

ผลของสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์
และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่

นางสาวมาลัยพร ศรีวิระ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2551

**EFFECTS OF BACTERIOCINS AND ROSEMARY
EXTRACTS ON MICROBIAL AND PHYSICO-
CHEMICAL PROPERTIES OF CHICKEN MEATBALLS**

Malaiporn Sriwira

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2008

ผลของสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์
และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)
ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)
กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มาลัยพร ศรีวิระ : ผลของแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่ (EFFECTS OF BACTERIOCINS AND ROSEMARY EXTRACTS ON MICROBIAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CHICKEN MEATBALLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.กนกกร อินทรานิษฐ์, 116 หน้า.

วัตถุประสงค์การทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ผลิตสารแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่คัดเลือกได้จากลูกชิ้นไก่ และศึกษาผลของสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์ และทางเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่ โดยวิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์ ความเป็นกรดค่า การเกิดออกซิเดชัน และเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่ขณะเก็บรักษา เก็บเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่จำนวนมาก (dominant flora) แยกและจำแนกได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus saprophyticus* (ประชากร 12%) และ *Bacillus* spp. PN-3 (ประชากร 85%) ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687 และ *B. subtilis* TISTR 008) เป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารแบคทีริโอซินจาก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *Pediococcus acidilactici* TISTR 424 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตสารแบคทีริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่ได้ดีที่สุดคือ *Lc. lactis* TISTR 1401 สารแบคทีริโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% yeast extract, 2% glucose และ 2% meat extract มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. PN-3 เฉลี่ยเท่ากับ 5,333.3 AU/ml มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที และมีความเสถียรที่ pH 2-8 นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ชนิดของเหลวข้น (concentrated crude bacteriocins, CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze-dried crude bacteriocins, FDCB) มีประสิทธิภาพการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 3,200 และ 6,400 AU/ml ตามลำดับ

เมื่อใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในการผลิตลูกชิ้นไก่ 2 วิธี คือ 1) เคลือบผิวลูกชิ้นด้วยชนิดปลดเชื้อด้วยความร้อน (heated crude bacteriocins, HCBS) และชนิดปลดเชื้อด้วยการกรอง (filtered crude bacteriocins, FCBS) และ 2) ผสมในส่วนผสมลูกชิ้นด้วยชนิดของเหลวข้น (concentrated crude bacteriocins, CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins, FDCB) บรรจุลูกชิ้นแบบปกติ และแบบสุญญากาศ เก็บที่ 4°C นาน

21 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ ความเป็นกรดต่าง ค่า TBARS และแรงกดของลูกชิ้นไก่ ตามมาตรฐานกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหารที่จำนวน 10^5 cfu/g พบว่า การเคลือบลูกชิ้นด้วย HCBS และ FCBS บรรจุแบบปกติ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบไนซินสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 18 วัน และลูกชิ้นควบคุมเก็บได้เพียง 9 วัน สำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นาน 18 วัน 21 วัน และ 12 วัน ตามลำดับ ค่า pH และ TBARS ของลูกชิ้นทุกชนิดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่แรงกดของลูกชิ้นต่างกันเล็กน้อย ($p<0.05$) โดยลูกชิ้นเคลือบด้วยไนซินและบรรจุแบบสุญญากาศมีค่าแรงกดต่ำลงเมื่อเก็บนานขึ้น การผสมสารแบคทีริโอซิน CCB และ FDCB ในส่วนผสมของลูกชิ้นพบว่า เมื่อเก็บลูกชิ้นแบบปกติ การใช้ CCB สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 18 วัน การใช้ FDCB เก็บลูกชิ้นได้นานถึง 21 วัน เท่ากับการใช้ไนซิน ขณะที่ตัวอย่างควบคุมสามารถเก็บได้เพียง 15 วัน และเมื่อเก็บแบบสุญญากาศเก็บได้นานกว่า 21 วัน สำหรับการใส่สารแบคทีริโอซินทุกชนิดรวมทั้งไนซิน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้นานประมาณ 18 วัน ค่า pH และ TBARS ของลูกชิ้นผลิตจากสารแบคทีริโอซินทุกชนิดไม่แตกต่างกัน ค่าแรงกดของลูกชิ้นจากสูงที่สุดไปต่ำที่สุด ($p<0.05$) คือ ลูกชิ้นผลิตด้วยไนซิน CCB, FDCB และลูกชิ้นควบคุมตามลำดับ

การทดลองใช้สารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] (ORH) ผสมในลูกชิ้นเปรียบเทียบกับสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oil of rosemary (OR) พบว่า ORH สามารถด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่ได้ดีกว่า ($p<0.05$) ชนิด OR เมื่อใช้สารสกัด ORH ร่วมกับสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 สำหรับการผลิตลูกชิ้น โดยใช้ ORH ปริมาณ 0.5% ผสมในส่วนผสมลูกชิ้นแล้วเคลือบลูกชิ้นด้วย HCBS (ลูกชิ้น RC) และใช้ ORH ปริมาณ 0.5% และ FDCB ปริมาณ 0.2% ผสมในส่วนผสมลูกชิ้น (ลูกชิ้น MR) พบว่า เมื่อใช้สารสกัดโรสแมรี่และสารแบคทีริโอซินผลิตลูกชิ้นแบบ MR สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วัน และการผลิตแบบ RC เก็บลูกชิ้นได้ประมาณ 20 วัน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้ประมาณ 14 วัน เท่านั้นเมื่อบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ และเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วัน 19 วัน และ 16 วัน ตามลำดับ สำหรับการบรรจุลูกชิ้นแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นมีค่า pH ต่างกันเล็กน้อย ($p<0.05$) ลูกชิ้นควบคุมมีค่า TBARS และ hexanal สูงกว่า ($p<0.05$) ลูกชิ้น CR และ MR ตลอดเวลาการเก็บสำหรับการบรรจุทั้ง 2 แบบ นอกจากนี้ค่าแรงกดของลูกชิ้น MR สูงกว่า ($p<0.05$) ลูกชิ้น CR และลูกชิ้นควบคุมเล็กน้อย

ทั้งนี้จากกล่าวได้ว่าสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพด้านการเจริญของจุลินทรีย์ และได้ลูกชิ้นที่มีเนื้อสัมผัสเทียบเท่าสารไนซิน และเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ทางการค้าชนิด ORH สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บ

ของถูกขึ้นไปได้มากขึ้น โดยเสริมการด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และด้านการเกิดออกซิเดชัน
ของถูกขึ้นได้ดียิ่งขึ้น

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

MALAIORN SRIWIRA : EFFECTS OF BACTERIOCINS AND
ROSEMARY EXTRACTS ON MICROBIAL AND PHYSICO-CHEMICAL
PROPERTIES OF CHICKEN MEATBALLS. THESIS ADVISOR : ASSOC.
PROF. KANOK-ORN INTARAPHICHET, Ph.D., 116 PP.

BACTERIOCINS/ LACTIC ACID BACTERIA/ ROSEMARY EXTRACTS/
LACTOCOCCUS LACTIS

The objectives of the experiment were to screen lactic acid bacteria that could produce bacteriocins with the ability to inhibit indicator bacteria obtained from chicken meatballs, and to study the effects of crude bacteriocins and rosemary extracts on microbial and physico-chemical properties of chicken meatballs. Microbial growth, pH, oxidation and texture of chicken meatballs were analyzed. Two dominant flora bacteria from chicken meatballs were selected and identified as *Staphylococcus saprophyticus* (12% population) and *Bacillus* spp. PN-3 (85% population) and used as indicator bacteria along with other Gram positive; *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus* sp. TISTR 908, *Bacillus cereus* TISTR 687, and *Bacillus subtilis* TISTR 008, for selection of bacteriocins producing lactic acid bacteria (LAB). Five culture strains of the LAB were used for screening, namely *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *Pediococcus acidilactici* TISTR 424, and *Pediococcus acidilactici* TISTR 051. It was found that *Lc. lactis* TISTR 1401 produced bacteriocins with the highest inhibition activity against indicator bacteria from chicken meatballs. Crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 in MRS broth with the addition of 2% yeast extract, 2% glucose and 2% meat extract had the ability to inhibit *Bacillus* spp. PN-3

with an average of 5,333.3 AU/ml, heat stability 100°C for 20 minutes and pH stability of pH 2-8. In addition, concentrated crude bacteriocins (CCB) and freeze-dried crude bacteriocins (FDCB) showed the inhibition ability of 3,200 and 6,400 AU/ml, respectively.

Crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 were used in chicken meatball production in two different preparations: 1) coating the meatball surface with heated crude bacteriocins supernatant (HCBS) and filtered crude bacteriocins supernatant (FCBS), and 2) mixing in the meatball batter with 0.2% concentrated crude bacteriocins (CCB) and 0.2% freeze-dried crude bacteriocins (FDCB). Nisin in the same concentration was also used for comparison. The meatballs were aerobically packed and vacuum packed, stored at 4°C for 21 days. The meatballs were sampled every 3 days for the analysis of microbial content, pH, TBARS values and compression force. According to the Thai FDA standard for microbial count of 1×10^5 cfu/g food sample, it was found that coated chicken meatballs with HCBS and FCBS, aerobically packed, could be kept for about 15 days while the ones coated with nisin could be kept for 18 days and control for only 9 days. The vacuum packed meatballs could be kept for 18, 21 and 12 days, respectively. pHs and TBARS values of all meatballs were not different ($p > 0.05$) while the compression forces were slightly different ($p < 0.05$) with the nisin coated meatball and vacuum packed had lower compression force when kept longer. For the CCB and FDCB mixed chicken meatballs, aerobically packed, the CCB mixed meatballs could be kept for about 18 days while the FDCB and nisin mixed meatballs could be kept for up to 21 days, but only 15 days for control samples. Moreover, for vacuum packaging, all bacteriocins treated meatballs could be kept longer than 21 days while control meatballs for about

18 days. pHs and TBARS values of all meatballs were not different. However, significant differences of compression forces were found in the order from low to high of nisin, CCB and FDCB mixed, and control meatballs, respectively.

Two different rosemary extracts, oleoresin rosemary Herbalox[®] (ORH) and oil of rosemary (OR) were used in comparison for antimicrobial and antioxidant ability in chicken meatballs. It was found that the ORH showed better activity ($p<0.05$) than the OR. The ORH was used incorporation with crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 in chicken meatball production in two different preparations. The meatballs were made by mixing 0.5% ORH in the batter and then, coated with HCBS (RC meatballs). Another batch was made by mixing 0.5% ORH and 0.2% FDCB in the batter (MR meatballs). It was found that for aerobically packed, the MR meatballs could be kept longer than 21 days and the RC meatballs for about 20 days while the control meatballs could be kept for about 14 days, and for vacuum meatballs 21, 19 and 16 days, respectively. For both packing types, slightly different ($p<0.05$) pHs of the meatballs were observed. TBARS and hexanal contents of the control meatballs were higher ($p<0.05$) than those of RC and MR meatballs throughout storage time for both types of packing. In addition, the MR meatballs had slightly higher compression force ($p<0.05$) than RC and control meatballs.

Therefore, it could be mentioned that crude bacteriocins produced from *Lc. lactis* TISTR 1401 had the ability to inhibit microbial growth and provided meatballs with the texture equally to nisin. The use of crude bacteriocins in combination with commercial rosemary extracts, ORH, could reduce microbial numbers and help to

extend longer shelf life of chicken meatballs by a good synergism in antimicrobial and antioxidant activities.

School of Food Technology

Academic Year 2008

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ดังนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณที่กรุณาให้ความรู้ คำสั่งสอน คำแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขเพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ และช่วยเหลืออย่างดียิ่งมาโดยตลอด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ต่าง ๆ อย่างดียิ่งและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวชื่อมา ณ ที่นี้ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำในด้านวิชาการและด้านอื่น ๆ ตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ศึกษามาในรั้วแสดงทอง

ขอขอบพระคุณ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือต่าง ๆ ในงานวิจัย ขอบคุณ พี่ น้อง “Food Tech” ทุกคนที่ร่วมทุกข์ ร่วมสุข คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กันตลอดมา ขอบคุณ “ชมพู จี๊ว เปรม พี่เก้ น้องแต้ม น้องแป้ง” ที่คอยเป็นห่วง ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยมาตลอด และขอบคุณพี่เอ๋ อานุภาพ ชัยวิเชียร ที่คอยให้กำลังใจในทุก ๆ เรื่อง เป็นแรงผลักดันให้ตั้งใจทำงานตลอดมาจนสำเร็จได้ในที่สุด

ขอขอบพระคุณ บริษัท Vicchi Consolidated (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดโรสแมรี และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนตลอดงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำเนิด ให้ความรัก อบรมเลี้ยงดูอย่างดีเสมอมา และให้ทุนทรัพย์ในการศึกษาครั้งนี้ พี่ชาย น้องสาว และญาติ ๆ ทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับคุณพ่อ คุณแม่ ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

มาลัยพร ศรีวิระ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	

1	บทนำ.....	1
1.1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2	วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3	สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.4	ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.6	รายการอ้างอิง.....	5
2	ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1	การเสื่อมเสียของอาหาร.....	7
2.1.1	สาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร.....	8
2.1.2	การถนอมอาหาร.....	9
2.2	สารแบคทีริโอซิน.....	14
2.2.1	การจัดกลุ่ม.....	15
2.2.2	กลไกการทำงาน.....	17
2.2.3	การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก.....	19
2.3	สารต้านออกซิเดชันในอาหาร.....	23
2.3.1	ประเภทของสารต้านออกซิเดชัน.....	24
2.3.2	การใช้สารต้านออกซิเดชันและสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติใน	

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

	ผลิตภัณฑ์อาหาร.....	27
2.4	เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.....	29
2.4.1	ลูกชิ้น.....	30
2.5	รายการอ้างอิง.....	31
3	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีริโอซินและแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่.....	38
3.1	บทคัดย่อ.....	38
3.2	บทนำ.....	39
3.3	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	41
3.3.1	การแยกและคัดเชื้อจุลินทรีย์จากลูกชิ้นไก่เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ.....	41
3.3.2	การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน.....	44
3.3.3	การผลิตสารแบคทีริโอซินจากเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> TISTR 1401.....	48
3.3.4	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	49
3.4	ผลการทดลองและการวิจารณ์.....	50
3.4.1	การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่.....	50
3.4.2	การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน.....	57
3.4.3	การผลิตและประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์.....	65
3.5	สรุปผลการทดลอง.....	67
3.6	รายการอ้างอิง.....	68
4	การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรี่ในลูกชิ้นไก่.....	72
4.1	บทคัดย่อ.....	72
4.2	บทนำ.....	73
4.3	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	75
4.3.1	การผลิตสารแบคทีริโอซินด้วยเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> TISTR 1401.....	75
4.3.2	การผลิตลูกชิ้นไก่.....	77

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.3	การใช้สารแบคทีเรียโอซินสำหรับการผลิตลูกชิ้นไก่.....	78
4.3.4	การใช้สารแบคทีเรียโอซินร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่สำหรับการ ผลิตลูกชิ้นไก่.....	79
4.3.5	การวิเคราะห์คุณภาพของลูกชิ้นไก่.....	81
4.4	ผลการทดลองและการวิจารณ์.....	81
4.4.1	ผลการใช้สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์เคลือบลูกชิ้นไก่.....	88
4.4.2	ผลการผสมสารแบคทีเรียโอซินในส่วนผสมของลูกชิ้นไก่.....	94
4.4.3	ผลการผสมสารสกัดโรสแมรี่ในส่วนผสมของลูกชิ้นไก่.....	92
4.4.4	ผลการใช้สารแบคทีเรียโอซินร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่สำหรับการ ผลิตลูกชิ้นไก่.....	102
4.5	สรุปผลการทดลอง.....	110
4.6	รายการอ้างอิง.....	110
5	บทสรุป.....	114
	ประวัติผู้เขียน.....	116

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ค่า water activity (a_w) โดยประมาณสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่าง ๆ.....10
2.2	ช่วงของค่า water activity (a_w), pH และอุณหภูมิสำหรับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบางชนิด.....11
2.3	สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก.....20
2.4	สารต้านออกซิเดชันบางชนิดที่นิยมใช้ในอาหาร.....26
3.1	อัตราส่วนผสมของลูกชิ้นไก่.....42
3.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทดสอบ.....53
3.3	ความสามารถยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB ต่อแบคทีเรียทดสอบโดยวัดขนาดวงใส หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm).....59
3.4	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและขนาดวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ.....61
3.5	อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกกับวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ.....62
4.1	สูตรส่วนผสมลูกชิ้นไก่.....77
4.2	ค่า pH ของลูกชิ้นไก่เคลือบแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C.....85
4.3	ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C.....91
4.4	ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C.....97
4.5	ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C.....105

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

3.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่: ลักษณะโคโลนี (A) และ ลักษณะเซลล์ (B).....	52
3.2	วงใสการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ <i>Stap. saprophyticus</i> (A) และ <i>Bacillus</i> spp. strain PN-3 (B) โดยสารแบคทีริโอซิน (CBS) ผลิตจาก LAB: B1= <i>Ped. acidilactici</i> TISTR051, B2= <i>Ped. acidilactici</i> TISTR424, B3= <i>Ped. acidilactici</i> TISTR425, B4= <i>Lb. acidophilus</i> TISTR1338 และ B5= <i>Lc. lactis</i> TISTR1401.....	58
3.3	ความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆของสารแบคทีริโอซิน.....	64
3.4	ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่าง ๆ ของสารแบคทีริโอซิน.....	65
4.1	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	83
4.2	ปริมาณ LAB (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	84
4.3	ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 8$	86
4.4	ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 12$	87
4.5	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	89

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.6 ปริมาณ LAB (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีเรียโอสซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	90
4.7 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีเรียโอสซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 8$	92
4.8 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารแบคทีเรียโอสซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 12$	93
4.9 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	95
4.10 ปริมาณ LAB (Log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A=บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	96
4.11 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 8$	99
4.12 ปริมาณ hexanal ($\mu\text{g/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 6$	100
4.13 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัด	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

	โรสแมรีเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 12$.....	101
4.14	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	103
4.15	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging.....	104
4.16	ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 8$.....	106
4.17	ปริมาณ hexanal ($\mu\text{g/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 4$.....	108
4.18	ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n= 12$.....	109

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันพฤติกรรมการบริโภคอาหารของผู้บริโภคในประเทศไทย และทั่วโลกเปลี่ยนแปลงไปมาก มีการบริโภคอาหารสำเร็จรูปและอาหารแปรรูปต่าง ๆ มากขึ้น ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการขยายตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว กอปรกับผู้บริโภคมีความรู้ความเข้าใจในเรื่องคุณภาพของอาหาร และความปลอดภัยมากขึ้น กลุ่มอาหารประเภทเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นกลุ่มอาหารประเภทหนึ่งที่ทำให้ผู้บริโภคให้ความสนใจในด้านคุณภาพ ความสดใหม่ ความปลอดภัย และคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากตระหนักถึงปัญหาที่จะเกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะอนามัยและไม่ปลอดภัย ซึ่งก่อให้เกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร โรคมะเร็งที่เกิดกับอวัยวะต่างๆในร่างกาย เป็นต้น

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นกลุ่มอาหารที่เสี่ยงต่อการเสื่อมเสียได้ง่าย เนื่องจากเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง มีค่า water activity (a_w) และความชื้นสูง และมีค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ (Borch et al., 1996) โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และทำให้อาหารเสื่อมเสีย การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ซึ่งเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคไม่สามารถยอมรับได้ เช่น การเกิดเมือกที่ผิวหน้า การเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อจากสีแดงเป็นสีเขียว น้ำตาล หรือเทา การเปลี่ยนแปลงของไขมันทำให้เกิดการเหม็นหืน และมีกลิ่นและรสที่ผิดปกติได้แก่ กลิ่นเหม็นเน่า รสเปรี้ยว เป็นต้น (Samelis et al., 2000) จากลักษณะดังกล่าวทำให้อาหารกลุ่มนี้มีอายุการเก็บรักษาสั้น

ในอดีตการผลิตอาหารมักมีการใช้สารกันเสียเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร สารไนเตรทและไนไตรท์เป็นสารเติมแต่งที่ปกติใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีสีแดงน่ารับประทานและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ถ้าใช้มากเกินไปและมีสารไนไตรท์ตกค้าง จะเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง จึงเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แต่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยานี้ได้ด้วยการเติมกรดแอสคอร์บิก (Tannenbaum, 1989) ในประเทศไทยสามารถใช้สารโซเดียมไนไตรท์ได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณไนไตรท์ที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2536) ทั้งนี้สารไนไตรท์ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญได้เช่น *Clostridium botulinum* เมื่อทำการบรรจุ

ผลิตภัณฑ์แบบสุญญากาศ แต่นั่นไม่ใช่เหตุผลหลักในการเติมสารไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ เพราะใช้ไนไตรท์ได้ในปริมาณน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ยังมีความเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อยู่ได้อีก

การใช้สารกันหืนหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เพื่อชะลอการเสียของอาหารเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งทำให้อาหารเกิดการเสื่อมคุณภาพ เกิดกลิ่นหืน อาหารมีสีผิดปกติ กลิ่น รส และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนไป คุณค่าทางอาหารลดลง (สุทธิ ภูมิร, 2544) และอาจมีสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเกิดขึ้นด้วย เนื่องจากการเกิดกลิ่นหืนมักจะมีสารก่อให้เกิดโรคมะเร็ง สารกันหืนสังเคราะห์ที่ใช้นิยมในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่ butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ gallate ทั้งนี้เนื่องจากการวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศได้จัดให้สารกันหืน BHA เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม B2 คือกลุ่มที่น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (ไทยรัฐ, 2547)

แต่ปัจจุบันผู้บริโภคตระหนักถึงอันตรายที่จะได้รับจากสารเคมีสังเคราะห์เหล่านั้น กอปรกับการใส่ใจในสุขภาพ และกระแสของอาหารจากธรรมชาติกำลังมีบทบาทอย่างมาก จึงส่งผลให้มีการแสวงหาสารกันเสียจากธรรมชาติมากยิ่งขึ้น การใช้สารถนอมอาหารที่ได้มาจากธรรมชาติได้แก่ สารสกัดที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่อาจเสื่อมเสียจากเชื้อจุลินทรีย์ และป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ไม่เป็นอันตราย และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น อาหารประเภทที่ผ่านกรรมวิธีการหมักได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ซึ่งเป็นการถนอมนมให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น โดยใช้จุลินทรีย์พวกแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) โดยระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้มีค่า pH ต่ำประมาณ 4.5-5.0 ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์แฮม จากการทดลองพบว่า ค่า pH มีผลต่อรสชาติของแฮมและยังทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่พบในแฮมได้แก่ สารในกลุ่มแบคทีริโอซิน (ปีนมณี ขวัญเมือง, 2546)

บทบาทหนึ่งของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อเกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่มีผลต่อการยับยั้งคือ การสร้างกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดแลคติก และกรดแอซิติก และการลดลงของค่า pH ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไคโอะเซทิล และสารแบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น (Ray and Daeschel, 1992)

สารแบคทีริโอซิน เป็นสารประกอบสายเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเสื่อมเสียเช่น *Bacillus cereus*, *Cl. botulinum*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Cleveland et al., 2001) สารแบค

ทีริโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยสารแบคทีริโอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ แบคทีเรียเป้าหมาย (Hugas, 1998) สารแบคทีริโอซินผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด แต่ที่ได้รับการศึกษากันมากคือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยและใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารมานานแล้ว ในปัจจุบันในจีนเป็นสารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ซึ่งได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO ตัวอย่างการใช้ในจีนในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนย อาหารกระป๋อง เนื้อสัตว์ (Holzapfel et al., 1995) ในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก

สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติพบได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น พืช สมุนไพร สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติที่นิยมใช้และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ได้แก่ วิตามินอี กรดแอสคอร์บิก แคลโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และพืชสมุนไพรเช่น พริกไทยดำ โรสแมรี เสง อบเชย จิง เป็นต้น (นิธิยา รัตนานนท์, 2548) สารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหารส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพวกฟีนอลิกเช่น สารสกัดจากเสถ และโรสแมรี จะพบสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถต้านการเกิดออกซิเดชันได้คือ carnosic acid, carnosol ในสารสกัดจากเสถ และ rosmarinic acid และ rosmanol ในสารสกัดจากโรสแมรี เป็นต้น (Masuda et al., 2002) จากศึกษาของ Iamsa-ard (2005) พบว่า การใช้สารสกัดจากโรสแมรีเติมลงในเนื้อไก่แยกกระดูกแช่เย็นที่ระยะเวลา 3 วัน สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษารุ่นนี้เป็นการศึกษาการใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocins) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับสารสกัดจากโรสแมรี ซึ่งเป็นสารกันเสียที่ได้จากธรรมชาติเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของลูกชิ้นไก่ โดยสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีดังกล่าวมีแนวโน้มสำหรับการนำไปพัฒนา เพื่อใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้สารถนอมอาหารชนิดสังเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลการต้านจุลินทรีย์ของสารแบคทีริโอซิน ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในลูกชิ้นไก่

1.2.2 ศึกษาผลการต้านออกซิเดชัน และการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดโรสแมรีทางการค้าในลูกชิ้นไก่

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพร่วมกันของสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีในการต้านจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต่อคุณภาพการเก็บรักษาของลูกชิ้นไก่

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 การใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocins) สามารถยืดอายุการเก็บโดยลดปริมาณจุลินทรีย์ของลูกชิ้นไก่ได้

1.3.2 การใช้สารสกัดโรสแมรีทางการค้าสามารถยืดอายุการเก็บโดยลดการเกิดออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่ได้

1.3.3 การใช้สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ได้แก่ สารแบคทีริโอซิน ร่วมกับสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ได้แก่ สารสกัดโรสแมรี สามารถเพิ่มประสิทธิภาพต่อการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 แยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกชิ้นไก่ เพื่อใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน

1.4.2 คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซินทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 80°C

1.4.3 การใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ในลูกชิ้นไก่

1.4.3.1 ใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์โดยการจุ่มเคลือบผิวของลูกชิ้นไก่ คัดเลือกระดับการใช้ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดที่ระดับ 1 ระดับ

1.4.3.2 ใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์โดยเติมในส่วนผสมของลูกชิ้นไก่ คัดเลือกระดับการใช้ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดที่ระดับ 1 ระดับ

1.4.4 การใช้สารสกัดโรสแมรีทางการค้า โดยเติมในส่วนผสมของลูกชิ้นไก่ คัดเลือกระดับการใช้ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดที่ระดับ 1 ระดับ

1.4.5 การใช้ร่วมกันระหว่างสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี ในการผลิตลูกชิ้นไก่ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบข้อมูลการผลิตและใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่มีผลด้านการเจริญของจุลินทรีย์ และผลต่อคุณภาพทางเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่

1.5.2 ได้ทราบข้อมูลการใช้สารสกัดโรสแมรี่ทางการค้าเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่

1.5.3 สามารถพัฒนาการใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรี่ทางการค้าเพื่อใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์

1.5.4 ได้เผยแพร่ข้อมูลการวิจัย เพื่อเป็นพื้นฐานในการผลิตและการวิจัยทางผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และการทำวิจัยในแขนงต่างๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

1.6 รายการอ้างอิง

ไทยรัฐ. (2547). สารกันหืนในน้ำพริกเผา [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.nfi.or.th/publication/thairath/thairatch_current266.html.

นิธิยา รัตนปนนท์. (2548). วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2546). แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง. ว.เศรษฐศาสตร์อุตสาหกรรม. ปีที่ 3 ฉ. 1.

สุทธิ ภมรสุมิตร. (2544). เอกสารประกอบการเรียนวิชา Food Additives. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/fad/BHA.htm>.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2536). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมลูกชิ้นเนื้อวัว ลูกชิ้นหมู และลูกชิ้นไก่: มอก.1009-2533. กระทรวงอุตสาหกรรม.

Borch, E., Kant-Muermans, M., and Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Int. J. Food Microbiol.** 33: 103-120.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F.N., and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.

Holzappel, W.H., Geisen, R., and Schilinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocin and food-grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol.** 24: 343-362.

Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci.** 49: 139-150.

- Iamsa-ard, W. (2005). **Potential natural antioxidants utilized in mechanically deboned chicken meat and chicken ball**. M.S. thesis, Silpakorn University, Thailand.
- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Tamura, H., and Yamaguchi, H. (2002). Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. **Agric. Food Chem.** 5: 5863-5869.
- Ray, B., and Daeschel, M. (1992). **Food biopreservative of microbial origin**. CRC Press, Inc. Florida.
- Samelis, J., Kakouri, A., and Rementzic, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. **Food Microbiol.** 17: 329-340.
- Tannenbaum, S.R. (1989). Preventive action of vitamin C on nitrosamine formation. **Int. J. Vitamin and Nutrition Res.** 30: 109-113. [on-line]. Available: <http://cat.inist.fr/aModele=afficheN&cpsidt=6931659>.

