดยมีกลไกที่สำคัญในการยับยั้งคือ แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบเปปไทด์ที่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการรั่วขององค์ประกอบเซลล์ตามมา (ภาพที่ 2.1) ซึ่งอันตรกิริยาระหว่างแบคเทอริโอซินและเยื่อหุ้มเซลล์มีหลายขั้นตอนก่อให้เกิดสารคอมเพล็กซ์ที่เป็นสาเหตุ กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินได้สร้างสภาวะที่ไม่สมดุลของ Portion Motive Force (PMF)ให้เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายซึ่ง PMF จะประกอบไปด้วยสารต่างๆคือ เกรเดียนต์พีเอช (pH gradient ; ΔpH) และ electrostatic component (the membrane potential ; $\Delta\Psi$) ซึ่งจะเร่งให้เกิดการสังเคราะห์ ATP และสะสมไอออนรวมทั้งสารเมตาบอไลต์ต่างๆในเยื่อหุ้มเซลล์ ความไม่สมดุลย์ของ PMF ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการไหลออกของสารที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น ไอออน กรดอะมิโนและ ATP ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของเซลล์เกิดการบาดเจ็บและทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Hill, 1995; Nes *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000; Cleveland *et al*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003) จากการที่เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์จะทำให้เกิดการรั่วของ โปแทสเซียมไอออน (K^+) ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการรับกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ เซลล์จะตายในที่สุดเนื่องจากโปแทสเซียมไอออนซึ่งเป็นส่วนประกอบของ K^+ - ATPase ได้รั่วออกไปจากเซลล์จึงเป็นการเร่งให้เกิดการสลาย ATP จาก ATPase เพิ่มมากขึ้น (Skaugen *et al.*, 1994), ดังแสดงในภาพที่ 2.2

กลไกการการเกิดรูรั่วของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์นั้นเริ่มจากการเกิด Electrostatic interaction ระหว่าง ปลายทางด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารพวก hydrophobic ที่มีประจุบวกกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยมี anionic lipid ของไซโตพลาสมิกเมมเบรน (cytoplasmic membrane) เป็นตัวรับ (recepter) ตัวแรก ส่วนปลายทางด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-termina) ของแบคเทอริโอซินนั้นจะมีความเป็น hydrophobic มากกว่าปลายทางด้านหมู่อะมิโน และเกิด hydrophobic interaction กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย หลังจากการเกิด hydrophobic interaction แล้วแบคเทอริโอซินจะมีพลังงานมากขึ้นและจะแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทางด้านหมู่คาร์บอกซิล ตามมาด้วยการเกิดการรวมตัวกันเกิด water-fill pores ซึ่งกลไกนี้อธิบายได้ดังภาพที่ 2.3

ในปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงตัวเดียว ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยและใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกคือ ไนซิน (nisin) โดยได้มีงานทดลองพบว่าจาก 40 สายพันธุ์ของ *Lactococcus lactis* สามารถผลิตไนซินได้ถึง 35

สายพันธุ์ (Hurst,1981) แต่ในปัจจุบันได้มีการทำการวิจัยอย่างมากมายเพื่อค้นหาแบคเทอริโอซินใหม่ๆที่เหมาะสมและปลอดภัยในการใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร และพบว่าแบคเทอริโอซินในกลุ่ม IIa ได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีสเปกตรัมของกิจกรรมการยับยั้งที่แคบยิ่งขึ้นและมีความจำเพาะสูงต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย ไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่นในระบบนิเวศเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Pediocin PA-1/AcH ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและระบบการผลิตได้หลากหลาย

แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ Pediococci พบว่าใช้ เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมัก เช่น แตงกวาดองและไส้กรอกเปรี้ยวมาเป็นเวลานานแล้ว โดยสามารถแยกได้จากพืช (Mundt *et al.*, 1969) ในผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น silage และสามารถแยกได้จากมนุษย์ (Facklam *et al.*, 1989) นอกจากนั้นยังใช้ในการเพิ่มกลิ่นและรสเปรี้ยวในเนยแข็ง (Thomas *et al.*, 1985, Thomas, 1987) ใช้ในการทำ sourdough breads (Sugihara, 1985) แต่มีรายงานว่า Pediococci เป็นตัวการทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Rainbow, 1975 ; Lafon-Lafourcade, 1983) และยังสามารถแยก Pediococci ได้จากลำไส้โค (Baumann and Foster, 1956) จากปลาสด (Blood, 1975) ไก่ดิบ (Teuber and Geis, 1981) และจากอุจจาระไก่งวง (Harrison and Hanson, 1950) แบคทีเรียในกลุ่ม Pediococci จะสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์(Garriga *et al.*, 1993; Schillinger and Lücke, 1990) ซึ่งต่างจากแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria ชนิดอื่นๆ สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococcus* จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่กว้างโดยสามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มพวกแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria, Staphylococcus, Bacillus* และ *Clostridium* โดยได้มีรายงานมากมายเกี่ยวกับความสำเร็จในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อสด (Motlagh *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1990; Rozbeh *et al.*, 1993; Schillinger and Holzapfel, 1990.)



ภาพที่ 2.3 Schematic representation for bacteriocin and membrane interactions

a) bactericin predicted structural domain

b) possible interaction of each domain with the target membrane surface

c) bacteriocin insertion and formation of hydrophilic pores

ที่มา: Ennahar *et al.* (2000)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.3.3 Pediocin PA-1 (from *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)

Pediococcus pentosaceus TISTR 536 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้านของไทย มีคุณสมบัติในการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Swetwiwathana, 2005) รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Enterococcus faecalis* เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้สูงสุด 6,400 AU/ml ใน MRS broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (Swetwiwathana and Lotong, 1999; Swetwiwathana *et al.* 2000) ซึ่งต่อมาเชื้อดังกล่าวได้รับการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* และสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นเป็น class II bacteriocin ในกลุ่ม Pediocin PA-1 (Swetwiwathana *et al.* 2004; (Swetwiwathana, 2005)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกด้วยกัน ซึ่งPediocin PA-1 ที่ผลิตได้จาก *P. pentosaceus* TISTR 536 จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกันแต่ไม่ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* (Swetwiwathana and Lotong, 1999; Swetwiwathana *et al.* 2000) จากรายงานการศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินในการยับยั้งและทำลายกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่ทนต่อการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวได้ถ้ามีปัจจัยอื่นร่วมด้วยที่เรียกว่า synergistic effect เช่น มีสภาพความเป็นกรดสูง มีไฮโดรไลติกเอนไซม์ มีสารยับยั้งพวกไนไตรท์ EDTA หรือมีสารพวก chelating agent เป็นส่วนประกอบ เป็นต้น (Hanlin *et al.* 1993; Stevens *et al.* 1991; Helander *et al.* 1997; Swetwiwathana *et al.* 2001) ในปัจจุบันนอกเหนือจากไนซินแล้ว Pediocin PA-1/ AcH เป็นแบคเทอริโอซินที่ได้จาก Lactic Acid Bacteria ที่มีการศึกษามากที่สุด

Bhunia และคณะ (1987a) เป็นกลุ่มแรกที่รายงานเกี่ยวกับการสกัดสารแบคเทอริโอซินจาก *Pediococcus acidilactici* ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารและแบคทีเรียที่ก่อโรค ต่อมาจากการศึกษาในภายหลังของ Bhunia และคณะ (Bhunia *et al.*,1987b) พบว่า Pediocin AcH ประกอบด้วยโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 2700 Da สามารถทนต่อสารเคมีได้หลายชนิดแต่จะถูกทำลายด้วยProteolytic enzyme บางชนิด เช่น trypsin, chymotrypsin, ficin และ papain แต่สามารถทนต่อ lipase, ribonuclease, lysozyme และ organic solvents ได้ ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่า Pediocin AcH เป็นโปรตีนบริสุทธิ์มากกว่า conjugated protein (Bhunia *et al.*,1988) ความสามารถในการทนต่อ formaldehyde และความร้อนสูงชี้ให้เห็นว่ามีขนาดโมเลกุลเล็ก และ Pediocin AcH จะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อสัมผัสกับด่างที่มี pH 10หรือมากกว่า แสดงให้เห็นว่ามีโครงสร้างแบบ 2nd structure ซึ่งเป็นโครงสร้างที่

63484

สำคัญต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยได้มีงานวิจัยสนับสนุนเกี่ยวกับการใช้ Pediocin AcH ในผลิตภัณฑ์อาหารมากมาย คือ

Nielsen และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ Pediocin ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อโคสด โดยนำตัวอย่างเนื้อโคมาใส่เชื้อ *Listeria monocytogenes* ลงไปจากนั้นนำตัวอย่างมาใส่สาร Pediocin ทิ้งไว้ 2 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ 0.5-2.2 log cycle โดยขึ้นความเข้มข้นของ Pediocin ที่ใช้ และจากผลการทดลองพบว่าชิ้นเนื้อที่ใส่ Pediocin จะตรวจพบเชื้อ *Listeria monocytogenes* น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัส Pediocin 1-2.5 log cycle

Kalchayanand (1990) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Pediocin AcH ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อวัวสดโดยนำตัวอย่างเนื้อโคไปสัมผัส *Leuconostoc mesenteroides* ($5x10^3$ cfu/ml) แล้วนำมาสัมผัสสาร Pediocin AcH ความเข้มข้น 1240 AU/g แล้วบรรจุในภาชนะสุญญากาศ เก็บที่ 3 °C ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างเนื้อโคที่สัมผัส Pediocin AcH จะพบเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 2 log cycle เมื่อครบ 8 สัปดาห์ และเมื่อครบ 12 สัปดาห์พบว่ากลุ่มตัวอย่างพบเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* น้อยกว่า 1 log cycle

Nieto-Lozano และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรีย 39 ชนิดที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ในสเปน เพื่อดูความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน จากการทดลองพบว่ามี 14 ชนิด (35%) แสดงผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด โดยในการทดลองใช้วิธี agar spot test และชนิดที่แสดงผลยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *Pediococcus acidilactici, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum* โดยเชื้อเหล่านี้จะแสดงผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และมีเพียง *Pediococcus acidilactici* เท่านั้นที่ให้ผลในการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยให้ผลการยับยั้งสูงสุดตั้งแต่เริ่มต้นช่วง stationary phase

Swetwiwathana และคณะ (2002) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของสาร Pediocin PA-1 ที่ผลิตมาจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในการใช้เป็นกล้าเชื้อในระหว่างการหมักแหนม เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Anatum โดยในการศึกษาได้แบ่งผลิตภัณฑ์แหนมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่เติมกล้าเชื้อ กลุ่มที่ใช้ Pediocin PA-1 ที่ผลิตจาก *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อ และกลุ่มสุดท้ายใช้ *P. pentosaceus* JCM 5890 ซึ่งไม่ผลิตสารยับยั้งแบคเทอริโอซินเป็นกล้าเชื้อ ผลที่ได้พบว่าการใช้ การใช้เชื้อที่ผลิต Pediocin PA-1 เป็นกล้าเชื้อจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด โดยขึ้นกับปริมาณเชื้อปริมาณเชื้อที่เติมลงไป โดยพบว่าถ้าเชื้อมีปริมาณน้อย (8-10 cfu/g) จะสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 4 ในขณะที่ถ้าปริมาณเชื้อมาก (80-100 cfu/ml) จะใช้เวลา 5 วัน

Bari และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการใช้สาร ไนซิน (50μg/ml) สาร Pediocin (100AU/ml) และการใช้สารทั้งสองตัวนี้ร่วมกับ โซเดียมแลคเตด (2%) โปแทสเซียมซอเบท

(0.02%) กรดไฟติค (0.02%) และ กรดซิตริก (10 mM) ในการผสมในน้ำล้างผักสด คือ ถั่วเขียว กะหล่ำปลี และบร็อคโคลี ที่มีการเติมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ลงไปและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในน้ำที่ผสมสารเคมีดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 1 นาที และมาตรวจนับปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต ผลที่ได้พบว่าการใช้ Pediocin เพียงอย่างเดียวหรือการใช้ Pediocin ร่วมกับกรดต่างๆสามารถลดเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ มากกว่าการใช้สาร nisin

2.4 การใช้กรดแลคติกในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ในปัจจุบันการใช้กรดอินทรีย์ในการลดจำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ได้รับความสนใจอย่างสูง โดยกรดอินทรีย์มีคุณสมบัติในการทำลาย (bactericidal) และ ยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) ของแบคทีเรีย ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายแบคทีเรียของกรดอินทรีย์ขึ้นกับระดับ pH การแตกตัวของกรด และความเฉพาะเจาะจงของกรดในการทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความทนทานต่อระดับ pH ได้ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ ชนิดและความเข้มข้นของกรด เวลาในการสัมผัสของกรดและเชื้อ ค่าความเป็นบัฟเฟอร์ของอาหาร และสภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษา การยับยั้งหรือการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นกับค่า pH ความยาวพันธะของกรด และค่า degree of branching ของกรด การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดในรูปของเปอร์เซ็นต์ จำนวนโมเลกุลของกรด เป็นการแสดงค่า pH สุดท้ายของกรดเท่านั้น จึงเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบผลของกรดแต่ละชนิดในการยับยั้งจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพของกรดขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ซึ่งค่า pK_a ของกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง pH เท่ากับ 3-5 ดังตารางที่ 2.3

กรดอินทรีย์เป็นสารที่พบอยู่ในธรรมชาติ ในอาหารชนิดต่างๆ หรือในบางครั้งอาจมีการเติมใส่ลงในอาหาร เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้นๆให้ยาวนานขึ้น กรดอินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก, กรดแลคติก, กรดโพพิโอนิก, กรดซอร์บิก และ กรดเบนโซอิก ส่วนกรดซิตริก, กรดแคปพรีอิก, กรดฟูมาลิก และ กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆมีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัด แต่ถูกนำมาใช้ในแง่ของรสชาติมากกว่า กรดอินทรีย์มีอยู่มากมายหลายชนิด สำหรับกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการชำแหละและการแปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ คือ กรดแลคติก

ตารางที่ 2.3 ค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ

Acids	pK_1	pK_2	pK_3
Acetic acid	4.75		
Dehydroacetic acid	5.27		
Sodium diacetate	4.75		
Adipic acid	4.43	5.41	
Caprylic acid	4.89		
Citric acid	3.14	4.77	6.39
Fumaric acid	3.03	4.44	
Lactic acid	3.08		
Malic acid	3.40	5.11	
Propionic acid	4.87		
Succinic acid	4.16	5.61	
Tartaric acid	2.98	4.34	

ที่มา: Doores (1993)