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันพฤติกรรมการบริโภคอาหารมีการเปลี่ยนแปลงไปตามยุคโลกาภิวัตน์ ซึ่งคนส่วนใหญ่ต้องการความสะดวก รวดเร็ว และต้องการเก็บรักษาอาหารไว้บริโภคได้นาน ๆ การถนอมอาหารนั้นมีมาตั้งแต่สมัยโบราณ เช่นการรมควันเนื้อสัตว์ การหมักเครื่องดื่มนแอลกอฮอล์ การทำเนยแข็ง เป็นต้น การถนอมอาหาร เป็นการเก็บรักษาอาหารไว้ให้ได้นาน โดยไม่ทำให้อาหารนั้นเกิดการเสื่อมเสีย และยังคงอยู่ในสภาพที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.1 การเสื่อมเสียของอาหาร

การเสื่อมเสียของอาหาร (food spoilage) คือ การที่อาหารมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางเคมีและทางกายภาพ อาหารมีกลิ่น รสชาติ สี และลักษณะเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป ในบางครั้งมีเมือกและแก๊สเกิดขึ้นด้วย (Gram et al., 2002) การเสื่อมเสียของอาหารมีหลายสาเหตุ เช่น เกิดจากการกักตุนของสัตว์ เอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอาหารเอง และจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ เป็นต้น ทำให้เกิดการสูญเสียที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศได้ นอกจากนี้ปัญหาด้านสารพิษที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ไม่ได้คุณภาพหรือไม่ปลอดภัย อาจทำให้เกิดโรคมะเร็งไข้เจ็บต่างๆตามมาภายหลังได้ ดังนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาถึงลักษณะการเสื่อมเสียของอาหาร เพื่อเป็นแนวทางในการบริโภคอาหารต่อไป

อาหารแต่ละชนิดมีการเสื่อมเสียต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารประเภทนั้นๆ ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของการเสื่อมเสียได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ (Russell and Gould, 1991) ดังนี้

1. กลุ่มเสื่อมเสียยาก มีความคงตัวดี มีปริมาณน้ำน้อย เช่น น้ำตาล ถั่ว แป้ง และธัญพืช เก็บได้นานหลายเดือนหรือเป็นปี
2. กลุ่มเสื่อมเสียเร็วปานกลาง มีปริมาณน้ำค่อนข้างมาก เช่น ผัก ผลไม้ ที่แก่เต็มที่ หรือบางชนิดเสียภายใน 1-2 สัปดาห์
3. กลุ่มเสื่อมเสียเร็ว มีปริมาณน้ำมาก เช่น ผัก ผลไม้ นมสด เนื้อสัตว์ อาหารทะเล เสียได้ภายใน 1-2 วัน

2.1.1 สาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร

อาหารเกิดการเสื่อมเสียจากหลายสาเหตุด้วยกัน ซึ่งแต่ละสาเหตุนั้นจะทำให้อาหารมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น มีลักษณะนิ่ม และ เน่า มีเชื้อราขึ้น มีกลิ่นรสที่เปลี่ยนไป มีกลิ่นเน่า กลิ่นเหม็นหืน สีคล้ำขึ้น ซึ่งเกิดจากการถูกกระทำทั้งจากภายในและภายนอกอาหาร ได้แก่ เกิดจากการเก็บเกี่ยว การขนส่ง การบรรจุ ที่เกิดการกระทบกระเทือน ทำให้เกิดการแตกหัก ซ้ำได้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีในอาหาร เอนไซม์ในอาหารทำให้องค์ประกอบภายในอาหารเปลี่ยนแปลงไปเกิดการเสื่อมเสียได้ นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสีย และ สร้างสารพิษในอาหารได้ การเสื่อมเสียของอาหารเกิดจากสาเหตุสำคัญ 2 ประการ (Russell and Gould, 1991) คือ

1. เกิดจากสาเหตุทางเคมี

อาหารเสื่อมเสียที่เกิดจากสาเหตุเคมีส่วนใหญ่นั้น มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหาร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางคุณภาพของอาหาร เช่น ทำให้อาหารนิ่ม สีเปลี่ยน เกิดกลิ่น เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารอาหาร ย่อยน้ำตาล โปรตีน ไขมัน ตัวอย่างการเสื่อมเสียคุณภาพของอาหารที่มีสาเหตุมาจากทางเคมีเช่น การเหม็นหืนของอาหารที่มีองค์ประกอบจำพวกไขมัน การเกิดสีน้ำตาลในผัก ผลไม้ และเนื้อสัตว์ เป็นต้น

2. เกิดจากสาเหตุทางจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ เน่าเสีย และทำให้อาหารเป็นพิษได้ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารจะผลิตเอนไซม์ไปย่อยสลายสารอินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร แล้วนำกลับเข้าสู่เซลล์ เพื่อสร้างเป็นพลังงานให้สามารถดำรงเผ่าพันธุ์ และขยายพันธุ์ต่อไป ทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไป เช่น กลุ่มอาหารประเภทเนื้อสัตว์ องค์ประกอบส่วนใหญ่ คือโปรตีน เมื่อมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ จะเกิดการเน่า มีกลิ่นเหม็น กลุ่มอาหารประเภทแป้งและน้ำตาล จะเกิดการหมัก มีกลิ่นรสเปรี้ยว เป็นต้น

การเสื่อมเสียของอาหารไม่ว่าจะด้วยสาเหตุใดก็ตาม มีผลกระทบอย่างยิ่งในแง่ของสุขภาพ ความปลอดภัยในการบริโภค และทางเศรษฐกิจที่จะต้องสูญเสียเงินตรา ประกอบกับความต้องการในการเก็บอาหารไว้บริโภคนาน ๆ หรือบริโภคนอกฤดูการเก็บเกี่ยว ปัญหาภาวะของผักและผลไม้ล้นตลาด หรือเพื่อการส่งออก เพื่อลดปัญหาดังกล่าวจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาถึงวิธีการถนอมอาหาร

2.1.2 การถนอมอาหาร

การถนอมอาหารมีจุดประสงค์ที่สำคัญคือ ต้องการที่จะเก็บรักษาอาหารไว้ให้นานที่สุด โดยไม่เน่าเสีย ซึ่งสาเหตุที่สำคัญในการเน่าเสียของอาหารคือ จุลินทรีย์ ดังนั้น การถนอมรักษาอาหารด้วยวิธีต่าง ๆ มีหลักการดังต่อไปนี้ (Fellows, 1990)

1. ป้องกันหรือยืดเวลาการย่อยสลายอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ โดยการรักษาให้ปลอดเชื้อ
2. กำจัดจุลินทรีย์ที่มีอยู่ออกไป โดยการล้างหรือกรองออก
3. ลดการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยการใช้อุณหภูมิต่ำ ทำให้แห้ง หรือเก็บอาหารไว้ในสภาวะไร้ออกซิเจน
4. ทำลายจุลินทรีย์ โดยการให้ความร้อน การฉายรังสี
5. ป้องกันหรือยืดเวลาการสลายตัวที่เกิดขึ้นเองของอาหาร โดยการทำลาย หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหารเช่น เติมสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันในอาหาร
6. ป้องกันความเสียหายของอาหารจากการกัดแทะของแมลง และสัตว์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียนั้นมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ซึ่งจะพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และอากาศ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Ray and Daeschel, 1992) ได้แก่

1. องค์ประกอบของอาหาร ชนิดของสารอาหารที่มีมากในอาหารชนิดนั้น ๆ เช่น อาหารประเภทโปรตีน มักเกิดการเน่าเสียจากแบคทีเรีย หรืออาหารจำพวกแป้งมักจะเน่าเสียจากเชื้อราที่ย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ วิตามินก็เป็นตัวช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีด้วย
2. น้ำในอาหาร น้ำเป็นส่วนประกอบหลักของอาหารทุกชนิดโดยอยู่ในรูปอิสระ และเกาะเกี่ยวกับสารอื่น น้ำอิสระเป็นน้ำที่แทรกตัวอยู่ในช่องว่างของอาหาร อาจมีการเกาะตัวกับองค์ประกอบของอาหารบ้าง น้ำสามารถเป็นตัวทำละลายได้ มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมี และจุลินทรีย์สามารถใช้ในการดำรงชีวิตได้ เรียกน้ำอิสระนี้ว่า water activity (a_w) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่า a_w สูง และมีความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลต่ำ (นภาพร เชี่ยวชาญ, 2547) อาหารแต่ละชนิดจะมีค่า a_w ต่างกัน (ตารางที่ 2.1) แบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้อาหารเป็นพิษสามารถเจริญได้ที่ค่า a_w เท่ากับหรือสูงกว่า 0.8 ดังนั้นในการถนอมอาหารต้องลดค่า a_w ในอาหารลงให้ต่ำกว่า 0.8 จึงจะได้อาหารที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค
3. ค่า pH จุลินทรีย์ทุกชนิดจะมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยทั่วไปยีสต์ และรามีความทนทานต่อความเป็นกรดได้ดีกว่าแบคทีเรีย อาหารที่มีความเป็นกรดสูงหรือมีค่า pH ต่ำจะเก็บได้นานกว่าอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ

ตารางที่ 2.1 ค่า water activity (a_w) โดยประมาณสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่าง ๆ

a_w	จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้	ตัวอย่างอาหาร
0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , some yeasts	อาหารเน่าเสียง่ายเช่นอาหารสด อาหาร กระป๋อง ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ปลา ขนมปัง ไส้กรอก อาหารที่มี 4 Oz. sucrose หรือ 7% NaCl
0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>C.</i> <i>botulinum</i> , <i>Lactobacillus</i> , some molds	ชีสบางชนิด เช่น เชดด้า Swiss, Provolone เนื้อหมัก อาหารที่มี 55% sucrose หรือ 12% NaCl
0.87	Many yeasts, <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Hansenula micrococcus</i>	ไส้กรอกหมัก เค้กสปอง dry cheese มา การีน อาหารที่มี 65% sucrose หรือ 15% NaCl
0.80	Most molds, most <i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	น้ำผลไม้เข้มข้นต่างๆ นมข้นหวาน น้ำเชื่อม แป้ง เค้กที่มีน้ำตาลสูง ถั่ว (15- 17% moisture)
0.75	Most halophilic bacteria, <i>Mycotoxigenic</i> <i>aspergilli</i>	แยม แยมผิวส้ม ผลไม้เชื่อม marzipan, marshmallows
0.65	Xerophilic molds, <i>Saccharomyces</i> <i>bisporus</i>	ข้าวโอ๊ตบด 10% moisture เยลลี่ กากน้ำตาล ถั่วต่างๆ
0.60	Osmophilic yeasts, few molds	ผลไม้แห้ง 15-20% คาราเมล น้ำผึ้ง ลูก อม
0.50	No microbial proliferation	เส้นก๋วยเตี๋ยวแห้ง 12% moisture เครื่องเทศ 10% moisture
0.40		Whole egg powder with 5% moisture
0.30		ลูกเกด แครกเกอร์ ขนมปังกรอบ 3-5% moisture
0.03		นมผง 2-3% moisture ชุปผง

ที่มา: ดัดแปลงจาก http://www.foodtechsource.com/rcenter/tech_data/td_water.htm

ตารางที่ 2.2 ช่วงของค่า water activity (a_w), pH และอุณหภูมิสำหรับแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบางชนิด

ชนิดแบคทีเรีย	ค่า a_w ต่ำสุดที่เจริญ	ช่วง pH ที่เจริญ	ช่วงอุณหภูมิที่เจริญ ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Bacillus cereus</i>	0.930	4.3-9.3	4.0-52.0
<i>Clostridium botulinum</i> ชนิด E	0.965	5.0-9.0	3.3-45.0
<i>Clostridium perfringens</i>	0.945	5.0-9.0	10.0-52.0
<i>Escherichia coli</i>	0.935	4.0-9.0	7.0-49.4
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.920	4.4-9.4	-0.4-45.0
<i>Salmonella spp.</i>	0.940	3.7-9.5	5.0-46.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.830	4.0-1.0	7.0-50.0
สภาวะที่สร้างสารพิษ	0.850	4.0-9.8	10.0-48.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.936	4.8-11.0	5.0-44.0

ที่มา: นภาพร เชื้อวชาญ (2547)

4. อุณหภูมิ จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ตามระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต กลุ่ม Thermophilic มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ $35-55^{\circ}\text{C}$ กลุ่ม Mesophilic มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ $10-40^{\circ}\text{C}$ และกลุ่ม Psychrophilic มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ $5-15^{\circ}\text{C}$ ดังนั้นการเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการเก็บอาหารที่อุณหภูมิสูง

เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสถานะในการเจริญแตกต่างกัน ดังนั้นชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร จึงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหรือสถานะการเก็บรักษาของอาหารนั้น ๆ จากช่วงของค่า a_w ค่า pH และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในอาหารบางชนิด (ตารางที่ 2.2) โดยอยู่ในช่วงค่า a_w ประมาณ 0.85 ค่า pH ประมาณ 4.0-9.8 และอุณหภูมิประมาณ $10-48^{\circ}\text{C}$ จากปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้ เป็นเหตุให้ต้องหาวิธีการถนอมอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดังนี้

ก. การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อน ความร้อนจะทำลายจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารได้ แต่ก็ทำให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพไปด้วย การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนอาจแบ่งได้ 3 ระดับ (Fellows, 1990) คือ

1. การใช้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่ไม่รุนแรง โดยอุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่า 100°C เพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารให้นานหลายวันขึ้น เช่น นม น้ำผลไม้ วิธีนี้สามารถใช้ในการถนอมอาหารได้ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และทำลายจุลินทรีย์ที่มีความทนทานต่อความร้อนต่ำเช่น แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ยีสต์ และรา และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณค่าของอาหารน้อยที่สุดได้แก่ low temperature long time (LTLT) เป็นวิธีที่ให้ความร้อนต่ำประมาณ 60°C นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที และ high temperature short time (HTST) เป็นวิธีที่ให้ความร้อนสูงประมาณ 72°C นาน 15 วินาที แล้วทำให้เย็นทันที

2. การใช้ความร้อนระดับสเตอริไลซ์ (sterilization) เป็นการทำให้อาหารปราศจากเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และทำลายจุลินทรีย์ หรือสปอร์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งสามารถเก็บรักษาอาหารที่ผ่านกระบวนการนี้ที่อุณหภูมิปกติและไม่ต้องแช่เย็น โดยความร้อนในการสเตอริไลซ์จะสูงกว่าจุดเดือดคือประมาณ $100-130^{\circ}\text{C}$ วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงเช่น UHT (ultra high temperature) โดยจะใช้อุณหภูมิ $135-150^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1-4 วินาที

ข. การถนอมอาหารโดยใช้ความเย็น เป็นการลดอุณหภูมิของอาหารลงให้ต่ำกว่า 10°C เพื่อให้กระบวนการ metabolism และการเจริญของจุลินทรีย์ รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์เกิดได้ช้าลง จึงเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ชะลอการเน่าเสีย และลดอัตราการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ระยะหนึ่ง สามารถแบ่งระดับการให้ความเย็นได้ 2 ระดับ (Fellows, 1990) ดังนี้

1. การแช่เย็น (chilling) เป็นกรรมวิธีที่ควบคุมอุณหภูมิของอาหารไว้ที่อุณหภูมิ -1°C ถึง 8°C เพื่อลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี และการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์ วิธีนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการ และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสน้อยที่สุด โดยมักจะใช้การแช่เย็นควบคู่กับกรรมวิธีแปรรูปอื่น ๆ เช่น การหมัก การฉายรังสี เป็นต้น

2. การแช่เยือกแข็ง (freezing) เป็นกรรมวิธีการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยส่วนของน้ำจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นผลึกน้ำแข็ง การตรึงน้ำกับน้ำแข็ง และผลจากความเข้มข้นของตัวทำละลายในน้ำที่ยังไม่แข็งตัวจะทำให้ค่า a_w ของอาหารลดลง จุลินทรีย์จึงไม่สามารถนำน้ำมาใช้ในการเจริญได้ สำหรับอาหารที่นิยมแช่เยือกแข็งได้แก่ อาหารทะเลเช่น กุ้ง เนื้อปู และปลา เป็นต้น

ค. การถนอมอาหารโดยการทำให้แห้ง หมายถึง การกำจัดน้ำส่วนใหญ่ที่อยู่ในอาหารออกจากอาหาร ซึ่งจะมีผลให้กระบวนการ metabolism และการเจริญของจุลินทรีย์เกิดได้ช้าลง ทั้งยังเป็นการลดอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (กลิ่นหืน) เนื่องจากปฏิกิริยา hydrolysis (นิธิยา รัตนานนท์, 2548) การทำให้อาหารแห้งสามารถแบ่งได้ 2 วิธี (Fellows, 1990) ดังนี้

2. การทำให้อาหารแห้งโดยอาศัยเครื่องมือทางกล วิธีนี้เป็นการนำหลักการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเข้าช่วย เช่น การใช้แมมเบรน การระเหย และการอบ การทำให้แห้งโดยวิธีกล ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการถนอมอาหารแต่ละชนิด เพื่อให้มีการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อยที่สุด การทำให้แห้งส่วนใหญ่จะอาศัยหลักการนำความร้อน และการพาความร้อน การแผ่รังสี ซึ่งวิธีนี้จะสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ

ง. การถนอมอาหารโดยใช้รังสี การฉายรังสีอาหารเป็นวิธีการถนอมอาหารที่ต้องการเลี่ยงการใช้ความร้อน เนื่องจากความร้อนสามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านประสาทสัมผัสของอาหารนั้น ๆ ได้ รังสีชนิดที่แตกตัวได้ (ionizing radiation) ที่มีช่วงคลื่นสั้น สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของไข่ และตัวอ่อนของแมลงได้ดี ทั้งยังสามารถป้องกันการงอกของผัก และผลไม้ โดยยังคงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส และรสชาติของอาหารได้ดี โดยรังสีที่ใช้ในการถนอมอาหารมี 3 ชนิดคือ รังสีแกมมา (gamma radiation) รังสีเอกซ์ (x-radiation) และอิเล็กตรอนกำลังสูง (high speed electron) (Fellow, 1990)

จ. การถนอมอาหารโดยใช้สารเคมี มีจุดประสงค์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร โดยมีผลยับยั้งการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ สารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แก่ เกลือ น้ำตาล กรดหลายชนิดเช่น กรดฟอสฟอริก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริก สารกันเสียเช่น เกลือไนไตรต์ เกลือไนเตรด เกลือโซเดียมเบนโซเอต สารกันหืน เช่น butylated hydroxyanisol (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG) เป็นต้น

จ. การถนอมอาหารโดยการหมักดอง เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตหรือสารอื่น ภายใต้อาหารที่มีหรือไม่มีอากาศ ซึ่งจะแตกต่างจากการถนอมอาหารอื่นที่มีวัตถุประสงค์ในการทำลายจุลินทรีย์และเอนไซม์ธรรมชาติในอาหาร การหมักดองจะทำให้ pH ของอาหารลดต่ำลง ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเจริญได้ กลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ที่นิยมนำมาใช้ในการหมักคือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. delbruckii* supsp. *bulgaricus*, *Lb. sake* และ *Lactococcus lactis* ยีสต์ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Sac. diastaticus*, *Hansenula sp* และเชื้อราได้แก่ สกุล *Rhizopus sp.* เช่น *Rhi. oryzae*, สกุล *Aspergillus sp.* เช่น *Asp. oryzae*, *Asp. niger* เป็นต้น (Bamforth, 2005; Hugas, 1998)

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั่วไปคือ ดิคลีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทั้งท่อนยาว ท่อนสั้น และกลม ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophilic bacteria) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมคือ กรดแลคติก สามารถเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถทนต่อกรดได้ ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลที่พบได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Stiles and Holzapfel, 1997)

ปัจจุบัน LAB นิยมใช้ในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น แหนม ไส้กรอกหมัก นมเปรี้ยว เนยแข็ง เป็นต้น เนื่องจาก LAB จัดอยู่ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) โดยกิจกรรมหลักของ LAB ในผลิตภัณฑ์อาหารคือกระบวนการหมัก (fermentation) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักได้แก่ กรดแลคติก กรดแอซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเฉพาะ นอกจากนี้บทบาทที่สำคัญอย่างหนึ่งของ LAB ในอาหารหมักพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและเกิดโรคได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรดและการลดลงของค่า pH ที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดอินทรีย์คือ กรดแลคติกและกรดแอซิติกแล้ว นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น และมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารแบคทีริโอซิน เป็นต้น

2.2 สารแบคทีริโอซิน

สารแบคทีริโอซินเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลิเปปไทด์ (polypeptide) โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน จำพวกแบคทีเรียแกรมบวกในวงศ์สกุล *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Clostridium*, และ *Staphylococcus* (Noonpakdee et al., 2003) สารแบคทีริโอซินส่วนใหญ่ผลิตจาก LAB โดย LAB แต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของสารแบคทีริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุลสมบัติทางพันธุกรรม และสมบัติทางชีวเคมี เป็นต้น สารแบคทีริโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่แตกต่างจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยสารแบคทีริโอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผล

ให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย (Cleveland et al., 2001)

การถนอมอาหารแบบกรรมวิธีทางชีวภาพ (biopreservative) โดยใช้สารแบคทีริโอซินมี 4 วิธี ดังนี้

1. การเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เป็นการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินลงไปในอาหาร โดยระหว่างการเจริญเติบโตในอาหารนั้น จะเกิดการผลิตสารแบคทีริโอซิน ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่ควบคุมการผลิตสารแบคทีริโอซินของ LAB นั้น ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่า pH ปริมาณของสารเติมแต่งในอาหาร และเชื้อ LAB นี้ต้องสามารถเจริญแข่งขันกับเชื้ออื่น ๆ ได้อย่างดี เป็นต้น (Ananou et al., 2005; Zhu et al., 2005)

2. การเติมสารแบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin) เป็นการเติมสารแบคทีริโอซินลงในอาหาร ที่ได้จากการผลิตสารแบคทีริโอซินโดยเชื้อ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่งก่อน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งเป็นวิธีการที่มีขั้นตอนผลิตที่ยุ่งยากน้อยกว่าการใช้สารแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ (Zhu et al., 2005)

3. การเติมสารแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ (purified bacteriocin) หรือสารแบคทีริโอซินทำบริสุทธิ์บางส่วน (semi-purified bacteriocin) เป็นการเติมสารแบคทีริโอซินที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปในอาหาร และต้องเติมลงไปปริมาณที่กฎหมายควบคุม (Ananou et al., 2005)

4. การใช้ LAB ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปกติ (mesophiles lactic acid bacteria) เป็นการเติม LAB ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40°C ลงไปในอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (chilling temperature) เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นอันตราย ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพการเก็บรักษาเช่น จากการขนส่ง อุปกรณ์ตู้แช่เย็นมีปัญหา อาจทำให้อุณหภูมิที่เก็บสูงขึ้น โดยที่เชื้อ LAB ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปกติ ที่เติมลงในอาหารจะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ได้ (Ray and Daeschel, 1992)

2.2.1 การจัดกลุ่ม (Classification)

การจัดกลุ่มของสารแบคทีริโอซิน ตามลักษณะของโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุล คุณสมบัติอื่น ๆ เช่น การทนความร้อน สามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มหลัก ๆ (Klaenhammer, 1993; Holzapfel, 1995; Chen and Hoover, 2003; มยุรา ลุนบุตร, 2546) ดังนี้

1. กลุ่ม 1: Lantibiotics

เป็นสารแบคทีริโอซินกลุ่มที่มีสายเปปไทด์ขนาดเล็ก โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุล < 5 kDa. ในสายเปปไทด์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนโดยทั่วไป เช่น lanthionine, α -methyllanthionine, β -methyllanthionine, dehydroalanine และ dehydrobutyrine อยู่

ในโครงสร้าง มีฤทธิ์จำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูง ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งกลุ่มย่อยตามประจุรวมของโมเลกุลออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1 กลุ่ม 1a สายเปปไทด์ยาว (elongated peptides) ประจุรวมเป็นบวก (positive charge) เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการสร้างรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ตัวอย่างของสารแบคทีริโอซินกลุ่มนี้เช่น nisin, lacticin 481, lactocin S, epidemin และ gallidermin เป็นต้น

1.2 กลุ่ม 1b เปปไทด์ขนาดเล็กทรงรูปร่างกลม (smaller globular peptides) มีประจุรวมเป็นลบ หรือไม่มีประจุ การยับยั้งจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับความจำเพาะของเอนไซม์ที่จะใช้ในการทำลายแบคทีเรียเป้าหมาย ตัวอย่างของสารแบคทีริโอซินกลุ่มนี้เช่น mersacidin, cinnamycin, ancovenin, duramycin และ actagardin เป็นต้น

2. กลุ่ม 2: Peptides Bacteriocin

เป็นสารแบคทีริโอซินกลุ่มที่ไม่มีกรดอะมิโน lanthionine อยู่ในสายเปปไทด์ มีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุล <10 kDa. ทนความร้อนได้สูงประมาณ 100-121°C โดยสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

2.1 กลุ่ม 2a เป็นสารแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria* สายเปปไทด์ด้านปลาย N (N-terminal) ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนคือ -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys ตัวอย่างของสารแบคทีริโอซินกลุ่มนี้เช่น pediocin PA-1/AcH, sakacin A, sakacin P, enterocin A, lactococcin MMFII และ divercin V41 เป็นต้น

2.2 กลุ่ม 2b เป็นกลุ่มสารแบคทีริโอซินที่ต้องประกอบไปด้วยสายเปปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 สาย เพื่อใช้ในกิจกรรมการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างของสารแบคทีริโอซินกลุ่มนี้เช่น lactococcin G, lactococcin M, lactacin F, plantaricin A, plantaricin S และ plantaricin EF เป็นต้น

2.3 กลุ่ม 2c เป็นกลุ่มสารแบคทีริโอซินที่มีสายเปปไทด์แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับการสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งสารแบคทีริโอซินบางชนิดอาจต้องลดปริมาณของ cysteine ลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลาย เช่น lactacin B (สุรรัตน์ เงินดวง, 2545) ตัวอย่างสารแบคทีริโอซินที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ acidocin B, carnobacteriocin A, divergin A และ enterocin P เป็นต้น

3. กลุ่ม 3: Protein Bacteriocin

เป็นสารแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพการทำลายไม่ค่อยดี เนื่องจากไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60-100°C ไม่มีกรดอะมิโน Lanthionine มีขนาดใหญ่ น้ำหนักโมเลกุล >30 kDa. เช่น helveticin J, helveticin V-1829 และ caseicin 80 เป็นต้น

4. กลุ่ม 4: Complex Bacteriocin

สารแบคทีริโอซินกลุ่มนี้จะรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต จึงมีส่วนของ glycoprotein หรือ lipoprotein เป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลด้วย ทนความร้อนได้เช่น leuconocin S, Pediocin SJ-1

2.2.2 กลไกการทำงาน (Mode of action)

สารแบคทีริโอซินจัดได้ว่าเป็นสารกันเสียที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้กับอาหารได้หลากหลายประเภท โดยทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียหรือก่อโรคในอาหารได้ ลักษณะการทำงานของสารแบคทีริโอซินคือ ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยการทำลายความสามารถในการยอมให้สารผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์เสียสมดุลไป ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดเสียสมบัติไป หรือไปทำลายสารพันธุกรรมให้แปรสภาพไป ทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายตาย ซึ่งเป็นกลไกการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ทำให้อาหารมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น

การศึกษากลไกการทำงานหรือการทำลายเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายของสารแบคทีริโอซินพบว่า เกิดจากสารแบคทีริโอซินหลาย ๆ โมเลกุลมารวมตัวกันทำให้เกิดรูหรือช่องว่างที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบประเภทฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายตายลงในที่สุด (Ennahar et al., 1999, Ennahar et al., 2000)

การออกฤทธิ์ยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก LAB ต่อแบคทีเรียเป้าหมายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิตสารแบคทีริโอซินของเชื้อ LAB แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการแตกต่างกัน อาทิเช่น

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กันมากในการเลี้ยงเชื้อ LAB เพื่อให้ผลิตสารแบคทีริโอซินคือ MRS medium, M17 medium, brain heart infusion (BHI), synthetic medium และ litmus milk เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาผลของการเติมสารสกัดยีสต์ 3% ลงใน MRS broth ทำให้เชื้อ LAB, *Lactobacillus brevis* OG1 ผลิตสารแบคทีริโอซินได้ปริมาณมากที่สุด (Ogunbanwo et al., 2003a) และ Guerra et al. (2001) ได้ทำการศึกษาผลของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาล ในโตรเจน ฟอสฟอรัส และบัพเฟอร์ในการผลิต nisin ของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 539 และ pediocin ของ *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดในการผลิต nisin ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนกับบัพเฟอร์ และผลของปริมาณน้ำตาลเป็นปัจจัยเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในทางตรงกันข้ามการ

ผลิต pediocin จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงที่สุดขึ้นอยู่กับปริมาณฟอสฟอรัส และบัฟเฟอร์ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจน และน้ำตาลสูงจะลดการสร้าง pediocin ได้

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซิน และมีผลต่อความคงตัวของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตขึ้นมาได้เช่น ประสิทธิภาพการยับยั้งของ lactacin จะดีที่สุดเมื่อสร้างจากสถานะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH อยู่ระหว่าง 5.9-7.0 และถ้าต่ำกว่า 5.9 ประสิทธิภาพการยับยั้งจะลดลง ตรงข้ามกับการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้าง helveticin V-1829 ให้ได้ปริมาณสูงสุดควรเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และสำหรับการผลิต lactacin F ให้ได้ปริมาณสูงสุดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ควรมีค่า pH 7.0 (Muriana and Luchansky, 1993) การเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 เพื่อให้สร้างสารแบคทีริโอซินสูงที่สุดที่ค่า pH 6.5 (Juarez Toma' et al., 2002)

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญของเชื้อ LAB โดยที่อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญของเชื้อเป็นไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกันกับการผลิตสารแบคทีริโอซินที่เพิ่มขึ้นด้วย โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ LAB อยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 30-37°C เชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C เช่นเชื้อ *Lc. lactis* IO-1 หรือ *Lc. lactis* JCM 7638 (Matsusaki et al., 1998) *Ped. pentosaceus* ACCEL (Wu et al., 2004) และ *Lc. salivarius* CRL 1328 (Juarez Toma' et al., 2002) เป็นต้น ส่วนเชื้อ *Lc. pentosus* B96 (Delgado et al., 2005) *Lc. plantarum* F1 และ *Lc. brevis* OG1 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30°C (Ogunbanwo et al., 2003b)

นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้ว ปริมาณการสร้างสารแบคทีริโอซินขึ้นอยู่กับ Phase ของการเจริญ (growth cycle) ของเชื้อที่ผลิต โดยเชื้อ LAB ที่สร้าง helveticin J, helveticin V-1829 และ sakacin A จะสร้างได้ดีในช่วงกลางถึงช่วงปลายของ log phase หลังจากนั้นไปการสร้างจะมีปริมาณลดลง แตกต่างกับเชื้อที่สร้าง lactocin 27 และ lactocin B จะสร้างได้ดีในช่วงต้นของ stationary phase ส่วนเชื้อ streptococci เริ่มสร้างสารแบคทีริโอซินในช่วง exponential phase และหยุดสร้างเมื่อเข้าสู่ในช่วง stationary phase ของ growth cycle (Muriana and Luchansky, 1993) นอกจากนี้พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลานานเกินไป หรือเกินช่วงที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคทีริโอซินที่สร้างได้นั้นอาจถูกทำลายได้ด้วย proteolytic enzymes หรือกรดแลกติกที่สร้างจากเชื้อที่สร้างสารแบคทีริโอซินได้เอง โดยในช่วงท้ายของการเจริญของเชื้อ LAB จะมีการผลิตกรดมากขึ้นเป็นผลให้สารแบคทีริโอซินไม่เสถียรได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Gosaarak (2006) ที่ได้ทำการทดลองในการผลิตสารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 โดยการกำหนดสถานะของการเลี้ยงเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth มีค่า pH เท่ากับ 6.5 ควบคุมให้คงที่ตลอดระยะเวลาการ

หมัก 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C พบว่า สารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 12,800 AU/ml ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง เทียบกับสารแบคทีริโอซินที่ไม่ได้ควบคุมค่า pH ให้คงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 3,200 AU/ml ภายในระยะเวลา 10 ชั่วโมง ดังนั้นการผลิตจากเชื้อ LAB จำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สำหรับเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้การผลิตสารแบคทีริโอซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายมากที่สุดได้

2.2.3 การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Application of bacteriocins produced from LAB)

ในปัจจุบันไนซินเป็นสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* ไนซินจัดเป็น Lactibiotics ที่เป็นส่วนหนึ่งของเปปไทด์ที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ sulfur ระหว่าง alanine กับ alanine เรียกว่า lanthionine และระหว่าง aminobutyric acid (ABA) กับ alanine เรียกว่า β -methyllanthionine สร้างในช่วง logarithmic phase (log phase) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa. มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเช่น Lactococci, Bacilli, Micrococci, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น (Hansen, 1993) โดยไนซินได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO และใช้ในชีสในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนย อาหารกระป๋อง เนื้อสัตว์ ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก สารแบคทีริโอซินมีแนวโน้มสำหรับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมี สารแบคทีริโอซินถูกสร้างจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดแต่ที่ได้รับการศึกษากันมากและมีความปลอดภัยคือ สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ LAB (ตารางที่ 2.3)

Reunanen และ Saris (2004) ได้ศึกษาอายุการเก็บ (shelf life) ของไส้กรอกสุก (cooked sausage) ที่มีการใช้ในชีส และตรวจสอบปริมาณไนซินในไส้กรอกโดยวิธี GFP-fluorescence (green fluorescent protein) พบว่า วิธี GFP- bioassay สามารถตรวจวัดปริมาณของไนซินในไส้กรอก ที่ระดับความเข้มข้นได้อย่างต่ำ คือ 0.9 $\mu\text{g/g}$ และสามารถตรวจพบปริมาณไนซิน 68% จากปริมาณไนซินที่เดิมเริ่มต้น 91% ของไส้กรอกที่เก็บที่อุณหภูมิ 6°C เป็นเวลานาน 28 วัน แสดงว่าไนซิน มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์สูง จึงเหมาะสมสำหรับเป็นสารถนอมอาหารได้

ศิรินาถ หนูเอก (2540) ได้ศึกษาการผลิตสารแบคทีริโอซินในสภาพมีออกซิเจนน้อย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร APT, MRS, BHT และ M17 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ APT และ MRS เหมาะสมในการเจริญ และการสร้างสารแบคทีริโอซินของ LAB และพบว่า *Lactobacillus casei* spp. *Rhamnosus* (SN11) มีการเจริญ และยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยเริ่มต้นที่ pH 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

มยุรา อุณบุตร (2546) ทำการคัดเลือก LAB 17 ไอโซเลท แต่มีเพียง 9 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินจากเนื้อสัตว์และอาหารหมักที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Samonella typhi*, *Proteus vulgaris* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ทนความร้อนได้ 100°C และถูกย่อยสลายได้ด้วย Proteolytic enzyme ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ Bacteriocin Class I และ Class II

ตารางที่ 2.3 สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติก	สารแบคทีริโอซิน
แลคโตบาซิลลัส	เคซีซิน (caseicin) เคอวาซิน (curvacin) บรีวีซิน (brevicin) แพลนทาริซิน (plantaricin) เฟอเมนติซิน (fermenticin) แลคตาซิน (lactacin) แลคโตซิน (lactocin) และเฮลเวติซิน (helveticin)
แลคโตคอคคัส	ไดโพลคอคซิน (diplosocin) นินซิน (nisin) แลคโตคอคซิน (lactococcin) แลคติซิน (lacticin) และแลคโตสเตรปซิน (lactostrepcins)
ลิวโคนอสตอค	คาโนซิน (carnocin) มีเซนเทอโรซิน (mesenterocin) ลิวโคซิน (leucocin) และลิวโคโนซิน (louconocin)
พีดีโอคอคคัส	พีดีโอซิน (pediocin)

ที่มา: วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541

Samelis et al. (1994) ทำการคัดแยก *Lactobacillus sake* จากไส้กรอกหมักแห้งของกรีก และนำมาเลี้ยงใน MRS broth พบว่า สามารถผลิตสารยับยั้งได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารแบคทีริโอซินคือ sakecin B สารแบคทีริโอซินนี้ถูกสร้างขึ้นในช่วงท้าย ๆ ของ log phase (late log phase) มีความเสถียรที่ pH 2-9 ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลานาน 20 นาที และเมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE จะได้น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6.3 kDa

Gill และ Holley (2000) ได้ศึกษาผลการใช้ lysozyme , nisin และ EDTA ในแฮมและโบโลน่าที่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ (inoculated) ได้แก่ *Brochothrix thermosphacta*, *E. coli* O157:H7, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia grimesii* และ *Shewanella putrefaciens* บรรจุแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ 8°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเมื่อนำแฮมและโบโลน่าที่มีและไม่มี การเติม 500 mg/kg lysozyme:nisin (1:3) และ 500 mg/kg EDTA พบว่า การใช้ lysozyme , nisin และ EDTA สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นของ *Bc. thermosphacta* และ *Leu. mesenteroides* ได้ โดยสามารถ

ป้องกันการเจริญของเชื้อ *Bc. thermosphacta* ภายใน 4 สัปดาห์ สามารถลดอัตราการเจริญของ *Lb. curvatus* ภายใน 3 สัปดาห์ สามารถลดอัตราการเจริญของ *Leu. mesenteroides* และ *L. monocytogenes* ภายใน 2 สัปดาห์ และสามารถลดอัตราการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ภายใน 4 สัปดาห์ นอกจากนี้สามารถตรวจพบการเจริญของเชื้อ *Sal. typhimurium* เพิ่มขึ้นหลังจาก 3 สัปดาห์ของการเก็บในแฮมที่มีการเติมสารดังกล่าวมีผลไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม

Noonpakdee et al. (2003) ได้คัดแยก *Lactococcus lactis* WNC 20 ที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินได้จากนม โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ LAB ด้วยกันเองอีกหลายชนิด เมื่อทำการเปรียบเทียบในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายกับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงคือ *Lc. lactis* subsp. *Lactis* DL11 ที่สามารถสร้างไนซิน และการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่ควบคุมการผลิตสารแบคทีริโอซินด้วยเทคนิค PCR พบว่าสารแบคทีริโอซินที่แยกได้นั้น เป็นไนซินชนิดที่เรียกว่าไนซินซี (Nisin Z asparagine)

Castellano et al. (2004) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL705 ที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus sakai* CR L1424 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อที่เก็บแบบสุญญากาศและเชื้อ *Listeria innocua* 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (MRS broth) ภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 8°C ได้ที่ 10 และ 4 วันของระยะเวลาเก็บตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 4°C สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมดภายใน 14 และ 8 วัน ตามลำดับเช่นกัน และเมื่อหาประสิทธิภาพการยับยั้งพบว่า ที่อุณหภูมิ 8°C มีค่าการยับยั้งสูงที่สุดที่ 2130 และ 400 AU/ml ของระยะเวลาการเก็บที่ 10 และ 8 วัน โดยที่อุณหภูมิ 4°C มีค่าการยับยั้งสูงที่สุดที่ 690 และ 30 AU/ml ของระยะเวลาการเก็บที่ 14 และ 10 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเติมสารแบคทีริโอซินลงใน meat batter ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิดได้ที่ 21 วันของการเก็บและมีค่า pH ไม่แตกต่างจากวันแรก แสดงว่าสารแบคทีริโอซินสร้างโดยเชื้อ *Lb. casei* CRL705 สามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารในเนื้อสัตว์ได้

Ananou et al. (2005) ใช้สารแบคทีริโอซิน enterocin AS-48 โดยการเติมเชื้อ *Enterococcus faecalis* A-48-32 ในปริมาณ 10^7 CFU/g และสารแบคทีริโอซินที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน AS-48 ที่ความเข้มข้น 30 หรือ 40 ไมโครกรัมต่อกรัมอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไส้กรอกได้ดี จึงสามารถเติม AS-48⁺ strain ผสมลงในเนื้อที่จะผลิตได้ โดยเชื้อนี้สามารถสร้าง AS-48 ได้มากถึง 76-88 AU/g

Todorov และ Dick (2005) ศึกษาสารแบคทีริโอซิน pediocin ST8 ที่สร้างจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ST18 ที่แยกได้จาก boza ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศบัลแกเรีย

pediocin ST8 มีความสามารถในการยับยั้ง *Pediococcus* spp., *Listeria innocua* และ *Lactobacillus plantarum* ได้ และมีประสิทธิภาพการยับยั้งจะลดลงเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease IV และ pronase แต่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ catalase และ α -amylase นอกจากนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที และมีความเสถียรต่อ pH ตั้งแต่ 2-12 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

Samelis et al. (2005) ได้ทำการศึกษาผลร่วมระหว่าง nisin กับ organic acid และเกลือ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในโบโลน่าหมู (sliced pork bologna) โดยนำแผ่นโบโลน่าจุ่มลงใน 5000 IU/ml nisin ให้ทั่ว และ inoculated เชื้อ *L. monocytogenes* 10^2 - 10^3 cfu/cm² จากนั้นจุ่มลงในสารละลาย organic acid ได้แก่ lactic หรือ acetic acid ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5 g/100 ml ตามลำดับ หรือสารละลายเกลือ ได้แก่ sodium acetate or diacetate ที่ความเข้มข้น 3, 5 g/100 ml และ potassium benzoate or sorbate ที่ความเข้มข้น 3 g/100 ml ตามลำดับ แล้วบรรจุแบบสุญญากาศเก็บที่ 4°C นาน 120 วัน พบว่า เมื่อติดตามผลการเจริญของ *Listeria* ภายใน 10 วัน nisin สามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* จากวันที่ 0 ลงได้ 1.0-1.5 log cfu/cm ต่างกับตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการจุ่มด้วยกรดและเกลือจะมีปริมาณเชื้อที่หลากหลายและเจริญอย่างรวดเร็วกว่าตัวอย่างที่จุ่มด้วย nisin และมีปริมาณ *L. monocytogenes* เพิ่มขึ้นถึง 6-7 logcfu/cm² ในวันที่ 20 และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเชื้อ *listeria* และค่า pH ของตัวอย่าง พบว่า การใช้ nisin ร่วมกับ 3 g/100 ml sodium diacetate เป็นพริทเมนต์ที่สามารถการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในโบโลน่าหมูได้ดีที่สุด

Nieto-Lozano et al. (2006) ทำการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* โดยใช้สารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ในชิ้นเนื้อหมูของประเทศสเปน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น bacteriocin 500, 1000, และ 5000 units/ml (BU/ml) สามารถลดการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* เก็บที่อุณหภูมิ 15°C นาน 72 ชั่วโมง ได้ 1, 2, และ 3 log cycles ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 1000 หรือ 5000 BU/ml เก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลา 21 วัน สามารถลดการเจริญของเชื้อ *Cl. perfringens* ได้ 2.5 หรือ 3.5 log cycles ตามลำดับ

นอกจากนี้สารแบคทีริโอซิน AMA-K ที่สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* AMA-K ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จาก Amasi หรือนมเปรี้ยวหมักแบบ Zimbabwean สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Listeria* spp. โดยสารแบคทีริโอซิน AMA-K มีลักษณะและคุณสมบัติใกล้เคียงกับ pediocin PA-1 (Todorov, 2008) และ Mataragas et al. (2003) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ protective culture จากเชื้อ LABs ที่คัดแยกได้จากไส้กรอก

หมักแห้ง (dry fermented sausages) ในแฮมที่บรรจุแบบสุญญากาศและการตัดแปรรบรยากาศที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าเชื้อ LAB 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* L124 และ *Lactobacillus curvatus* L442 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *L. innocua* ได้ โดยที่ตัวอย่างมีจำนวนเชื้อ *Listeria* ลดลงประมาณ 1.5 log cfu/g

2.3 สารต้านออกซิเดชันในอาหาร (Antioxidants in food)

สารต้านออกซิเดชันหรือสารกันหืน (antirancidity or antioxidants) เป็นสารประกอบที่สามารถลดอัตราเร่งของปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่เกิดการออกซิไดซ์ตัวเอง โดยเฉพาะการยืดระยะเวลาในขั้นเริ่มก่อนปฏิกิริยา (induction period) ในการเกิดการหืน (Sies, 1997)

การหืน (rancidity) ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมคุณภาพ มีสี กลิ่น รส ผิดปกติ และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนไป คุณค่าทางอาหารลดลง และบางครั้งอาจมีสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเกิดขึ้นด้วย การหืนมักจะเกิดกับอาหารพวกไขมัน ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศจะทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นไม่พึงประสงค์ (off flavor) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างไขมันกับออกซิเจนในอากาศนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งจะเกิดได้ 3 แบบ (สุภามาส อินทฤทธิ์, 2547) คือ

1. เกิดจากเอนไซม์ในน้ำมันเอง เช่นในกรณีที่ผลิตน้ำมันโดยใช้การหีบ (บีบคั้นจากพืช) เช่น น้ำมันมะกอก หรือในเนื้อสัตว์ที่มีไขมันสูง เช่น หมูสามชั้น หรือน้ำมัน ซึ่งจะมีเอนไซม์ที่ส่งเสริมการเกิดออกซิเดชันอยู่

2. เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ เพราะในการเจริญเติบโตของเซลล์สิ่งมีชีวิตจะมีกระบวนการย่อยสลายไขมัน เรียกว่า β -oxidation ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นหืนได้

3. เกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้องคือ การสัมผัสกันโดยตรงระหว่างไขมันและอากาศ โดยอาจมีแสงเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยานี้เรียกว่า photochemical auto-oxidation reaction ผลที่ได้จะเกิดสิ่งที่เรียกว่า อนุมูลอิสระ (free radical) ขึ้น ซึ่งอาจสลายตัวต่อไปเป็นสารที่ให้กลิ่นหืนได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันและไขมันมีหลายประการ ดังนี้ (นิธิยา รัตนปณนท, 2548)

1. จำนวนพันธะคู่ หรือพันธะสามที่มีทั้งหมดในน้ำมัน และโครงสร้างของกรดไขมัน โดยโครงสร้างแบบ *cis*-form จะถูกออกซิไดซ์ได้เร็วกว่า *trans*-form ของกรดไขมันที่มีคาร์บอนเท่ากัน

2. ปริมาณออกซิเจน สาเหตุหลักในการเกิดออกซิเดชันเป็นผลมาจากออกซิเจน ดังนั้นถ้าในอาหารมีปริมาณออกซิเจนสูงจะเกิดตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นได้

3. ปริมาณความชื้น ความชื้นที่มีในอาหารเพียงเล็กน้อย สามารถลดอัตราการเกิดออกซิเดชันได้ เพราะว่าความชื้นในปริมาณต่ำสามารถลดอัตราการดูดซึมออกซิเจนในอากาศได้

4. แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) มีผลทำให้การเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าแสงในช่วงการมองเห็น (visible light) เพราะว่ามีพลังงานสูงกว่าทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

5. โลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง สามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้

6. การที่มีสารด้านการเกิดออกซิเดชันโดยธรรมชาติ เช่นวิตามินอี ซึ่งพบได้ในน้ำมันพืชทั่วไป สารเซซามอล (sesamol) และ เซซาโมลิน (sesamol) ที่พบได้ในเฉพาะน้ำมันงา เป็นต้น สารต้านออกซิเดชันที่ใช้ในปัจจุบันมีอยู่หลากหลายชนิด ตารางที่ 2.4 แสดงสารกันหืนที่นิยมใช้กันมากในอาหาร ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการกันหืนที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการเลือกใช้สารต้านออกซิเดชันจึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติเบื้องต้นดังนี้ (Anderson, 2001)

1. ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคทั้งในระยะสั้นและระยะยาว
2. ใช้ในปริมาณน้อยแต่ให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันสูง
3. ใช้ได้สะดวก มีความคงตัวสูง ทนต่อสภาพการแปรรูปอาหาร
4. ทนต่อความร้อนอุณหภูมิสูงได้ดี (carry through)
5. ไม่เกิดการสะสม หรือตกค้างในร่างกายผู้บริโภค
6. ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง

2.3.1 ประเภทของสารต้านออกซิเดชัน (Type of antioxidants)

สารต้านออกซิเดชันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1. สารต้านออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ (สุทธิ ภูมิสมิตร์, 2544; Anderson, 2001; Domingos et al., 2007) หรือสารกันหืนสังเคราะห์มีหลากหลายชนิด แต่ที่นิยมและอนุญาตให้ใช้ในอาหารได้แก่

บิเอชเอ (Butylated hydroxy anisole: BHA)

BHA เป็นวัตถุกันหืนที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทที่มีไขมัน และน้ำมันเป็นส่วนประกอบบิเอชเอที่มีการใช้กันส่วนใหญ่ จะอยู่ในรูปของสารผสม 2- และ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole หรืออาจใช้ร่วมกับ gallate หรือ BHT เพื่อให้ประสิทธิภาพดีขึ้น ประสิทธิภาพในการกันหืนขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นที่ใช้จนถึง 0.02% ซึ่งเป็นระดับสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงกว่านี้ประสิทธิภาพในการกันหืนจะลดลง ในปัจจุบันองค์การวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ ได้จัดให้สารกันหืน BHA เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม B2 คือ กลุ่มที่น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (ไทยรัฐ, 2547)

บีเอชที (Butylated hydroxy toluene: BHT)

BHT เป็นวัตถุกันหืนอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันเช่นเดียวกับ BHA แต่มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย และให้กลิ่นฟินอลเช่นเดียวกัน การใช้มักนิยมใช้ผสมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่น เพื่อเสริมให้ประสิทธิภาพดีขึ้น

แกลเลต (Gallate)

โพรพิล ออคทิล และโคเคซิลแกลเลต เป็นเอสเทอร์ (ester) ของกรดแกลลิก (gallic acid) เป็นวัตถุกันหืนที่มีประสิทธิภาพดี ช่วยป้องกันการเกิดเพอร์ออกไซด์ได้ ประสิทธิภาพจะขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้น

ทีบีเอชคิว (Tertiary Butylated Hydroquinone: TBHQ)

TBHQ เป็นสารประกอบที่อนุญาตให้ใช้ได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา แต่บางประเทศยังไม่อนุญาตให้ใช้ ในประเทศไทยอนุญาตให้ได้ไม่เกิน 200 ppm เป็นชนิดที่ไม่มีกลิ่นไม่มีสี และละลายในน้ำมันได้ดี

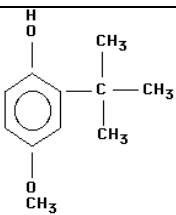
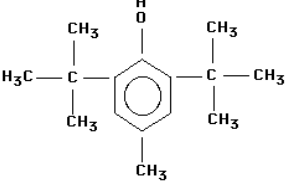
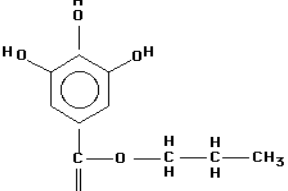
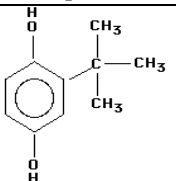
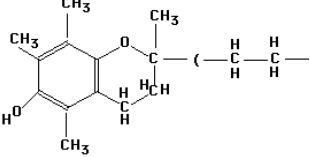
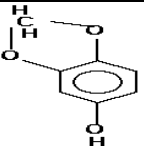
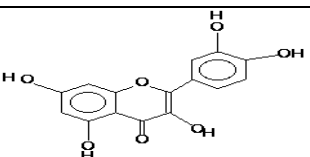
2. สารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ

เป็นสารกันหืนที่พบได้ตามธรรมชาติ อยู่ในส่วนต่างๆของพืช เช่น สมุนไพร เครื่องเทศ ชา กาแฟ ในเมล็ดของพืชน้ำมัน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทพอลิฟินอล (polyphenol) หรือที่กำลังเป็นที่นิยมนั้นมาก คือสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช (plant antioxidants) ชนิดต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารกลุ่มใหญ่มีชื่อเรียกหลายแบบเช่น

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ฟลาวานอล (flavanol) หรือสารกลุ่มฟินอลิก (phenolic) ตัวอย่างเช่น เควอร์เซทิน (quercetin) คาเทชิน (catechins) จากใบชา กรดแกลลิก (gallic acid) ไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic) และเลซิทีน (lecithin) เป็นต้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ยังนิยมนำมาใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ โดยเติมลงในเครื่องสำอางค์ หรือเติมลงในอาหารเสริม เพื่อใช้เป็นสารป้องกันการเกิดมะเร็งอีกด้วย ตัวอย่างสารกันหืนที่นิยมใช้กว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหาร

เช่น โทโคฟีรอล (tocopherol) หรือ วิตามินอี ซึ่งพบมากในจมูกข้าวสาลี ข้าวโพด เป็นสารกันหืนที่มีอยู่ตามธรรมชาติในน้ำมันพืช มีลักษณะเป็นของเหลวชั้นหนืดที่อุณหภูมิ 23°C มีสีเหลืองอ่อนถึงสีน้ำตาล อาจตกผลึกได้ที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าอยู่ในรูปที่บริสุทธิ์จะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ละลายได้ในน้ำมัน ชนิดที่พบในธรรมชาติแบ่งตามโครงสร้างได้แก่ α -Tocopherol พบมากในจมูกข้าวสาลี β -Tocopherol พบมากในข้าวโพด γ -Tocopherol และ δ -Tocopherol โทโคฟีรอลมี ประสิทธิภาพในการกันหืนที่ดีกว่าสารกันหืนชนิดอื่นๆอยู่บ้าง ดังนั้นเวลาใช้มักจะใช้ร่วมกับวัตถุกันหืนชนิดอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2.4 สารต้านออกซิเดชันบางชนิดที่นิยมใช้ในอาหาร

ชนิด	สูตรโครงสร้าง	ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้*	ตัวอย่างอาหาร
1. BHA		0.02%	น้ำมันหมู-พืช มันฝรั่งทอด ขนมปังกรอบ และขนมอบ
2. BHT		0.02%	น้ำมันหมู-พืช มันฝรั่งทอด ขนมปังกรอบ และขนมอบ
3. Propyl Gallate		0.02%	น้ำมันหมู น้ำมันพืช อาหารสัตว์
4. TBHQ		0.2%**	น้ำมันฝ้าย มันฝรั่งทอด คอนเฟิร์ก น้ำมันหมู
5. Alpha tocopherol		0.3%	น้ำมันหมู ขนมอบ มันฝรั่งทอด แครกเกอร์
6. Sesamol		ปริมาณที่เหมาะสม หรือ 0.01%	อาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำมัน
7. Quercitrin		ปริมาณที่เหมาะสม หรือ 0.01%	อาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำมัน

* = เป็นปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหาร โดยคิดเป็นร้อยละของไขมัน

**= เป็นปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ ตามกฎหมายของประเทศไทย

ที่มา : <http://class.fst.ohio-state.edu/fst605/lectures/lect6.html>; Anderson, 2001

กรดแอสคอร์บิก ไอโซเมอร์ของกรดแอสคอร์บิก หรือเกลือของกรดแอสคอร์บิก ได้แก่ โซเดียมแอสคอร์เบต และแคลเซียมแอสคอร์เบต เป็นสารกันหืนที่จัดว่ามีความปลอดภัย เมื่อเติมลง

ไปในอาหารจะทำหน้าที่ในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเป็นตัวถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมจากโมเลกุลไปให้กับออกซิเจนทำให้ออกซิเจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไขมันในอาหารต่อไปได้ (Ibrahim Sallam, 2007)

2.3.2 การใช้สารต้านออกซิเดชันและต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหาร (Application of natural antioxidants and antimicrobial in food products)

ในปัจจุบันนิยมใช้สารต้านออกซิเดชันและต้านจุลินทรีย์ที่ได้มาจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารมากขึ้น โดยเฉพาะอาหารแนวเพื่อสุขภาพซึ่งปราศจากสารเคมี ทำให้มีการศึกษาวิจัยพรรณพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น สมุนไพรจัดเป็นกลุ่มของเครื่องเทศที่นิยมเติมลงไปในอาหาร เพื่อเพิ่มกลิ่นและรสชาติของอาหารให้ดีขึ้น นอกจากนี้พบว่า ในสมุนไพรมีสารประกอบที่มีความสามารถในการเป็นสารกันหืนและสารต้านจุลินทรีย์ได้อีกด้วย ซึ่งสารประกอบในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบฟีนอลิกเช่น ในสารสกัดของโรสแมรี่มี carnosic acid, carnosol และ rosmarinic acid นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในกลุ่มของเครื่องเทศที่ให้กลิ่นหอมได้แก่ พืชตระกูล Labiaiae (กระเพรา) ซึ่งมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้แรงที่สุดโดยเฉพาะ sage และ rosemary เมื่อเปรียบเทียบกับพืชสมุนไพรหรือเครื่องเทศทั่วไป (Richheimer et al., 1996) สอดคล้องกับการศึกษาของ Masuda et al. (2002) และ Inatani et al. (1983) รายงานว่า โรสแมรี่มีคุณสมบัติของการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

การศึกษาใช้สารสกัดโรสแมรี่ในเนื้อบดของ Balentine et al. (2006) โดยการนำสารสกัดโรสแมรี่เติมลงในขั้นตอนการบดเนื้อ แล้วเก็บเนื้อบดไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 144 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) โดยการวิเคราะห์ค่า TBARS วัดค่าสีแดง (a values) และปริมาณ oxymyoglobin ในตัวอย่างเนื้อบดพบว่า ตัวอย่างเนื้อบดที่มีการเติมสารสกัดโรสแมรี่มีค่าสีแดง (a values) และมีปริมาณ oxymyoglobin สูงที่สุด ส่วนค่า TBARS จะมีค่าต่ำเทียบกับตัวอย่างเนื้อบดที่ไม่มีการเติมสารสกัดโรสแมรี่ นอกจากนี้ศึกษาของ Iamsa-ard (2005) พบว่า การใช้สารสกัดจากโรสแมรี่เติมลงในเนื้อไก่แยกกระดูกแช่เย็นที่ระยะเวลา 3 วัน สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างหุ้ดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

น้ำมันหอมระเหยจากพืชธรรมชาติ สามารถใช้เป็นสารกันเสีย เนื่องจากสารประกอบบางตัวในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยมาจากสารประกอบในกลุ่ม terpenoids และ phenolic เช่น thymol, carvacrol และ eugenol เป็นต้น Mounia et al. (2007) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 สายพันธุ์คือ *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 2812 1/2a,

Salmonella typhimurium SL 1344 และ *Staphylococcus aureus* พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดคือ น้ำมันหอมระเหยจาก *Corydothymus capitatus* (ออริกาโนสเปน) *Cinnamomum cassia* (อบเชยจีน) *Origanum heracleoticum* (ออริกาโนกรีก) *Satureja Montana* (savory) และ *Cinnamomum verum* (เปลือกไม้ของต้นอบเชยเทศ) โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ต่ำสุดทั้ง 4 ชนิด $\leq 0.05\%$ และ *S. aureus* เป็นเชื้อที่ไวต่อการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด

Oussalah et al. (2006) ทำการศึกษาผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ 60 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อเกิดการเน่าเสีย โดยทำการหาค่าที่ใช้ในการยับยั้งอยู่ในช่วงความเข้มข้นต่ำที่สุด (minimum inhibitory, MIC) ถึงสูงที่สุด (maximal tolerated concentrations, MTC) คือ 0.003-0.8% (wt/vol) ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด พบว่า น้ำมันหอมระเหยของ *Corydothymus capitatus* มีผลการยับยั้งดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.025% และ MTC เท่ากับ 0.06%

Bhusita et al. (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย 32 ชนิดต่อเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร 4 สายพันธุ์คือ *Salmonella* spp., *E. coli* O157, *Campylobacter jejunii* และ *Clostridium perfringens* พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจาก *Zingiber cassumuna* (ไพล) *Cinnamomum bejolghota* (อบเชยไทย) *Mentha arvensis* var. *piperacens* (สาระแหน่) *Cymbopogon citrates* (ตะไคร้) และ *Ocimum basilicum* var. *citratum* (ใบแมงลัก)

Viuda-Martos et al. (2008) ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในตระกูล Citrus spp. 4 ชนิด คือ lemon oil, mandarin oil, grapefruit oil และ orange oil โดยใช้เชื้อราที่มักปะปนในอาหารได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* และ *Penicillium verrucosum* พบว่า น้ำมันหอมระเหยทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ในความแรงที่ต่างกัน โดย orange oil ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *Asp. niger*, mandarin oil ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *Asp. flavus* และ grapefruit oil ออกฤทธิ์ดีที่สุดต่อ *Pen. chrysogenum* และ *Pen. verrucosum*

Ahna, Gru และ Mustapha (2007) ได้ศึกษาผลของ butylated hydroxyanisole/butylated hydroxytoluene (BHA/BHT) สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (grape seed extract; ActiVinTM), pine bark extract (Pycnogenol[®]) และสารสกัดโรสแมรี่ (oleoresin rosemary; Herbalox[®]) ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงสี และการเกิดออกซิเดชันของเนื้อวัวสุกพบว่า ActiVinTM และ Pycnogenol[®] สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 และ *Salmonella Typhimurium* และ สามารถหน่วงการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Aeromonas hydrophila* มีความคงตัวต่อสีแดงของเนื้อได้นานที่สุด นอกจากนี้ BHA/BHT, ActiVinTM, Pycnogenols[®] และ Herbaloxs[®] ทำ

ให้การเกิดออกซิเดชันในเนื้อต่ำลง โดยมีค่า TBARS ลดลงเทียบกับตัวอย่างควบคุมเท่ากับ 75%, 92%, 94 % และ 92% ตามลำดับ ของระยะเวลาการเก็บ 9 วัน

Romano et al. (2009) ได้ศึกษาผลของสารสกัดโรสแมรี และผลการใช้ร่วมกับ BHA หรือ BHT ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันและต้านจุลินทรีย์ สารสกัดโรสแมรี (RE) ที่สกัดด้วยเมทานอลประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิกคือ carnosic acid (CA), carnosol (COH) และ rosmarinic acid (RA) เท่ากับ 30, 16 และ 5% ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate radical (DPPH) และผลยับยั้งต่อการเจริญของ *E. coli* และ *Stap. aureus* โดยวิธีหาค่า MIC พบว่า RE, RA และ CA สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีเทียบกับ BHA และ BHT และถ้าใช้ RE+BHA จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Stap. aureus* ได้ดีกว่าการใช้ RE เพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้สารต้านออกซิเดชัน และต้านจุลินทรีย์ จากธรรมชาติ ร่วมกับกรรมวิธีถนอมอาหารแบบต่าง ๆ โดยมีความมุ่งหมายให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีอายุการเก็บนานขึ้นหลายวิธีได้แก่ การใช้สารสกัดโรสแมรีและสาร ascorbate กับ citrate ร่วมกับการบรรจุแบบดัดแปรบรรยากาศในเนื้อมด (Lund, Hviid, and Skibsted, 2007) การศึกษาของ Fernandez-Lopez et al. (2005) ใช้สารสกัดจากโรสแมรี ส้ม และมะนาวในลูกชิ้นวัว Estévez et al. (2007) ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยของเสถ และโรสแมรีต่อการเกิดออกซิเดชันในดับเบด และ Bozkurt (2006) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากชาเขียวและน้ำมันหอมระเหยของไทม์ (*Thymra spicata* oil) ในไส้กรอกหมักแห้งของประเทศตุรกี และจากการศึกษาของพิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล (2549) พบว่า สารสกัดจากพืชผักพื้นบ้านของไทยหลายชนิด มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน โดยสารสกัดจากใบผักคัตมีสารประกอบฟีนอลิกหลักคือ collagenic acid สามารถยับยั้งการเกิดกลิ่นหืนในข้าวอบกรอบได้ดีกว่าวิตามินอี เป็นต้น

2.4 เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Meat and meat products)

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นกลุ่มอาหารที่เสี่ยงต่อการเสื่อมเสียได้ง่าย เนื่องจากเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง มีความชื้นสูงถึงร้อยละ 50-75 มีค่า water activity (a_w) มากกว่า 0.99 มีค่า pH 5.4-5.6 และมีธาตุอาหารพวกไนโตรเจน แร่ธาตุและวิตามินที่อุดมสมบูรณ์ จึงเหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียก่อเกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Aeromonas hydrophila*, *C. botulinum*, *Listeria* spp., *Yersinia enterocolitica* และบาง strains ของ *Bacillus cereus*, *E. coli* และ *Vibrio parahaemolyticus* (Marth, 1998)

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตส่วนใหญ่ เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเช่น แหนม หม่า ส้มผัก รวมทั้งไส้กรอกแห้งและไส้กรอกกึ่งแห้งเช่น ซาลามิ เปปเปอร์โรมิ

เป็นต้น แหนมจัดเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยที่มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ในแถบยุโรป เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมูบดละเอียด หนัสมู ขาวสุก กระเทียม และ ส่วนผสมอื่น ๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้ว บรรจุในถุงพลาสติกอาจมีการห่อทับด้วยใบตอง ปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติก เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้ค่า pH ของส่วนผสมลดจาก 6.5-6.6 เป็น 4.5-5.0 ซึ่งการลดลงของค่า pH มีผลต่อรสชาติของแหนม (Adam and Moss, 1995) นอกจากนั้นยังทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อน และก่อโรคในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากสารที่ผลิตจากกลูตาเมต หรือจากแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่น สารกลุ่มสารแบคทีริโอซิน (Noonpakdee, 2003) โดย จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อช่วยให้แหนมมีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ใช้เป็นกลูตาเมตในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในต่างประเทศ นอกจากนั้นบางผลิตภัณฑ์ยังใช้ *Micrococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรดเป็นไนไตรต์ มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนยิ่งขึ้น (สุชาดา อนุตรกุล และคณะ, 2537)

2.4.1 ลูกชิ้น (Meatball)

ลูกชิ้นเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อที่นิยมบริโภคกันสูง สามารถบริโภคได้ทางตรงหรือใช้เป็น ส่วนประกอบของอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น ลูกชิ้นทอด นึ่ง และย่าง ก๊วยเตี๋ยว แกงต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้ มีกำลังผลิตที่สูงในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศไทย การผลิตลูกชิ้นเป็นกรรมวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ผลิตจากเนื้อสัตว์ต่าง ๆ เช่น เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อไก่ และเนื้อปลา เป็นต้น เครื่องเทศหรือสมุนไพร เช่น กระเทียม รากผักชี พริกไทยดำ เครื่องปรุงรส เช่น เกลือ และวัตถุเจือปนอาหารอื่น โดยการนำ บดเนื้อจนละเอียดผสมรวมกับส่วนผสมอื่น ๆ จนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำให้เป็นรูปร่างตามต้องการ ลวกให้สุก ผึ่งลมจนเย็น บรรจุลงถุงพลาสติกทั้งแบบธรรมดา และแบบสุญญากาศ โดยปกติลูกชิ้น ทั่วไปจะมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 2-7 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ในตู้เย็น

การเสื่อมเสียของลูกชิ้นโดยส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และการเกิด ออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งทำให้ลูกชิ้นมีกลิ่นเหม็นหืน สีเปลี่ยนแปลง มีเนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลง มีน้ำ เยิ้ม หรือเกิดเมือกได้ เนื่องจากส่วนประกอบของลูกชิ้นเป็นแหล่งอาหารชั้นเลิศในการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้แก่ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น เชื้อจุลินทรีย์ที่ พบและเป็นปัญหาในลูกชิ้นที่เก็บในตู้เย็น ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีที่ อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic bacteria) ยีสต์และราได้แก่ *Acinetobacter* *Moraxella* group, *Alcaligenes* species, *Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp., เชื้อ *Xanthomonas* spp., เชื้อ

Brochothrix thermosphacta, เชื้อ LAB (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp.), *Carnobacterium* spp., Enterobacteriaceae และ *Pseudomonas* spp. (Marth, 1998; Russo et al., 2006) และนอกจากนี้ ลูกชิ้นที่วางขายหรือเก็บที่อุณหภูมิห้องปกติ อาจพบกลุ่มมีโซไฟล์ (mesophilic bacteria) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียและเกิดอาหารเป็นพิษในลูกชิ้นได้เช่น ในตัวอย่างลูกชิ้นไก่ มักจะพบคือ *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *C. perfringens*, *Bacillus aureus*, Enterobacteriaceae และ *B. cereus* เป็นต้น (Nyati, 2000)

2.5 รายการอ้างอิง

- ไทยรัฐ. (2547). สารกันหืนในน้ำพริกเผา. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.nfi.or.th/publication/thairath/thairatch_current266.html.
- นภาพร เชื้อชาญ. (2547). แบคทีเรียกับความปลอดภัยอาหาร. ว.จารย์พ. 11: 25-30.
- นิธิยา รัตนปนนท์. (2548). วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- พิชญ์อร ไหมสุทิสกุล. (2549). การประเมินศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกในพืชพื้นเมืองของไทยบางชนิด เพื่อใช้เป็นสารกันหืนในอาหาร. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.foodsciencetoday.com/viewContent.php>.
- มยุรา ลุณบุตร. (2546). การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินสารแบคทีริโอซินจากเนื้อสัตว์และอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก. ว.จารย์พ. 45 [ออนไลน์]. ได้จาก: http://library.uru.ac.th/webdb/images/charpa_probio5.html.
- ศิรินาถ หนูเอก. (2540). การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินสารแบคทีริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุชาดา อนุตรกุล, ลักขณา รุจนะไกรกานต์, และไพโรจน์ วิริยจารี. (2537). การพัฒนาผลิตภัณฑ์หมักโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม: ผลของโซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรต์ และเชื้อ *Micrococcus varians* ต่อสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์. เทคโนโลยีชีวภาพกับความหลากหลายทางชีวภาพ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร.