2.4.1 กรดแลคติก

กรดแลคติกบริสุทธิ์ (2-hydroxy lactic acid) จะอยู่ในรูปผงสีขาวแห้ง มีจุดหลอมเหลวที่ 18-26 °C โดยทั่วไปแล้ว กรดแลคติกจะอยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันไป โครงสร้างพื้นฐานของกรดแลคติกมี 3 รูป คือ L(+), (D-) และ DL ซึ่งโครงสร้างที่มนุษย์สามารถสร้างขึ้นในร่างกายได้ คือ L(+) โดยสังเคราะห์ได้ในปริมาณ 117-144 g lactate/ 24 hr/70 kg และโครงสร้าง D(-) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นได้ ส่วนโครงสร้าง DL พบในพืชชั้นสูง กรดแลคติกที่ใช้ในอาหารจะเป็นของเหลวสีขาวเหลืองมีความเข้มข้น 50%-80% สำหรับกรดแลคติกที่ใช้ในทางการแพทย์จะเป็นของเหลวใสไม่มีสี มีความเข้มข้น 88%-90%

คุณสมบัติของกรดแลคติก

1. เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีอยู่ในอาหารทั่วไปในเนื้อสัตว์ก็มีการผลิตกรดแลคติกด้วยโดยมีการเปลี่ยนจากไกลโคเจนให้เป็นกรดแลคติก
2. เป็นสารที่ไม่เป็นพิษและรับรองความปลอดภัยในการใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา
3. มีรสกรดอ่อนๆ ต่างจากกรดชนิดอื่นๆ ทำให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อสัตว์แล้วไม่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของเนื้อสัตว์มากนัก โดยเฉพาะด้าน สีและกลิ่น

4. ไม่กลบหรือลบกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสอื่นๆเมื่อใส่ลงในเนื้อสัตว์
5. มีบทบาทเด่นชัดด้านการถนอมอาหาร และควบคุมปริมาณจุลินทรีย์
6. เกลือของกรดแลคติกละลายน้ำได้ดี ทำให้ซึมเข้าไปในเนื้อสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว

เนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบที่สำคัญต่อการบริโภคและการแปรรูป เมื่อผ่านการชำแหละแล้วจะมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้น อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์จึงมักใช้กรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ พบว่าการใช้ กรดแลคติก 1%, กรดอะซิติก 2%, กรดซิตริก 0.25% และกรดแอสคอบิก 0.1%สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaeae* ได้ที่ 10 °C (Oshold *et al.*, 1984) และ Smulders and Woolthus (1983) ได้พบว่า การใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 1-1.25% สเปรย์ลงบนซากสัตว์และเก็บในภาชนะสุญญากาศจะลดปริมาณจุลินทรีย์ได้หลังการเก็บ 14 วันที่ 2 °C นอกจากนั้น Smulders and Woolthus (1983) ยังพบอีกว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับการเก็บในภาชนะสุญญากาศจะยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ได้ดีกว่าและ Anderson และคณะ (1992) ยังพบอีกว่าการใช้กรดแลคติกร่วมกับการใช้กรดชนิดอื่นๆจะให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า และยังพบว่ากรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพสามารถลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ได้ถึง 2 log cycle และลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 1.5 log cycle ที่ 70 °C ดังนั้นในปัจจุบันอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์กรดแลคติกจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้นโดยมีจุดประสงค์เพื่อ

1. ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในซากสัตว์
2. เพิ่มอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์

2.4.2 กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยใช้กรดแลคติก

ความสามารถของการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ขึ้นอยู่กับ pH โดยกรดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ในรูป undissociated ดังนั้นการเลือกใช้กรดอินทรีย์ในการถนอมอาหารต้องพิจารณาถึงค่า pH และ pKa ของกรดชนิดนั้นๆซึ่งโดยปกติกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีค่าpH ต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3.0-5.0 เนื่องจากที่ค่า pH 5.5 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารจะถูกยับยั้ง (Ingram and Simonsen, 1980) สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์นั้น กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูป undissociated จะสามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ และ lipid bilayer ได้ง่ายขึ้น โดยปกติสภาพภายในเซลล์กรดจะอยู่ในรูป associated เนื่องจากภายในเซลล์มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ แบคทีเรียจึงพยายามรักษา pH ภายในเซลล์ให้มีค่าใกล้เคียงความเป็นกลาง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนรูปของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลิอิก และ ฟอสโฟไลปิด โปรตอนจากกรดอินทรีย์จะทำให้ความเป็นกรดภายในไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้น จึงต้องมีการกำจัดกรดที่มากเกินไปออกสู่ภายนอกเซลล์ โปรตอนถูกขับออกภายนอกเซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้าเรียกว่า proton motive force (PMF) การขับโปรตอนภายใน

เซลล์ซึ่งเกิดจากกรดอินทรีย์ ออกสู่ภายนอกเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการไหลเข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่องของโปรตอน ทำให้พลังงานภายในเซลล์ถูกนำมาใช้ในการกำจัดโปรตอนจนหมด ขณะเดียวกันก็เกิดการรบกวนการผ่านเข้าออกของสารในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้แบคทีเรียขาดพลังงานและตายในที่สุด (Doyle *et al.*, 1997)

2.4.3 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์เมื่อใช้กรดแลคติก

การใช้กรดแลคติกกับส่วนต่างๆของเนื้อสัตว์ จะมีผลต่อคุณภาพของเนื้อสัตว์ โดยพบว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายในและลักษณะภายนอกของเนื้อสัตว์ได้ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายใน

เป็นการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในอวัยวะต่างๆ เช่น เนื้อสันใน เนื้อไม่ติดซี่โครง เนื้อสะโพก เนื้อที่มีก้อนเลือด เนื้อที่คอ เป็นต้น โดยต้องใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เหมาะสม เพราะถ้าใช้ความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้สีของเครื่องในซีดจางอย่างเห็นได้ชัด แต่ถ้าน้อยเกินไปอาจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก

2.1 สี

ทำให้เกิดการซีดจางของเนื้อสัตว์จนบางครั้งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ความซีดจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดแลคติก โดย Stivarius และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองโดยนำเนื้อโคที่แช่เชื้อ *E. coli*, *S.* Typhimurium, coliforms และ aerobic plate count จากนั้นนำมาแช่ในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 82 °C และสารละลายกรดแลคติก 5% และสังเกตผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบทางประสาทสัมผัส ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่แช่ในสารละลายกรดแลคติกให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในด้านการยับยั้งเชื้อ *E.coli*, coliforms และ aerobic plate count แต่ก็ทำให้เนื้อโคมีสีซีดลง

2.2 กลิ่น

การใช้กรดแลคติกจะให้ผลดีในแง่ของกลิ่นซากในแง่ของกลิ่นเนื้อสัตว์ โดยการใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 5% จะไม่มีผลต่อความผิดปกติของกลิ่นเลย (Hamby *et al.*, 1987)

คมแข พิลาสสมบัติ (2540) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* ในหลอดทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ 1 2 และ 3% (v/v) ผลที่ได้พบว่า เชื้อ *S.* Derby จะลดลงอย่างสมบูรณ์เมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลายกรดแลคติกนาน 48 24 และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Staph. aureus* นั้น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) ในการใช้กรดแลคติกทั้งสามระดับดังกล่าว แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาที่สารละลายกรดแลคติกสัมผัสกับเชื้อนานขึ้น จะพบแนวโน้มการลดลงมากขึ้นและมากที่สุดที่48 ชั่วโมง

ผุสดี ตังวัชรินทร์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลคติกในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* บนเนื้อสันนอกสุกร โดยใช้เนื้อสุกรปลอดเชื้อที่มีน้ำหนัก 100-200 กรัมต่อชิ้น ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ *S.* Derby ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5 log cfu/g และเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 3 log cfu/g โดยแบ่งชิ้นเนื้อสุกรเป็นกลุ่มควบคุมคือไม่สัมผัสสารละลายและกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 2% (v/v) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 15 °C และสุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 วัน ผลที่ได้พบว่า การเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ 4 °C นั้นกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Derby และ *Staph. aureus* ได้ดีกว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่การเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ 15 °C ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Derby ได้ แต่สำหรับเชื้อ *Staph. aureus* พบว่ากลุ่มที่สัมผัสกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นาน 7 วัน

Anderson และ Marshall (1990) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของกรดแลคติก โดยใช้ กรดแลคติก 1%, กรดอะซิติก 2%, กรดซิตริก 0.25% และกรดแอสคอบิก 0.1% สัมผัสกับเนื้อวัวที่มีการสัมผัสเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaeae* โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรด (0-3%) และใช้อุณหภูมิต่างกัน (20-700°C) ผลที่ได้พบว่าสามารถลดเชื้อในกลุ่ม aerobic bacteria, *E. coli* และ *S.* Typhimurium และพบว่าค่า pH ที่ผิวหน้าเนื้อวัวลดจาก 5.2 เหลือ 4.3 เมื่อใส่กรด 3% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

Blaise และคณะ (1997) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดความเข้มข้นระหว่าง 0.1%-1% (w/v) 5 ชนิด คือกรดอะซิติก, กรดเบนโซอิก , กรดแลคติก, กรดโพพิโอนิกและ กรดซอร์บิกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *B. thermosphacta, C. piscicola, Lb. curvatus, Lb. sake, P. fluorescens* และ *S. liquefaciens* ผลที่ได้พบว่าการใช้กรดอะซิติก จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ตามมาด้วยกรดโพพิโอนิก กรดแลคติกและ กรดซิตริกตามลำดับ นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่า เชื้อในกลุ่ม lactobacillus จะมีความทนต่อการยับยั้งของกรดมากที่สุด ตามมาด้วย *P. fluorescens* และ *S. liquefaciens* ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *B. thermosphacta, C. piscicola* จะถูกยับยั้งด้วยกรดได้มาก

Yang และ Slavik (1998) ได้รายงานถึงผลการลดจำนวนของเชื้อ *S.* Typhimurium ไป 1.7-2.0 log cfuในเนื้ออกไก่ โดยได้นำเนื้อไปแช่ในสารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟส 10% , ซิตริลไพริดิเนียมคลอไรด์ 0.5%,กรดแลคติก 2% และ โซเดียมไบซัลเฟต 5%

Yasmina และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างกระบวนการฆ่า และศึกษาผลของการใช้สารไนซิน, กรดแลคติกรวมทั้งสารผสมของสารละลายดังกล่าวในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้สารไนซิน 500 IU/ml, กรดแลคติก 1.5% รวมทั้งสารผสมของสารละลายดังกล่าวพ่นลงบนซากเนื้อโคและทำการ swab

บริเวณซอกคอ ส่วนอก และ บริเวณไต หลังจากกระบวนการ ลอกหนัง ผ่าซากและล้างซาก โดยกลุ่มควบคุมจะไม่พ่นสารละลายลงไป ผลจากการศึกษาพบเชื้อจำพวก aerobic place counts (APCs), total coliforms และ *E.coli* มากที่สุดบริเวณซอกคอหลังกระบวนการผ่าซาก และพบเชื้อน้อยสุดหลังกระบวนการลอกหนัง และการใช้สารละลายผสมจะมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดโดยลดได้มากถึง 2 log units

Gill และ Badoni (2004)ได้ทำการวิจัยโดยใช้กรดแลคติก 2 และ 4 % , เพอออกซีอะซิติก 4% , อะซิดิฟายโซเดียมคลอไรด์ 0.16 % เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ประเภท aerobes, coliforms และ *E. coli* ในชิ้นเนื้อวัว และทำการทดลองที่ 7 °C ผลที่ได้พบว่าการใช้ เพอออกซีอะซิติก และ อะซิดิฟายโซเดียมคลอไรด์ จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 กลุ่มเพียงเล็กน้อยและให้ผลน้อยกว่าการใช้กรดแลคติก 4% นอกจากนั้นในการทดลองยังพบอีกว่ากลุ่มที่ใช้กรดแลคติก 4% เมื่อชิ้นเนื้อสัมผัสกรด 5-60 นาทีที่ 7± 1 °C จะสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 กลุ่มได้มากกว่า 1.5 log unit ในขณะที่กลุ่มที่ใช้กรดแลคติก 2% จะให้ผลในการลดปริมาณเชื้อคล้ายกับกลุ่มที่ใช้กรดแลคติก 4% ที่เวลา 5 นาทีแต่เมื่อมาดูที่ 60 นาทีจะพบว่าลดปริมาณเชื้อได้ 1 log unit

Haydar และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้กรดแลคติก 1, 2% น้ำร้อน และการใช้ทั้งกรดแลคติกและน้ำร้อนร่วมกันในการลดปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium และ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ° C โดยทำการเก็บรักษา 5 วัน ผลที่ได้พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ 0.5-1.19 และ 0.09-1.14 log unit ในวันที่ 0 สำหรับเชื้อ *S.* Typhimurium และ *L. monocytogenes* ตามลำดับ และลดได้ 0.43-1.78 และ 1.69-3.84 log unit ในวันที่ 5 และพบอีกว่าการใช้น้ำร้อนและตามด้วยการใช้กรดแลคติก 2% จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เนื้อโคที่ใช้ในการทดลอง

เนื้อโคที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่เนื้อสะโพก ซึ่งมาจากเขียงเนื้อในตลาดเขตพระโขนง, เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2.1 *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 (Swetwiwathana, 2005)

3.1.2.2 เชื้อ *Salmonella* Senftenberg SH 540/04 (WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

3.1.2.3 เชื้อ*Salmonella* Weltevreden SO 1691/04 (WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

3.1.2.4 เชื้อ *Salmonella* Anatum (WHO Salmonella-Shigella Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

3.1.2.5 เชื้อ *Listeria innocua* LTH 3096

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Scharlau)

3.1.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Sodium Deoxycholate(XLD) agar (Scharlau)

3.1.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar (Merck)

3.1.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron(TSI) agar slant (Critenion)

3.1.3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine Indole Motility (LIM) medium (Difco)

3.1.3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) slant,plate (Critenion)

3.1.3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) (Critenion)

3.1.3.8 Agglutinating antiserum (polyvalent) A-67,A-I (Serotest)

3.1.3.9 Antisera O group B,C,D,E (Serotest)

3.1.3.10 Meat extract (Scharlau)

3.1.3.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport Vassiliadis broth (RV broth) (Difco)

3.1.3.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric(HE) agar (Merck)

3.1.3.13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Semi-solid Rappaport-Vassiladis (MSRV)

3.1.3.14 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth(TTB) (Merck)

3.1.3.15 Yeast Extract (Merck)

3.1.3.16 โซเดียมคลอไรด์ (BDH)

3.1.3.17 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95%

3.1.3.18 กรดแลคติก (Purac)

3.1.4 เครื่องมือ

3.1.4.1 Autoclave (บริษัท HIRAYAMA รุ่น HICLAVE HVE-25)

3.1.4.2 Incubator (บริษัท Herareus รุ่น UT 6420)

3.1.4.3 Hot air oven (บริษัท Memmert)

3.1.4.4 Laminar air flow carbinet (บริษัท Microflow รุ่น ABS 1200)

3.1.4.5 pH meter (บริษัท Mettler toledo)

3.1.4.6 Microwave (บริษัท LG รุ่น MS-1822C)

3.1.4.7 Micropipette (บริษัท eppendorf Research)

3.1.4.8 เครื่องชั่งชนิดอิเลคโทรนิค (บริษัท OHAVS รุ่น ARC 1)

3.1.4.9 กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท OLYMPUS รุ่น CH 30)

3.1.4.10 Vortex (บริษัท Vortex mixer รุ่น VM-300)

3.1.4.11 เครื่องแก้วอื่นๆ

3.1.4.12 เครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 ศึกษาปริมาณและซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี

สุ่มตรวจตัวอย่างเนื้อโคที่จำหน่ายในตลาดสดจำนวน 32 ตัวอย่างนำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี standard conventional method (AOAC International ,1984) นำสายพันธุ์ที่พบมาก 3 สายพันธุ์มาศึกษาต่อในหัวข้อ 3.2.2

<u>วิธีการทดลอง</u>

3.2.1.1 สุ่มตัวอย่างเนื้อโค ตัวอย่างละ 25 กรัม เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 225 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2.1.2 ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 1 มิลลิลิตร ลงใน 10 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ TTB บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 43 องศาเซลเซียส และ ถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน 10 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ RV broth บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2.1.3 ถ่ายเชื้อจำนวน 1 loop จาก TTB และ RV broth ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar Rambach agar HE agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อจาก TTB และ RV broth จำนวน 0.1 มิลลิลิตร โดยแบ่งหยดให้ได้ 5 จุด ลงบน MSRV บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2.1.4 สุ่มเลือกโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของเชื้อซัลโมเนลลา (ภาคผนวก ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD, HE และ Rambach agar อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อละ 3 โคโลนี ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละโคโลนีในอาหาร TSI agar และ LIM medium บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อซัลโมเนลลา สำหรับ MSRV ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่สงสัยจากหยดที่มีการแผ่เคลื่อนที่ของเชื้อจากจุดหยด โดยเขี่ยเชื้อจากบริเวณที่แผ่ไกลที่สุดจานเพาะเชื้อละ 3 จุด นำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TSI agar และ LIM medium บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.1.5 คัดเลือกหลอดที่ให้สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อซัลโมเนลลา (ภาคผนวก ก) มาทำการตรวจสอบยืนยันคุณสมบัติทาง serology โดยเขี่ยเชื้อบนผิว slant ของหลอด TSI agar มาทดสอบกับ polyvalent A-67 antiserum, polyvalent A-I และ antiserum group A B C D และ E ของเชื้อซัลโมเนลลา โดยวิธี slide agglutination นำหลอดที่ให้ผลบวกเพาะเชื้อลงใน TSA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำหลอดเชื้อ TSA ส่งตรวจยืนยันผลและแยกชนิดซีโรวาร์ของซัลโมเนลลาที่ WHO *Salmonella-Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.2.2 ศึกษาการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาจากการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

3.2.2.1 การเตรียม Crude Pediocin PA-1จากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 (Swetwiwathana, 2002)

1) เลี้ยงเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชม.

2) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็น Supernatant fluidไว้

3) กรองผ่าน sterile filter ขนาด 0.2-μm-pore-size เก็บที่ 5 องศาเซลเซียส

4) ตรวจสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตโดยวิธี agar spot test

3.2.2.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน

1) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Listeria innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2) ถ่ายเชื้อ *Listeria innocua* 10 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE (0.75% agar w/v) 5 มิลลิลิตรที่หลอมแล้ว

3) เทอาหาร TSAYE ที่ถ่ายเชื้อแล้วทับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อนานประมาณ 10 นาทีให้ไม่มีหยดน้ำบนผิวหน้าอาหาร

4) นำแบคเทอริโอซิน Pediocin ที่สกัดเตรียมไว้ในข้อ 3.2.2.1 มาทำการทดสอบความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่ *P.pentosaceus* TISTR 536 ผลิตได้โดยทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 จากนั้นหยดสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3) บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการเกิด clear zone นำค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่เกิด clear zone มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิต โดยใช้หน่วย Activity Unit ต่อมิลลิลิตร (AU/ml)

3.2.2.3 ศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ต่อการยับยั้งการเจริญและการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S.* Senftenberg *S.* Weltevreden และ *S.* Anatum ในหลอดทดลอง (in vitro test) (Thatcher and Clark. 1968)

<u>ขั้นตอนการทดลอง</u>

แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่สัมผัสสารเคมี)

กลุ่มที่ 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 6. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีPediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

วิธีการทดลอง

1) เตรียมสารละลายเชื้อ *S.* Senftenberg *S.* Weltevreden และ *S.* Anatum ให้มีความเข้มข้น10^4 CFU/ml

2) ถ่ายเชื้อ *S.* Senftenberg *S.* Weltevreden และ *S.* Anatum ที่มีความเข้มข้น 10^4 CFU/ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 กลุ่มข้างต้น

3) เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงเพื่อทำการตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี spread plateบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ XLD

4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นับจำนวนเชื้อ

6) นำโคโลนีที่นับได้จากอาหาร TSA และ XLD มาวิเคราะห์ปริมาณ injured cell จากสูตร

$$\% \text{ injured cell} = 1-\frac{\text{(จำนวนโคโลนีที่พบบนอาหาร XLD)}}{\text{(จำนวนโคโลนีที่พบบนอาหาร TSA)}} \times 100$$

3.2.3 ศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก (ดัดแปลงมาจาก จุฑารัตน์ เลี่ยนกัตวา, 2545)

3.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโค

นำเนื้อโคส่วนที่เป็นสะโพกมาตัดแต่งให้มีขนาด 5 x5 x 1 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อโดยวิธีฉายรังสีระดับ 10 Kgy (ได้รับความอนุเคราะห์การฉายรังสีเนื้อโคจากสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

3.2.3.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 6 x 5 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มตลอด (6 x 5 Factorial in RCBD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือกลุ่มของสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค 6 กลุ่ม

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาที่ทำการศึกษา ได้แก่วันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8

สารเคมีที่ใช้ในการสัมผัสสาร แบ่งเป็น 6 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มที่ 1. เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่สัมผัสสารเคมี)

กลุ่มที่ 2. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ

Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 4. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 6. สัมผัส Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

วิธีการทดลอง

1) นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เตรียมไว้ทั้ง 6 กลุ่มข้างต้นมาจุ่มในสารละลาย *S.* Senftenberg *S* Weltevreden และ *S.* Anatum ที่มีความเข้มข้น 10^6 CFU/ml เป็นเวลา 3 นาทีผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 15 นาที

2) แบ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการเติมเชื้อแล้วเป็น 6 กลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มที่ 2-6 นำมาสัมผัสกับสารเคมีที่ระบุไว้เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างทั้ง 6 กลุ่มมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติก PE เก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ $4\pm1^{\circ}C$

3) เก็บตัวอย่างในวันที่0,2,4,6และ8 นำตัวอย่างชิ้นเนื้อโคมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA และ XLD

4) นำตัวอย่างทั้ง 6 กลุ่มข้างต้น วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของชิ้นเนื้อในวันที่0, 2, 4, 6 และ 8 ของการเก็บรักษาด้วยเครื่อง pH meter และนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่องเครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300)

5) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS analysis of variance)

3.2.4 ศึกษาผลของ กรดแลคติก และ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโค (ดัดแปลงจาก จุฑารัตน์ เลี่ยนกัตวา, 2545)

เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโค ขนาด 5 X 5 X 1 ตารางเซนติเมตร แบ่งชิ้นเนื้อออกเป็น 6 กลุ่มการทดลองดังที่แสดงในหัวข้อ 3.2.3.2 นำชิ้นเนื้อสัมผัสสารละลายเป็นเวลานาน 5 นาที และผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 15 นาที นำชิ้นเนื้อบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติก PE เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อตรวจหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในวันที่ 0, 2, 4, และ8 ของการเก็บรักษา

3.2.5 ศึกษาด้านคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคที่ผ่านการสัมผัสกรดแลคติก และ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว (ดัดแปลงจาก จุฑารัตน์ เลี่ยนกัตวา, 2545)

เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ ขนาด 5 x 5 x 1 ตารางเซนติเมตร แบ่งชิ้นเนื้อออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อสัมผัสสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที และวางชิ้นเนื้อไว้นานประมาณ 30 นาที นำมาทดสอบประสาทสัมผัสทางด้าน สีและกลิ่นของเนื้อโคสด โดยใช้การทดสอบแบบ Different from control โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ในการทดสอบใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS ansalysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละวิธีด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาปริมาณและซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง,เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิ และเขตมีนบุรี

จากการสุ่มตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกที่จำหน่ายในตลาดสดในเขตบางกะปิ มีนบุรี พระโขนง อ่อนนุช ประเวศและลาดกระบัง 35 ตัวอย่างโดยทำการตรวจโดยวิธีมาตรฐานของการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอาหาร (standard conventional method) เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment โดยใช้ Tetrathionate (TT) broth และ Rapport-Vassiliadis (RV) medium กับขั้นตอน isolation โดยใช้ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, Rambach agar และ Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium พบว่าตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (74.3%) เป็นการตรวจพบจากการใช้ TT เป็น selective enrichment บ่มที่ 43 ^{0}C จำนวน 19 ตัวอย่าง (73.1%) TT บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C จำนวน 16 ตัวอย่าง (61.5%) และจากRV บ่มที่อุณหภูมิ 42 ^{0}C จำนวน 9 ตัวอย่าง (34.6%) (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อวัวชำแหละจำหน่ายปลีกโดยวิธีมาตรฐานจากขั้นตอน selective enrichment

จำนวนตัวอย่าง(%)	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบซัลโมเนลลาจาก			จำนวนทั้งหมดที่ตรวจพบซัลโมเนลลา (%)
	RV	TTB(37°C)	TTB(43°C)	
35 (100.0)	9 (34.6%)	16 (61.5%)	19 (73.1%)	26 (74.3%)

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซโรวาร์ต่างๆ ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ตรวจพบจากเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

serovar	จำนวนที่แยกได้	คิดเป็นเปอร์เซ็นต์
S. Senftenberg	21	19.3
S. Anatum	17	15.6
S. Weltevreden	12	11.0
S. Agona	11	10.0
S. Lexington	10	9.1
S. Typhimurium var. copen-hagen	6	5.5
*S.*Give	5	4.6
S. Amsterdam	4	3.7
S. Hvittingfoss	4	3.7
S. Corvallis	3	2.8
S. Augustenborg	3	2.8
S. Rissen	3	2.8
S. Weltevreden var. 15[15]	3	2.8
S. Cubana	1	0.9
S. Enterica	1	0.9
S. Farmsen	1	0.9
S. Kedougou	1	0.9
S. Monterideo	1	0.9
S. Worthington	1	0.9
S. Kentucky	1	0.9
รวม	109	100

ผลการศึกษาปริมาณและเซโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ, เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิ และเขตมีนบุรี โดยใช้วิธี standard conventional method ในการตรวจ โดยทำการสุ่มตรวจตัวอย่างเนื้อโค 35 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าจากการศึกษาตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (74.3%) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อนำซัลโมเนลลาทั้งหมด 26 ตัวอย่าง 109 หลอดทดลองมาตรวจยืนยันซีโรวาร์จาก WHO *Salmonella-Shigella* center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมด 20 เซโรวาร์ โดยพบ *S.* Senftenberg มากที่สุด 21 หลอดตัวอย่าง (19.3%) รองลงมาคือ *S.* Anatum 17 หลอดตัวอย่าง (15.6%) และ *S.* Weltevreden 12 หลอดตัวอย่าง (11.0%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งผลในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคนั้นใกล้เคียงกับในเนื้อหมู โดย อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ (2548) ได้รายงานการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อหมูสดที่จำหน่ายในตลาด พบเชื้อซัลโมเนลลา 88.0% และพบเชื้อรวม 19 เซโรวาร์ โดยพบ *S.* Anatum เป็นซีโรวาร์ที่ตรวจพบมากที่สุด รองลงมาคือ *S.* Rissen *S.* Panama และ *S.* Stanley ตามลำดับ นอกจากนั้นได้มีรางานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อไก่สดและเนื้อหมูสดถึงร้อยละ 66 และ 90 ตามลำดับ (Jernklinchan *et al.*, 1994; Bangtrakulnonth *et al.*, 1994)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าในเนื้อโคสดที่จำหน่ายในท้องตลาดทั่วไปนั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงทั้งนี้การปนเปื้อนอาจเกิดตั้งแต่ขั้นตอนในการฆ่า ผ่าซาก ชำแหละ ตัดแต่งของเนื้อสัตว์ (Florjanc *et al.*, 1992; Berends *et al.*, 1993; Berends *et al.*, 1995) โดยในขั้นตอนตั้งแต่สัตว์เข้าไปในโรงฆ่านั้นมีโอกาสที่เชื้อซัลโมเนลลาจะปนเปื้อนได้หลายทางด้วยกัน เริ่มจากการใช้น้ำร้อนลวกซากซึ่งในกระบวนการนี้จะสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ในระดับหนึ่ง (Chau *et al.*, 1977; Gill and Bryant, 1992) อย่างไรก็ตาม ถ้าอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ลวกซากต่ำกว่า 62 องศาเซลเซียส จะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะมีเชื้อจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งยังคงมีชีวิตรอดและปนเปื้อนในกระบวนการต่อไป (Sorqvist and Danielsson-Tham, 1990) ในกระบวนการถอนขนนั้นเป็นจุดที่จะเกิดการปนเปื้อนที่ต่อเนื่องจากกระบวนการลวกซาก (Simonsen *et al.*, 1987; Borch *et al.*, 1996) โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการถอนขนนั้นจะรีดเอาอุจจาระของสัตว์ออกมาจากบริเวณก้น ซึ่งจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอุปกรณ์ที่ใช้โดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลา (Borch *et al.*, 1996) การใช้ความร้อนเพื่อลนให้ขนออกจากตัวสัตว์นั้น Gracey (1986) ได้รายงานว่าการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 1300-1500 องศาเซลเซียสจะลดการปนเปื้อนที่บริเวณผิวหน้าของซากสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในบริเวณอื่นๆ อาจยังมีชีวิตรอดอยู่ (Berends *et al.*, 1997; Gill, 1998) และอยู่รอดไปจนถึงขั้นตอนการขัด (Simonsen *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1999) ในกระบวนการตัดแต่งซาก มี 2 ขั้นตอนที่เป็นจุดที่มักก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ คือ การชำแหละ และการเอาเครื่องในออก (Gill and Jones, 1997) อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการผ่าซากก็มักเป็นขั้นตอนที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน โดยเฉพาะ

เชื้อซัลโมเนลลาในซากสัตว์ (Sorensen *et al.*, 1999; Hald *et al.*, 2001) นอกจากนั้นอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆที่ใช้ในโรงฆ่าสัตว์ รวมทั้งสุขอนามัยของผู้ฆ่าก็เป็นสิ่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในซากสัตว์ด้วย (Hald *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1999)