- สุทธิ ภมรสุมิตร. (2544). เอกสารประกอบการเรียนวิชา **Food Additives**. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.techno.msu.ac.th/fn/center/fad/BHA.htm>.
- สุภามาส อินทฤทธิ์. (2547). สารแอนติออกซิแดนท์. *ว.วิทยาศาสตร์*. 58: 156-163. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://scitech.rmutsv.ac.th/majorSci/generalstudy/index5/antioxidants.htm>.
- สุริยรัตน์ เงินดวง. (2545). การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adam, M.R. and Moss, M.O. (1995). **Food Microbiology** (pp. 232-248). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Ahna, J., Gru, I.U., and Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiol.** 24: 7-14.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A., and Valdivia, E. (2005). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Sci.** 71: 549-556.
- Anderson, S. (2001). **Antioxidants** [On-line]. Available: <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects/2001/anderson/antioxidants.htm>.
- Anonymous. (n.d.). **Antioxidants** [On-line]. Available: <http://class.fst.ohio-state.edu/fst605/lectures/lect6.html>.
- Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., and Pohlman, F.W. (2006). The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. **Meat Sci.** 73: 413-421.
- Bamforth, C.W. (2005). **Food: fermentation and micro-organisms**. Ames, Iowa: Blackwell Science.
- Bhusita, W., Siripen, J., Thammathad, S., and Sirinun, T. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**. 76: 233-236.
- Bozkurt, H. (2006). Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Sci.** 73: 442-450.
- Castallano, P.H., Holzapfel, W.H., and Vignolo, G.M. (2004). The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL 705. **Food Microbiol.** 21: 291-298.

- Chen, H., and Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.** 2: 81-100.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F.N., and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noe -Arroyo, F., and Garrido-Ferna, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. **Food Microbiol.** 22: 521-528.
- Domingos, A.K., Saad, E.B., Vechiatto, W.W.D., Wilhelm, H.M., and Ramos, L.P. (2007). The Influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **J. Braz. Chem. Soc.** 18: 416-423.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocin from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **J. Biosci. Bioen.** 87: 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., and Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. **LWT.** 40: 58-65.
- Fellow, P. (1990). **Food processing technology: principles and practice.** New York: Ellis Horwood.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., and Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Sci.** 69: 371-380.
- Gill, A.O. and Holley, R.A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Res. Inter.** 33: 83-90.
- Gosaarak, S. (2006). **Production of bacteriocins by *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and application in pork meatballs.** M.S. thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., and Givskov, M. (2002). Food spoilage: interactions between food spoilage bacteria. **Int. J. Food. Microbiol.** 78: 79-97.
- Guerra, N. P., Rua, M.L., and Pastrana, L. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. **Int. J. Food Microbiol.** 70:267-281.

- Hansen, J.N. (1993). The molecular biology of nisin and its structural analogues. In D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria** (pp 93-119). California: Academic Press.
- Hansen, B. E. (2002). Commercial bacterial starter culture for fermented food of the future. **Int. J. Food Microbiol.** 78:119-131.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., and Schilinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocin and food-grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol.** 24: 343-362.
- Hugas, H.C. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci.** 49: 139-150.
- Iamsa-ard, W. (2005). **Potential natural antioxidants utilized in mechanically deboned chicken meat and chicken ball**. M.S. thesis, Silpakorn University, Thailand.
- Ibrahim Sallam, K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. **Food Control.** 18: 566-575.
- Inatani, R., Nakatani, N., and Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. **Agric. Biol. Chem.** 47: 521-528.
- Juarez Toma', M.S., Bru1, E., Wiese, B.A., de Ruiz Holgado1, A.P., and Nader-Maci', M.E. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. **J. Appl. Microbiol.** 93: 714-724.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-86.
- Lund, M.N., Hviid, M.S., and Skibsted, L.H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. **Meat Sci.** 76: 226-233.
- Marth, E.H. (1998). Extended shelf life refrigerated foods: Microbiological quality and safety. **Food Technol.** 52: 57-62.

- Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., Takeda, Y., Tamura, H., and Yamaguchi, H. (2002). Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic Acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. **Agric. Food Chem.** 5: 5863-5869.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., and Metaxopoulos, J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. **Food Microbiol.** 20: 259-265.
- Matsusaki H., Chinachoti, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1998). Purification, identification, and effective production of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactis* OI-1 (JCM 7638). **Annals of the New York Academy of Sciences.** 864: 422-427.
- Mounia, O., Stephane, C., Linda, S., and Monique, L. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food control.** 18: 414-420.
- Muriana, P.M., and Luchansky, J.B. (1993). Biochemical methods for purification of bacteriocins. In D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria** (pp 41-61). California: Academic Press.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.del.C., and de la Torre, A.H. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. **Meat Sci.** 72: 57-61.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin- producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81: 137-145.
- Nyati, H. (2000). An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products. **Food cont.** 11: 471-476.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A. A. (2003a). Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 179-184.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A. A. (2003b). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 219-227.

- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., and Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Sci.** 73: 236-244.
- Ray, B. and Daeschel, M. (1992). **Food biopreservatives of microbial origin**. Florida: CRC Press, INC.
- Reunanen, J. and Saris, P.E.J. (2004). Bioassay for nisin in sausage; a shelf-life study of nisin in cooked sausage. **Meat Sci.** 66: 515-518.
- Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C., and Bailey, D.T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. **J. Am. Oil chem. Soc.** 73: 507-514.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A., and Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. **Food Chem.** 115: 456-461.
- Russell, N.J., and Gould, G.W. (1991). **Food preservatives**. New York: Blackie.
- Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G., and Villani, F. (2006). Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. **Food Microbiol.** 23: 797-802.
- Samelis, J., Roller, S., and Metaxopoulos, J. (1994). Sakecin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry sausages. **J. Appl. Bacteriol.** 76: 475-486.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A., and Smith, G.C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 °C in vacuum packages. **Lebensm. Wiss. U. Technol.** 38: 21-28.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiol.** 82: 291-295.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1-29.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Process Biochem.** 40: 365-370.

- Todorov, S.D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus planarum* AMA-K isolated from Amasi, A Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian J. Microbiol.** 39: 178-187.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., and Perez-Alvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulate* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food control.** 19: 1130-1138.
- Wu, C.W., Yin, L.J., and Jiang, S.T. (2004). Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. **J. Agric. Food Chem.** 52: 1146-1151.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., and Ahn, D.U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. **Food Scie. Food Saf.** 4: 34-42.

บทที่ 3

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีริโอซิน และแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่

Selection of bacteriocins-producing lactic acid bacteria and indicator bacteria from chicken meatballs

3.1 บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ โดยทำการศึกษา LAB ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินได้ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR051, *Pediococcus acidilactici* TISTR424, *Pediococcus acidilactici* TISTR425 และ *Lactococcus lactis* TISTR1401 โดยใช้เชื้อแบคทีเรียชนิดที่ปนเปื้อนที่แยกและจำแนกได้จากลูกชิ้นไก่เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) สำหรับทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก LAB แบคทีเรียทดสอบที่แยกและจำแนกได้จากลูกชิ้นไก่ประกอบด้วย *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus saprophyticus* และ *Bacillus* ssp. โดยมีจำนวนประชากรของเชื้อที่ปนเปื้อนของแต่ละสายพันธุ์ คือ 3, 12 และ 85% ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารแบคทีริโอซินโดยวิธี agar well diffusion พบว่า cell free supernatant (CFS) ของเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus* ssp. สูงที่สุด มีขนาดของวงใสการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 9.6 และ 22.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ CFS ของ LAB ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Stap. lentus* ได้ สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocins supernatant: CBS) ของเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 มีความเสถียรต่อความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 20 นาที และเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างช่วง pH 2-8 และเมื่อทำให้ CBS ซึ่งมีค่าการยับยั้งเฉลี่ย 5,333.3 AU/ml มีความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า โดยการระเหยน้ำออกด้วย rotary evaporator และการทำให้แห้งโดยวิธีระเหิดแห้ง พบว่าความสามารถการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวชั้นและผงแห้งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,200 และ 6,400 AU/ml ตามลำดับ

3.2 บทนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารทั้งการแปรรูปและการถนอมอาหาร ทำให้ผู้บริโภคสามารถเลือกซื้ออาหารได้หลากหลายชนิดมากขึ้น โดยในการเลือกซื้ออาหาร นอกจากจะพิจารณาจากรสชาติและราคาแล้ว ยังคำนึงถึงคุณค่าทางโภชนาการและความปลอดภัยด้วย อุตสาหกรรมการผลิตอาหารนิยมใช้สารเจือปนในอาหารที่เกินขนาดมาตรฐานกำหนดโดยรู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือการด้วยเจตนา เช่น การใช้สารกันเสีย และการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น อาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษและโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารหรือแม้กระทั่งโรคมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้น เพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค และสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีความพยายามที่หาทางแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และมีการวิจัยค้นคว้าหาและใช้สารกันเสียธรรมชาติทดแทนสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าสารกันเสียที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าได้รับในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน ทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสะดวก และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง คือ การใช้สารต้านแบคทีเรียที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ที่เรียกว่า สารแบคทีริโอซิน (bacteriocins)

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไข่กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นมเช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยวหรือ โยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์เช่นในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมในอาหาร (Hugas and Monfort, 1997) เพื่อให้ผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ยังมีการสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัวเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารไดอะซีทิล (diacetyl) มีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร และมีสารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ สารแบคทีริโอซิน (bacteriocins) ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะ (Hoover and Steenson, 1993; Jack et al., 1995)

ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามใช้สารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร สารแบคทีริโอซินที่ได้ถูกนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร และเป็นที่ยอมรับแล้วว่าเป็นสารที่ปลอดภัย (Generally Regarded As Safe: GRAS) ได้แก่ นิสิน (nisin) ที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* (Reunanen and Saris, 2004) และมีการใช้มากในผลิตภัณฑ์อาหาร

ประเภทเนื้อ ผักบรรจุกระป๋อง เนย นม และโยเกิร์ต เป็นต้น (Reunanen and Saris, 2004; Nieto-Lozano et al., 2002)

สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก (Gram-positive) ได้หลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Staphylococcus aureus* (Ananou et al., 2005), *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Cl. botulinum* เป็นต้น (Ennahar et al., 1999; Cleveland et al., 2001) และอาจจะมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) ได้บ้างเป็นบางชนิด แต่ต้องมีการใช้ร่วมกับสารยับยั้งอื่น ๆ (disodium EDTA) ด้วย เช่น *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. (Sankuntaw et al., 2008; Stevens et al., 1991) นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินบางชนิดสามารถที่จะยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้อีกด้วย (Lavermicocca et al., 2000) การผลิตสารแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกเพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ นั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาถึงปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์นั้น ต้องการสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างสารแบคทีริโอซินแตกต่างกันด้วยได้แก่ องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และระยะเวลาในการหมัก เป็นต้น (Avonts, Uytven, and Vuyst, 2004)

สารแบคทีริโอซินส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอาหาร เนื่องจากอาหารส่วนใหญ่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ตัวอย่างเช่น สารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* สายพันธุ์ Hansen มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงที่ 115°C เป็นเวลานาน 15 นาที โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย *Ped. pentosaceus* Fbb 61 เท่ากับ 4000 BU/ml (Nieto-Lozano et al., 2002) การศึกษาของ Khalid et al. (1999) พบว่า สารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus* strain LC-09 สามารถทนความร้อนได้สูงที่ 100°C เป็นเวลานานถึง 4 ชั่วโมง และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ระดับ pH ต่ำได้อีกด้วย นอกจากนี้ในซันยังมีความสามารถในการทนความร้อนได้สูงที่ 121°C นาน 15 นาที (Noonpakdee et al., 2003) สารแบคทีริโอซินอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้คือ Pediocin ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารที่แช่ในตู้เย็นเน่าเสียได้แก่ *Brochotrix thermosphacta* ที่พบได้ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ที่บรรจุในระบบสุญญากาศและเนื้อหมัก (Ennahar et al., 1999)

นอกจากนี้ Hugas (1998) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อต่าง ๆ ว่า มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้ด้น้อยกว่าการใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากไนซินมี

คุณสมบัติความสามารถในการละลายต่ำ (low solubility) การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ (uneven distribution) และไม่มีความเสถียร (lack of stability)

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์เนื้อในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มักมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์เช่น *Staphylococcus spp.* และ *Bacillus spp.* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermal tolerance pathogenic bacteria) และสามารถสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อความร้อนสูงได้อีกด้วย โดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ยังสามารถเจริญขึ้นได้ แม้จะผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง ซึ่งความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความแห้ง ปริมาณไขมัน และปริมาณเกลือในตัวอย่างอาหารด้วย การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อและสัตว์ปีก โดยทั่วไปขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่เอื้ออำนวยอาทิเช่น องค์ประกอบของสารอาหาร ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (a_w) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และสภาพบรรยากาศในสถานที่เก็บรักษา เป็นต้น ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีอิทธิพลอย่างยิ่งที่จะเป็นตัวกำหนดกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือก่อให้เกิดโรคได้

ในการศึกษานี้มีความคาดหวังว่าจะได้ทราบข้อมูลในการผลิตสารแบคทีริโอซิน เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่ และศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ ตลอดจนสามารถคัดเลือกสารแบคทีริโอซินที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ เพื่อใช้เป็นสารต้านแบคทีเรีย และสามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ให้นานขึ้นได้

3.3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.3.1 การแยกและคัดเชื้อจุลินทรีย์จากลูกชิ้นไก่เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ

3.3.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่

เก็บตัวอย่างลูกชิ้นไก่อายุ 24 ชั่วโมง ที่ผลิตได้จากสูตรที่ดัดแปลงมาจากสูตรมาตรฐานสำหรับลูกชิ้นไก่ของกรมปศุสัตว์ (ตารางที่ 3.1) จำนวน 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ใช้สำหรับเครื่องตีปั่น เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) 225 มิลลิลิตร ตีปั่นในเครื่องตีปั่น (Stomacher Lab-blender model 400, Seward, London, England) นาน 2 นาที ได้ตัวอย่างอาหารเจือจาง 1:10 จากนั้นเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า จนมีความเจือจาง 10^{-7} เท่า ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจางใส่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA agar: Hi-media, Mumbai, India) จานละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อทำ spread plate บ่มเชื้อที่ 37 และ 45°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และที่ 10°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนผสมของลูกชิ้นไก่

Main ingredients	% (w/w)
Chicken breast meat	80
Ice	15
Tapioca starch	5
Total	100
Sub ingredients*	% (w/w)
Salt	1.5
Sugar	0.75
Phosphate	0.3

หมายเหตุ * = ใช้ในปริมาณที่คิดเทียบกับส่วนประกอบหลักทั้งหมด

3.3.1.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นฉีดลากบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA: Merck, Darmstadt, Germany) บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บแยกโคโลนีของแบคทีเรียและทำการเพิ่มจำนวนเชื้อที่แยกได้โดยเก็บโคโลนีเดี่ยวไว้ในหลอดอาหารวุ้นแข็งผิวหน้าลาดเอียง (slant agar) ที่ 4°C และเก็บเป็น stock culture สำหรับใช้ทดสอบคุณสมบัติต่างๆต่อไป ดังนี้

1. ใช้ลวดห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 1 loopful ลงในหลอดอาหารเหลว TSB (tryptic soy broth: Hi-media, Mumbai, India) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. บ่มเชื้อให้เจริญในอาหารเหลว TSB ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
3. นำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลวที่เตรียมด้วยหางนมผง (skim milk powder) ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ใน microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร
4. เก็บเชือนั้นเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -40°C ทันที

3.3.1.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

3.3.1.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์และสปอร์

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแบบแกรมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียมรอย smear ของแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ลงบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแน่นบนแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน ปล่อยให้เย็น หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ชะล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ ล้างน้ำออกด้วย Gram's iodine และหยด Gram's iodine ให้ทั่วรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างรอย smear ด้วยแอลกอฮอล์ (95%) จนหมดสีม่วงของ crystal violet แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย smear ด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วทิ้งให้แห้ง จากนั้นตรวจสอบรูปร่าง โครงสร้าง และการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Olympus, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ศึกษาลักษณะ รูปร่างของ endospore ด้วยการย้อมสีสปอร์โดยเตรียมรอย smear ของแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแน่นบนแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน วางสไลด์บนหลอดรองสไลด์ที่วางบนไอน้ำเดือด หยดสี malachite green ให้ทั่วรอย smear อังบนไอน้ำเป็นเวลา 5 นาที คอยเติมสีไม่ให้แห้ง เมื่อครบเวลานำสไลด์ออกจากไอน้ำเดือดทิ้งให้เย็นแล้วล้างสีออกด้วยน้ำ ย้อมทับรอย smear ด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง แล้วตรวจสอบรูปร่างและโครงสร้างของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.3.1.3.2 การทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง nutrient agar และทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ motility test medium โดยใช้เข็มเจาะเชื้อบริสุทธิ์แล้วแทงลงใน motility test medium ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญที่ 37°C เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจสอบการกระจายของเชื้อจากรอยที่ใส่เชื้อลงไปในการอาหาร

3.3.1.3.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยการเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

3.3.1.3.3.1 การสร้างเอนไซม์ Oxidase

วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 4 ลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด แล้วหยดสารละลาย tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) ลงบนกระดาษ

กรอง ใช้ห้วงเชื้อเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เป็ยกระดาษละลายสำหรับทดสอบ สังเกตดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

3.3.1.3.3.2 การสร้างเอนไซม์ Catalase

ใช้ห้วงเชื้อเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยด สารละลาย hydrogen peroxide (3%) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ สังเกตดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ catalase

3.3.1.3.3.3 การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F test)

ทดสอบ oxidation-fermentation (O-F test) โดยใช้ O-F test medium บรรจุในหลอดทดสอบ และทดลองควบคู่ทั้งหลอดที่ปิดทับผิวหน้าอาหารด้วย Mineral oil ปิดด เชื้อ และไม่ปิดทับผิวหน้าอาหาร ภายหลังการใส่เชื้อ (inoculate) โดยใช้เข็มเย็บปลายตรง (needle) เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ แล้วแทง (stab) ลงในอาหาร ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารและการเกิดแก๊สภายหลังการเจริญ ผลบวกสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและอาจเกิดแก๊ส

3.3.1.3.3.4 การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของระบบ API (bioMérieux)

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบระบบ API (API System; bioMérieux, bioMérieux Inc., Lyon, France) ตามกลุ่มของแบคทีเรีย โดยเตรียม suspension ของ เซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ให้มีความขุ่นตาม turbidity standard ที่สอดคล้องกับข้อแนะนำของผู้ผลิตชุด ทดสอบ และคำนวณตามขั้นตอนที่ระบุไว้ และเทียบผลการทดสอบกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีใน ฐานข้อมูลของระบบ API (bioMérieux) และ/หรือส่งวิเคราะห์ เพื่อจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ทาง ชีวเคมี ด้วยระบบ API ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน

3.3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.3.2.1.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียง กับ LAB ที่มีการศึกษาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทไส้กรอกและลูกชิ้น และมีคุณสมบัติในการ สร้างสารต้านจุลินทรีย์ (Rodriguez et al., 1995; Lunnaboot, 2003; Gosaarak, 2006) ซึ่งได้รับเชื้อ LABs จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เป็น

ลักษณะเชื้อแห้งในหลอดแก้วเพื่อใช้ทดสอบและคัดเลือกทั้งหมด 5 เชื้อ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR051, *Pediococcus acidilactici* TISTR424, *Pediococcus acidilactici* TISTR425 และ *Lactococcus lactis* TISTR1401 ทำการเลี้ยงเซลล์ของ LAB ให้พร้อมสำหรับการใช้ทดสอบความสามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน ดังนี้

3.3.2.1.1.1 การเตรียม LAB จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง

เปิดหลอดแก้วเก็บเชื้อ LAB ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ใช้หลอดแก้วดูดสาร (pasture pipette) ดูดอาหารเหลว MRS (Hi-media, Mumbai, India) ปริมาตรประมาณ 0.3-0.4 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดบรรจุจุลินทรีย์เพื่อละลายสารผสมเซลล์จุลินทรีย์ในหลอด ดูดสารละลายผสมเซลล์จุลินทรีย์หยดลงบนจานวุ้น MRS agar (Hi-media, Mumbai, India) 1 หยด ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อให้กระจายเชื้อ (streak plate) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ส่วนสารละลายผสมเซลล์จุลินทรีย์ที่เหลือถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37°C ใน anaerobic jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่เป็น pure culture บันทึกลักษณะและขนาดของโคโลนี จากนั้นเพิ่มจำนวนเชื้อ โดย streak เชื้อที่เจริญต่ออีกบนวุ้น MRS agar และบ่มเชื้อให้เจริญที่ 37°C ใน anaerobic jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.3.2.1.1.2 การเตรียม Stock culture ของ LAB

ใช้ห้วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อให้เจริญที่ 37°C ใน anaerobic jar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเหลวที่เตรียมจากหางนมผง (skim milk powder) ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บเชื้อเข้าตู้แช่แข็งที่ -40°C ทันที

3.3.2.1.2 แบคทีเรียทดสอบ (Indicator bacteria)

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินได้รับมาจาก 2 แหล่งดังนี้

3.3.2.1.2.1 ใช้แบคทีเรียจาก stock culture ของสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Bacillus cereus* TISTR 687, *Bacillus* sp. TISTR 908 และ *Escherichia coli* TISTR 780

3.3.2.1.2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากลูกชิ้นไก่ 3 สายพันธุ์ (ตามข้อ 3.3.1) ได้แก่ *Stap. lentus* (PN-1), *Stap. saprophyticus* (PN-2) และ *Bacillus* ssp. (PN-3)

3.3.2.2 การทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Well diffusion method

3.3.2.2.1 การเตรียม supernatant ของ LAB

ดัดแปลงการทดสอบจากวิธีของสุริย์รัตน์ เงินดวง (2545), Mogan et al. (1999) และ Nieto-Lozano et al. (2006) โดยถ่ายเชื้อ LAB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว bacteriocin screening medium (BSM) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีการเติม yeast extract (Hi-media, Mumbai, India), glucose (Ajax Finechem, Australia), และ meat extract (Merck, Darmstadt, Germany) อย่างละ 2% (w/w) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ แยกเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Hollywood PK 121R, ALC International srl., Italy) ความเร็ว 12000 x g เป็นเวลา 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (cell-free supernatant, CFS) ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย 1 M NaOH แล้วมากรองแบบปลอดเชื้อผ่าน cellulose acetate syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร (PALL, New York, USA) แล้วเติมเอนไซม์ catalase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin supernatant: CBS) เก็บไว้ในหลอดแก้วปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

3.3.2.2.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกและจำแนกสายพันธุ์ได้จากข้อ 3.3.2.1.2 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมนลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง soft nutrient agar หรือ soft tryptic soy agar ปริมาตร 99 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 45°C ผสมให้เข้ากัน เพื่อให้มีความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเป็น 1×10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.3.2.2.3 การทดสอบผลการยับยั้งของสารแบคทีริโอซิน

ใช้ CBS ที่สร้างจาก LAB ในข้อ 3.3.2.1.1 ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากข้อ 3.3.2.1.2 โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่รองพื้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จานละ 15 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อเจาะรูให้เป็นหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะจานละ 6 หลุม จากนั้นใช้ micropipette ขนาด 40-200 ไมโครลิตร ปิเปต CBS ของเชื้อ LAB ที่เตรียมได้ใส่ลงไปในหลุม ๆ ละ 40 ไมโครลิตร โดยมีกรดแลคติก 5% pH 2.3 เป็น positive control และอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

broth (Hi-media, Mumbai, India) pH 7.0 เป็น negative control วางไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนแห้ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ CBS ที่สร้างจาก LAB ที่มีต่อแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 โดยการสังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

3.3.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน

3.3.2.3.1 ระยะเวลาการผลิตสารแบคทีริโอซิน

ถ่ายเชื้อ LAB แต่ละชนิด ปริมาณ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM broth ปริมาตร 10 มิลลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์ เช่นเดียวกับการเตรียม CBS ของ LAB (ข้อ 3.3.2.2.1) ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ CBS ที่สร้างจาก LAB ที่มีต่อแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 โดยการสังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.3.2.3.2 อุณหภูมิการผลิตสารแบคทีริโอซิน

ถ่ายเชื้อ LAB แต่ละชนิด ปริมาณ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM broth ปริมาตร 10 มิลลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 45°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ เช่นเดียวกับการเตรียม CBS ของ LAB (ข้อ 3.3.2.2.1) ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 โดยการสังเกต และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.3.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ

Lactococcus lactis TISTR1401

นำสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 ได้ดีที่สุด มาทดสอบคุณสมบัติดังนี้

3.3.2.4.1 ความเสถียรต่อความร้อน

ใช้ micropipette ปิเปตสาร CBS ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร วางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath: GP-400, Neslab instruments, Newington, USA) ที่ระดับอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 100°C เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ทดสอบความสามารถของ CBS ที่ผ่านการให้ความร้อนต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth pH 7.0

เป็น negative control ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง โดยการสังเกต และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.3.2.4.2 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ใช้ CBS ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 5 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0 และ 14.0 ด้วยเครื่องวัด pH (718 STAT Titrino, Metrohm, Ireland) โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N NaOH เป็นตัวปรับค่า pH จากนั้นทดสอบความสามารถของ CBS ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 โดยการสังเกต และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นโดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth pH 7.0 เป็น negative control ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง (Ogunbanwo et al., 2003)

3.3.3 การผลิตสารแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR1401

3.3.3.1 การเตรียมสารแบคทีริโอซินแบบปกติ

ถ่ายเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ปริมาณ 10% ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BSM ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 12000×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatants) ปรับความเป็นกรดต่าง (pH) ด้วย 1 M NaOH ให้มี pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นเติมเอนไซม์ catalase ใน cell-free supernatant (CSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที (Nieto-Lozano et al., 2005) กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ cellulose acetate membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และ/หรือทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave (LABO Autoclave, Sanyo, NB Scientific, Edison, N.J.) ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที (Gosaarak, 2006) ได้สารแบคทีริโอซิน (CBS) ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ 2 วิธีคือ การกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ (filtered crude bacteriocin supernatant: **FCBS**) และการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (heated crude bacteriocin supernatant: **HCBS**) เก็บตัวอย่าง CBS ทั้ง 2 ตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการผลิตลูกชิ้นไก่ต่อไป

3.3.3.2 การเตรียมสารแบคทีริโอซินแบบเข้มข้น

3.3.3.2.1 การเตรียมสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวเข้มข้น

ทำให้ CBS ที่เตรียมได้ตามข้อ 3.3.3.1 มีความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า โดยใช้ CBS 250 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask ปลอดเชื้อ ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40-60°C เวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง เก็บสารแบคทีริโอซินชนิดระเหยเข้มข้น (concentrated crude bacteriocin: **CCB**) ที่ได้ในรูปของเหลวเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.3.2 การเตรียมสารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง

ทำให้ CBS ที่เตรียมได้ตามข้อ 3.3.3.1 แห้งด้วยเครื่อง freeze drying โดยใส่ CBS 100 มิลลิลิตร ใน round bottom flask ปิดดเชื้อ ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วกลิ้ง flask ในไนโตรเจนเหลว ให้ CBS มีลักษณะแข็งเป็นชิ้นบาง ๆ รอบ ๆ กันขวด แล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิเยือกแข็ง -20°C นาน 12 ชั่วโมง นำเข้าเครื่องระเหิดแห้ง freeze dryer (LYOVAC GT2, GEA Lyophil GmbH) จนกระทั่ง CBS มีลักษณะเป็นของแข็งแห้ง โดยใช้เวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง เก็บสารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins: **FDCB**) บรรจุลงถุงในระบบสุญญากาศ เก็บไว้ใน desiccator cabinet ที่อุณหภูมิ 4°C

3.3.3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน

ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของ CBS ที่เตรียมได้ในรูปต่าง ๆ ในหน่วยของ Arbitrary Unit (AU/ml) ด้วยวิธี agar well diffusion ก่อนใช้เดิมในการผลิตลูกชิ้นไก่ โดยเจือจาง CBS ที่เตรียมได้ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ระดับความเจือจางลดลงในช่วง 2 ระดับ (two-fold serial dilution) คือ 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 เท่า (A) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร (B) หยดลงในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy soft agar หรือ Nutrient soft agar ขนาด 6 มิลลิเมตรของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ PN-2 และ PN-3 บ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ คำนวณค่า AU/ml จากความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดวงใสของการยับยั้ง คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หาค่าด้วยปริมาตร CBS ที่ใช้ (นิธินาถ หนูเอก, 2539) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Arbitrary Unit} = \frac{1000\mu\text{l} \times A}{B\mu\text{l}}$$

3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS institute, Inc., 1995) สำหรับทุกการวิเคราะห์

3.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

3.4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่

3.4.1.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่

จากการเก็บตัวอย่างลูกชิ้นไก่อายุ 24 ชั่วโมง จากการผลิตเสร็จ 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ เป็นจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยแยกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่สภาวะการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45, 37 และ 10°C เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ปนเปื้อนมาก (dominant flora) ในตัวอย่างลูกชิ้น ได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 3 isolates คือ PN-1, PN-2 และ PN-3 ซึ่งปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนคิดเป็น 3%, 12% และ 85% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) โดยทั้ง 3 isolates สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิการบ่มเชื้อที่ 37 และ 45°C ภายในระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับอุณหภูมิการบ่มเชื้อที่ 10°C ที่มีเฉพาะ PN-2 และ PN-3 ที่สามารถเจริญได้ แต่ต้องใช้เวลาจนถึง 48 ชั่วโมง แสดงว่ากลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในลูกชิ้นไก่ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม mesophile

กลุ่มจุลินทรีย์ mesophile เป็นกลุ่มที่สร้างความเสื่อมเสียแก่อาหารได้มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-45°C โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีบทบาทตั้งแต่กระบวนการผลิต ขนส่ง และการจัดเก็บ (Borch et al., 1996; George-John et al., 2008) เชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนได้บ่อยได้แก่ Salmonella และ Staphylococcus เป็นต้น (Chris, 2008)