นอกจากนี้การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโค ยังอาจเกิดจากผู้ขายซึ่งขาดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสุขอนามัยที่ถูกต้อง (Moy *et al.*, 1997) โดย Bangtrakulnonth และคณะ (2004) ได้รายงานถึงซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาในประเทศไทย ในช่วงปี 1993-2002 พบว่าทั้ง *S.* Weltevreden *S.* Anatum และ *S.* Senftenberg ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้เป็น 3 สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดที่แยกได้จากเนื้อโคในงานวิจัยครั้งนี้ โดย *S.* Weltevreden เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดที่แยกได้จากมนุษย์ ซึ่งอาจเป็นได้ว่าการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์ในเนื้อโคอาจเป็นการปนเปื้อนข้ามมาจากผู้ขายสู่ผลิตภัณฑ์เนื้อ Sorensen *et al.*, 2002 ได้รายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคสด 1.3 %จากร้านค้าจำหน่ายปลีกทั่วไปในเมือง Alberta ซึ่งการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเกิดเนื่องมาจากคุณภาพที่ต่ำกว่ามาตรฐานของซากสัตว์จากโรงฆ่า เช่น กระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ การทำความสะอาดเครื่องมือ และบริเวณที่ทำการฆ่าสัตว์ไม่มีความสะอาดเพียงพอ อีกทั้งสุขอนามัยที่ไม่เพียงพอของคนงาน Panisello และคณะ (2000) พบการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคสูงถึง 18.7 % เนื่องมาจากการควบคุมอุณหภูมิที่ไม่ได้มาตรฐาน อีกทั้งอุปกรณ์เครื่องมือ รวมถึงสภาพแวดล้อมในโรงงานที่ไม่สะอาดเพียงพอ Berends และคณะ (1998) ได้รายงานว่าการปนเปื้อนข้ามของเชื้อซัลโมเนลลาจากเขียงเนื้อมาสู่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้น เนื่องมาจากการที่ผู้ขายไม่มีการทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น มีด เขียง ให้มีความสะอาดเพียงพอ อีกทั้งตัวผู้ขายเองก็ขาดสุขอนามัยที่เพียงพอ

4.2 ศึกษาการบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Senftenberg, *S.* Anatum และ *S.* Weltevredenจากการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

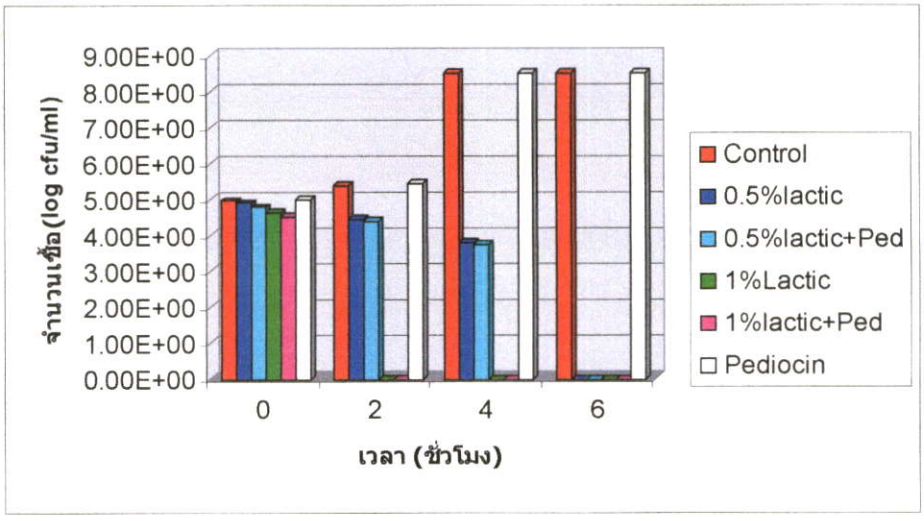
จากผลการทดลองข้างต้น (ข้อ 4.1) พบว่าเชื้อซัลโมเนลลา 3 ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกได้แก่ *S.* Senftenberg *S.* Anatum และ *S.* Weltevreden จึงได้นำเชื้อทั้ง 3 ซีโรวาร์นี้ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 log cfu /ml แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม คือTSB ที่ไม่เติมกรดแลคติก (กลุ่มควบคุม) TSB ที่เติมกรด 0.5% TSBที่เติมกรด 0.5%และมีสารPediocin TSBที่เติมกรด 1% TSB ที่เติมกรด 1%และมีสาร Pediocin TSB ที่เติมสารPediocin เพียงอย่างเดียว ทำการสุ่มตรวจทุก 2 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง โดยใช้วิธี spread plate technique เพื่อศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin ต่อการยับยั้งการเจริญและการบาดเจ็บของเชื้อ ดังนี้

4.2.1 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารละลายกรดและสาร Pediocin PA-1 จะมีปริมาณเชื้อ *S.* Weltevreden เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 8 log cfu /ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา และเมื่อมาพิจารณา TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสารละลายกรดแลคติก 1% ที่มีการเติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 จะพบว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่า โดยพบว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% นั้นจะสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 6 ของการศึกษา ในขณะที่ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% นั้นพบว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรด 0.5% โดยสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้อย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการศึกษาส่วน TSB ที่เติมสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวนั้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ซึ่งจากภาพที่ 4.1 จะพบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงประมาณ 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

การใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรด หรือสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว โดยดูจากผลการศึกษาในกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% จะเห็นว่า TSB ที่เติมสารละลายกรด 0.5%ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ผลการยับยั้งเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากกว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดเพียงอย่างเดียวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษาและการใช้สารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Weltevreden ได้มากที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษาและสามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษา

ผลการทดลองจากตารางที่ 4.3 จะแสดงให้เห็นถึงการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S.* Weltevreden ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดทั้ง 0.5 และ 1% นั้นจะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อที่มากกว่าการใช้สารละลายกรดเพียงอย่างเดียวทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่ในกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งผลที่ได้จะเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevredenใน หลอดทดลอง (*In vitro* test)

ตารางที่ 4.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Weltevredenในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ระยะเวลา	ค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์					
การเก็บ (ชม.)	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1% lactic	1%lac+Ped	P
0	11.0	27.0	32.3	45.5	47.8	20
2	10.0	31.9	35.4	100.0	100.0	15.8
4	0	51.2	71.0	100.0	100.0	0
6	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0

C คือ TSB ที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

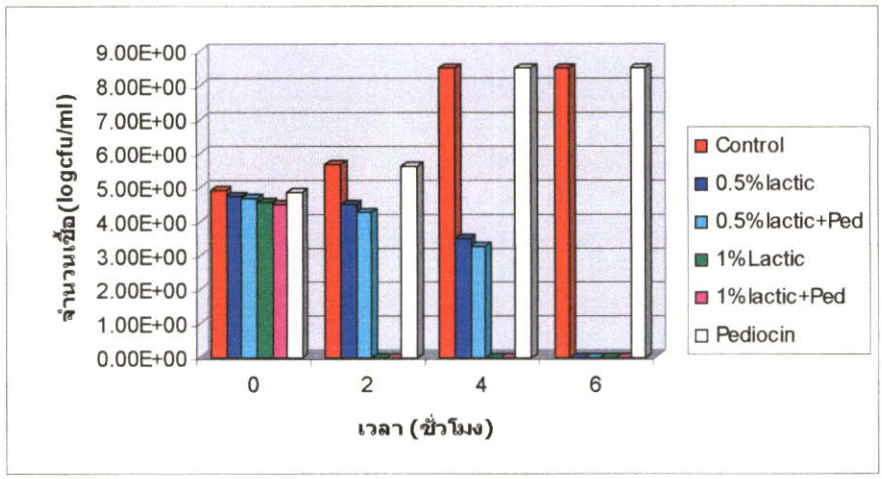
P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

4.2.2 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับ ยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ผลการทดลองในภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% และ 1% ที่เติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 พบว่าในทั้งสองกลุ่มการใช้สารละลายกรดร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ผลในการยับยั้งดีกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา ส่วนกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวจะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อโดยจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา

ส่วนผลการทดลองในตารางที่ 4.4 นั้นให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในภาพที่ 4.2 คือ การใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์มากกว่าการใช้สารละลายกรดหรือการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาจาก TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติกทั้งสองกลุ่ม คือ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 และ 1% จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีการใช้สารละลายกรดร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ใน TSB ที่เติมสารละลายกรด 0.5% นั้นเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 57.0 63.8 และ 100 % ในชั่วโมงที่ 0 2 และ 4 ตามลำดับ ส่วนใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1นั้น เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 58.2 67.2 และ 100% ในชั่วโมงที่ 0 2 และ 4 ตามลำดับ ใน TSB ที่เติมสารละลายกรด 1% นั้นเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จาก 73.1 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2ของการศึกษา ส่วนในTSB ที่มีการเติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วยนั้น การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 75.3 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษาเช่นกัน

ในกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวจะมีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ลดลงเรื่อยๆตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา



ภาพที่ 4.2 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ตารางที่ 4.4 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ระยะเวลา	ค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์					
การเก็บ (ชม.)	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1% lactic	1%lac+Ped	P
0	10.0	57.0	58.2	73.1	75.3	13.3
2	3.8	63.8	67.2	100.0	100.0	13.8
4	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0
6	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0

C คือ TSB ที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

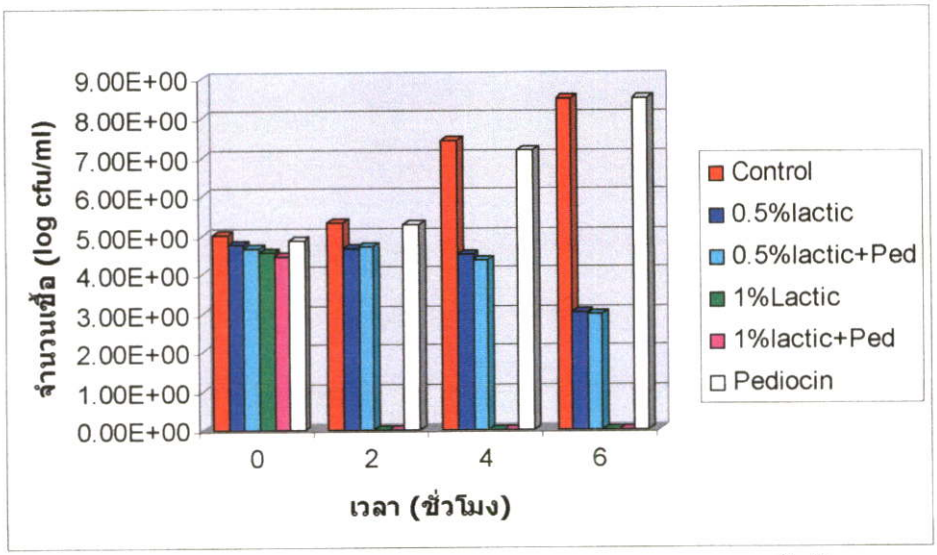
1% lac+Ped คือ TSB ที่สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

4.2.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

จากผลการทดลองในภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมซึ่งคือ TSB ไม่มีการเติมสารละลายกรดและสาร PediocinPA-1 จะมีปริมาณเชื้อ*S.* Senftenberg เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา และเมื่อมาพิจารณา TSB ที่มีการใช้สารละลายกรดแลคติก 0.5% และสารละลายกรดแลคติก 1% ที่มีการเติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 จะพบว่าTSB ที่มีการใช้สารละลายกรดร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่า โดยพบว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5%นั้นจะมีการลดลงของปริมาณเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 โดยลดลงจาก 4.8 log cfu/ml เหลือ 3.0 logcfu/mlในชั่วโมงที่ 6 แต่ใน TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วยจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีกว่า คือ ปริมาณของเชื้อจะลดลงจาก 4.6 log cfu/mlในชั่วโมงที่ 0 เหลือเพียง 2.9 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 6 อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลคติก 1% นั้นพบว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรด 0.5% โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Senftenbergได้อย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการศึกษา ส่วนกลุ่มที่เติมสารละลายPediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวนั้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ซึ่งจากภาพที่ 4.3 จะพบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงประมาณ 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S.* Senftenberg ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 4.3 คือการใช้สารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ผลเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยพิจารณาเปรียบเทียบใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% เพียงอย่างเดียว พบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มจาก 45.5 83.8 94.2 และ 100% ในชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 6 ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วย พบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มจาก 49.2 89.2 และ 100% ในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 ตามลำดับ และเช่นเดียวกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 4.3 การใช้สารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ดีที่สุดคือ เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 55.3 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษา



ภาพที่4.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Senftenbergใน หลอดทดลอง (*In vitro* test)

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ระยะเวลาการเก็บ (ชม.)	ค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1% lactic	1%lac+Ped	P
0	30.3	45.5	49.2	50.2	55.3	4.8
2	26.8	83.8	89.2	100.0	100.0	50.3
4	0	94.2	100.0	100.0	100.0	49.3
6	0	100.0	100.0	100.0	100.0	0

C คือ TSB ที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

จากการทดลองในหัวข้อที่ 4.2.1, 4.2.2 และ 4.2.3 นั้นสรุปได้ว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% และ สาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ และเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S.* Weltevreden, *S.* Anatum และ *S.* Senftenberg ได้ดีที่สุดเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างนี้สามารถยับยั้งเชื้อและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการทดลองในทั้งสามหัวข้อจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่ผลของการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองสรุปได้ว่าการใช้สารละลายกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด รองลงมา คือ *S.* Senftenberg และ *S.* Weltevreden ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาในการศึกษาของเชื้อ *S.* Anatum (ในหัวข้อ 4.2.2) พบว่า ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาสามารถลดปริมาณเชื้อ *S.* Anatum เหลือเพียง 3.5 และ 3.2 log cfu/ml ใน TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ตามลำดับ และก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์อย่างสมบูรณ์ใน TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในเชื้อ *S.* Senftenberg (ในหัวข้อที่ 4.2.3) พบว่าปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาในทั้งสองกลุ่มการทดลอง คือ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้น คือ 4.5 และ 4.3 log cfu/ml แต่การบาดเจ็บของเซลล์จะเกิดอย่างสมบูรณ์ในทุกกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก และ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ยกเว้น TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% จะมีค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ 94.2 ส่วน *S.* Weltevreden (ในหัวข้อที่ 4.2.1)นั้นในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษานั้นยังคงมีปริมาณเชื้อเหลืออยู่ 3.8 และ 3.7 log cfu/ml ใน TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ตามลำดับของเชื้อ *S.* Weltevreden แต่ในเชื้อ *S.* Weltevreden นี้พบว่าในทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างจะพบค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพียง 51.2 และ 71.0 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า *S.* Weltevreden เป็นเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ที่มีความทนต่อความเป็นกรดมากที่สุดในทั้ง 3 สายพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้

ทั้งนี้จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 4.2.1 4.2.2 และ 4.2.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว การใช้สารผสมของสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในทั้ง TSB ที่ใช้ความเข้มข้นกรดแลคติก 0.5 % และ 1% จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงตัวเดียว โดยสอดคล้องกับ Stevens และคณะ (1991) ซึ่งได้กล่าวอ้างว่า ประสิทธิภาพของสาร nisin เพียงอย่างเดียว โดยไม่ใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพต่ำต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบ เช่น *E. coli* 0157:H7 และ *Salmonella* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ

Yasmina และคณะ (2002) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับกรดแลคติกจะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จำพวกต้องการอากาศ total coliforms และ *E. coli* ในเนื้อโคสดได้ดีกว่าการใช้สาร nisin หรือกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ Mustapha และคณะ (2002) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับสารละลายกรดชนิดต่างๆจะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อโคได้ดีกว่าการใช้สาร nisin หรือสารละลายกรดเพียงอย่างเดียว โดยการใช้สารผสมระหว่างสาร nisin ร่วมกับสารละลายกรดนั้นสามารถลดเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อโคเหลือประมาณ 2-3 log cfu/cm^{2}โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/cm^2 ทำการทดลอง 28 วัน เก็บรักษาเนื้อโคที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อในกลุ่ม Pediococcus จะจัดอยู่ใน class Iia ซึ่งจะให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก และมักไม่ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะมีส่วนของ outer membrane ซึ่งมีส่วนประกอบที่เรียกว่า porine ซึ่งเป็นส่วนที่สารที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 600 Da ผ่านเข้าไปได้ แต่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteriaโดยทั่วไปจะมีน้ำหนักประมาณ 3 Kda ซึ่งใหญ่เกินกว่าที่จะผ่านเข้าไปในส่วนของporine (Klaenhammer, 1993) จึงทำให้สาร Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งจัดเป็น lactic acid bacteria ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ ดังผลการทดลองข้างต้นจะพบว่าในทั้ง 3 สายพันธุ์ของเชื้อซัลโมเนลลากลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1เพียงอย่างเดียวนั้นไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้นำสารละลายกรดแลคติกมาใช้ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลา เนื่องจากสารละลายกรดที่ใช้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วน outer membrane ของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลา ทำให้ส่วน outer membrane ถูกทำลายเกิดรูรั่วทำให้สาร Pediocin PA-1 สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาได้และทำให้เกิดการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นสูงกว่า จะสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีกว่า โดยจากการทดลอง TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อและเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ที่ดีกว่า TSB ที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ทั้งนี้เนื่องจากผลของระดับ pH ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดจำนวนจุลินทรีย์

4.3 ศึกษาผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

จากการทดลองตรวจนับเชื้อ *S.* Weltevreden, *S.* Anatum และ *S.* Senftenberg ในตัวอย่างเนื้อโคส่วนสะโพกที่ผ่านการฉายรังสีระดับ 10 Kgy โดยจุ่มตัวอย่างในสารละลายเชื้อความเข้มข้น 6 log cfu/ml จากนั้นแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม คือ เนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม) เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% เนื้อโคที่เติมสารผสมระหว่างสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 เนื้อโคที่เติมสารผสมระหว่างสารละลายกรดแลคติก 1% , เนื้อโคที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่เติมสาร Pediocin PA-1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 6 และ 8 วัน

4.3.1 ผลของของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

ผลการศึกษาจำนวนเชื้อ *S.* Anatum ในกลุ่มตัวอย่างเนื้อโค ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษา จากผลการทดลองในตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นพบว่ามีการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

จำนวนเชื้อ *S.* Anatum ใน เนื้อโคที่มีการสัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1 , สารละลายกรดแลคติก1% และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1 มีจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการศึกษา (ชั่วโมงที่ 0) และพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 1.2 2.0 3.6 และ 3.6 log cfu/g ตามลำดับในวันที่ 8 ของการเก็บรักษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.6 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Anatum ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	จำนวนเชื้อ *S.* Anatum (log cfu/g)					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$5.3^{ขa}$	$5.1^{กขa}$	$5.0^{กขa}$	$5.0^{คa}$	$5.0^{กa}$	$5.2^{ขa}$
2	$5.2^{ขa}$	$4.9^{กขa}$	$4.8^{กขa}$	$4.5^{คa}$	$4.5^{กa}$	$5.5^{ขa}$
4	$5.1^{ขa}$	$4.9^{กขa}$	$4.7^{กขa}$	$4.5^{คa}$	$4.5^{กa}$	$5.5^{ขa}$
6	$5.2^{ขa}$	$4.7^{กขa}$	$4.6^{กขa}$	$4.3^{คa}$	$3.1^{กa}$	$5.2^{ขa}$
8	$5.2^{ขb}$	$3.2^{กขb}$	$3.1^{กขb}$	$1.6^{คb}$	$1.6^{กb}$	$5.2^{ขb}$

ตัวอักษร ก-คแสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

4.3.2 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในเนื้อโค

จำนวนเชื้อ *S.* Senftenberg ในตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าสารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถลดจำนวนจำนวนเชื้อ *S.* Senftenberg ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษา

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1%และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Senftenberg ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นพบว่ามีการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม จำนวนเชื้อ *S.* Senftenberg ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1 , เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1 มีจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการศึกษา (ชั่วโมงที่ 0) และพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 0.5 1.8 3.2 และ 3.3 log cfu/g ตามลำดับในวันที่ 8 ของการเก็บรักษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.7 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	จำนวนเชื้อ *S.* Senftenberg (log cfu/g)					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$5.3^{ขa}$	$5.3^{กขa}$	$4.9^{กขa}$	$4.8^{กa}$	$4.7^{กa}$	$5.2^{ขa}$
2	$5.3^{ขa}$	$4.9^{กขa}$	$4.8^{กขa}$	$4.8^{กa}$	$4.7^{กa}$	$5.2^{ขa}$
4	$5.3^{ขa}$	$4.8^{กขa}$	$4.7^{กขa}$	$4.6^{กa}$	$4.5^{กa}$	$5.2^{ขa}$
6	$5.3^{ขa}$	$4.7^{กขa}$	$4.7^{กขa}$	$4.4^{กa}$	$3.7^{กa}$	$5.1^{ขa}$
8	$5.3^{ขb}$	$4.8^{กขb}$	$3.1^{กขb}$	$1.6^{กb}$	$1.5^{กb}$	$5.2^{ขb}$

ตัวอักษร ก-ค และแสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

4.3.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสาร ผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโค

จำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden ในตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่าสารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถลดจำนวนจำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษา

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1%และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Weltevreden ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 %, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%และสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นไม่พบว่ามีการลดลงของเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

จำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1 เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก1% และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1 มีจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่เริ่มการศึกษา (ชั่วโมงที่ 0) และพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อเหลือ 4.6 4.5 4.5 และ 4.4 log cfu/ml ตามลำดับในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสาร Pediocin นั้นตรวจพบเชื้อ 5.3 log cfu/ml ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม คือ 5.3 log cfu/ml โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 6 log cfu/ml

ตารางที่ 4.8 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา	จำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden (log cfu/g)					
การเก็บ (วัน)	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$5.1^{\text{ข a}}$	$5.0^{\text{ก a}}$	$5.0^{\text{ก a}}$	$4.8^{\text{ก a}}$	$4.8^{\text{ก a}}$	$5.3^{\text{ข a}}$
2	$5.3^{\text{ข b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$4.7^{\text{ก b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$5.3^{\text{ข b}}$
4	$5.3^{\text{ข ab}}$	$4.8^{\text{ก ab}}$	$4.8^{\text{ก ab}}$	$4.6^{\text{ก ab}}$	$4.6^{\text{ก ab}}$	$5.4^{\text{ข ab}}$
6	$5.3^{\text{ข b}}$	$4.7^{\text{ก b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$4.6^{\text{ก b}}$	$5.3^{\text{ข b}}$
8	$5.3^{\text{ข c}}$	$4.6^{\text{ก c}}$	$4.5^{\text{ก c}}$	$4.5^{\text{ก c}}$	$4.4^{\text{ก c}}$	$5.3^{\text{ข c}}$

ตัวอักษร ก-ค แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a - c แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.3.1 4.3.2 และ 4.3.3 ผลที่ได้พบว่าไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 คือ เนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ คือ *S.* Weltevreden *S.* Anatum และ *S.* senftenberg ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และสามารถลดปริมาณเชื้อ *S.* Anatum ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมา คือ *S.* senftenberg และ *S.* Weltevreden ตามลำดับ โดยในวันที่ 8 ของการศึกษานั้นเนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ของเชื้อ *S.* Anatum จะสามารถลดปริมาณเชื้อได้ถึง 3.4 log reduction ส่วน *S.* senftenberg และ *S.* Weltevreden นั้นในตัวอย่างเนื้อโคเดียวกันนี้จะสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 3.2 และ 0.4 log reduction ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาในหัวข้อ 4.2 เช่นกัน คือเชื้อ *S.* Weltevreden เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อความเป็นกรดมากที่สุด และเชื้อ *S.* Anatum ก็เป็นสายพันธุ์ที่มีความทนต่อกรดน้อยที่สุด นอกจากนั้นจากการศึกษายังพบอีกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 นั้นจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลคติก หรือการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงสารเดียวในทุกกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกทั้ง 0.5 และ 1% และการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงสารเดียวนั้นพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ (ตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Zhang และ Mustapha (1999) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับสารจำพวก metal chelators เช่น EDTA จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก เนื่องจาก EDTA จะก่อให้เกิดความเสียหายกับส่วน outer membrane ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนั้นจะทำให้สาร nisin ซึ่งปกติมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะ ผ่านเข้าไปในส่วนของ outer membrane ของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบสามารถเข้าสู่เซลล์และก่อให้เกิดการทำลายเซลล์เชื้อได้ (Abee *et al.,* 1995) นอกจากนั้นขึ้น และประภาพร ขอไพบูลย์และคณะ (2548) ได้รายงานว่าการใช้ กรดแอสคอร์บิก 1%ร่วมกับ กรดกลูโคนิค 1.5% จะสามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Derby ได้ 0.67 log cycle และควบคุมการเจริญของเชื้อได้ 5 วัน และได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ Pediocin เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์เนื้อสด ซึ่งพบว่าการใช้ Pediocin ใน ผลิตภัณฑ์เนื้อสดจะให้ผลดีกว่าการใช้สาร nisin ทั้งๆที่ สาร nisin น่าจะให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อสดโดยทั่วไปได้ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจาก nisin จะถูก inactivated ด้วยสาร glutathione ในปฏิกิริยา glutathione S-transferase ซึ่งโดยทั่วไป glutathione มักจะพบในเนื้อสด และปฏิกิริยาดังกล่าวนี้จะลดประสิทธิภาพของ nisin นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า nisin จะมีประสิทธิภาพต่ำในผลิตภัณฑ์เนื้อสดเนื่องจากค่า pH ที่สูง และสารประกอบบางชนิดที่อยู่ในเนื้อ เช่น phospholipids, fat content เป็นต้น (Rayman *et al.,* 1983; De Vuyst and Vandamme, 1994; Devies *et al.,* 1999) Swetwiwathana และ คณะ (2002) ได้รายงานว่าการใช้ Pediocin PA-1 ซึ่งผลิตมาจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อใน

การผลิตแหนมเพื่อยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในตัวอย่างแหนม ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างแหนมที่มีค่า pH 4.5 และใช้ Pediocin PA-1 เป็นกล้าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด

4.4 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อค่า pH ของเนื้อโค

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.9 ค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยค่า pH จะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตั้งแต่วันที่ 2 ของการศึกษา

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เริ่มการทดลอง (วันที่ 0) และลดลงเรื่อยๆ และพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1จะมีการลดลงของค่า pH มากที่สุด โดยมีค่า pH ต่ำสุด คือ 4.9 ในวันที่ 8 ของการทดลอง รองลงมา คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก0.5 % โดยมีการลดลงของค่า pH 0.23 0.17 0.15 และ 0.09 ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 8 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุมนั้นพบว่าค่า pH จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการศึกษา (วันที่ 0)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าค่า pH ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1นั้นจะลดลงในแนวทางที่สอดคล้องกับการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาในหัวข้อที่ 4.2 และ 4.3 เนื่องจากค่า pH ที่ลดต่ำลงจะมีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ โดยความเป็นกรดที่มากขึ้นจะสามารถยับยั้งเชื้อและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อของกรดก็ขึ้นกับระดับ pH ความสามารถในการแตกตัว (pK_a) และความจำเพาะเจาะจงของกรดในการทำลายจุลินทรีย์ (Gill and Newton. 1982) ส่วนกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลา

ตารางที่ 4.9 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อค่า pH ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่า pH ของเนื้อโค					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$5.54^{กa}$	$5.39^{ขa}$	$5.38^{ขa}$	$5.23^{คa}$	$5.18^{คa}$	$5.47^{งa}$
2	$5.51^{กb}$	$5.36^{ขb}$	$5.35^{ขb}$	$5.20^{คb}$	$5.15^{คb}$	$5.54^{งb}$
4	$5.53^{กb}$	$5.35^{ขb}$	$5.33^{ขb}$	$5.18^{คb}$	$5.10^{คb}$	$5.60^{งb}$
6	$5.54^{กb}$	$5.32^{ขb}$	$5.28^{ขb}$	$5.10^{คb}$	$5.06^{คb}$	$5.56^{งb}$
8	$5.55^{กb}$	$5.30^{ขb}$	$5.23^{ขb}$	$5.06^{คb}$	$4.95^{คb}$	$5.63^{งb}$

ตัวอักษร ก-ง แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

จากผลการศึกษาค่า pH ในกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสารละลายต่างๆทั้ง 6 กลุ่ม ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำที่สุดในทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง โดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.9-5.2 ตั้งแต่เริ่มจนสิ้นสุดการศึกษา (วันที่ 0 – วันที่ 8) รองลงมาคือเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% เนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลคติก 0.5 % และสาร Pediocin PA-1 เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % เนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุม โดยผลของค่า pH ที่ได้จากการศึกษาจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ และค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ในหลอดทดลอง (หัวข้อ 4.2) และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ในตัวอย่างเนื้อโคสด (หัวข้อ 4.3) โดยในตัวอย่างที่มีค่า pH ต่ำที่สุดซึ่งก็คือเนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด และเนื้อโคที่มีค่า pH สูง คือ กลุ่มที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุมจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่ต่ำ

เมื่อพิจารณาค่า pH ในเนื้อโคที่ทำการศึกษาจะพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก หรือเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pedioci n PA-1 เพียงสารเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ทั้งกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่างก็มีความเป็นกรด จึงมีผลให้ค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคลดต่ำลงมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samelis และคณะ (2001) ที่ทำการทดลองโดยใช้กรดอะซิติกร่วมกับสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus sake* ในการลดปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อสด พบว่าการใช้กรดอะซิติกร่วมกับแบคเทอริโอซินในระดับสูงขึ้น ส่งผลให้การลดลงของค่า pHในตัวอย่างสูงขึ้น

4.5 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อค่าความสว่างของสี (L^*)ของเนื้อโค

ผลการศึกษาค่าความสว่างของสี (L^*) โดยใช้เครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300) ในตัวอย่าง เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและสารPediocin PA-1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 6 และ 8 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าในเนื้อโคแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin นั้นจะมีค่าความสว่างของสี(L^*) แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 4.10 นั้น ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้นจะให้ความสว่างของสี (L^*) มากที่สุด คือ 50.46 รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสารPediocin PA-1 เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 โดยมีค่าความสว่างของสี (L^*) เท่ากับ 49.78 48.55 46.66 และ 45.98 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมนั้นจะมีค่าความสว่างของสีน้อยที่สุด คือ 45.41

ตารางที่ 4.10 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อค่าสี (L^*) ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่าความสว่างของสี (L^*) ของเนื้อโค					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$44.43^{กa}$	$45.03^{ขคa}$	$45.46^{งa}$	$46.33^{ขคa}$	$47.43^{คa}$	$45.63^{ขคa}$
2	$44.69^{กb}$	$45.63^{ขคb}$	$45.14^{งb}$	$47.48^{ขคb}$	$47.32^{คb}$	$45.09^{ขคb}$
4	$44.10^{กa}$	$45.71^{ขคa}$	$47.32^{งa}$	$48.48^{ขคa}$	$48.65^{คa}$	$45.77^{ขคa}$
6	$45.06^{กb}$	$45.37^{ขคb}$	$47.38^{งb}$	$48.62^{ขคb}$	$50.06^{คb}$	$45.37^{ขคb}$
8	$45.41^{กa}$	$46.66^{ขคa}$	$48.55^{งa}$	$49.78^{ขคa}$	$50.46^{คa}$	$45.98^{ขคa}$

ตัวอักษร ก-คแสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อค่าความสว่าง(L^*) ของสีเนื้อโคนั้น พบว่าค่าความสว่างของสีเนื้อโคจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดเพิ่มมากขึ้นหรือเมื่อค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคนั้นต่ำลง ซึ่งจากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.5 จะแสดงให้เห็นว่าในเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมของสารละลายกรกแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 นั้นจะมีค่าความสว่างของสี (L^*) สูงที่สุด ซึ่งจะสัมพันธ์กับผลในหัวข้อ 4.4 คือในเนื้อโคนี้จะมีค่า pH ต่ำที่สุดเนื่องมาจากการที่ใช้สารละลายผสมของสารทั้งสองจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างในตัวอย่างเนื้อโคต่ำลง และจากผลการศึกษาจะพบอีกว่าค่าความสว่างของสีเนื้อโค (L^*) จะเพิ่มสูงขึ้นตลอดการศึกษาในทุกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้จะสอดคล้องกับ Kotula และ Thelappurath (1994) ซึ่งได้รายงานว่าในตัวอย่างเนื้อโคสดที่มีค่า pH ต่ำจะพบว่าจะมีค่าความสว่างของสีเนื้อ (L^*) สูง และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Jimenez-Villarreal และคณะ (2003) ที่พบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 2 % ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อโคสดพบว่าสารละลายกรดแลคติกจะทำให้ตัวอย่างเนื้อโคมีสีซีดลง (ค่า L^* สูงขึ้น) และ Jimenez-Villarreal และคณะ ยังพบอีกว่าค่า pH จะสัมพันธ์กับค่าความสว่างของสี (L^*) oxymyoglobin content และค่า (a^*) Desmond และ Troy (2001) ได้ทำการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างไส้กรอกแฟรงเฟอร์เตอร์ที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลคติก 0.05 mol/L ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างไส้กรอกจะมีสีซีดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่ง Bayles และคณะ (1996) ได้ให้เหตุผลว่าเมื่อค่า pH ของเนื้อลดต่ำลงจะมีผลทำให้โปรตีนที่อยู่ในกล้ามเนื้อเกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้เนื้อไม่สามารถเก็บกักน้ำเอาไว้ได้ ทำให้เนื้อมีน้ำซึมออกมาที่ผิวหน้าเนื้อมาก ทำให้ค่าความสว่างของสีเนื้อ นอกจากนี้ Arganosa และ Marriott (1989) ได้ให้เหตุผลที่เมื่อตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่สัมผัสสารละลายกรดแล้วจะมีสีซีดลงเนื่องจาก สารละลายกรดจะเร่งให้เกิดการเปลี่ยนจากไมโอโกลบินเป็นเมทไมโอโกลบินซึ่งจะทำให้เนื้อมีสีซีดลง

4.6 ผลของกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

ภายหลังการจุ่มชิ้นเนื้อโคในสารละลายกรดแลคติก 0.5%, สารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1, สารละลายกรดแลคติก 1%, สารละลายกรดแลคติก 1%ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และสาร Pediocin PA-1 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 $\pm$1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 6 และ 8 วัน พบว่าสารละลายกลุ่มต่างๆมีผลต่อการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 4.12 พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสารPediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคมากที่สุด คือ 0.6 ตั้งแต่เริ่มการศึกษา (วันที่0) รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโค 0.6 0.3 และ 0.3 ตามลำดับ และค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามวันในการเก็บรักษา โดยพบว่าในวันที่ 8 ของการเก็บรักษานั้นเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคเพิ่มขึ้นเป็น 2.1 ส่วนในกลุ่มเนื้อโคอื่นๆ ก็มีการเพิ่มการสูญเสียน้ำหนักเช่นเดียวกัน คือ 1.8 1.4 และ 0.9 ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ตามลำดับ ส่วนในเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคนั้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.11 ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อโคที่ผ่านการจุ่มสารละลายในกลุ่มต่างๆ ภายหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 4 $\pm$1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อโค					
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	$0.1^{กa}$	$0.3^{ขb}$	$0.3^{ขb}$	$0.6^{คb}$	$0.6^{คb}$	$0.1^{กa}$
2	$0.1^{กa}$	$0.4^{ขb}$	$0.5^{ขb}$	$0.6^{คb}$	$0.7^{คb}$	$0.2^{กa}$
4	$0.1^{กb}$	$0.5^{ขb}$	$0.9^{ขb}$	$0.7^{คb}$	$0.9^{คb}$	$0.2^{กb}$
6	$0.2^{กb}$	$0.6^{ขb}$	$1.0^{ขb}$	$1.6^{คb}$	$1.7^{คb}$	$0.2^{กb}$
8	$0.2^{กc}$	$0.9^{ขc}$	$1.4^{ขc}$	$1.8^{คc}$	$2.1^{คc}$	$0.2^{กc}$

ตัวอักษร ก-ค แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a - c แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

ผลของการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโค ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมของสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักกรดแลคติกมากกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่นๆ คือ 2.1 ในวันที่ 8 ของการศึกษา เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างนี้มีค่า pH ต่ำกว่าทุกกลุ่มเนื้อโค ซึ่งการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคขึ้นกับค่า pH ของสารละลาย โดยสารละลายที่มีค่า pH ต่ำจะทำให้ค่า pH ภายในเซลล์กล้ามเนื้อลดต่ำลงใกล้กับค่าไอโซอิเลคตริก (isoelectric point) ทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อเสียสภาพ และเป็นผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อในส่วนไมโอไฟบริลเกิดการหดตัว เป็นเหตุให้เนื้อสัตว์อุ้มน้ำได้น้อยลงเกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น (Arganosa และ Marrioott , 1989) และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 กับเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดเพียงอย่างเดียวจะพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมจะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากค่า pH ที่ต่ำกว่า และความเข้มข้นของกรดที่สูงกว่า ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Mendonca และคณะ (1989) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดอะซิติก 3 % และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % สารละลายผสมระหว่างกรดแลคติก 3 % และเกลือโซเดียมแอสคอร์เบท 3 % จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสูงกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 3 % เพียงสารเดียว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ประภาพร ขอไพบูลย์ และคณะ (2548) พบว่าการใช้สารผสมของสารโปแตสเซียมซอร์เบท 5% และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต 8 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Derby โดยที่มีการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อน้อยที่สุดและไม่ทำให้เนื้อเกิดสีซีด ดังนั้นการใช้สารอื่นๆร่วมกับกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาโดยที่ไม่ทำให้เนื้อเกิดการสูญเสียน้ำหนักและสีซีดจึงเป็นอีกแนวทางที่ควรทำการศึกษาต่อไป

4.7 ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค

ผลทางคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโคทั้ง 5 กลุ่ม คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 %, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คนและใช้วิธี different from control ในการทดสอบ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยผลจากตารางที่ 4.11 พบว่าเนื้อโคทุกกลุ่มจะมีความแตกต่างในด้านสีของเนื้อ และกลิ่นกรดแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมีใดๆเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 4.12 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

กลุ่มตัวอย่าง	เนื้อโค	
	สีของเนื้อ	กลิ่นกรด
C	0.00	0.00
0.5% lactic	-1.43^{กข}	0.27^{ก}
0.5%lac + Ped	-1.50^{กข}	0.29^{กข}
1% lactic	-1.50^{กข}	0.38^{กข}
1%lac + Ped	-2.03^{ก}	0.45^{กข}
P	-1.50^{ข}	0.13^{ข}

ตัวอักษร ก-ขแสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค

C คือ เนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

0.5% lac+Ped คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1

1% lactic คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

1% lac+Ped คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค โดยใช้ผู้ชิมทั้งหมด 30 คน ใช้วิธี Different from control ในการทดสอบพบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกความแตกต่างทางด้านสีและกลิ่นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเนื่องมาจากเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ใช้ในการศึกษา คือ 0.5 และ 1 % นั้นเป็นความเข้มข้นกรดที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นในเนื้อโคแต่ละกลุ่มจึงพบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมระหว่างกรดแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1นั้นจะพบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากที่สุด คือตัวอย่างเนื้อมีสีซีดและมีกลิ่นกรดมากที่สุด เนื่องจากสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดสูงไปทำลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ทำให้สีของเนื้อซีดลง ผลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Jimenez-Villarreal และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าในการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโคสด โดยนำตัวอย่างเนื้อโคสัมผัสสารละลายกรดแลคติก 2 % พบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกความแตกต่างโดยรวมทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการสุ่มตรวจตัวอย่างเนื้อโคทั้งหมด 35 ตัวอย่างที่จำหน่ายในตลาดสดในเขตพระโขนง ประเวศ ลาดกระบัง มีนบุรีและบางกะปิพบการปนเปื้อน 26 ตัวอย่าง (74.3%) และเมื่อนำไปตรวจยืนยันซีโรวาร์จาก WHO *Salmonella – Shigella* Center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมด 20 ซีโรวาร์โดย *S.* Senftenberg เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (19.3%) รองลงมาเป็น *S.* Anatum (15.6%) และ *S.* Weltevreden (11.0%) ตามลำดับ โดยในขั้นตอน selective enrichment การใช้ TTB บ่มที่ 43 องศาเซลเซียสจะให้ผลการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลามากกว่าการใช้ TTB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และ RV broth บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาผลของกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาในหลอดทดลองในเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่ากลุ่มอาหาร TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถยับยั้งและทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุดโดยให้ผลในการยับยั้งและการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S.* Anatum ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด รองลงมาคือ *S.* Senftenberg และ *S.* Weltevreden ตามลำดับ

3. การศึกษาผลของกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเนื้อโคผลที่ได้พบว่าเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1ความเข้มข้น 1,600 AU/ml จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด และพบอีกว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด รองลงมาคือ *S.* Senftenberg และ *S.* Weltevreden ตามลำดับ

4. จากการศึกษาพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1ความเข้มข้น 1,600 AU/ml นี้มีค่า pH ต่ำที่สุดจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด และมีค่าความสว่างของสี (L^*) มากที่สุด เนื้อในกลุ่มนี้จึงดูมีสีซีดมากที่สุดเนื่องมาจากการที่ค่าpH ลดต่ำลงมากเท่าไรก็จะส่งผลให้เนื้อมีสีซีดเนื่องจากความเป็นกรดที่เกิดจากค่า pH ที่ต่ำจะส่งผลให้กล้ามเนื้อของเนื้อโคเกิดการเสื่อมสภาพ ไม่สามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ จึงทำให้มีน้ำซึมออกมาบริเวณผิวหน้าเนื้อมากเนื้อโคจึงดูมีสีซีด

5. การศึกษาผลของกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในเนื้อโคพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลาย

กรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคสูงที่สุด เนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคนั้นเกี่ยวข้องกับค่า pH โดยค่า pH ที่ต่ำจะทำให้ค่า pH ในเนื้อโคต่ำลงจนใกล้จุดไอโซอิเลคตริก (Isoelectric point) ทำให้กล้ามเนื้อทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อเสียสภาพ และเป็นผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อในส่วนไมโอไฟบริลเกิดการหดตัว เป็นเหตุให้เนื้อสัตว์อุ้มน้ำได้น้อยลงเกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น

6. ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคโดยวิธี Different from control โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน ทดสอบทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค พบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเนื้อโคที่สัมผัสกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้สาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับสารละลายกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคที่ดีกว่าการใช้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำสาร Pediocin PA-1 มาประยุกต์ใช้ในเนื้อสัตว์จึงเป็นอีกแนวทางที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียแม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกันแต่ก็จะมีความไวต่อสารเคมีต่างกันเช่นในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อซัลโมเนลลาแต่ละซีโรวาร์จะมีความไวต่อสารละลายกรดและสาร Pediocin PA-1 ต่างกัน ดังนั้นในการทำการวิจัยครั้งต่อไปนั้นจะทำการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดควรทำการศึกษาถึงความไว (sensitive) ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ ต่อสารที่จะใช้ยับยั้งเพื่อประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีที่สุด นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *S.* Senftenberg *S.* Anatum และ *S.* Weltevreden เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าแยกได้จากมนุษย์ ดังนั้นการปนเปื้อนจึงอาจมาจากผู้ขายเนื้อจึงควรมีการให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยที่ถูกต้องแก่ผู้ขายเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโค

การใช้กรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้นจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum *S.* Senftenberg และ *S.* Weltevreden ในเนื้อโคได้ดีที่สุดแต่สารละลายกลุ่มนี้ก็จะทำให้เนื้อโคมีสีซีด และมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่ากลุ่มเนื้อโคที่ใช้สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นน้อยกว่าหรือที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ไม่ได้ผสมสาร Pediocin PA-1 ซึ่งทำให้เนื้อโคไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรลดความเข้มข้นของสารละลายกรดแลคติกลง หรืออาจใช้สารที่มีสมบัติอุ้มน้ำและมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่นการใช้สารผสมของ โปรแตสเซียมซอร์เบทกับไตรโซเดียมฟอสเฟต ซึ่งจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Derby และเกิดการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อน้อยที่สุดและไม่ทำให้เนื้อเกิดสีซีด (ประภาพร ขอไพบูลย์และคณะ,2548)

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2543. "อาหารพร้อมปรุงในซุปเปอร์มาร์เก็ต ปลอดภัยจากเชื้อโรค อาหารเป็นพิษจริงหรือ?." **รายงานประจำปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์:** 91.

คมแข พิลาสสมบัติ. 2540. " การลดปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนผิวซากสุกรที่ผ่านขบวนการฆ่ามาตรฐานและไม่มาตรฐานโดยการใช้สารละลายกรดแลคติกและคลอรีน" วิทยานิพนธ์ปริญญาโทสาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑารัตน์ เลี่ยนกัตวา. 2545. " ผลของกรดกลูโคนิค กรดแอสคอร์บิก และสารไนซินต่อการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Derby และ เชื้อ *E.*coli ในเนื้อสุกร." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2536. เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาทางอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร วันที่ 24 สิงหาคม 2536.