3.4.1.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

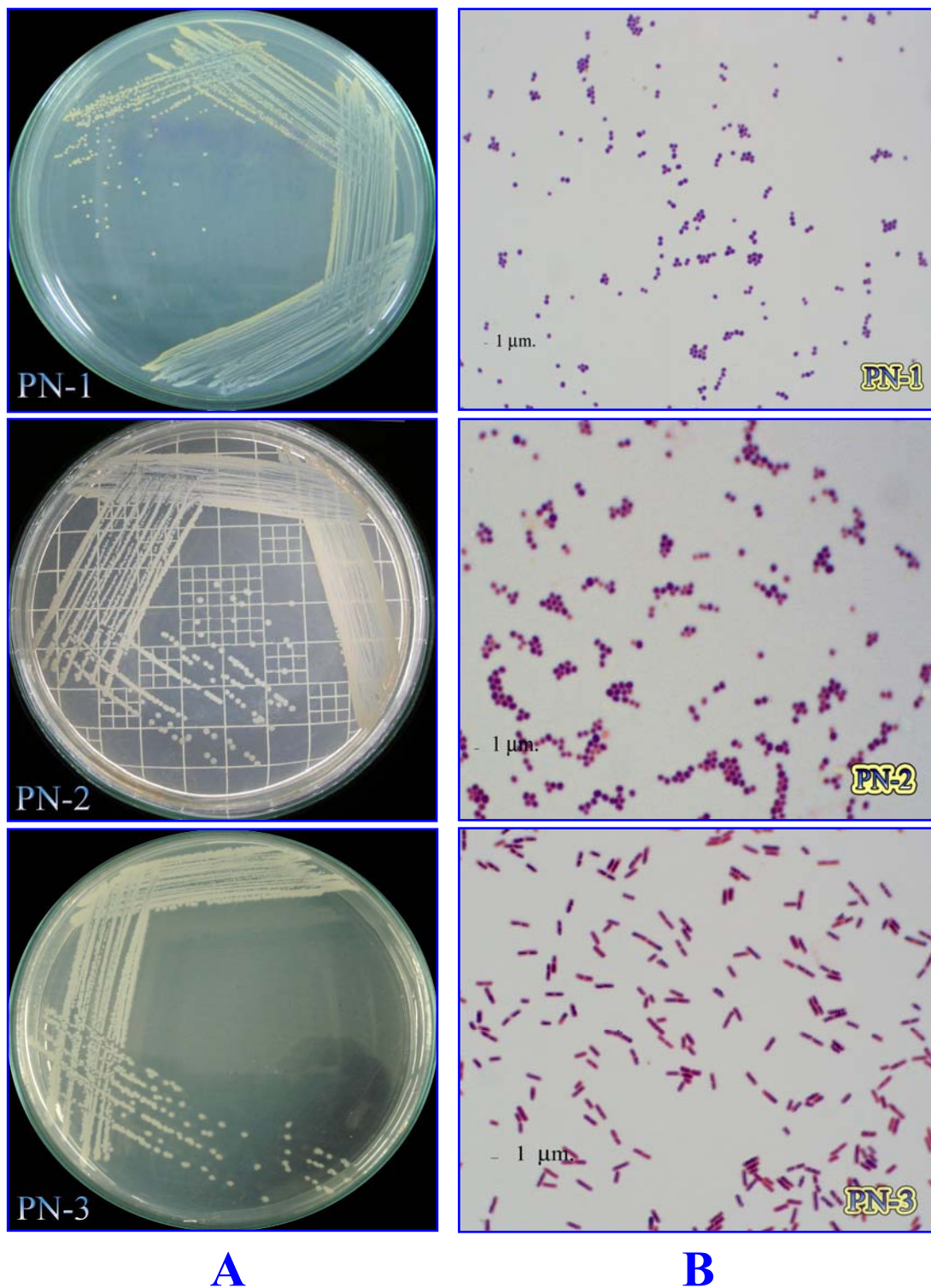
ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อทั้ง 3 isolates พบว่า ลักษณะโคโลนีของ PN-1 และ PN-2 มีลักษณะคล้ายคลึงกันในด้านขนาด รูปร่าง ระดับความนูน และขอบริมของโคโลนีคือ มีขนาดเล็ก (1-2 mm.) รูปร่างกลม โคนูน และมีขอบริมเรียบ แต่ PN-1 และ PN-2 มีความแตกต่างกันในด้านสีคือ สีเหลือง และสีขาว ตามลำดับ ส่วน PN-3 มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจาก PN-1 และ PN-2 คือ มีขนาดใหญ่กว่า (2-3 mm.) รูปร่างกลมรี มีความโคนูนน้อยกว่า สีขาวแกมเหลือง และมีขอบริมหยักเล็กน้อย ลักษณะเซลล์ของ PN-1 และ PN-2 มีรูปร่างเซลล์กลม มีการเรียงตัวเป็น Tetrads ส่วน PN-3 มีรูปร่างเซลล์แท่ง มีการเรียงตัวเป็น Pairs ตัวอย่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์แสดงในรูป 3.1A และ 3.1B ตามลำดับ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแต่ละ isolate มีความแตกต่างกันในรายละเอียดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 3.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของทั้ง 3 isolates ในการเคลื่อนที่ และการสร้างเอนไซม์บางชนิดพบว่า เชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate มีความสามารถแตกต่างกัน เชื้อแบคทีเรียทุก isolates ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase PN-1 และ PN-2

สามารถเจริญได้ดีในทั้งสภาวะอากาศที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ส่วน PN-3 สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอากาศที่มีออกซิเจน และมีการเจริญได้บ้างเล็กน้อยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase พบว่า มีเพียง PN-1 ที่สามารถสร้างได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่ โดยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม ด้วยชุดทดสอบระบบ API ซึ่งเป็นการศึกษา fermentative metabolism ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยสามารถจัดกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย PN-1 และ PN-2 ที่มีลักษณะเซลล์เป็น cocci ติดสีแกรมบวก และเมื่อทดสอบด้วย OF medium ให้ผลเป็นบวก, บวก (O+F+) ทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STAPH ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้จัดจำแนกกลุ่ม Staphylococcus สำหรับ PN-3 มีลักษณะเซลล์เป็น rod ติดสีแกรมบวก มีการสร้าง endospore ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และเมื่อทดสอบด้วย OF medium ให้ผลเป็นลบ, ลบ (O-F-) การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH/B ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ใช้จำแนกกลุ่มของ Bacillus พบว่า ชุดทดสอบ API STAPH สามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียเป็นที่น่ายอมรับได้ โดยเชื้อ PN-1 มีความใกล้เคียงกับ *Stap. lentus* มีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (% ID) เท่ากับ 90.8% และเชื้อ PN-2 มีความใกล้เคียงกับ *Stap. saprophyticus* มีเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (% ID) เท่ากับ 87.9% แตกต่างกับเชื้อ PN-3 ที่วิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH/B (อ้างอิงผลวิเคราะห์จาก วว.) ที่ไม่สามารถระบุชื่อและสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ เนื่องจากให้ผลไม่ชัดเจนในกลุ่มของ Bacillus

จากผลการศึกษาการแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่ เพื่อคัดเลือกเป็นแบคทีเรียทดสอบนั้น ได้แก่ *Stap. lentus* (PN-1), *Stap. saprophyticus* (PN-2) และ *Bacillus spp.* (PN-3) โดยใช้แบคทีเรียทดสอบทั้งหมดเป็นดัชนีบ่งชี้ผลการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกได้



รูป 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่: ลักษณะโคโลนี (A) และลักษณะเซลล์ (B)

ตารางที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทดสอบ

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Viable cell population	3%	12%	85%
Growth at temperature:			
10°C	-	+	+
37°C	+	+	+
45°C	+	+	+
Colony:			
Color	Yellow	White	White- yellow
Form	Circular	Circular	Spindle
Size(mm.)	1-2	1-2	2-3
Margin	Entire	Entire	Undulate
Surface	Smooth	Smooth	Smooth
Elevation	Convex	Convex	Raised
Cell:			
Shape	Cocci	Cocci	Rod
Size (µm)	0.79	0.68	2.66/0.69
Gram stain	+	+	+ ve
Arrangement	Pairs/Tetrads	Tetrads	Pairs
Endospore	-	-	+
Motility	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Catalase	-	+	+
O-F test	+,+	+,+	-, -
Aerobic growth	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Fermentative production of acid from:			
Glycerol	ND	ND	-

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของ
แบคทีเรียทดสอบ

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Fermentative production of acid from:			
Erythritol	ND	ND	-
D-arabinose	ND	ND	-
L-arabinose	ND	ND	-
D-ribose	ND	ND	-
D-xylose	+	-	-
L-xylose	ND	ND	-
D-adonitol	ND	ND	-
Methy- β D-xylopyranoside	ND	ND	-
D-galactose	ND	ND	-
D-glucose	+	+	-
D-fructose	+	-	-
D-mannose	+	-	-
L-sorbose	ND	ND	-
L-rhamnose	ND	ND	-
Dulcitol	ND	ND	-
Inositol	ND	ND	-
D-mannitol	+	+	-
D-sorbitol	ND	ND	-
Methyl- α D-mannopyranoside	ND	ND	-
Methyl- α D-glucopyranoside	ND	ND	-
N-acetylglucosamine	+	+	+
Amygdaline	ND	ND	-
Arbutine	ND	ND	-
Esculine ferric citrate	ND	ND	-

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของ
แบคทีเรียทดสอบ

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Fermentative production of acid from:			
Salicine	ND	ND	-
D-cellobiose	ND	ND	-
D-maltose	ND	ND	-
D-lactose (bovine origin)	ND	ND	-
D-melibiose	+	-	-
D-saccharose (sucrose)	+	+	-
D-trehalose	+	+	-
Inuline	ND	ND	-
D-melezitose	ND	ND	-
D-raffinose	ND	ND	-
Amidon (starch)	ND	ND	-
Glycogen	ND	ND	-
Xylitol	+	-	-
Gentiobiose	ND	ND	-
D-turanose	ND	ND	-
D-lyxose	ND	ND	-
D-tagatose	ND	ND	-
D-fucose	ND	ND	-
L-fucose	ND	ND	-
D-arabitol	ND	ND	-
L- arabitol	ND	ND	-
Potassium gluconate	ND	ND	-
Potassium 2-ketogluconate	ND	ND	-
Potassium 5-ketogluconate	ND	ND	-

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทดสอบ

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Fermentative production of acid from:			
Maltose	+	+	ND
Lactose	+	+	ND
Potassium nitrate	+	-	ND
β -naphthyl-acid phosphate	+	-	ND
Sodium pyruvate	+	-	ND
Raffinose	+	-	ND
α -methyl-D-glucoside	+	-	ND
Arginine	+	-	ND
Urea	-	+	ND
Identification result according to biochemical characteristics			
Closest relative	<i>Stap. lentus</i>	<i>Stap. saprophyticus</i>	<i>Bacillus</i> spp.
Identity (%)	90.8	87.9	ND

^a = API system (API STAPH for cocci belonging to genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*; API 50 CH/B for bacilli having spores; bioMérieux(จากการส่งวิเคราะห์ที่ วว.))

+ = Positive test

- = Negative test

ND = Not detect

+ ve= Gram positive bacteria

- ve= Gram negative bacteria

3.4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน

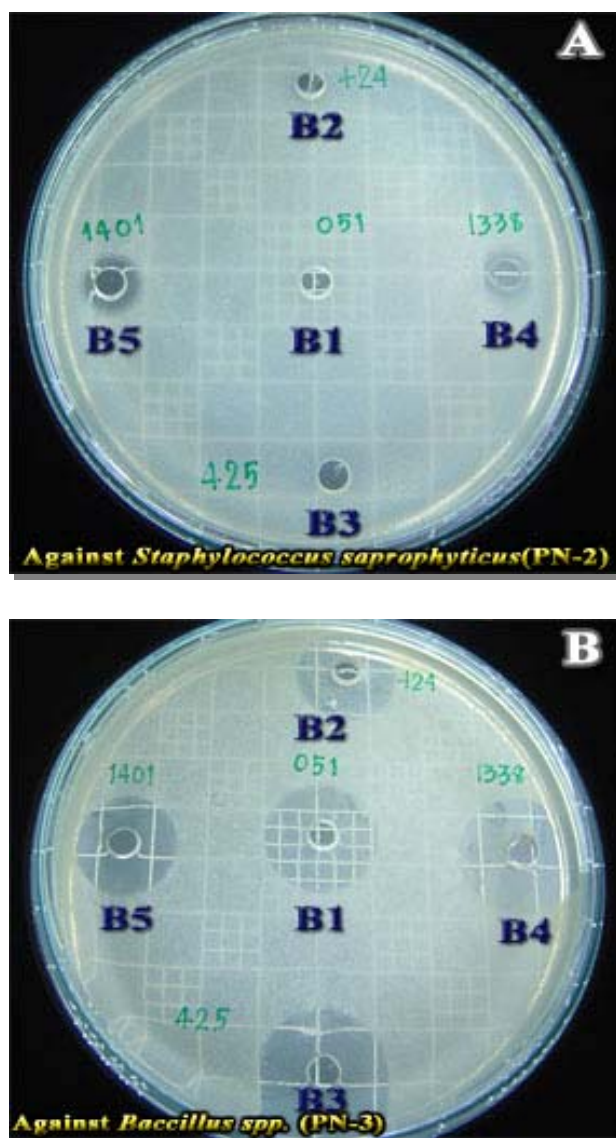
3.4.2.1 การทดสอบการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ

ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ LAB จาก 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Ped. acidilactici* TISTR051, *Ped. acidilactici* TISTR424, *Ped. acidilactici* TISTR425, *Lb. acidophilus* TISTR1338 และ *Lc. lactis* TISTR1401 ที่มีความสามารถผลิตสารแบคทีริโอซิน เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด เชื้อทดสอบประกอบด้วย *Stap. lentus*, *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* strain PN-3 ที่คัดเลือกได้จากลูกชิ้นไก่ และเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Stap. aureus* TISTR 118, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* TISTR 687, *Bacillus sp.* TISTR 908 และ *E. coli* TISTR 780 ได้จากห้องปฏิบัติการพบว่า LAB 2 สายพันธุ์คือ *Lb. acidophilus* TISTR1338 และ *Lc. lactis* TISTR1401 ที่ให้ผลการทดสอบดีมาก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* strain PN-3 ที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่ได้ดีที่สุด

เมื่อสังเกตวงใส (clear zone) ของการยับยั้งการเจริญของสาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ LAB ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* strain PN-3 แสดงดังรูป 3.2 และตารางที่ 3.3 พบว่า สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีที่สุดโดยเกิดวงใสขนาด 9.6 และ 22.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR1338 โดยเกิดวงใสขนาด 7.8 และ 21.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ แตกต่างกับสาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Ped. acidilactici* TISTR051, *Ped. acidilactici* TISTR424 และ *Ped. acidilactici* TISTR425 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นคือ *Bacillus spp.* strain PN-3

และจากตารางที่ 3.3 แสดงประสิทธิภาพของ CBS ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 8 สายพันธุ์พบว่า สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบมากที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อได้มากถึง 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Stap. saprophyticus*, *Bacillus spp.* strain PN-3, *Stap. aureus* TISTR 118, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* TISTR 687 และ *Bacillus sp.* TISTR 908 รองลงมาคือ สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR1338 โดยให้ผลยับยั้งต่อเชื้อเพียง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 จึงเป็นเชื้อ LAB ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารแบคทีริโอซิน เพื่อใช้ต้านแบคทีเรียแกรมบวก (Stecchini et al., 1992) ส่วนมากที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบทั่วไปที่มีแกรมบวกของ nisin ที่สร้างโดยเชื้อ *Lc. lactis* strain จากไส้กรอกหมักแห้ง (Rodriguez et al., 1995) และงานวิจัยของ Gosaarak (2006) พบว่า เชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus sp.* TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B.*

subtilis TISTR 008, *Lb. sake* TISTR 911, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Ped. acidilactici* TISTR 051, *Lb. plantarum* และ *Stap. aureus* TISTR 118 เป็นต้น



รูป 3.2 วงใสการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Stap. saprophyticus* (A) และ *Bacillus* spp. strain PN-3 (B) โดยสารแบคทีริโอซิน (CBS) ผลิตจาก LAB: B1= *Ped. acidilactici* TISTR051, B2= *Ped. acidilactici* TISTR424, B3= *Ped. acidilactici* TISTR425, B4= *Lb. acidophilus* TISTR1338 และ B5= *Lc. lactis* TISTR1401

ตารางที่ 3.3 ความสามารถยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB ต่อแบคทีเรียทดสอบ โดยวัดขนาดวงใส หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm).

Indicator bacteria	Average diameter of inhibition zone (mm.) of indicator bacteria				
	<i>Ped.</i>	<i>Ped.</i>	<i>Ped.</i>	<i>Lb.</i>	<i>Lc. lactis</i>
	<i>acidilactici</i>	<i>acidilactici</i>	<i>acidilactici</i>	<i>acidophilus</i>	
	TISTR	TISTR	TISTR	TISTR	TISTR
	051	424	425	1338	1401
<i>Stap. lentus</i>	-	-	-	-	-
<i>Stap.</i>	-	-	-	7.8	9.6
<i>Saprophyticus</i>					
<i>Bacillus spp.</i>	19.3	18.9	19.5	21.0	22.5
<i>Stap. aureus</i>	-	-	-	6.1	10.5
TISTR 118					
<i>Bac. subtilis</i>	-	-	-	-	15.3
TISTR 008					
<i>Bac. cereus</i>	-	-	-	-	15.0
TISTR 687					
<i>Bacillus sp.</i>	-	-	-	-	17.0
TISTR 908					
<i>E. coli</i> TISTR	-	-	-	-	-
780					

- = ไม่เกิดวงใส

3.4.2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน

การศึกษานี้เหมาะสำหรับการผลิตสารแบคทีริโอซิน ที่มีประสิทธิภาพด้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม LAB มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน เป็นต้น ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลทำ

ให้สารแบคทีเรียโอซินมีคุณภาพและประสิทธิภาพแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Li et al., 2002; Avonts, Uytven, and Vuyst, 2004; Todorov, 2008)

ดังนั้นจึงทำการศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิการเจริญของเชื้อ LAB ที่ใช้ทดสอบที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน เพื่อใช้ประกอบการคัดเลือก LAB ที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่ให้ผลทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบดี และเป็นสภาวะที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับ LAB ที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดี แสดงผลดังตารางที่ 3.4 และตารางที่ 3.5 ตามลำดับ เมื่อทดสอบผลการยับยั้งกับแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus spp.* strain PN-3 คือ BSM broth และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งดีกว่าการใช้ MRS broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ไม่ได้แสดงผล) จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมเกี่ยวกับระยะเวลาและอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ LAB ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ สิริ นานา หนูเอก (2540) และจิตรารักษ์ แสนสิทธิ์ (2547) รายงานว่า ช่วงของระยะเวลาในการเจริญของเชื้อ LAB ทั้งหมดที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ และมีผลต่อการยับยั้งเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ถึง ชั่วโมงที่ 72 หรืออยู่ในช่วง log phase จนถึงช่วงต้นของ stationary phase (Muriana and Luchansky, 1993) ดังนั้นเชื้อ LABs ที่ทำการศึกษามาก่อน จึงมีระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ให้ผลการยับยั้งที่ดีต่อเชื้อ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* strain PN-3 คือ อยู่ในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของระยะเวลาในการบ่มเชื้อ

และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งที่มีต่อ *Bacillus spp.* strain PN-3 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.4) พบว่า เชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่า LAB อื่น ๆ คือ มีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 22 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Lb. acidophilus* TISTR1338, *Ped. acidilactici* TISTR425, *Ped. acidilactici* TISTR051 และ *Ped. acidilactici* TISTR424 โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 18, 17.9, 16.7 และ 16.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า เชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ให้ผลการทดสอบลดลงเมื่อเทียบกับระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่ในทางตรงกันข้าม LAB อื่น ๆ กลับให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus spp.* strain PN-3 ได้ดีขึ้น

การศึกษการเจริญของเชื้อ LAB ที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 45°C (ตารางที่ 3.5) พบว่า อุณหภูมิในการเจริญของ LAB แต่ละสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่ 37°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของ LAB ทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ และสอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ทั้งนี้เชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุดและเป็นที่น่าพอใจมากกว่า LAB อื่น ๆ คือ มีขนาดวงใสการยับยั้งมากกว่า 23.2 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gosaarak (2006) ที่พบว่า สภาวะการบ่มเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อ *Lc. lactis* TISTR14018 คือ ที่อุณหภูมิ 37°C โดยสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นถึง 8.54 log cfu/g ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.4 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและขนาดวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

LAB	Strains	Time (h.)	Average inhibition zone (mm.)	
			<i>Stap. saprophyticus</i>	<i>Bacillus</i> spp. strain PN-3
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR051	12	-	-
		18	-	-
		24	-	16.7
		48	-	19.3
		72	-	8.0
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR424	12	-	-
		18	-	6.2
		24	-	16.3
		48	-	18.9
		72	-	6.5
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR425	12	-	-
		18	-	6.4
		24	-	17.9
		48	-	19.5
		72	-	6.5
<i>Lb. acidophilus</i>	TISTR1338	12	-	-
		18	-	-
		24	8.0	18.0
		48	7.8	21.0
		72	-	-
<i>Lc. lactis</i>	TISTR1401	12	-	-
		18	9.3	9.6
		24	10.2	22.0
		48	9.6	16.5
		72	6.0	6.8

- = ไม่เกิดวงใส

ตารางที่ 3.5 อุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกกับวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

LAB	Strains	Temp. (°C)	Average inhibition zone (mm.)	
			<i>Stap. saprophyticus</i>	<i>Bacillus spp.</i> strain PN-3
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR051	30	-	7.0
		35	-	15.4
		37	-	19.0
		45	-	-
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR424	30	-	6.5
		35	6.2	6.8
		37	-	16.6
		45	-	9.8
<i>Ped. acidilactici</i>	TISTR425	30	-	6.8
		35	6.2	6.8
		37	-	17.9
		45	-	10.4
<i>Lb. acidophilus</i>	TISTR1338	30	7.5	10.0
		35	8.0	13.6
		37	8.2	20.0
		45	7.8	18.1
<i>Lc. lactis</i>	TISTR1401	30	8.4	9.0
		35	10.0	14.0
		37	10.5	23.2
		45	6.2	8.5

- = ไม่เกิดวงใส

ดังนั้นจากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของสารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ LAB ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* strain PN-3 ซึ่งเป็นเชื้อที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่พบว่าเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่ได้ดีที่สุด โดยมีสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่

เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีประสิทธิภาพสูงคือ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหาร BSM broth เป็นอาหารสำหรับการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

3.4.2.3 คุณสมบัติบางประการของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis*

TISTR1401

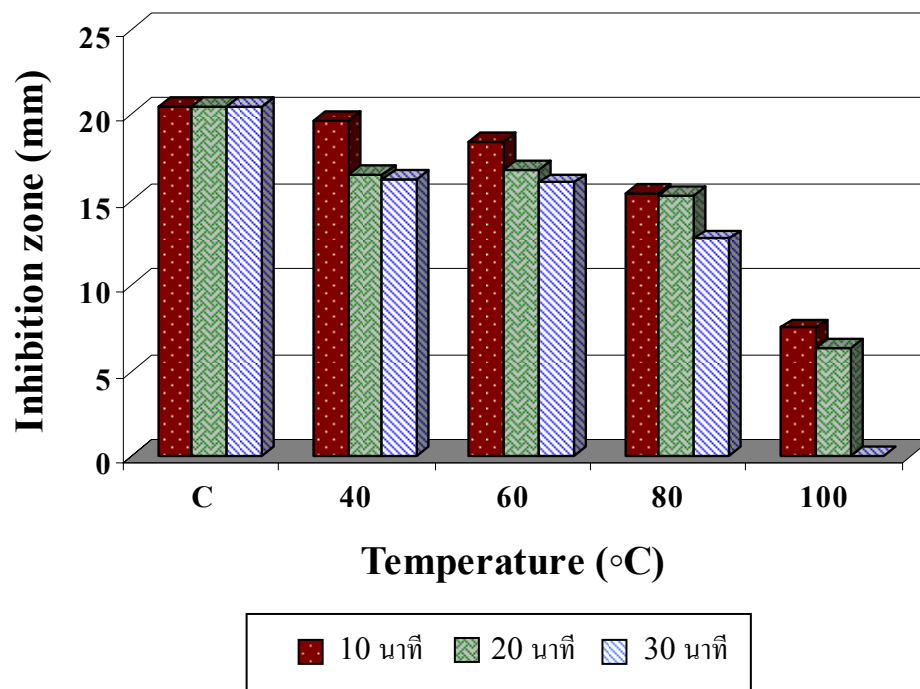
สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR1401 เป็นสารแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus spp.* strain PN-3 ได้ดี และเมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Lc. lactis* TISTR1401 (CBS) ได้แก่ การทดสอบความเสถียรต่อความร้อนและ pH ที่ระดับต่างๆ ได้ผลการทดลองแสดงดังรูป 3.3 และรูป 3.4 ตามลำดับ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ในอาหาร BSM broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วให้ความร้อนกับ CBS ที่ได้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 100°C แต่ละอุณหภูมิใช้เวลานาน 10, 20 และ 30 นาทีพบว่า CBS ของเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ที่ผ่านการให้ความร้อนสูงถึง 100°C เป็นเวลา 10-20 นาที ยังมีประสิทธิภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus spp.* strain PN-3 ได้โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 7.5 และ 6.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่วงใสจากสภาวะนี้มีขนาดลดลงถึง 61.95 และ 69.27% เมื่อเทียบกับวงใสการยับยั้งของ CBS ที่ไม่ได้รับความร้อน และ CBS จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอย่างสมบูรณ์ (ลดลง 100%) เมื่อเพิ่มเวลานานถึง 30 นาที

การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของ CBS โดยปรับ pH ของ CBS ให้มีค่า pH เท่ากับ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 ด้วย 1 N. HCl และ 1 N. NaOH และใช้ CBS ที่ pH 6.5 เป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อการเปรียบเทียบผล ได้ผลการทดลองแสดงดังรูป 3.4 พบว่า CBS มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ในช่วงที่เป็นกรดถึงเป็นกลางคือ ที่ pH 2-7 และให้ผลการยับยั้งที่ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม pH 6.5 โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งเท่ากับ 20±0.2 มิลลิเมตร แต่ที่ระดับ pH 8 (เป็นด่าง) นั้นจะมีความสามารถลดลงกว่าครึ่งของตัวอย่างควบคุม (ลดลง 56.93%) และ CBS จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งอย่างสมบูรณ์ 100% เมื่ออยู่ในสภาวะความเป็นด่างสูงตั้งแต่ pH 9 ขึ้นไป

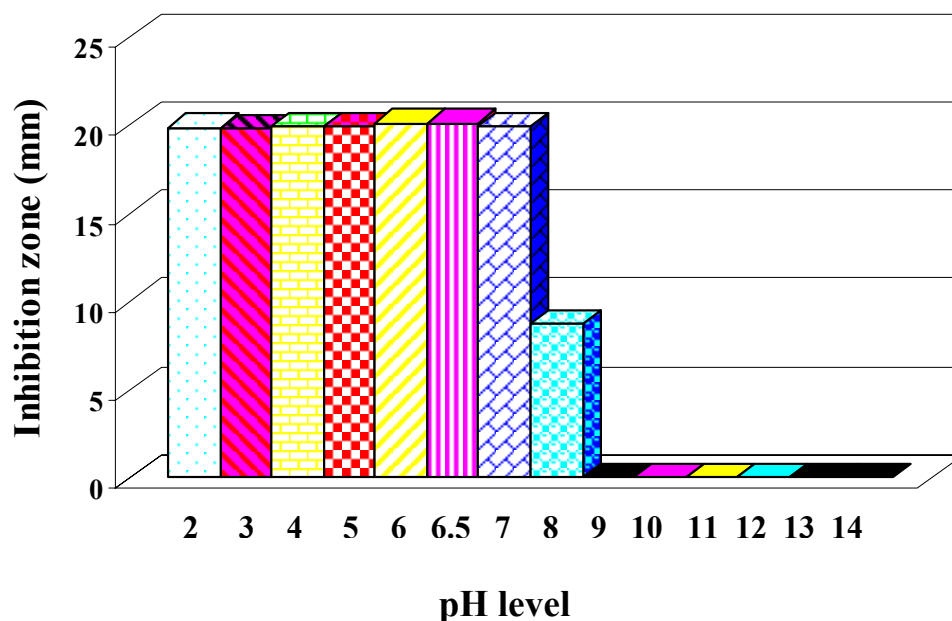
จากผลการทดสอบความเสถียรต่อความร้อน และความเป็นกรด-ด่าง ของ CBS ที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 กล่าวได้ว่าเป็นสารแบคทีเรียโอซินที่มีความเสถียรต่อความร้อนสูงถึง 100°C และเสถียรต่อค่า pH อยู่ในช่วงของ pH 2-7 ผลการศึกษาคุณสมบัติของ CBS ทั้งสองประการนี้ได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Moreno et al. (2000) ที่ได้ศึกษาคุณลักษณะของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* ทั้งนี้ strains ของ *Lc. lactis* ส่วนมากจะมีความทนต่อความร้อนได้

สูงที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที และ 121°C นาน 10 นาที และมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน ในช่วง pH ที่เป็นการจดจนถึงเป็นด่างอ่อน (pH 2-8) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้เป็นคุณสมบัติที่คล้ายกับ nisin ซึ่งเป็นสารแบคทีริโอซินทางการค้าที่นิยมและใช้ได้อย่างกว้างขวางในการยืดอายุการเก็บของอาหารประเภทผลิตภัณฑ์นม และเนื้อสัตว์ (Hoover and Steenson, 1993; Ouwehand, 1998; Cleveland et al., 2001)

จากคุณสมบัติของ CBS ที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ดังกล่าวจึงได้ใช้ CBS ที่ได้จากการทดลองนี้ในรูปของสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocins) ในการทดลองผลิตและยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ อันได้แก่ ลูกชิ้นไก่ต่อไป เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ CBS กับ nisin ทางการค้า



รูป 3.3 ความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆของสารแบคทีริโอซิน



รูป 3.4 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่าง ๆ ของสารแบคทีริโอซิน

3.4.3 การผลิตและประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีผลต่อการผลิตและประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน และคุณสมบัติความเสถียรต่อความร้อนและระดับ pH ของสารแบคทีริโอซินตามผลการศึกษาข้างต้นนั้น จึงได้ทำการผลิตสารแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 ใน 3 รูปแบบคือ 1) สารแบคทีริโอซินแบบปกติ 2) สารแบคทีริโอซินแบบเข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกบางส่วนด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้แก่ สารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวข้น และ 3) สารแบคทีริโอซินแบบของแข็งโดยการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ได้แก่ สารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้งโดยมีเป้าหมายเพื่อคงความสามารถของสารแบคทีริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่ชุดเดิม และเพื่อให้ได้สารแบคทีริโอซินในรูปแบบที่เหมาะสมคือ ให้ความสะดวกมากขึ้นสำหรับการใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะปรากฏและคุณลักษณะอื่น ๆ ที่ดีเป็นที่ยอมรับได้ของผู้บริโภค

จากผลการทดสอบการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. ให้ผลเป็นที่ชัดเจนกว่าการใช้ *Stap. saprophyticus* (ไม่ได้แสดงผล) เป็นแบคทีเรียทดสอบ ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินทั้ง 3 รูปแบบต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี Agar well diffusion แสดงดังตารางที่ 3.6 พบว่า สารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocin: FDCB) มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด มีค่าการ

ยับยั้ง (inhibition activity) เท่ากับ 6,400 AU/ml รองลงมาได้แก่ สารแบคทีริโอซินที่ผลิตแบบปกติ (crude bacteriocin supernatant: CBS) ซึ่งสาร CBS ได้ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ 2 วิธีคือ การกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ (filtered crude bacteriocin supernatant: FCBS) และการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (heated crude bacteriocin supernatant: HCBS) มีผลการยับยั้งเฉลี่ยที่เท่ากันคือ 5,333.3 AU/ml และสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวเข้มข้น (concentrated crude bacteriocin: CCB) มีผลการยับยั้งต่ำที่สุดคือ 3,200 AU/ml