ประภาพร ขอไพบูลย์, ทิพรดี คงสุวรรณ, และเยวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2548. " ผลของไตรโซเดียมฟอสเฟต เซททิลไพริดิเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมซอร์เบทต่อการยับยั้งเชื้อ *salmonella* Derby บนผิวเนื้อสุกร." หน้า 86. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสาขาสัตวบาล/ สัตวศาสตร์/ สัตวแพทย์ ครั้งที่ 5. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, ประภาพร ขอไพบูลย์ และ ทิพย์วรรณ ปริญญาศิริ. 2545. "ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลคติกในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* บนเนื้อสุกร" **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 20(2): 1-9.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. "การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อโปรไบโอติก." **วารสารจาร์พา.** 45.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 470 หน้า.

สุมาลี บุญมา, อรุณ บ่างตระกูลนนท์, นพรัตน์ หมานริน และ ชุทพจน์ อมาตยกุล. 2539. "การตรวจเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ โดยวิธี SCM และ MSRV." **อาหาร.** 26 : 88-97.

สุมาลี บุญมา, นพรัตน์ หมานริม, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2540. "การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่และเนื้อหมู." **ว.เกษตรศาสตร์.**31 :413-418.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, วราวุฒิ ครูส่ง, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, และ อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2548. " เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 23(1) : 1-13.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. "การสำรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอุจจาระของพนักงานในโรงงานผลิตอาหารแช่แข็ง."เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 13 วันที่ 15-16 พฤษภาคม 2545 ณ โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น.

Abee, T., Krockel, L., and Hill, C., 1995. " Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning." **Int. J. Food. Microbiol.** 28: 169-185.

Anderson, M.E., and Marshall, R.T. 1990. "Reducing microbial populations on beef tissue: concentration and temperature of an acid mixture." **J. Food Sci.** 55: 903.

Anderson, M.E., Marshall, R.T., and Dickson, J.S. 1992. "Efficacies of acetic, lactic and two mixed acids in reducing numbers of bacteria on surfaces of lean meat." **J. Food. Safety.** 12: 139.

AOAC International. 1984. Official method of analysis. **14th.ed. Association of Analytical chemist.** Arlington, Verginia.

Arganosa, G. C., and Marriott, N. G. 1989. " Organic acids as tenderizers of collagen in restructured beef." **J. Food. Sci.** 54: 1173-1176.

Arumugaswamy, R.K., Rusul, G., Abdul Hamid, S. N., and Cheah, C.T. 1995. "Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia." **Food Microbiology.** 12:3-8.

Bangtrakulnoth, A., Boonmar, S., Luengyosluechakul, S., Musum, M., and Sutanthavibul, J. 1994. "Study of pig salmonellosis in Thailand ." **Proc. 13 th IPVS congress.** Bangkok : triranasar press.

Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Wong, D., and Aarestrup, F.M. 2004. " *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002." **Emerging Infectious Diseases.** 10(1): 131-136.

Bari, M. L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., and Kawamoto, S. 2005. "Combined Efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce." **J. Food Prot.** 68: 1381-1387.

Baumann, H. E., and Foster, E.M., 1956. "Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick." **Am.J.Clin.Nutr.** 33: 2426-243

Bayles, D. O., Annous, B. A., and Wilkinson, B. J. 1996. " Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in responses to temperature down shock and growth at low temperatures." **Appl. Environ. Microbiol.** 62(3): 1116-1119.

Berends, B.R., Snijders, J.M.A. and Van Logtestijn, J.G., 1993. "Efficacy of current EC meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiological safety: A critical review." **Vet. Rec.**. 133: 411–415.

Berends, B.R., Burt, S.A., Snijders, J.M.A., 1995. "Critical control points in relation to breaking *Salmonella* and *Listeria* cycles in pork production." In: Burt, S.A., Bauer, F. (Eds.). New challenges in Meat Hygiene: Specific Problems in Cleaning and Disinfection. European Consortium for the Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology (ECCEAMST), Utrecht, The Netherlands. Pp. 11–17.

Berends, B.R., Knapen, F.V., Mossel, D.A.A., Snijders, J.M.A and Burt, S.A. 1997. " Idenification and quantification of rik factors regarding *Salmonella* spp. On pork carcasses." **Int. J. Food. Microbiol.** 36: 199-206.

Berends, B.R., Knapen, F.V., Mossel, D.A.A., Burt, S.A., and Snijders, J.M.A. 1998. " *Salmonella* spp. On pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors." **Int. J. Food. Micro.** 44:207-217.

Bhunia, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1987a. "Partial purification and characterization of antimicrobial substances from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum.*" **IFT 87 Program and Abstracts. Annual Meeting, Institute of food technologists, Las Vegas,June 16-19.** Abstract no.143.

Bhunia, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1987b. "Direct detection of and antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis." **J.Ind.Microbiol.** 2: 319-322.

Bhunia, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1988. "Purification, characterization and Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici.*" **J.Appl.Bacteriol.** 65: 261-268.

Binkin, N., Scuderi, G., Novaco, F., Giovanardi, G.L., Paganelli, G., Ferrari, G., Cappelli, A., Ravaglia., L., Zilioli, F., Amadei, V., and Magliani, W. 1993. "Egg-related *Salmonella* Enteritidis, Italy, 1991." **Epidemiol. Infect.** 100: 277-287.

Blaise, O., Ronald, E. S., Richard, A. H., Gabriel, J. P., and Andre, B. 1997. "Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria." **J.Food.Prot.** 60(3): 246-253.

Blood, R.M. 1975. "Lactic acid bacteria in marinated herring" In Lactic acid bacteria in beverages and food. J.G. Carr, C.V. Cutting, and G.C. Whiting,eds., pp.195-208. Academic Press,Inc. New York.

Borch, E., Nesbakken, T., and Christensen, H. 1996. " Hazard identification in swine slaughter to with respect foodborne bacteria." **Int. J. Food. Microbiol.** 30:9-25.

Cardinale, E., Perrier Gross-Claude, J.D., Tall, F., Gueye, E.F., and Salvet G. 2005. "Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal." **Int. J.FoodMicro.** 103:157-165.

Chau, P.Y., Shortridge, K.F., and Huang, C.T. 1977. "*Salmonella* in pig carcasses for human consumption in Hong Kong: a study on the mode of contamination." **J. Hyg. (Camb.)** 78: 253-260.

Chen, H., and Hoover, D.G. 2003. " Bacteriocins and their food applications." **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 2: 82-100.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. " Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." **Int. J. Food. Microbiol.** 63: 13-20.

Collin, C.H. 1995. "Collins and Lyne's microbiological methods." Oxford, UK: Butterworth-Heinemann.

Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.W., Williams, G.C., Thomas, L.V., and Delves-Broughton, J. 1999. " Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage." **J. Food. Prot.** 62: 1004-1010.

de Vuyst, L., Vandamme, E., 1994. " Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis: properties, biosynthesis and application. In: de Vuyst, L., Vandamme, E. (Eds.), Bacteriocns of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications, Blackie Academic and Profesional, London, pp. 151-221.

Desmond, E.M., and Troy, D.J. 2001. "Effect of lactic acid and citric acid on low-value beef used for emulsion-type meat products." **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** 34: 374-379.

Doores, S. 1993. "Organic acids." In Branen, A.L., and Davidson, P.M. (ed). Antimicrobial in foods. Pp. 75-103. Marcel Dekker, Inc, Newyork

Doyle M.P., Beuchat L.R., and Montville T.J. 1997. "Food microbiology:Fundamentals and frontiers." Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

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

Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., and Saldana-Lozano, J. 1999. "Prevalence of *Salmonella* in Chorizo and its survival under different storage temperatures." **Food Microbiology**. 16: 479-486.

Facklam, R., Hollis, D., and Collins, M.D. 1989. "Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. **J.Clin.Microbiol.** 27: 724-730.

Florjanc, P., Eggenkamp, A.E., Burt, S.A., Berends, B.R., and Snijders J.M.A., 1992. "The effects of disinfection on the prevalence of *Salmonella* spp. And *Listeria* spp. In the cutting room of a pig slaughterhouse." VVDO-report H9214. Department of the Science of Food of Animal Origin (VVDO), Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands.

Forsythe, S.J., and Hayes, P.R. 1998. "Food hygiene, microbiology and HACCP." 3rd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.

Garneau, S.,Martin, N. I., and Vederas, J. C. 2002. "Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **Biochemie.** 84: 577-592.

Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., and Monfort, J.M. 1993. "Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages." **J. Appl. Bact.** 75: 142-148.

Gill, C.O. 1998. " Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In : Davies, A.R., Board, R.G. (Eds.), The microbiology of meat and poultry. Blackie Academic, London, pp. 118-157.

Gill, C. O., and Badoni, M. 2004. "Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses." **Int. J. Food Micro.** 91:43-50.

Gill, C.O., and Brayant, J. 1992. " The contamination of pork with spoliage bacteria during, chilling and cutting of pig carcasses. **Int. J. Food Microbiol.** 16: 51-62.

Gill, C.O., and Brayant, J. 1993. "The presence of *Escherichia* Coli, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass deharing equipment." **Food Microbiol.** 10: 337-344.

Gill, C. O., and Jones, T., 1997. " Assessment of the hygienic characteristics of process for dressing pasteurized pig carcasses." **Food. Microbiol.** 14: 81-91.

Gracey, J.F. 1986. " Preservation of meat." In: Gracey, J.F. (Ed.) , Meat Hygiene. Balliere Tindall, London, pp. 248-278.

Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., Von Altrock, A., Limpitakis, N., and Thorberg, B. 2001. " The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. In: *Salmonella* in pork. Epidemiology, control and the public health impact. Royal Veterinary and Agicultural University, Denmark, pp. 115-152.

Hamby, P.L., Savell, J.W., Acuff, G.R., Vanderzant, C., and Cross, H.R. 1987. "Spary-chilling and carcass decontaminatation systems using lactic acid and acetic acid." **Meat Sci.** 21:1-14

Hanlin, M.B., Kalcayanand, N., Ray, D., and Ray, B. 1993. " Bacteriocin of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity." **J. Food. Prot.** 56: 252-255.

Haydar, O., Yeliz, Y., Ozlem, K., Ahmet, K., Muammer, G., and Gokhan, I. 2006. " Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on beef" **Food control.** 17: 299-303.

Harrison, A.P., and Hanson, P.A. 1950. "The bacterial flora of the cecal feces of healthy turkeys." **J.Bacteriol.** 54: 197-210.

Helander, J. M., Von, W. A., and Mattila-Sandholm, M. 1997. " Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria." **Trends in Food Sciences & Technology.** 8: 146-150.

Hill, C. 1995. " Bacteriocin: natural antimicribials from microorganisms." 23-29. in **G.W. Goulol(ed.) new Methods of food preservation.** Blackie Academic & Professional, London.

Hoover, D.G., and Steenson, L.R. 1993. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". Academic Press, San Dieago.

Hurst, A. 1981. "Nisin." **Adv. Appl. Microbiol.** 27: 85-123.

Ingram, M., and Simonsen, B., 1980. "Meat and meat products." In International Comission on Microbiological specifications for Foods, Microbial ecology of foods. Vol.2. Academic Press, New York.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995. "Bacteriocins of Gram-positive bacteria." **Microbiol. Rev.** 59:171–200.

Jernklinchan, J., Koowatannanukul, K., and Saittanu, K. 1994. " Occurrence of *Salmonella* in raw broilers and their products in Thailand." **J. Food Prot.** 57: 808-810.

Jimenez-Villarreal, J. R, Pohlman, F. W., Johnson, Z. B., and Brown, A. H. 2003. " Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium,lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef." **Meat Science** 65: 1055-1062.

Kalchayanand, N. 1990. "Extension of shelf-life of vacumm-packaged refrigerated fresh beef by bacteriocins of lactic acid bacteria. Philosophy thesis, University of Wyoming, Laramie.

Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-85.

Kotula, K. L., and Thelappurath, R. 1994. " Microbial and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solution." **J. Food. Prot.** 57(8): 665-670.

Kusunoki, J., Hashimoto, Y., Hirai, A., Itoh, T., Kai, A., Yanagawa, Y., Ohato, K., Kudoh, Y. and Nakamura, A. 1995. "Characterization of *Salmonella ser.enteritidis* isolated from food poisoning in Tokyo by epidemiological markers." XXV Congress of the World Veterinary Association (Abstacts). 3-9 September, 1995, Yokohama, Japan, P. 249.

Lafon-Lafourcade, S. 1983. "wine and brandy" In Biotechnology,Volume5. G. Reed, ed., pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach. Florida.

McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. 2001. " Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action . **FEMS Microbiol. Rev.** 25: 285-308.

Medden, H.R., Espie, W.E., Moran, L., Mabride, J., and Scates, P. 2001. "Occurrence of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella* and *Campylobacter* spp. On beef carcasses." **Meat Science.** 58: 343-346.

Mendonca, A. F., Molins, R. A., Kraft, A. A., and Walker, H. W. 1989. " Microbiological chemical and physical changes in fresh vacuum packed pork treated with organic acids and salts." **J. Food. Sci.** 54: 18-21.

Motlagh, A. M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B., and Field, R.A.. 1992. "Inhibition of *Listeria spp.* In sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilaciti* H." **J. Food Prot.** 55:337-343.

Moy, G., Hazzard, A., and Kaferstein, F. 1997. " Improving the safety of street-vended food." **World Health Statistiss Quarterly.** 50: 124-131.

Mrema, N., Mpuchane, S., and Gashe, B. A. 2004. "Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana." **Food Control.** 17(3): 207-212.

Mundt, J.O., Beattie, W.G., and Weiland, F.R. 1969. "Pediococci residing on plants." **J. Bacteriol.** 98: 938-942.

Mustapha, A., Ariyapitipun, T., and Clarke, A.D. 2002. " Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-Packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin." **J. Food. Sci.** 67(1): 262-267.

Naidu, A.S.. 2000. "Natural food antimicrobial systems". CRC Press,New York.

Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., EiJsink, V., and Holo, H. 1996. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria." **Antonie van Leeuwenhoek.** 70: 113-128.

Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Pela'ez-Mart'inez, M. C., and Harrison de la torre, A. 2001. "Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry." **Meat Science.** 62: 237-243.

Nielsen, W. J., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. 1990. "Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2142-2145.

Orji, M.U., Onuigbo, H.C., and Mbata, T.I. 2005. "Isolation of Salmonella from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria." **Int. J. Inf. Dis.** 9: 86-89.

Oshold, W., Shin, H.K., Dresel, J., and Leistner, L. 1984. "Improving the storage life of carcasses by treating their surfaces with an acid spray." **Fleischwirtschaft.** 64: 828.

Panisello, P.J., Roison, R., Quantick, P.C., and Rosalind, S. 2000. " Application of foodborne diseases outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems." **Int. J. Food. Micro.** 59: 221-234.

Prasai, R.K., Acuff, G.R., Lucia, L.M., Hale, D.S., Savell, J.W., and Morgan, J.B. 1991. "Microbiological effects of acid decontamination of beef carcesses at various location in processing." **J.Food. Prot.** 54: 868-872.

Rainbow, C. 1975. "Beer spoilage lactic acid bacteria" In Lactic acid bacteria in beverages and food. J.G. Carr, C.V. Cutting, and G.C. Whiting,eds., pp. 149-158 Academic press, New york.

Rayman, ., Malik, N., and Hurst, A., 1983. " Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in model cured meat system." **Appl. Environ. Microbiol.** 46:1450-1452.

Rose, B.E., Hill, W.E., Umholtz, R., Ransom, G.M., and James, W.O. 2002. "Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States of America,1998 through 2000." **J. Food. Prot.** 65: 937-947.

Rozbeh, M., Kalchayanand , N., Field, R. A., Johnson, M.C., and Ray, B.. 1993. "The influence of biopreservatives on bacterial level of refrigerated vacuum packaged beef ." **J. Food. Safety.** 13: 99-111.

Saitana, K., Koowatananukul, C., Jerngklinchan, J., and Sasipreeyajan, J. 1994. " Detection of Salmonellae in hen eggs in Thailand. Southeast Asia." **J. Trop. Med. Public Health.** 25(2): 324-327.

Samelis, J. J., Sofos, J. N., Kendal, P. A., and Smith, G. C. 2001. " Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination Fluids." **Appl. Environ. Microbiol.** 67(6): 2410-2420.

Shcillinger, U., and Lücke, F.K. 1990. "Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products." **Fleischwirtsschaf.** 70: 1296-1299.

Shcillinger, U., and Holzapfel, W.H.. 1990. "Antibacterial activity of carnobacteria." **Food Microbial.** 7: 305-310.

Simonsen, B., Christensen, J., Baggesen, J.H.B., Robert, T.A., Tompkin, R.B., and Silliker, J.H. 1987. "Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). **Int. J. Food. Microbiol.** 4: 227-247.

Skaugen, M., Nissen-Meyer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Abildgaard, C.I.M. and Nes, I.F., 1994. "In vivo conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide." **J. Biol. Chem**.. 269 (27): 183–27185.

Smulders, F.J.M., and Woolthus, C.H.J. 1983. "Influence of two levels of hygiene in the microbiological condition of veal as a product of two slaughtering/processing sequences." **J.Food.Prot.** 46: 1032 .

Snijders, J.M.A., Van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A., and Smulders, F.J.M. 1985. "Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedure." **The Quarterly Veterinary.** 277-282.

Solberg, O., Hegna, I. K., and Clausen, O.G. 1975. "*Pediococcus acidilactici* NCIB 6990, a new test organism for microbiological assaying of pantothenic acid. **J. appl. Bacteriol.** 39: 119-120.

Sorqvist, S., and Danielsson-Tham, M., 1990. " Survival of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia* spp. In scalding water used in pig slaughter. **Fleischwirtsch.** 70: 1451-1454.

Sorensen, L.L., Sorensen, R., Klint, K., and Nielsen, B. 1999. " Presistent environment strains of *Salmonella infantis* at two Denish slaughterhouses, two case stories. **In: Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and control of *Salmonella* in pork. 285-286. 4-7 August,.** Washington, DC

Sorensen, O., Van Donkersgoed, J., Mcfall, M., Manninen, K., Gensler, G., and Ollis, G. 2002. " *Salmonella* spp. Shedding by Alberta beef cattle and detection of *Salmonella* spp. In ground beef. **J. Food. Prot.** 65: 484-491.

Stevens, K. A., Sheldon, B.W., Kelps, N. A., and Klaenhammer, T.R. 1991. " Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria ." **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3613-3615.

Stivarius, M. R., Pohlman F. W., Mcelyea K.S., and Waldroup, A.L. 2002. "Effects of hot water and lactic acid treatment of beef trimmings prior to grinding on microbial, instrumental color and sensory properties of ground beef during display." **Meat Science.** 60:327-334.

Sugihara, T. F. 1985. " Microbiology of breadmaking." In Microbiology of fermented foods. B.J.B.Wood, ed., Vol.1, pp. 249-261. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

Swetwiwathana, A. 2005. " Microbiological quality enhancement of Thai fermented meat product (Nham) using Nham-associated pediocin-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)." Philosophy Degree thesis, Kyushu University, Japan.

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

Swetwiwathana, A., Lotong, N., and Sonomoto, K. 2000. "Isolation and selection of thermotolerant bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat) ." **Proceeding of the 2 nd Seminar of Thai and Japanese Coordinator Meeting .** Yamaguchi University, Japan.

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Fischer, A., and Sonomoto, K. 2001. " Potential for use of isolated bacteriocin -producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from nham (Thai fermented meat) to control the growth of *Salmonella* Anatum (An *In-Vitro Study*) ." **The 45th International Congress of Meat Science and Tecnology (ICoMST) Proceeding. Volume II: 18-19. August 26-31, 2001.** Krakow, Poland.

Swetwiwathana, A., Lotong, N., and Fischer, A. 2002. " Use of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) to control *Salmonella* Anatum in nham (Thai fermented meat)" **The 48th International Congress of Meat Science and Tecnology (ICoMST) Proceeding. Volume II:966-967. August25-30, 2002.**Rome, Italy.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 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 8th – 13th 2004.** Helsinki, Finland.

Teuber, M., and Geis, A. 1981. "The family Streptococcaceae(nonmedical aspects)." In The prokaryotes. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, Eds.,Vol.2, pp. 1614-1630. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Thatcher, F.S., and Clark. (eds). 1968. " Microorganisms in foods: Their significance and methods of enumeration." University of Toronto press, Toronto, Ontario. 434 p.

Thomas, T.D. 1987. "Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in cheddar cheese. **N.Z.J.Dairy Sci. Technol.** 22: 25-38.

Thomas, T.D., Mckay, L.L., and Morris, H.A. 1985. "Lactate metabolism by pediococci isolated from cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 908-913.

Threlfall, E.J., and Chart, H. 1993. "Inter-relationships between strains of *Salmonella* Enteritidis." **Epidemiol. Infect.** 11: 1-8.

Van, M. J., and Shies, M. E. 2000. "Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria." **Natl. Prod. Rep.** 17: 323-335.

Van Belkum, M.J., and Stiles, M.E. 2000. " Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria." **Nat. Prod. Rep.** 17: 323-335.

Van Nierop, W., Duse, A.G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S., and Bloomfield, S.F. 2005. "Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella, Listeria monocytogenes* and *Campylobacter.*" **Int. J. Food Microbiol.** 99: 1-6.

Yang Z., LI Y., and Slavik, M. 1998. "Use of antibacterial spray applied with an inside-outlet birdwasher to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses." **J. Food. Prot.** 61: 829-832.

Yasmina, B., Kenna, F., and Enrique, M. S. 2002. "Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses." **J.Food. Prot.** 65(11): 1780-1783.

Yu, S.L., Bolton, D., Laubach, C., Kline, P., Oser, A., and Palumbo, S.A. 1999. " Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses. **J. Food. Prot.** 62: 1478-1481.

Zhang, S., and Mustapha, A. 1999. " Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 numbers on vacuum packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA." **J. Food. Prot.** 62: 1123-1127.

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ และ การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของชิ้นเนื้อ

การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

1.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* Weltevreden

นำเชื้อ *S.* Weltevreden มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden แล้วนำสารละลายที่ได้มาเจือจางใน 0.85 % Nacl ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 และ 10^5 cfu/ml

1.2 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* Anatum

นำเชื้อ *S.* Anatum มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden แล้วนำสารละลายที่ได้มาเจือจางใน 0.85 % Nacl ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 และ 10^5 cfu/ml

1.3 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella* Senftenberg

นำเชื้อ *S.* Senftenberg มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อ *S.* Weltevreden แล้วนำสารละลายที่ได้มาเจือจางใน 0.85 % Nacl ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 และ 10^5 cfu/ml

การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อ (Mendonca *et al.*, 1989)

ชั่งน้ำหนักชิ้นเนื้อก่อนจุ่มสารละลายและจดบันทึกผลน้ำหนักเริ่มต้นเป็นค่า X_1 และชั่งน้ำหนักภาชนะถุงพลาสติก (p) ก่อนบรรจุชิ้นเนื้อจดบันทึกเป็นค่า X_2 หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อจุ่มลงในสารละลายกลุ่มต่างๆ แล้วจึงนำชิ้นเนื้อที่ได้บรรจุในถุงพลาสติก ชั่งน้ำหนักของชิ้นเนื้อและถุงพลาสติก (p + e+ m) จดบันทึกค่าเป็น X_3 และนำชิ้นเนื้อออกจากถุงพลาสติก ชั่งน้ำหนักเนื้อที่ได้ (m) จดบันทึกค่าเป็น X_4 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{X_3 - X_4 - X_2}{X_1} \times 100$$

$$= \frac{(p + e+ m) - (m) - (p)}{X_1} \times 100$$

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อในแต่ละกลุ่มการทดลองในวันที่ 0 2 4 6 และ 8 ของการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและ
ลักษณะเฉพาะของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypicase Soy Broth (TSB)

ประกอบด้วย

peptone from casein	17.0 ก.
Peptone from soymeal	3.0 ก.
D(+)glucose	2.5 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
di-potassium hydrogen phosphate	2.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Tetrathionate Broth (TTB)

ประกอบด้วย

peptone from casein	2.5 ก.
Peptone from meat	2.5 ก.
Bile salt mixture	1.0 ก.
Calcium carbonate	10.0 ก.
Sodium thiosulfate	30.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Rappapost Vassiliadis (RV)

ประกอบด้วย

peptone from soymeal	4.5 ก.
Magnesium chloride hexahydrate	29.0 ก.
Sodium chloride	8.0 ก.
di-potassium hydrogen phosphate	0.4 ก.
Potassium di-hydrogen phosphate	0.6 ก.
Malachite-green	0.036 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Rambach (Rm) agar

ประกอบด้วย

peptone	8.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.

Sodium deoxychlolate	1.0 ก.
Chromogenic mix	1.5 ก.
Proplylene glycol	10.5 ก.
Agar-agar	15.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Hektoen Enteric (HE) agar

ประกอบด้วย

peptone	15.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
Yeast extract	3.0 ก.
Sucrose	14.0 ก.
Lactose	14.0 ก.
Salicin	2.0 ก.
Sodium thisulfate	5.0 ก.
Ammonium iron(III) citrate	1.5 ก.
Bile salt mixture	2.0 ก.
Bromothymol blue	0.05 ก.
Acidic fuchsin	0.08 ก.
Agar-agar	13.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Xylose-Lysin-Desoxycholate (XLD) agar

ประกอบด้วย

yeast extract	3.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
D(+)xylose	3.5 ก.
Lactose	7.5 ก.
Sucrose	7.5 ก.
Lysine	5.0 ก.
Sodium deoxychlolate	2.5 ก.
Sodium thiosulfate	6.8 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.8 ก.
Phenol red	0.08 ก.

Agar-agar	13.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Modified Sami-Solid Rappapost Vassiliadis (MSRV) medium

ประกอบด้วย

tryptose	4.59 ก.
Casein hydrolysate	4.59 ก.
Sodium chloride	7.34 ก.
Potassium dihydrogen phosphate	1.47 ก.
Magnesium chloride anhydrous	10.93 ก.
Malachite green	0.037 ก.
Agar-agar	2.7 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Triple Sugar Iron (TSI) agar slant

ประกอบด้วย

peptone from casein	15.0 ก.
Peptone from meat	5.0 ก.
Meat extract	3.0 ก.
Yeast extract	3.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
Lactose	10.0 ก.
Sucrose	10.0 ก.
D(+)glucose	1.0 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.5 ก.
Sodium thiosulfate	0.5 ก.
Phenol red	0.024 ก.
Agar-agar	12.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Lysine-Indole-Motility (LIM) medium

ประกอบด้วย

peptone from meat	5.0 ก.
Yeast extract	3.0 ก.
D(+)glucose	1.0 ก.

L-lysine monohydrochloride	10.0 ก.
Sodium thiosulfate	0.04 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.5 ก.
Bromocresol purple	0.02 ก.
Agar-agar	12.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Trypticase soy agar (TSA)

ประกอบด้วย

peptone from casein	15.0 ก.
Peptone from soymeal	5.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
Agar-agar	15.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

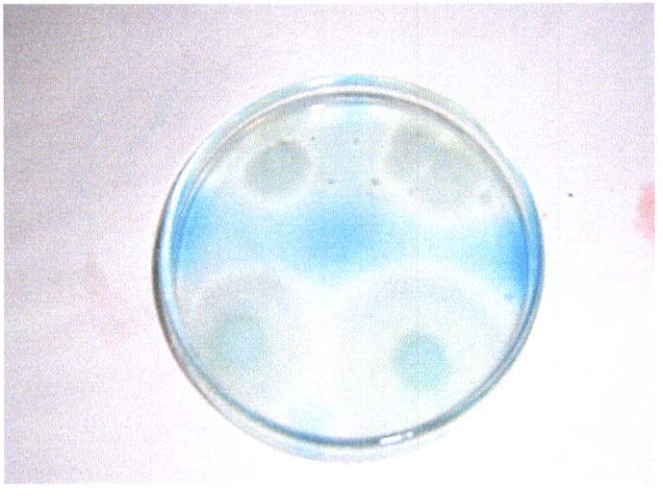
11.MRS agar

ประกอบด้วย

Peptone from casein 10.0	10.0 ก.
Meat extract	8.0 .ก
yeast extract	4.0 ก.
D(+)-glucose	20.0 ก.
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0 ก.
Tween® 80	1.0 ก.
di-ammonium hydrogen citrate	2.0 ก.
Sodium acetate	5.0 ก.
Magnesium sulfate	0.2 ก.
Manganese sulfate	0.04 ก.
Agar-agar	14.0. ก.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

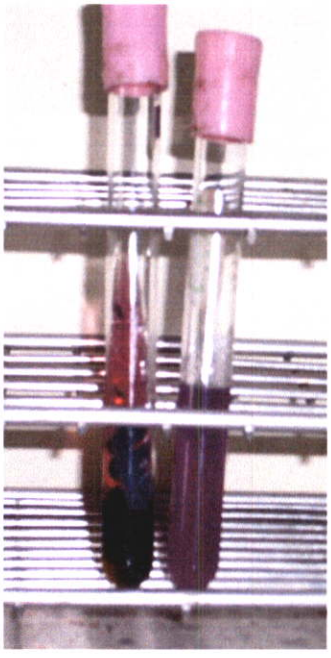
ภาพที่ 1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Hektoen Enteric (HE) agar



ภาพที่ 2. ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Modified Semi-solid Rappaport-Vassiladis (MSRV)

ภาพที่ 3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Rambach agar

ภาพที่ 4. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Xylose Lysine Sodium Dxycholate (XLD) agar



ภาพที่ 5. ลักษณะของเชื้อซัลโมเนลลาที่แสดงในอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) agar และ Lysine Indole Motility (LIM) medium ในขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมี

ประวัติผู้เขียน

นางสาว สมัญญา สุขพหล เกิดเมื่อวันที่ 23 กันยายน พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ในสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2545 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหารในปี พ.ศ. 2546