จากการทดลองในการผลิตสารแบคทีริโอซินทั้ง 3 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่า สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้ดี เป็นผลที่สอดคล้องกับการทดสอบของสารแบคทีริโอซิน (ข้อ 3.4.2.3) ถึงแม้ว่าจะมีการให้ความร้อนเป็นเวลานาน เช่นดังในขั้นตอนการเตรียม CCB ขณะทำการระเหยน้ำที่อุณหภูมิ 40 ถึง 60°C นานถึง 6 ชั่วโมง พบว่า CCB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง 39.9% เทียบกับ FCBS แสดงว่า การเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแก่ CBS จะมีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งของสารแบคทีริโอซินลดลง เนื่องจากสารแบคทีริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน จึงไม่สามารถทนต่อการสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิสูง โดยอาจเกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีน (denaturation of protein) ได้บางส่วน (นิธินาถ หนูเอก, 2540) สอดคล้องกับการทดลองของ Vandenberg et al. (1993) ที่รายงานว่า สาร nisin ที่สร้างจาก *Lc. lactis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผัก ไม่สูญเสียฤทธิ์ยับยั้งที่ความร้อนอุณหภูมิ 100°C นาน 2 ชั่วโมง และ Moreno et al. (2000) รายงานว่า สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ITAL 383 ที่ทำการปรับค่า pH ที่ 2 และที่ 6 แล้วฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที พบว่าที่ pH 2 ไม่สูญเสียฤทธิ์ยับยั้งของสารแบคทีริโอซินหลังจากแช่ในอ่างน้ำเดือด (boiling bath) นาน 60 นาที แต่ที่ pH 6 จะสูญเสียการฤทธิ์ยับยั้งลง 50% เมื่อแช่นาน 30 นาที

และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตสารแบคทีริโอซินในปริมาณมาก การทำให้สารแบคทีริโอซินปลอดเชื้อโดยวิธีการกรองนั้นไม่เหมาะสม เนื่องจากแผ่นกรองมีราคาสูง อายุการใช้งานต่ำใช้ได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น บางครั้งต้องเปลี่ยนแผ่นกรองบ่อยๆ และใช้เวลาในการกรองนาน นอกจากนี้จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของ FCBS และ HCBS พบว่า สารแบคทีริโอซินทั้ง 2 รูปแบบนี้มีค่าการยับยั้งใกล้เคียงกันของแต่ละชุดการทดลองคือ มีค่าเฉลี่ยประมาณ 5,333.3 AU/ml ดังนั้นจึงแนะนำว่าควรเลือกใช้วิธีการให้ความร้อนทำให้ปลอดเชื้อสำหรับการผลิตสารแบคทีริโอซิน (crude) ในปริมาณมากเพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร

ตารางที่ 3.6 ความสามารถในการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR1401 ต่อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus spp.* strain PN-3

Type	Treatment	Inhibition activity (AU/ml)
FCBS	Filtered sterilization	5,333.3
HCBS	Heated sterilization	5,333.3
CCB	Evapolation	3,200.0
FDCB	Freeze drying	6,400.0

FCBS = filtered crude bacteriocin supernatant

HCBS= heated crude bacteriocin supernatant

CCB = concentrated crude bacteriocin

FDCB= freeze dried crude bacteriocin

3.5 สรุปผลการทดลอง

การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ที่เก็บเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีจำนวนมาก (dominant flora) เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่มาได้ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Stap. lentus*, *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.* มีจำนวนประชากรคิดเป็น 3, 12 และ 85% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก 5 สายพันธุ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยวิธี agar well diffusion พบว่า สารละลายที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้คือ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus spp.*

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินมีคุณภาพยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดจาก 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Lc. lactis* TISTR1401, *Lb. acidophilus* TISTR1338, *Ped. acidilactici* TISTR425, *Ped. acidilactici* TISTR051 และ *Ped. acidilactici* TISTR424 พบว่า สารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR1401 มีประสิทธิภาพยับยั้งได้ดีที่สุด CBS จาก *Lc. lactis* TISTR1401 ที่ผลิตได้สามารถทนความร้อนได้ถึง 100°C เป็นเวลานาน 20 นาที และมีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างช่วง pH 2-7 แต่ที่ระดับความเป็นด่างอ่อน (pH 8) มีประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของตัวอย่างควบคุม (CBS ที่ pH 6.5) และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อปรับ CBS ให้มี pH ช่วง 9-14 และเมื่อทำ CBS ให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่า

โดยวิธีระเหยนํ้าออกและการระเหิดแห้งพบว่า สารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวชั้นและชนิดผงแห้ง มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 3,200 และ 6,400 AU/ml ตามลำดับ

3.6 รายการอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. (ม.ป.ป.). **สูตรมาตรฐานสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อ**. กลุ่มงานผลิตภัณฑ์สัตว์ กองส่งเสริมการปศุสัตว์.
- จิตรารักษ์ แสนสิทธิ์. (2547). **การตรวจหาสารแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียที่สามารถใช้แปรงและผลิตภัณฑ์แลคติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศิรินาถ หนูเอก. (2540). **การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารสารแบคทีริโอซินจากอาหารหมัก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุริยรัตน์ เงินดวง. (2545). **การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซินจากอาหารหมัก**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A., and Valdivia, E., (2005). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Sci.** 71: 549-556.
- Avonts, L., Uytven, E.V., and Vuyst, L. D. (2004). Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **Int. Dairy J.** 14: 947-955.
- Borch, E., Kant-Muermans, M., and Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Food Microbiol.** 33: 103-120.
- Chris B.S. (2008). Growth of bacteria and spoilage of meat [On-line]. Available: www.meatupdate.csiro.au/data/Chilled_meat_for_export_02-91.pdf.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, IF.N., and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noé-Arroyo, F., and Garrido-Fernández, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration . **Food Microbiol.** 22: 521-528.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocin from Lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **J. Biosci. Bioen.** 87: 705-716.
- George-John, E.N., Panos, N.S., Chrysoula, C.T., and Konstantinos, P.K. (2008). Meat spoilage during distribution. **Meat Sci.** 78: 77-89.

- Gosaarak, S. (2006). **Production of bacteriocins by *Lactococcus lactis* TISTR 1401 and application in pork meatballs.** M.S. thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Hoover, D.G., and Steenson, L.R. (1993). **Bacteriocin of lactic acid bacteria.** San Diego: Academic Press.
- Hugas, M., and Monfort, J.Ma. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chem.** 59: 547-554.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol Rev.** 59: 171-200.
- Khalid F., Siddiqi R., and Mojgani N., (1999). Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of *Lactobacilli*. **Med. J. Islamic Acad. Sci.** 12: 67-71.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4084-4090.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., and Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J. Biotechnol.** 93: 27-34.
- Lunnaboot, M. (2003). **Screening for bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from meat and fermented foods.** M.S. Thesis, Khon Kaen University, Thailand.
- Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Baldini, V.L.S., and Leitão, M.F. de F. (2000). Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian J. Microbiol.** 31: 182-192.
- Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P., and Hill, C. (1999). Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. **J. Food Prot.** 62: 1011-1016.
- Muriana, P.M., and Luchansky, J.B. (1993). Biochemical methods for purification of bacteriocins. In D.G. Hoover and L.R. Steenson (eds.). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria** (pp 41-61). California: Academic Press.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C., and Hardisson de la Torre, A. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. **Meat Sci.** 62: 237-243.

- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.del.C., and de la Torre, A.H. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. **Meat Sci.** 72: 57-61.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin- producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81: 137-145.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **African J. Biotechnol.** 2: 219-227.
- Ouwehand, A. C. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salminen, S. and Wright A. V. (eds.). **Lactic Acid Bacteria; Microbiology and Functional Aspects** (2nd ed., 139-159) New York: Marcel Dekker, Inc.
- Reunanen, J. and Saris, P.E.J. (2004). Bioassay for nisin in sausage; a shelf-life study of nisin in cooked sausage. **Meat Sci.** 66: 515-518.
- Rodriguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H.M., Hernández, P.E., and Gasson, M.J. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **J. Appl. Microbiol.** 78: 109-115.
- Sankuntaw, N., Suranarakun, W., Phumkhachorn, P., and Rattanachaikunsopon, P. (2008). Partial characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus* SK 5.1: antimicrobial spectrum and optimal incubation time for bacteriocin production [On-line]. Available: http://www.scisoc.or.th/stt/30/sec_b/paper/stt30_B0024.pdf.
- Stecchini, M.L., Aquili, V., Sarais, I., and Pitotti, A. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from Italian raw ham. **J. Food Safety.** 12: 295-302.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, 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.
- Todorov, S. D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolate from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian J. Microbio.** 139: 178-187.

Vandenberg, D.J.C., Smits, A., Pot, B., Ledeboer, A. M., Kersters, K., Verbakel, J. M. A., and Verrips, T. (1993). Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. **Food Biotechnol.** 7: 189-205.

บทที่ 4

การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรี ในลูกชิ้นไก่

Application of crude bacteriocins and rosemary extracts in chicken meatballs

4.1 บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และสารสกัดโรสแมรี เป็นสารต้านแบคทีเรียและต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เพื่อยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ ลูกชิ้นไก่ที่เคลือบและผสมสารแบคทีริโอซิน ลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี และลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารสกัดโรสแมรีแล้วเคลือบด้วยสารแบคทีริโอซินหรือผสมทั้งสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมี และกายภาพ ทุก 3 วัน เป็นเวลา 12-21 วัน ลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซิน (crude bacteriocins supernatant: CBS) ชนิดปลอดเชื้อด้วยการกรอง (FCBS) และชนิดปลอดเชื้อด้วยความร้อน (HCBS) และลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวเข้มข้น (concentrated crude bacteriocins: CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins: FDCB) รวมถึงลูกชิ้นที่ใช้ในชิน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.05$) พิจารณาตามมาตรฐานจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหาร 10^5 cfu/g (มอก. 1009-2533) ลูกชิ้นเคลือบ HCBS และ FCBS บรรจุแบบปกติ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบในชินเก็บได้ประมาณ 18 วัน และแบบสุญญากาศเก็บได้นานประมาณ 18 วัน และ 21 วัน ตามลำดับ ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้นานเพียง 9 วัน และ 12 วัน ตามลำดับ สำหรับลูกชิ้นผสมสารแบคทีริโอซินมีอายุการเก็บที่นานกว่าลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.05$) โดยลูกชิ้นผสม CCB สามารถเก็บได้นานประมาณ 18 วัน ลูกชิ้นผสม FDCB และลูกชิ้นผสมในชินสามารถเก็บได้นานประมาณ 21 วัน แต่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้เพียง 15 วัน แบบการบรรจุปกติ และแบบสุญญากาศสามารถเก็บได้ประมาณ 21 วัน สำหรับลูกชิ้นที่ผสมสารแบคทีริโอซินทุกชิ้น ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้นานเพียง 18 วัน

สารสกัดโรสแมรีชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] (ORH) มีประสิทธิภาพต้านจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าชนิด oil of rosemary (OR) ($p < 0.05$) และเมื่อใช้ชนิด ORH ในลูกชิ้นและเคลือบด้วยสารแบคทีริโอซินผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 พบว่า ลูกชิ้นไก่ที่ได้จาก

การใช้สารสกัดโรสแมรีและร่วมกับสารแบคทีริโอซินมีการเจริญของจุลินทรีย์และการเกิดออกซิเดชันต่ำกว่า ($p < 0.05$) ลูกชิ้นควบคุม ทั้งนี้ลูกชิ้นไก่ผลิตแบบผสมสารสกัดโรสแมรีและเคลือบด้วยสารแบคทีริโอซิน เก็บบรรจุแบบปกติมีเชื้อจุลินทรีย์ $3.82 \log \text{ cfu/g}$ ในวันที่ 15 ขณะที่ค่า TBARS และปริมาณ hexanal เท่ากับ $0.29 \mu\text{g MDA/g}$ และ $1.717 \mu\text{g/g}$ ตามลำดับ และแบบสุญญากาศ $4.5 \log \text{ cfu/g}$ ในวันที่ 18 ขณะที่ค่า TBARS และปริมาณ hexanal เท่ากับ $0.26 \mu\text{g MDA/g}$ และ $2.462 \mu\text{g/g}$ ตามลำดับ ส่วนลูกชิ้นไก่ผลิตแบบผสมทั้งสารสกัดโรสแมรีและสารแบคทีริโอซินในลูกชิ้น เก็บแบบปกติมีเชื้อจุลินทรีย์ $3.54 \log \text{ cfu/g}$ ในวันที่ 15 ขณะที่ค่า TBARS และปริมาณ hexanal เท่ากับ $0.23 \mu\text{g MDA/g}$ และ $0.781 \mu\text{g/g}$ ตามลำดับ และแบบสุญญากาศ $3.60 \log \text{ cfu/g}$ ในวันที่ 18 ขณะที่ค่า TBARS และปริมาณ hexanal เท่ากับ $0.23 \mu\text{g MDA/g}$ และ $0.681 \mu\text{g/g}$ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่า pH ของลูกชิ้นไก่ทุกชนิดและลูกชิ้นควบคุม มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ผลทางเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นทุกชนิด ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12 วันที่มีค่าแรงต้านทานการกด (compression force) แตกต่างกันเล็กน้อย ($p < 0.05$) แสดงว่าการใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์และสารต้านออกซิเดชัน เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของลูกชิ้นไก่ได้

4.2 บทนำ

สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Staphylococcus aureus* (Ananou et al., 2005), *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น (Ennahar et al., 1999; Cleveland et al., 2001) และอาจจะมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้บ้างบางชนิด แต่ต้องมีการใช้ร่วมกับสารยับยั้งอื่น ๆ ด้วย เช่น disodium, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. (Sankuntaw et al., 2008; Stevens et al., 1991) นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้อีกด้วย (Lavermicocca et al., 2000)

สารแบคทีริโอซินส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จึงเหมาะสมต่อการใช้ในอาหาร เนื่องจากอาหารทั่วไปส่วนมากต้องผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ตัวอย่างเช่น สารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* strain Hansen มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงที่ 115°C นาน 15 นาที โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย *Pediococcus pentosaceus* Fbb 61 เท่ากับ 4000 BU/ml (Nieto-Lozano et al., 2002) การศึกษาของ Khalid et al. (1999) พบว่า สารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus* strain LC-09 สามารถทนความร้อนได้สูงที่ 100°C เป็นเวลานานถึง 4 ชั่วโมง และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ระดับ pH

ต่ำได้อีกด้วย นอกจากนี้ นิสิน (nisin) ซึ่งเป็นสารแบคทีริโอซินทางการค้ายังมีความสามารถในการทนความร้อนได้สูงที่ 121°C นาน 15 นาที (Noonpakdee et al., 2003) สารแบคทีริโอซินอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้คือ Pediocin ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารที่แช่ในตู้เย็นเน่าเสียได้แก่ *Brochotrix thermosphacta* พบได้ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ ที่บรรจุในระบบสุญญากาศและเนื้อหมัก เป็นต้น (Ennahar et al., 1999) นอกจากนี้ Hugas (1998) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ นิสิน ในผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ ว่า มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้คือน้อยกว่าการใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนื่องจาก นิสิน มีความสามารถในการละลายต่ำ (low solubility) การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ และขาดความเสถียร

การเสื่อมเสียของอาหาร โดยทั่วไปมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของอาหารเองด้วย โดยอาหารแต่ละชนิดมีระดับการเสื่อมเสียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของอาหารได้แก่ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุเป็นต้น ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (a_w) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และสภาพบรรยากาศในสถานที่เก็บรักษา ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีอิทธิพลอย่างยิ่งที่เป็นตัวกำหนดกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์เนื้อในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มักมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์เช่น *Staphylococcus spp.* และ *Bacillus spp.* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermal tolerance pathogenic bacteria) และสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้อีกด้วย โดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ยังสามารถเจริญได้ แม้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง (Anonymous, 2007) การเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมีของอาหารเช่น เกิดกลิ่นเหม็นหืน สามารถเกิดขึ้นได้ในผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการเก็บวัตถุดิบ กระบวนการแปรรูป การขนส่ง ตลอดจนการเก็บรักษา ซึ่งนำไปสู่การไม่ยอมรับของผู้บริโภคที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียแล้ว ยังทำให้เกิดสารพิษ (toxic byproducts) (Anonymous, 2002) ซึ่งก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้

ดังนั้นจำเป็นต้องใช้สารกันหืนหรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เพื่อยืดอายุการเก็บของอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปสารกันหืนที่ใช้ในอาหารเป็นสารสังเคราะห์เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ propyl gallate (PG) เป็นต้น ในปัจจุบันผู้บริโภคใส่ใจกับความปลอดภัยที่มีต่อสุขภาพ จึงยอมรับสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้นเช่น วิตามินอี เครื่องเทศ และสมุนไพร เป็นต้น การศึกษาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของอาหารที่ให้ผลดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภคหลายชนิด เช่น การใช้สารสกัดจากโรสแมรี่ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้แก่ เนื้อไก่ (Keokamnerd et al., 2008) ไส้กรอกหมู (Martínez et al., 2006) แฮมเบอร์เกอร์สเต็ก (hamburger steak) (Lee et al., 2005) เนื้ออกไก่วงสด และเนื้ออกไก่วงสุก (Leaflet, 2004) และลูกชิ้นเนื้อวัว (Fernández-López et al., 2005) พบว่า สามารถลดอัตราการเกิดออกซิเดชันได้

นอกจากนี้การศึกษาของ Lalas และ Dourtoglou (2003) โดยการใช้สารสกัดโรสแมรีในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันระหว่างการทอดมันฝรั่งพบว่า น้ำมันที่มีส่วนผสมของสารสกัดโรสแมรีให้สีคล้ำน้อยกว่าน้ำมันที่ไม่มีการเติมสารสกัดโรสแมรี และเมื่อตรวจสอบการเกิดกลิ่นหืน (rancidity) ของมันฝรั่งแผ่นและน้ำมันที่ใช้ทอด และทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory test) โดยผู้ทดสอบชิมพบว่า ในตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดโรสแมรีมีค่าการเกิดกลิ่นหืนและมีสีคล้ำน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม

สารต้านออกซิเดชันที่พบและมีบทบาทมากในโรสแมรีได้แก่ rosmanol และ carnosol โดยเฉพาะ rosmanol ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีไม่มิกกลิ่น สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวอย่างน้ำมันหมูได้ดีกว่า BHA และ BHT (Inatani et al., 1983)

วัตถุประสงค์การทดลองนี้เพื่อประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอสซินที่ไม่บริสุทธ์และสารสกัดโรสแมรีในลูกชิ้นไก่ และเปรียบเทียบการต้านแบคทีเรียและต้านออกซิเดชันของสารทั้งสองชนิด และเพื่อยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ให้นานขึ้นได้

4.3 วัสดุและวิธีการ

4.3.1 การผลิตสารแบคทีเรียโอสซินด้วยเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

4.3.1.1 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์และสถานะการเลี้ยงเชื้อ

เพาะเชื้อและเพิ่มจำนวน (reactivate) เชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอสซินคือ *Lc. lactis* TISTR 1401 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่คือ *Stap. saprophyticus* (PN-2) และ *Bacillus* ssp. (PN-3) ให้เป็นเชื้อแบคทีเรียพร้อมใช้งาน โดยปล่อยให้เชื้อแบคทีเรียละลายที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นถ่ายเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Hi-media, Mumbai, India) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) (Orbital Incubator S-150, Stuart Scientific, UK) ที่สถานะเขย่าความเร็ว 50 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มเชื้อและเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสารแบคทีเรียโอสซิน ส่วนเชื้อแบคทีเรียทดสอบเมื่อละลายที่อุณหภูมิ 4°C แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Typtic soy broth (TSB) (Hi-media, Mumbai, India) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่สถานะเขย่าความเร็ว 50 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอสซิน

4.3.1.2 การเตรียมสารแบคทีริโอซิน

ถ่ายกล้ำเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 จากข้อ 4.3.1.1 ปริมาณ 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BSM ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีการเติม yeast extract (Hi-media, Mumbai, India), glucose (Ajax Finechem, Australia) และ meat extract (Merck, Darmstadt, Germany) อย่างละ 2% (w/w) ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย (micro aerobically) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกเซลล์ออก ด้วยเครื่อง centrifuge (Sorvall® RC SC-plus centrifuge, Thermo Scientifc, Waltham, USA) ความเร็ว 12000×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatants) ปรับความเป็นกรดค่า (pH) ด้วย 1 M NaOH ให้มี pH เท่ากับ 6.5 แล้วเติมเอนไซม์ catalase ใน cell-free supernatant (CSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที (Nieto-Lozano et al., 2006) และทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ cellulose acetate membrane filter ขนาด 0.22 ไมครอนเมตร และ/หรือใช้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave (LABO Autoclave, Sanyo, NB Scientific, Edison, N.J.) ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 20 นาที (Gosaarak, 2006) แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง ได้เป็นสารแบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocins supernatant: CBS) สาร CBS ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ 2 วิธี คือ 1) กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ (filtered crude bacteriocins supernatant: FCBS) และ 2) ฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (heated crude bacteriocins supernatant: HCBS) เก็บตัวอย่าง CBS ทั้ง 2 ตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไว้ใช้เคลือบผิวลูกชิ้นไก่ต่อไป

เตรียมสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวขึ้นด้วยการระเหยแบบสูญญากาศ (rota evaporator) (concentrated crude bacteriocins: CCB) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2.1 และสารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้งด้วยการระเหิดแห้ง (freeze dried crude bacteriocins: FDCB) ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2.2 เก็บ CCB ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°C และ FDCB ไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator cabinet) ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ผสมในสูตรการผลิตลูกชิ้นไก่ต่อไป

4.3.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซิน

ทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินโดยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงการทดสอบจากวิธีของสุริย์รัตน์ เงินดวง (2545) Mogan et al. (1999) และ Nieto-Lozano et al. (2006) โดยนำสารแบคทีริโอซินที่สกัดได้จาก LAB ในข้อ 4.3.1.2 ทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากข้อ 3.3.2.1.2 โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่รองพื้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จานละ 15 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้ว

ใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อเจาะรูให้เป็นหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะจานละ 6 หลุม ใช้ micropipette ขนาด 40-200 ไมโครลิตร ดูด supernatant ของเชื้อ LAB ที่เตรียมได้ใส่ลงไปในหลุม ๆ ละ 40 ไมโครลิตร โดยมีกรดแลคติก 5% pH 2.3 เป็น positive control และอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Hi-media, Mumbai, India) pH 7.0 เป็น negative control วางไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนแห้ง จากนั้นบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ๆ ละ 4 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของ CBS ที่เตรียมได้ในรูปต่าง ๆ ในหน่วยของ Arbitrary Unit (AU/ml)

4.3.2 การผลิตลูกชิ้นไก่

ทำการผลิตลูกชิ้นไก่ โดยการใช้น้ำอกไก่ไม่ติดมัน (หจก.สหฟาร์ม จังหวัดนครราชสีมา) บดผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วสับผสมกับส่วนผสมต่างๆ (ตารางที่ 4.1) ได้แก่ เกลือ น้ำตาล ฟอสเฟต น้ำแข็ง และแป้งมันสำปะหลังให้เข้ากันแล้ว บรรจุลงในเครื่องบรรจุไส้ ทำการบรรจุลงในไส้ cellophane ขนานเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร และใส่ในอากาศ แล้วมัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณ 6 นิ้ว ต้มให้ความร้อน อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเพิ่มเป็น 80°C เป็นเวลา 30 นาที แช่น้ำเย็นอุณหภูมิ 10°C จากนั้นลอกไส้ cellophane ที่หุ้มออก แล้วตัดเป็นชิ้นขนาด 20 ± 2 มิลลิเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.1 สูตรส่วนผสมลูกชิ้นไก่

Main ingredients	% (w/w)
Chicken breast meat	80
Ice	15
Tapioca starch	5
Total	100
Sub ingredients*	% (w/w)
Salt	1.5
Sugar	0.75
Phosphate	0.3

* ปริมาณที่คิดเทียบกับส่วนประกอบหลักทั้งหมด

4.3.3 การใช้สารแบคทีริโอซินสำหรับการผลิตลูกชิ้นไก่

4.3.3.1 การใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์เคลือบลูกชิ้นไก่

ทำการเคลือบผิวลูกชิ้นไก่ที่ผลิตตามข้อ 4.3.2 ด้วย crude bacteriocins supernatant (CBS) ชนิดปลอดเชื้อด้วยการกรอง (FCBS) มีประสิทธิภาพยับยั้ง 5,333.3 AU/ml และชนิดปลอดเชื้อด้วยความร้อน (HCBS) มีประสิทธิภาพยับยั้ง 5,333.3 AU/ml และใช้ในจีน ความเข้มข้น 0.2% (commercial nisin) (Fluka; 72535 nisin from *Streptococcus lactic*, UK) ซึ่งมีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml เป็น negative control เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน และตัวอย่างลูกชิ้นควบคุม (positive control) คลุกเคล้าให้สารแบคทีริโอซินเคลือบบนผิวของลูกชิ้นไก่ให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้ผิวลูกชิ้นแห้งโดยการผึ่งที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทำการแบ่งบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ (aerobically packaged) และแบบสุญญากาศ (vacuum packaged) เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

4.3.3.2 การใช้สารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวเข้มข้นและชนิดผงแห้งผสมในลูกชิ้นไก่

ทำการผลิตลูกชิ้นไก่ตามสูตร (ตารางที่ 4.1) จากข้อ 4.3.2 โดยผสมสารแบคทีริโอซินชนิดของเหลวเข้มข้น (concentrated crude bacteriocins: CCB) มีประสิทธิภาพยับยั้ง 3,200 AU/ml และชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins: FDCB) มีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml ในสูตรส่วนผสมลูกชิ้นปริมาณ 0.2% ใช้ nisin มีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml ปริมาณ 0.2% และตัวอย่างลูกชิ้นควบคุม ทำการแบ่งบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ (aerobically packaged) และแบบสุญญากาศ (vacuum packaged) เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

4.3.4 การใช้สารแบคทีริโอซินร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่สำหรับการผลิตลูกชิ้นไก่

4.3.4.1 การคัดเลือกสารสกัดโรสแมรี่สำหรับการผลิตลูกชิ้นไก่

เพื่อคัดเลือกชนิดของสารสกัดโรสแมรี่ทางการค้า สำหรับการใช้เสริมฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์และต้านออกซิเดชันร่วมกับสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ใช้สารสกัดโรสแมรี่ 2 ชนิดคือ 1) oil of rosemary (Kalsec, Michigan, USA.; Code: 20-01, Lot: 8219C) (OR) และ 2) oleoresin rosemary Herbalox[®] (Kalsec, Michigan, USA.; Brand, Type O, Code: 41-19-01, Lot: 8710C) (ORH) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Vicchi Consolidated Co Ltd., Thailand) ทำการผลิตลูกชิ้นด้วยสารสกัดโรสแมรี่ปริมาณ 0.5% ในสูตรการผลิตลูกชิ้นตามข้อ 4.3.2 ทำการแบ่งบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ (aerobically packaged) และแบบสุญญากาศ (vacuum packaged)

เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

4.3.4.2 การใช้สารแบคทีริโอซินร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่สำหรับการผลิตลูกชิ้นไก่

คัดเลือกชนิดของสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ที่ได้ผลการด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และด้านออกซิเดชันได้ดีที่สุดจากการทดลอง ข้อ 4.3.3.1, 4.3.3.2 และ 4.3.4.1 ซึ่งได้แก่ สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ชนิดปลดปล่อยด้วยความร้อน (HCBS) จากข้อ 4.3.3.1 สารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง (FCDB) จากข้อ 4.3.3.2 และสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] (OH) จากข้อ 4.3.4.1

ทำการผลิตลูกชิ้นตามข้อ 4.3.2 และใช้สารแบคทีริโอซิน และสารสกัดโรสแมรี่ใน 2 กระบวนการผลิตคือ

1) ผสม ORH ในสูตรส่วนผสมลูกชิ้น 0.5% แล้วเคลือบลูกชิ้นด้วย HCBS ตามวิธีข้อ 4.3.3.1

2) ผสม ORH ปริมาณ 0.5% และ FCDB ปริมาณ 0.2% ในสูตรส่วนผสมลูกชิ้น ตามข้อ 4.3.3.2

ทำการแบ่งบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ (aerobically packaged) และแบบสุญญากาศ (vacuum packaged) เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

4.3.5 การวิเคราะห์คุณภาพของลูกชิ้นไก่

4.3.5.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธีตาม AOAC (1997); Ananou et al. (2005) และ Viana et al. (2005) ซึ่งตัวอย่างลูกชิ้นไก่ 10 กรัม เติม 0.1% peptone water (Hi-media, Mumbai, India) พลอดเชื้อจำนวน 90 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (Stomacher Lab-blender model 400, Seward, London, England) ที่ระดับความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 1 นาที และที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที ได้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 10^{-1} เจือจางตัวอย่างด้วย 0.1% peptone water ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ 10^{-2} - 10^{-6} แล้วทำการ spread plate โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA agar (Hi-media, Mumbai, India) สำหรับการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Hi-media, Mumbai, India) สำหรับการหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

อากาศ ตรวจนับจำนวนโคโนนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี หากค่าเฉลี่ย และรายงานผลเป็นหน่วย log cfu/g

4.3.5.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

4.3.5.2.1 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของลูกชิ้นไก่ โดยสุ่มตัวอย่างลูกชิ้น วัด pH ด้วย เครื่อง meat pH meter แบบ probe แท่ง (Hanna; HI99163 pH/temperature meter, Italy)

4.3.5.2.2 การวิเคราะห์ค่า TBARS

ติดตามการเกิดออกซิเดชันด้วยการวิเคราะห์ค่า Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ McDonald and Hultin (1987) ทำการวิเคราะห์โดย ชั่งตัวอย่างลูกชิ้นไก่ 10 กรัม กับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ตีปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า (Homogenizer) เป็นเวลา 1 นาที ปรับ pH ให้เท่ากับ 1.5 ด้วย 4.0 M HCl แล้วเติม BHA (1.5% BHA in ethanol) 500 ไมโครลิตร และสารป้องกันการเกิดฟอง (antifoam) 1-2 หยด กลั่นด้วยความร้อน โดยตรงให้ได้ distillate 25 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาการเกิดสี (color reaction) โดยใช้ distillate 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติม 0.02 M TBA (in 15% TCA) 5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายในอ่าง ควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C เป็นเวลา 60 นาที ลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำเย็นจัด วัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer, GBC รุ่น UV/VIS 916) และคำนวณปริมาณ MDA (mg/kg) ของตัวอย่าง โดยคำนวณค่าความ เข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของ malonaldehyde (MDA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียม stock solution ของ MDA โดยชั่ง 1,1,3,3 Tetraethoxypropane (Fluka, USA) 100 mg แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N HCl ต้ม ในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยเปิดน้ำไหลผ่าน จะได้ stock solution เข้มข้น 10 mg/ml

4.3.5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ hexanal

วิเคราะห์หาปริมาณ hexanal จาก headspace volatiles ด้วยวิธี headspace ดัดแปลง ตามวิธีของ Ahn et al. (2007) โดยชั่งตัวอย่างจำนวน 1.5 กรัม ใส่ใน GC vials ขนาด 22 มิลลิลิตร เติม deionized water 3 มิลลิลิตร แล้วไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝา vial ด้วยฟาลอูมิเนียมและ Teflon septa อย่างรวดเร็วให้สนิท นำขวด vial ตัวอย่างใส่ในช่องตัวอย่าง (carousel) ของ headspace autosampler (Teledyne Tekmar HT3™, USA) ตั้งค่าให้ความร้อน 70°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเขย่าผสมตัวอย่างเป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการ pressurize ด้วย helium 0.30 นาที จากนั้น headspace ของตัวอย่างจะถูกดูดเข้าไปใน loop เป็นเวลา 0.30 นาที แล้วฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography (Varian, CP-3800 GC; Varian Associates, Walnut Creek, USA) โดยตั้งเวลาใน

การฉีด 1 นาที มีอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 220°C split ratio 10:1 โดยใช้คอลัมน์ fused silica capillary column (CP8924, 30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm film thickness) ตั้งค่าการไหลของ carrier gas เท่ากับ 2.0 ml/min อุณหภูมิเริ่มต้นจาก 35°C 5 นาที แล้วเพิ่มเป็น 45°C (8°C/min) และที่ 200°C (40°C/min) 6 นาที อุณหภูมิของ FID detector ตั้งที่ 250°C การคำนวณความเข้มข้นของ hexanal ในตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐาน โดยฉีด standard hexanal (H9008, Sigma-Aldrich Co.St. Louis, USA) ที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 7.5 μg/ml รายงานผลของ ปริมาณ hexanal เป็น μg/g

4.3.5.3 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer: TA.XT.plus, Texture Technologies Crop., Scardals, USA) ใช้หัววัด (Probe) แบบ spherical probes (P/ 0.5 s, 1.2 cm diameter ball probe) และใช้อัตราการเคลื่อนที่ของหัววัดเท่ากับ 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะทางการกดของหัววัดเท่ากับ 10 มิลลิเมตร นำตัวอย่างลูกชิ้นไก่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร ยาว 2 เซนติเมตร วัดเนื้อสัมผัสตัวอย่างละ 6 ครั้ง อ่านค่าแรงต้านทานการกด หน่วยเป็นนิวตัน (N) (Huang et al., 2005)

4.3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ทางเคมี และทางกายภาพ โดยวิเคราะห์ 3 ซ้ำในทุก การวิเคราะห์ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วางแผนการทดลอง แบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05) ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS institute, Inc., 1995) สำหรับทุกการวิเคราะห์

4.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.4.1 ผลการใช้สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์เคลือบลูกชิ้นไก่

ลูกชิ้นที่เคลือบ (coating) ด้วยสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 และใน ซิน เพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาลูกชิ้นไก่ (รูป 4.1) พบว่า ลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งหมดมากกว่าลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีริโอซินโดยในวันที่ 9 ของสภาวะบรรจุแบบปกติ (รูป 4.1A) ลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ 5.05 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีริ โอซินชนิดปลดปล่อยด้วยการกรอง (FCBS) และชนิดปลดปล่อยด้วยความร้อน (HCBS) และในซิน มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ 1.26, 1.25 และ 2.05 log cfu/g ตามลำดับ จากมาตรฐานจุลินทรีย์ กำหนดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารที่สามารถยอมรับได้สำหรับลูกชิ้นไก่ไม่เกิน 10⁵ cfu/g (5 log cfu/g) (มอก.1009-2533; the Meat Standards Committee of ARMCANZ, 2003) ดังนั้น

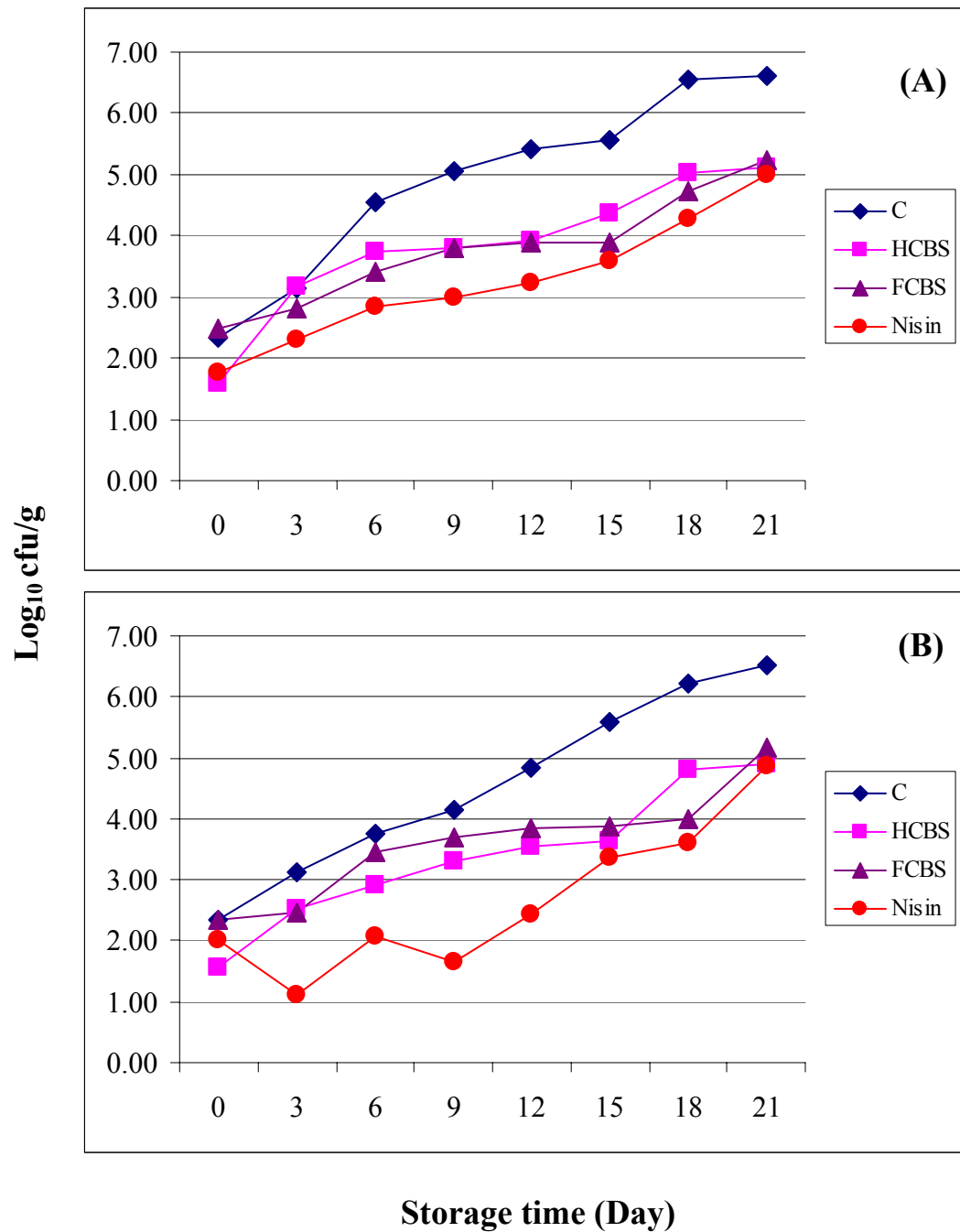
ลูกชิ้นควบคุมสามารถเก็บได้นานประมาณ 9 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสติน และไนซิน สามารถเก็บได้นานกว่า 15 วัน และ 18 วัน ตามลำดับที่อุณหภูมิ 4°C

สำหรับลูกชิ้นไก่ในสภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศ (รูป 4.1B) ลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีเรียโอสตินและไนซิน มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าลูกชิ้นควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลูกชิ้นพบว่า ลูกชิ้นควบคุมมีอายุการเก็บรักษา 12 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสตินและไนซินสามารถเก็บได้นานกว่า 18 วัน และ 21 วัน ตามลำดับ แสดงว่า ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสตินสามารถยืดอายุการเก็บได้นานกว่าลูกชิ้นควบคุมประมาณ 1 สัปดาห์

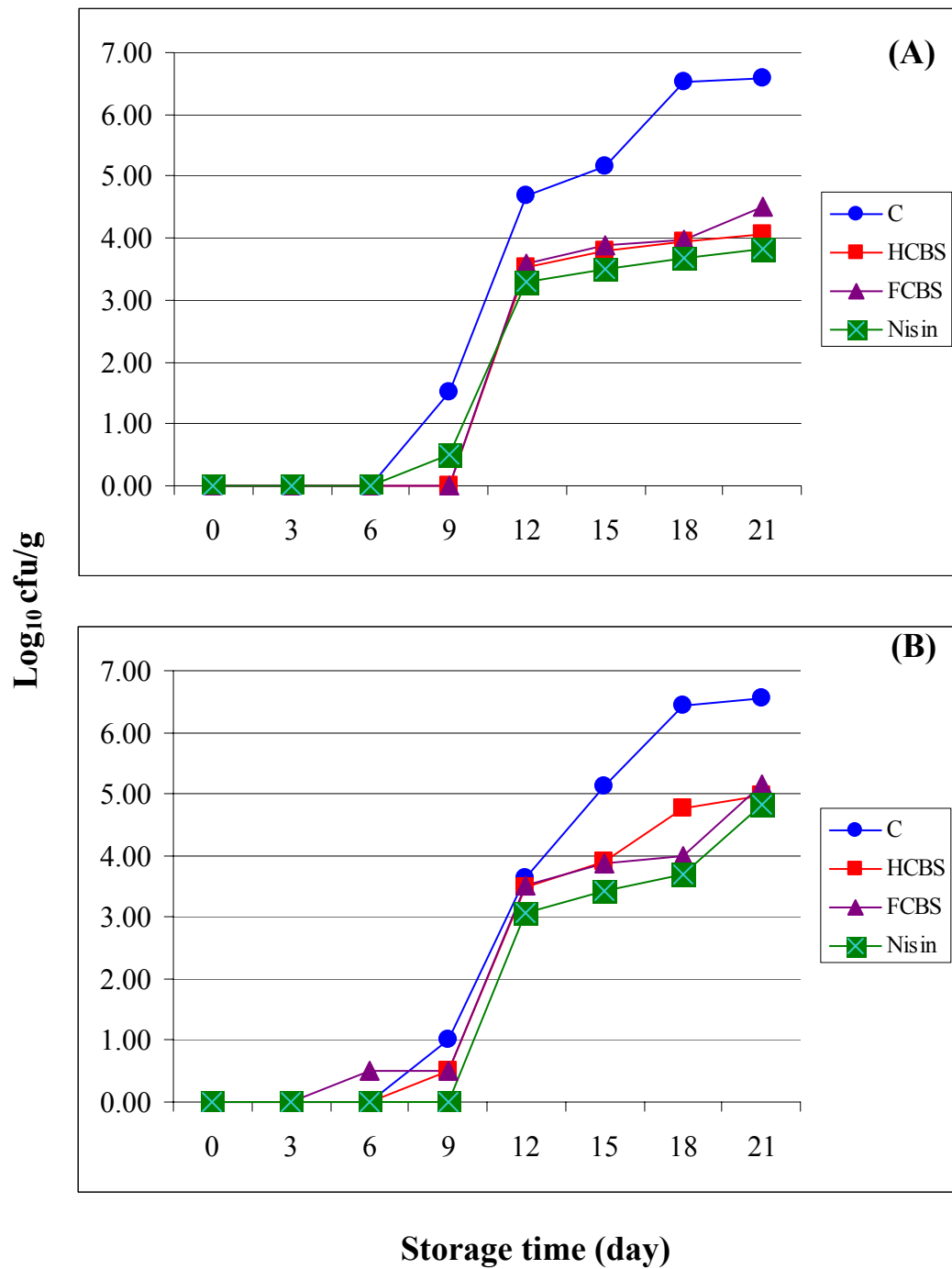
เชื้อ LAB เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของลูกชิ้น ที่เก็บรักษาในตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ผิวของลูกชิ้นมีลักษณะเป็นเมือก (slime surface) เกิดก๊าซ (gassing) และกลิ่นรสเปรี้ยว (souring) เป็นต้น กลุ่มเชื้อ spoilage LAB ที่พบและเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ เกิดจากเชื้อ *Leuconostoc* sp. (Samelis et al., 2006), *Streptococcus faecium*, *Strep. faecalis*, *Microbacterium thermosphactum* (Holy et al., 1992) เป็นต้น

ปริมาณเชื้อ LAB ทั้งหมด (รูป 4.2) ของลูกชิ้นไก่ทุกชนิด สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสตินทุกชนิดมีปริมาณเชื้อ LAB น้อยกว่าลูกชิ้นควบคุมทั้งในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเมื่อพิจารณาลูกชิ้นในวันที่ 15 ของสภาวะการบรรจุแบบปกติ พบว่า ลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณ LAB ทั้งหมดเท่ากับ 5.17 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสตินชนิด HCBS, FCBS และไนซินมี 3.79, 3.88 และ 3.51 log cfu/g ตามลำดับ และแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณ LAB ทั้งหมดเท่ากับ 5.11 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีเรียโอสตินชนิด HCBS, FCBS และไนซินมี 3.89, 3.87 และ 3.43 log cfu/g ตามลำดับ

และตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 21 วัน ลูกชิ้นไก่ไม่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มหรือมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว เนื่องจากผลของปริมาณ LAB ทั้งหมดที่พบในลูกชิ้นทุกชนิดนั้นต่ำกว่า 10^7 - 10^8 cfu/g ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่มากพอ สำหรับเชื้อ LAB เกิดการสร้างกรดและปล่อยออกมาอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Kun et al., 2008) จากผลทางจุลินทรีย์ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีเรียโอสติน แสดงว่าสารแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ชนิด HCBS มีความสามารถในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ไม่แตกต่างกับชนิด FCBS และไนซิน ($p>0.05$) ดังนั้นจึงเลือก HCBS ที่มีการเตรียมได้ง่าย สะดวก และใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า FCBS เพื่อใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ในการยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ต่อไป



รูป 4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของ ลูกชิ้นไก่เคลือบสารเบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging



รูป 4.2 ปริมาณ LAB (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีเรียโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging

ลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินมีค่า pH แสดงดังตารางที่ 4.2 ลูกชิ้นทุกชนิดมีค่า pH แตกต่างกันเล็กน้อย ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นทั้งในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ โดยมีช่วง pH เท่ากับ 6.17-6.30 และมีค่าไม่แตกต่างกับค่า pH ของ batter คือ 6.30 (ไม่ได้แสดงผล) ค่า pH ของอาหารเป็นตัวกำหนดชนิด และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง และค่อนข้างไปทางค่าอง่อน (pH 7-9) ดังนั้นเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่มีช่วง pH สูง จึงเกิดการเน่าเสียได้ง่ายกว่าเนื้อสัตว์ที่มีช่วง pH ต่ำ (pH < 6) (Borch, Kant-Muermans, and Blixt, 1996)

ตารางที่ 4.2 ค่า pH ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

Storage time (days)	pH							
	Aerobic Packaging				Vacuum Packaging			
	C	HCBS	FCBS	Nisin	C	HCBS	FCBS	Nisin
0	6.27a ⁽¹⁾	6.28a	6.22b	6.20c	6.28a	6.24b	6.20b	6.22b
3	6.28a	6.27a	6.20b	6.20b	6.30a	6.26b	6.21c	6.23bc
6	6.27a	6.23ab	6.18b	6.19b	6.28a	6.24b	6.20b	6.23b
9	6.26a	6.22ab	6.18bc	6.17c	6.28a	6.23b	6.19b	6.23b
12	6.27a	6.22bc	6.23ab	6.18c	6.27a	6.23b	6.20b	6.22b
15	6.26a	6.23a	6.18b	6.17b	6.28a	6.24ab	6.21b	6.20b
18	6.27a	6.22b	6.18c	6.18c	6.23a	6.25a	6.22a	6.22a
21	6.27a	6.22b	6.18c	6.18c	6.22a	6.25a	6.20a	6.20a

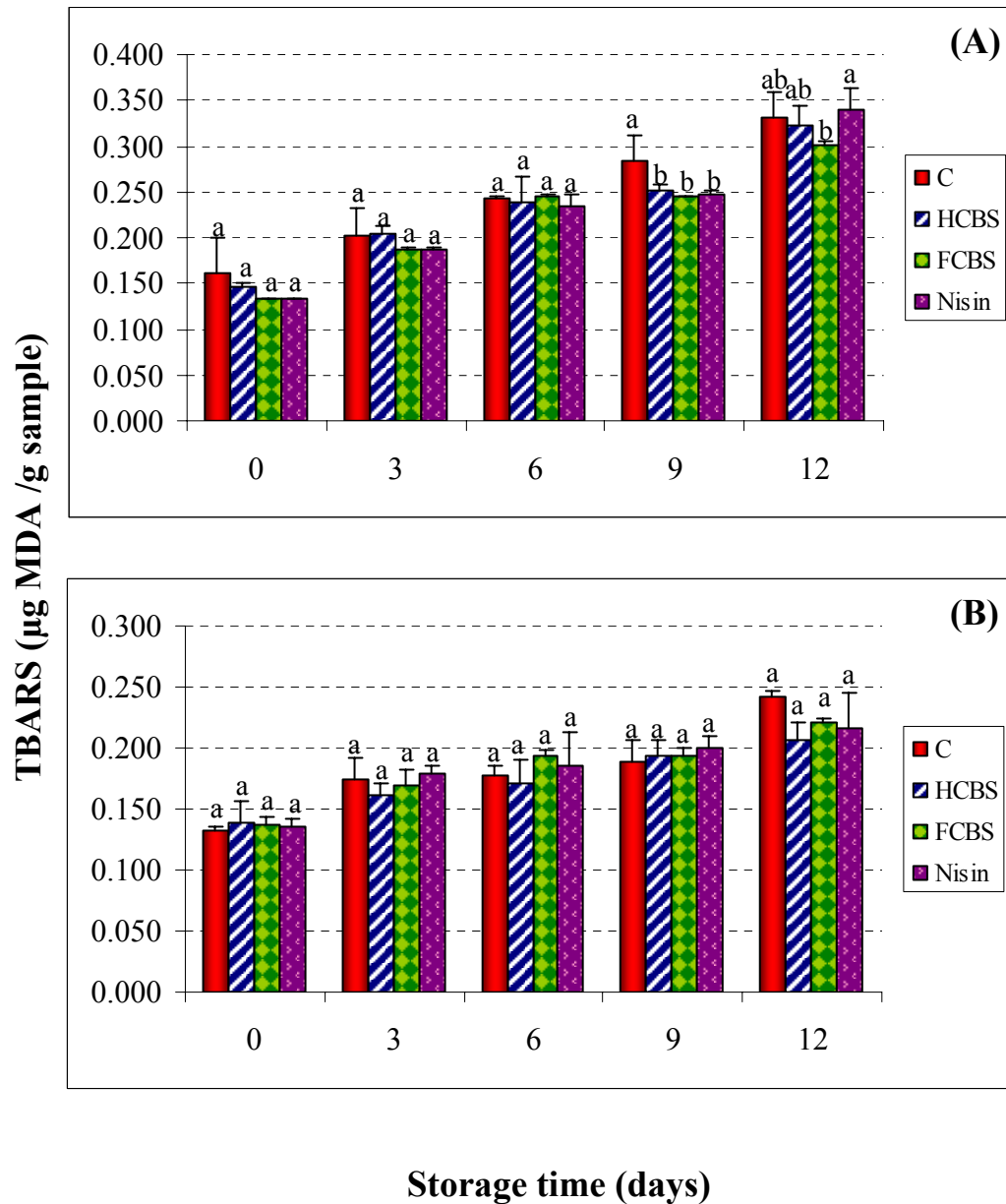
⁽¹⁾ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

n= 6

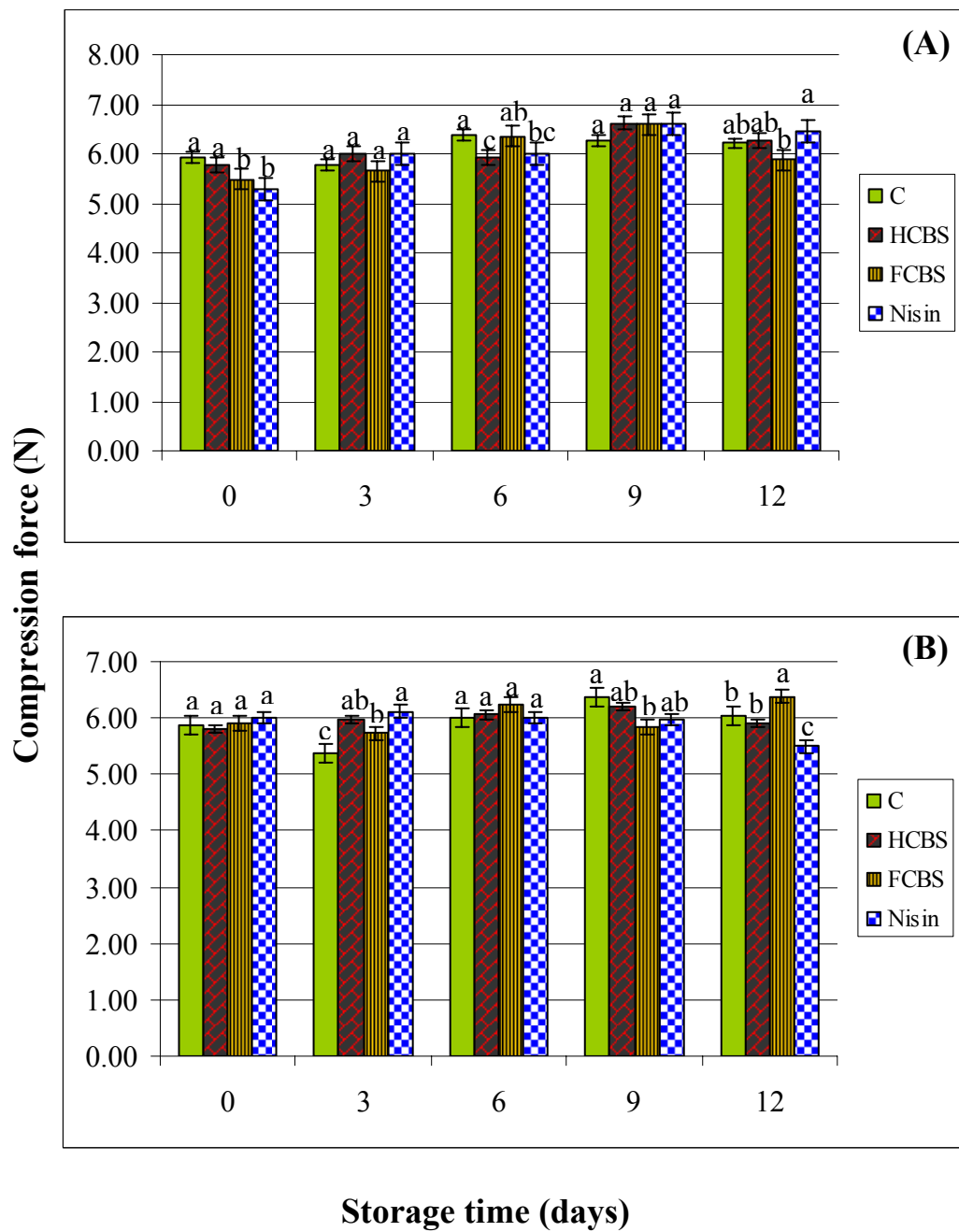
การเกิดออกซิเดชันในลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีริโอซินแสดงโดยค่า TBARS (รูป 4.3) ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีริโอซินทุกชนิดมีค่า TBARS ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้ง 2 สภาวะการบรรจุแสดงว่า สารแบคทีริโอซินไม่สามารถลดอัตราการเกิดออกซิเดชันของไขมันในตัวอย่างลูกชิ้นไก่ได้

เนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซิน แสดงดังรูป 4.4 พบว่า ลูกชิ้นเคลือบสารแบคทีริโอซินบรรจุแบบปกติมีค่าแรงต้านทานการกดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุมตลอดระยะเวลาเก็บรักษา โดยมีค่าแรงอยู่ระหว่าง 5.30- 6.62 N แต่การบรรจุแบบ

สัญญาณแรงกดของลูกชิ้นแตกต่างกันเล็กน้อย ($p < 0.05$) โดยลูกชิ้นเคลือบไนซินมีแรงกดลดลงเมื่อเก็บนานขึ้น



รูป 4.3 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ;
A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่าง
กันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 8$



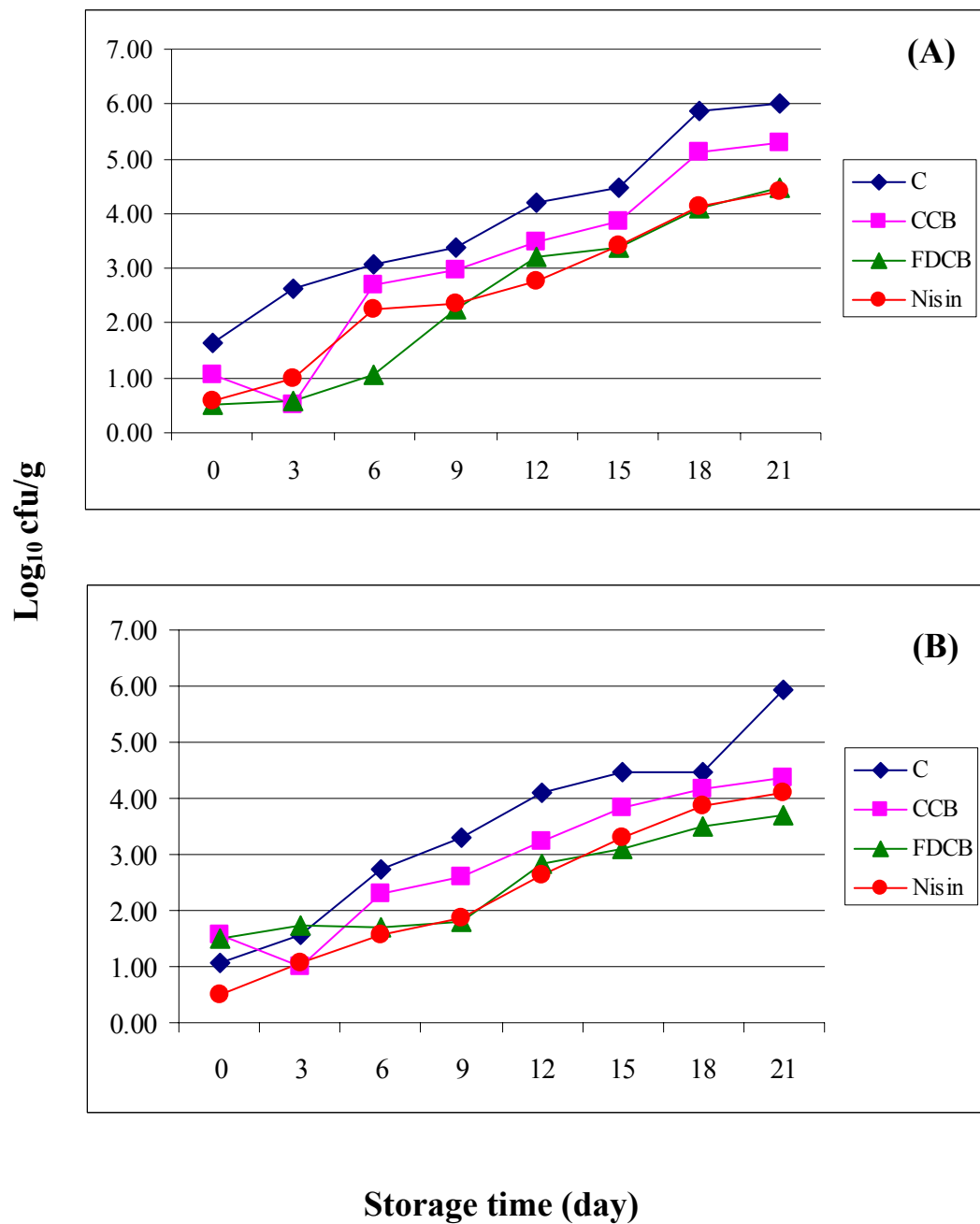
รูป 4.4 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่เคลือบสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n =$

4.4.2 ผลการผสมสารแบคทีเรียโอสลินในส่วนผสมของลูกชิ้นไก่

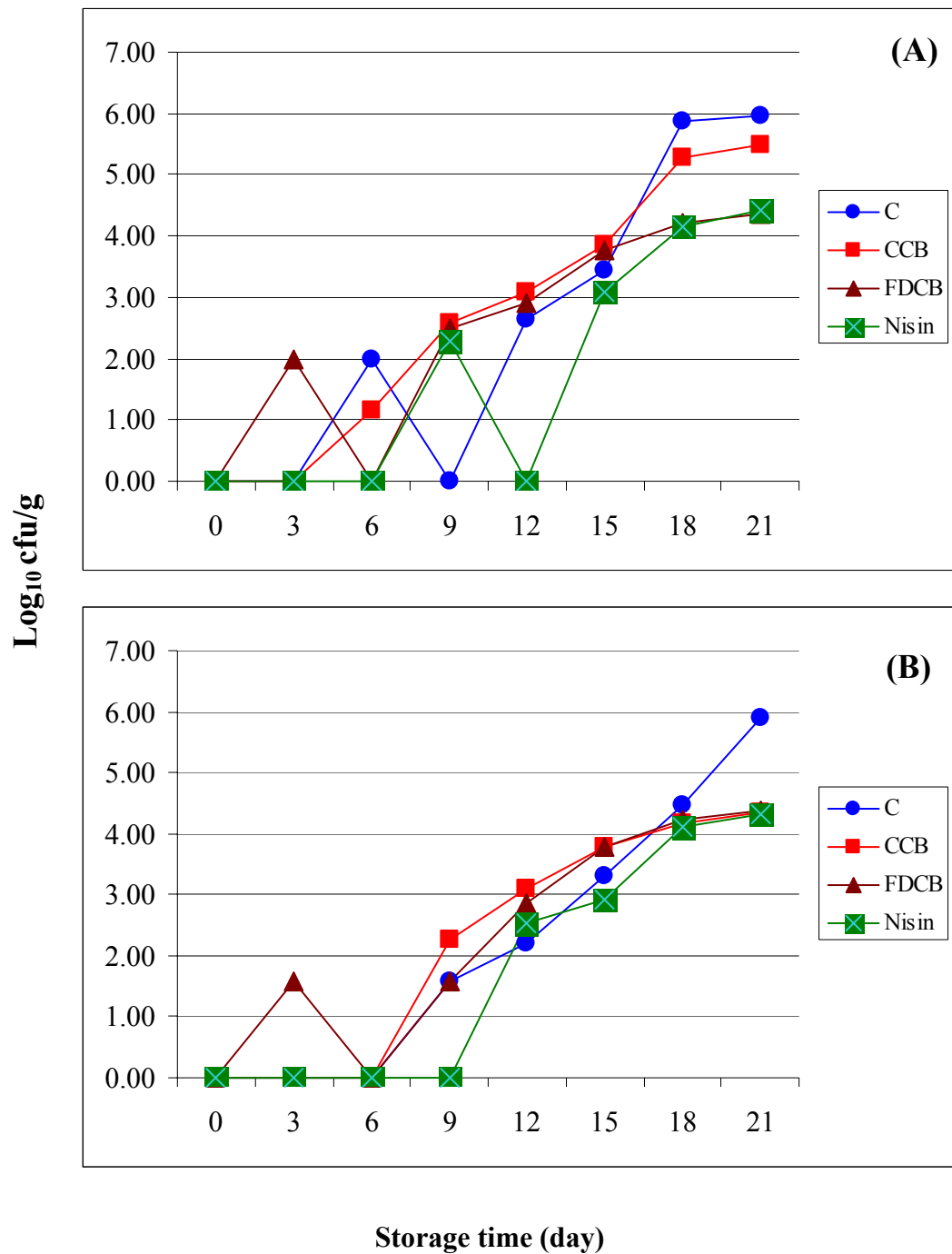
การผสมสารแบคทีเรียโอสลินเข้มข้น 2 ชนิด ได้แก่ CCB และ FDCB และไนซิน ลงใน batter ของลูกชิ้นไก่พบว่า ในสภาวะบรรจุแบบปกติ (รูป 4.5A) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินทั้ง 2 ชนิด และไนซินมีปริมาณต่ำกว่าลูกชิ้นควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บ ในสภาวะการบรรจุแบบปกติลูกชิ้นควบคุมมีอายุการเก็บประมาณ 15 วัน ขณะที่ลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินสามารถเก็บได้นานกว่าลูกชิ้นควบคุม โดยลูกชิ้นผสม CCB สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 18 วัน ลูกชิ้นผสม FDCB กับลูกชิ้นผสมไนซิน เก็บได้นานขึ้นถึง 21 วัน และแบบสุญญากาศลูกชิ้นควบคุมมีอายุการเก็บได้ประมาณ 18 วัน ขณะที่ลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินทุกชนิด รวมทั้งไนซินสามารถเก็บได้นานกว่า 21 วัน ของระยะเวลาการเก็บรักษา

ปริมาณ LAB ทั้งหมดในลูกชิ้นไก่เริ่มตรวจพบได้ในวันที่ 9 ของระยะเวลาเก็บรักษา ลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินทั้ง 2 ชนิด และไนซินมีปริมาณ LAB ทั้งหมดต่ำกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม โดยในวันที่ 18 ของสภาวะการบรรจุแบบปกติลูกชิ้นควบคุมมี $5.87 \log \text{cfu/g}$ ขณะที่ลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินชนิด CCB และ FDCB และไนซินมี 5.29, 4.22 และ 4.16 $\log \text{cfu/g}$ ตามลำดับ และในสภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศลูกชิ้นควบคุมมี 4.47 $\log \text{cfu/g}$ ขณะที่ลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอสลินชนิด CCB และ FDCB และไนซินมี 4.18, 4.22 และ 4.12 $\log \text{cfu/g}$ ตามลำดับ

ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีเรียโอสลินในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ (ตารางที่ 4.3) ค่า pH ของลูกชิ้นทุกชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้ง 2 สภาวะการบรรจุ โดยมีช่วง pH ระหว่าง 5.99-6.30 แสดงว่าระยะเวลาการเก็บรักษา ของลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 4°C ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในตัวอย่างลูกชิ้น



รูป 4.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของ ลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีเรียโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging



รูป 4.6 ปริมาณ LAB (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging

ตารางที่ 4.3 ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

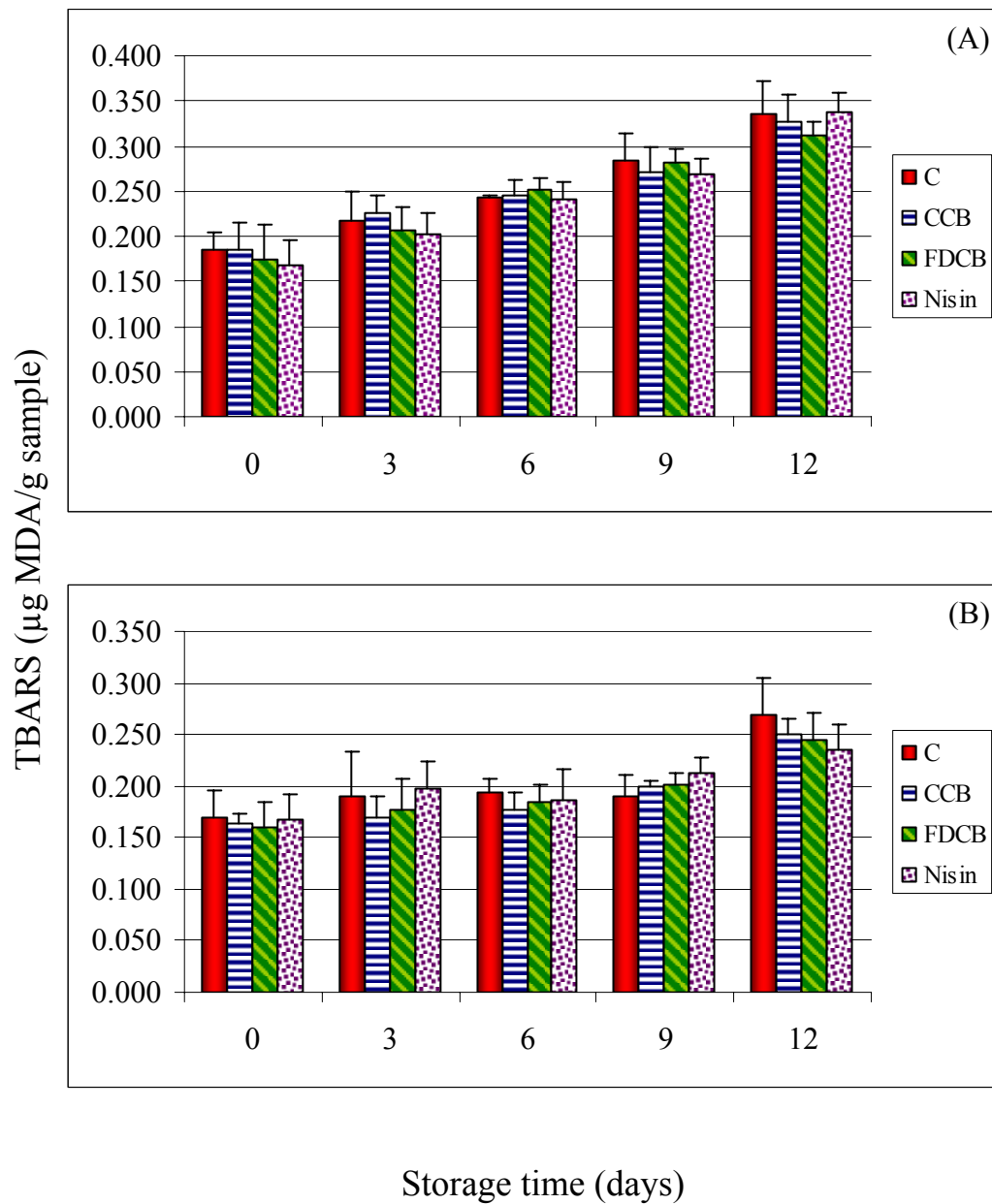
Storage time (days)	pH							
	Aerobic Packaging				Vacuum Packaging			
	C	CCB	FDCB	Nisin	C	CCB	FDCB	Nisin
0	6.27a ⁽¹⁾	6.22b	6.19bc	6.16c	6.28a	6.24a	6.18c	6.17c
3	6.28a	6.24b	6.20bc	6.17c	6.30a	6.26b	6.21c	6.18c
6	6.27a	6.23bc	6.18c	6.16c	6.28a	6.24b	6.20bc	6.16c
9	6.26a	6.22b	6.18bc	6.16c	6.28a	6.23b	6.19bc	6.16c
12	6.27a	6.22b	6.23ba	6.16c	6.27a	6.23b	6.20bc	6.17c
15	6.26a	6.23a	6.18b	6.17b	6.26a	6.24a	6.21ab	6.18b
18	6.27a	6.22b	6.18c	6.16c	6.22a	6.25a	5.99b	6.17a
21	6.26a	6.25a	6.20b	6.17c	6.26a	6.24a	6.17b	6.18b

⁽¹⁾ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

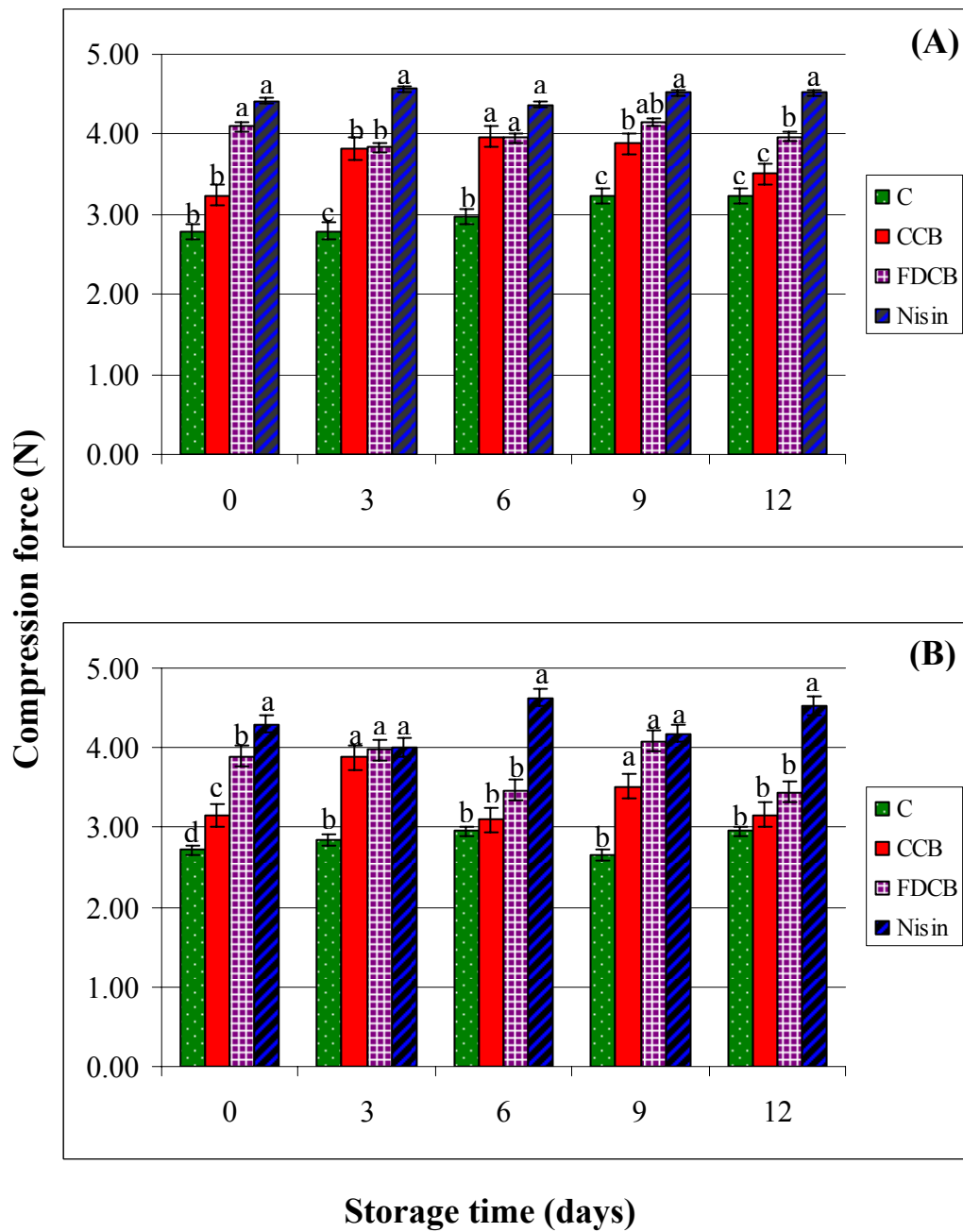
n= 6

ปริมาณ TBARS ในตัวอย่างลูกชิ้นไก่ที่ผสมด้วยสาร CCB, FDCB และไนซิน เก็บที่ 4°C เป็นระยะเวลา 12 วัน แสดงดังรูป 4.7 มีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม ($p > 0.05$) โดยลูกชิ้นทุกชนิดมีค่า TBARS สูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา

เนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่แสดงดังรูป 4.8 พบว่า ลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซินทุกชนิด และลูกชิ้นควบคุมมีค่าแรงต้านทานการกดแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งสภาวะบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ โดยเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นลูกชิ้นมีค่าแรงการกดเพิ่มขึ้นด้วย เรียงลำดับจากค่าสูงที่สุดไปหาลำดับที่ต่ำสุดคือ ลูกชิ้นผสมไนซิน ลูกชิ้น CCB ลูกชิ้น FDCB และลูกชิ้นควบคุม ตามลำดับ แสดงว่าสารแบคทีริโอซินและไนซินทางการค้าที่ผสมลงไป ซึ่งเป็นส่วนผสมเพิ่มเติมจากลูกชิ้นควบคุม ทำให้เกิดแรงต้านทานการกดที่กระทำต่อหัววัดมีค่ามากขึ้น



รูป 4.7 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารแบคทีริโอซิน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ;
 A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่าง
 กันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 8$



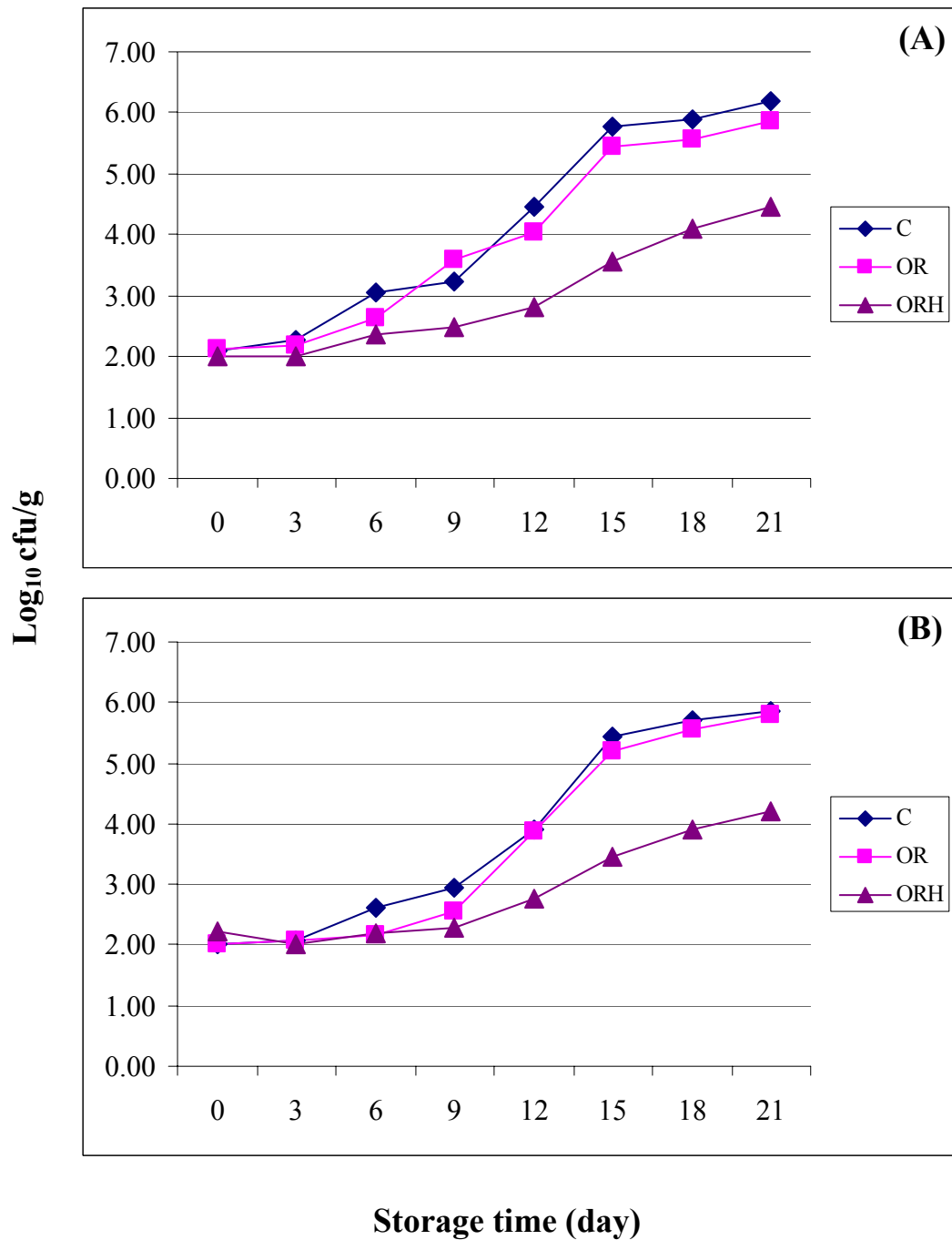
รูป 4.8 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 12$

4.4.3 ผลการผสมสารสกัดโรสแมรี่ในผสมของลูกชิ้นไก่

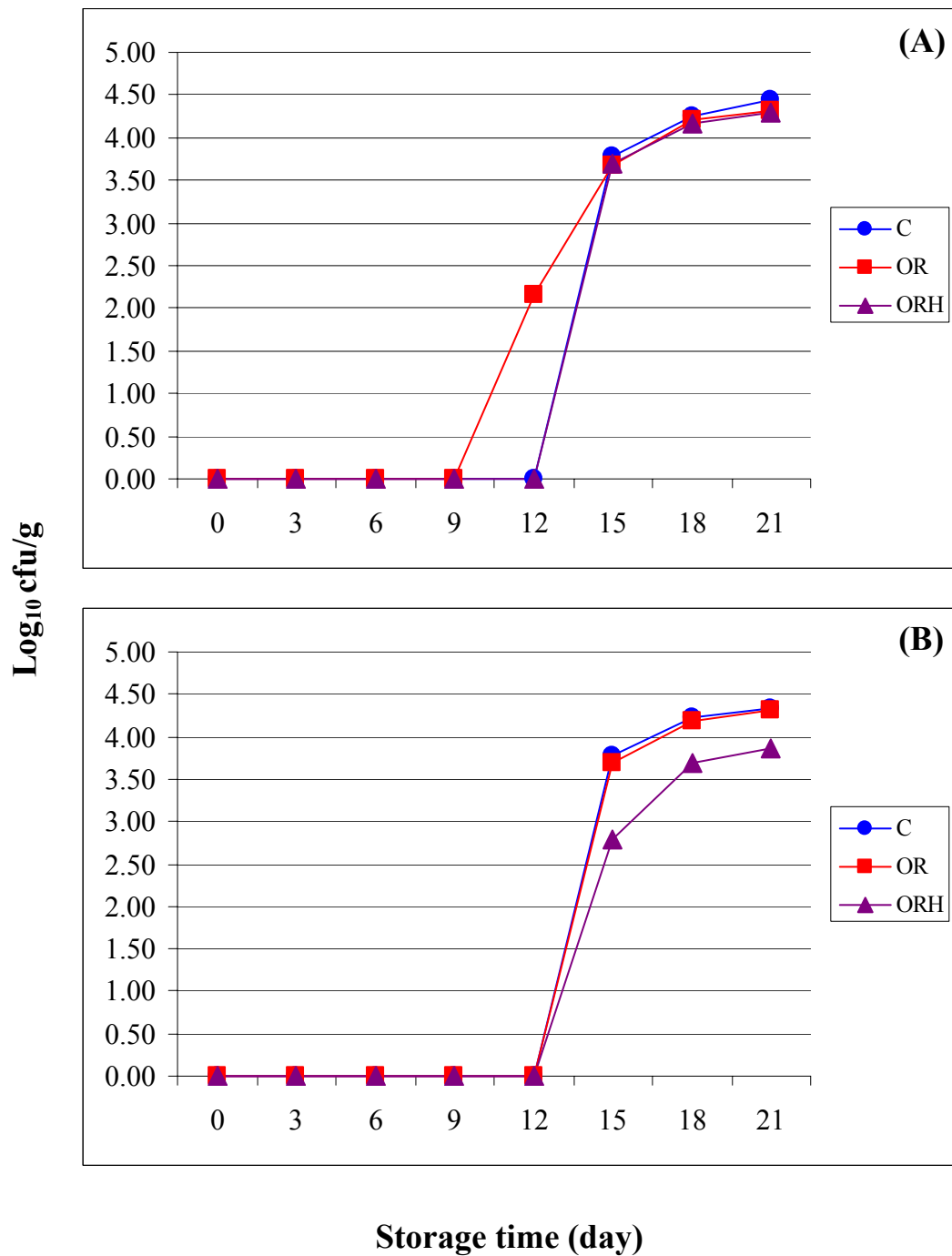
ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่ที่เติมสารสกัดโรสแมรี่ได้แก่ OR และ ORH ปริมาณ 0.5% ลงในส่วนผสมของลูกชิ้น แสดงดังรูป 4.9 พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ลูกชิ้นที่เติมสารสกัดโรสแมรี่ชนิด ORH มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าชนิด OR และลูกชิ้นควบคุม ในวันที่ 15 ของการเก็บแบบปกติพบว่า ลูกชิ้น OR มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกับลูกชิ้นควบคุม มีปริมาณเท่ากับ 5.45 และ 5.77 log cfu/g แต่ลูกชิ้น ORH มีค่าเท่ากับ 3.55 log cfu/g แสดงว่าการใช้ ORH เติมลงในลูกชิ้นไก่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดได้เท่ากับ 2 log cfu/g เทียบกับลูกชิ้นควบคุม โดยลูกชิ้นควบคุมและลูกชิ้น OR สามารถเก็บรักษาได้นานประมาณ 12 วัน ขณะที่ลูกชิ้น ORH สามารถเก็บได้นานมากกว่า 21 วัน

ปริมาณเชื้อ LAB ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารสกัดโรสแมรี่ แสดงดังรูป 4.10 พบว่าปริมาณ LAB ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่ 4°C ตรวจพบได้ในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา โดยลูกชิ้นทุกชนิดมีปริมาณ LAB ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ทั้ง 2 แบบสภาวะบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ และมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นในลูกชิ้นที่เติมสารสกัดโรสแมรี่และลูกชิ้นควบคุมไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่เติมสารสกัดโรสแมรี่ทุกชนิด และลูกชิ้นควบคุม เก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ตารางที่ 4.4) มีค่า pH ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ทั้ง 2 สภาวะการบรรจุ แต่มีแนวโน้มที่ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.12-6.22 แสดงว่า เมื่อเก็บลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานานหรือตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 21 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของลูกชิ้นทุกชนิด



รูป 4.9 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของ ลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging



รูป 4.10 ปริมาณ LAB (Log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging

ตารางที่ 4.4 ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารสกัดโรสแมรีเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

Storage time (days)	pH					
	Aerobic Packaging			Vacuum Packaging		
	C	OR	ORH	C	OR	ORH
0	6.22 ⁽¹⁾	6.21	6.22	6.14	6.15	6.15
3	6.14	6.15	6.16	6.14	6.15	6.16
6	6.12	6.14	6.14	6.13	6.14	6.15
9	6.13	6.15	6.15	6.15	6.16	6.15
12	6.12	6.14	6.14	6.14	6.14	6.15
15	6.13	6.15	6.15	6.13	6.15	6.15
18	6.12	6.13	6.14	6.13	6.14	6.14
21	6.12	6.13	6.14	6.13	6.14	6.14

⁽¹⁾ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

n= 6

การเกิดออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่ที่เติมสารสกัดโรสแมรี 2 ชนิดได้แก่ OR และ ORH และลูกชิ้นควบคุม เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยการหาปริมาณ TBARS แสดงผลดังรูป 4.11 พบว่า ปริมาณ TBARS ของลูกชิ้นไก่ทุกชนิดในวันที่ 0-3 อย่างค่อนข้างต่ำประมาณ 0.13-0.20 $\mu\text{g MDA/g sample}$ และเริ่มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น หลังจากผ่านวันที่ 6 ไปแล้ว โดยเฉพาะในวันที่ 12 ของการบรรจุแบบปกติ ค่า TBARS ของลูกชิ้นไก่ที่เติมสารสกัดโรสแมรีชนิด OR มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.42 $\mu\text{g MDA/g sample}$ แต่ปริมาณ TBARS ของลูกชิ้นที่มีการเติมสารสกัดโรสแมรีชนิด ORH มีค่าที่ไม่เปลี่ยนแปลงจากวันที่ 0 และมีค่าต่ำกว่าการเติมสารสกัดโรสแมรีชนิด OR และลูกชิ้นควบคุมทุกตัวอย่างตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดจากโรสแมรีชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] (ORH) มีการเกิดออกซิเดชันที่แตกต่างกับการใช้ชนิด oil of rosemary (OR) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้เทียบกับลูกชิ้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่า สารสกัดโรสแมรีชนิด OR ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในลูกชิ้นไก่

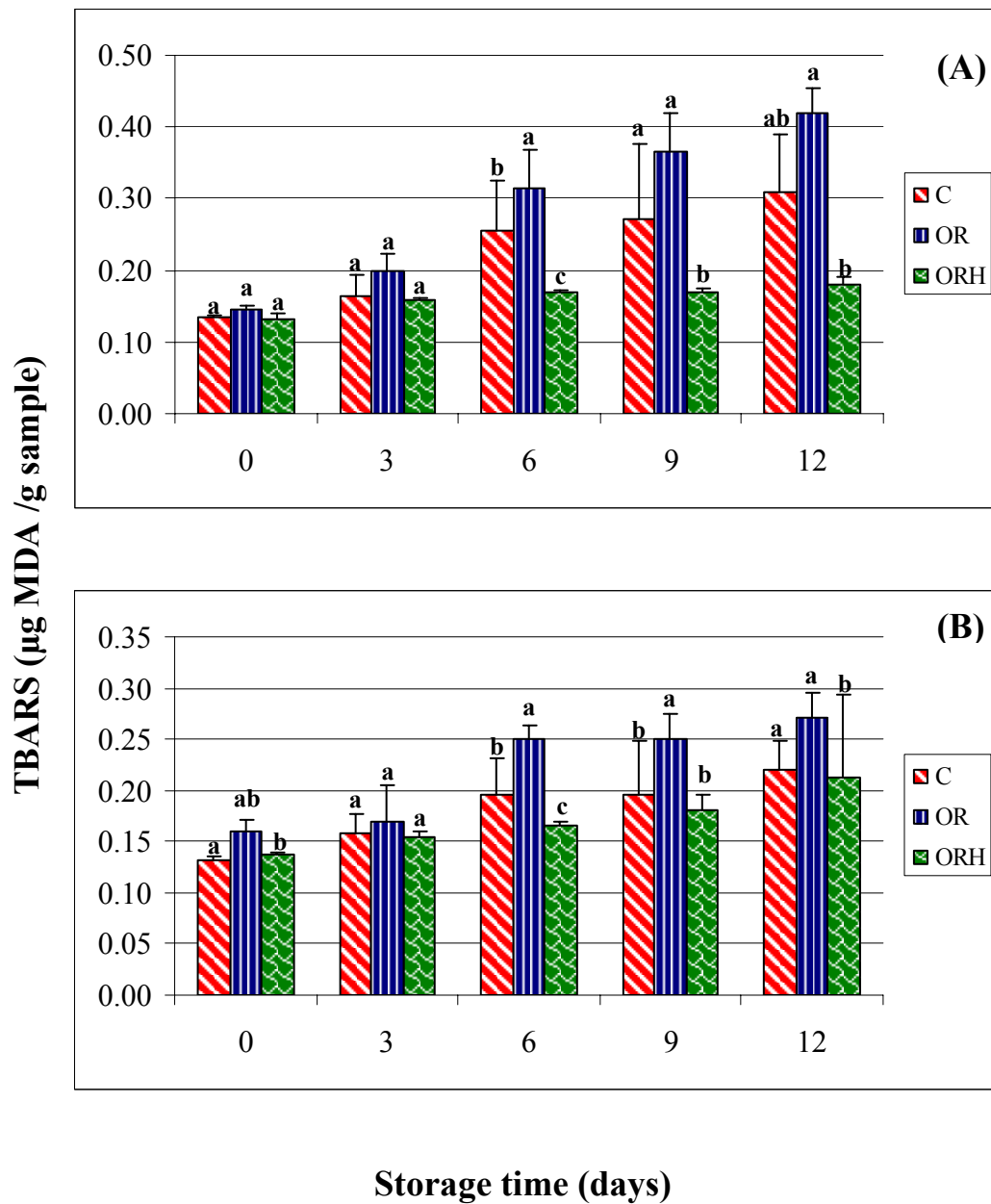
เมื่อสภาวะในการบรรจุของลูกชิ้นต่างกันมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันที่แตกต่างกันพบว่าสภาวะในการบรรจุแบบปกติ (รูป 4.11A) ของตัวอย่างลูกชิ้นทุกชนิดมีปริมาณ TBARS สูงกว่าสภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศ (รูป 4.11B) ซึ่งมีผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Martinez et al.

(2007) รายงานว่า ผลของสภาวะการบรรจุที่ไม่มีออกซิเจน ช่วยยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ในอาหารได้ดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากสารสกัดโรสแมรี วิตามินซี และ พริกไทยดำ เป็นต้น

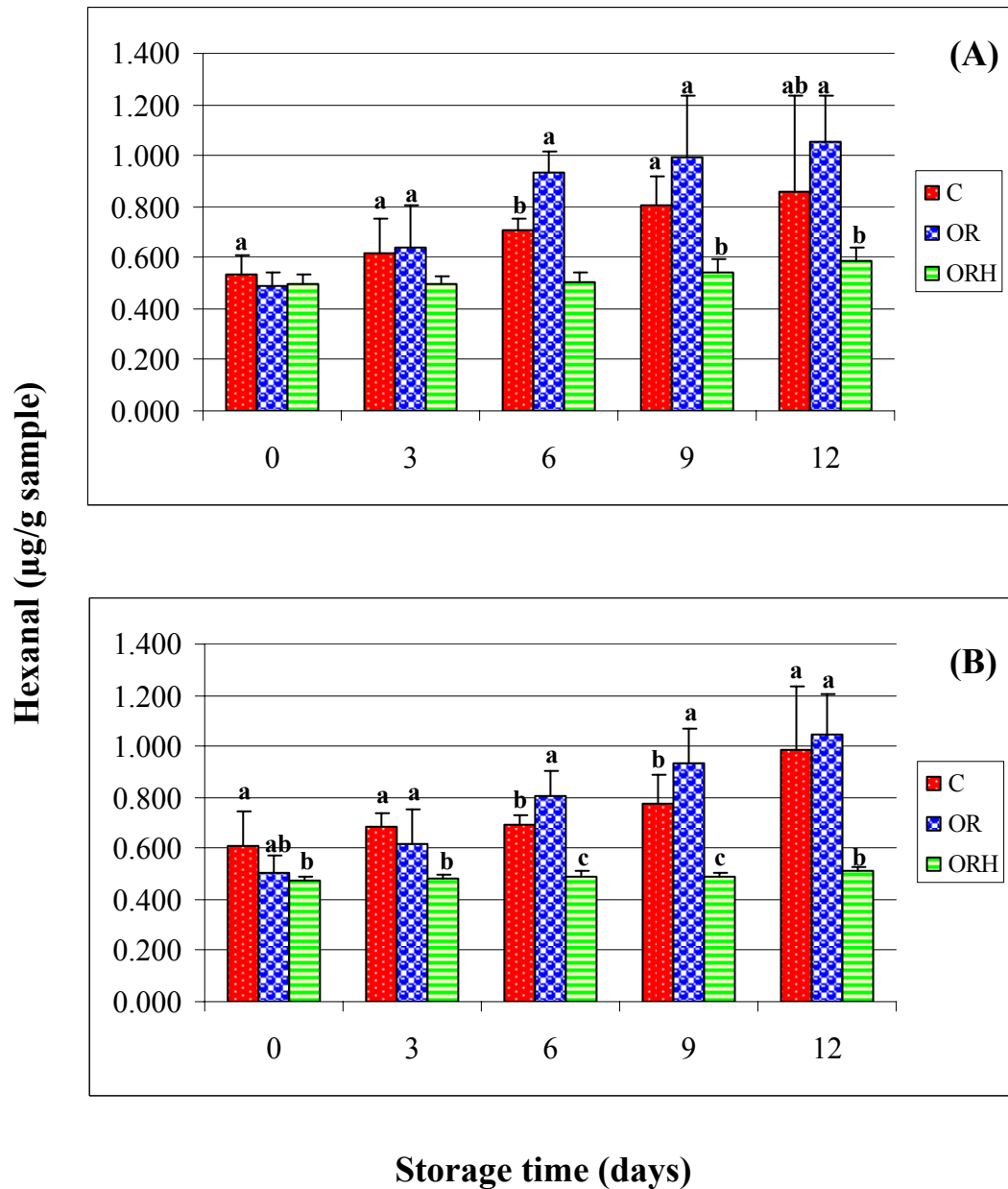
แบบบรรจุภัณฑ์มีอิทธิพลต่อการเกิดออกซิเดชันของอาหาร ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบเช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ เป็นต้น ดังนั้นการบรรจุแบบสุญญากาศสามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ เนื่องจากไม่มีออกซิเจนไปเร่งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัย ของ Martinez et al. (2006) ที่ทำการศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจน ในการบรรจุแบบดัดแปรบรรยากาศ (modified atmosphere) ที่ % ออกซิเจน: % คาร์บอนไดร็อกไซด์: % ไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ 0:20:80, 0:20:80 + O₂ scavenger, 20:20:60, 40:20:40, 60:20:20 และ 80:20:0 ต่ออายุการเก็บรักษาของไส้กรอกหมูพบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูที่บรรจุแบบไม่มีออกซิเจน (vacuum packed) และแบบใส่ตัวกำจัดออกซิเจน สามารถยืดอายุการเก็บของไส้กรอกหมูได้ โดยที่สี และกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากมีอัตราการเกิดออกซิเดชัน ต่ำ และในตัวอย่างที่มีออกซิเจนเป็นส่วนประกอบจะมีการเปลี่ยนแปลงของสี (discoloration) และเกิดกลิ่น (off-odor) อย่างรวดเร็ว ภายใน 8 วัน ของการเก็บรักษา

การวิเคราะห์ปริมาณ hexanal ในลูกชิ้นไก่ โดยใช้เครื่อง gas chromatography (GC) เป็น อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาการเกิดออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่นเดียวกับค่า TBARS ซึ่งทั้ง 2 ค่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน (Ahn, Grün, and Mustapha, 2007) โดยที่ ปริมาณ hexanal ในลูกชิ้นไก่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 6 เช่นกันกับปริมาณ TBARS (รูป 4.12) และเมื่อพิจารณาชนิดของสารสกัดโรสแมรีทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในลูกชิ้นไก่อีกก็ให้ผล เหมือนกันคือลูกชิ้น ORH มีปริมาณ hexanal ที่ต่ำกว่าลูกชิ้น OR และลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.05$) ทั้ง 2 แบบการบรรจุ โดยสังเกตในวันที่ 12 ปริมาณ hexanal ของลูกชิ้น ORH , OR และ ลูกชิ้นควบคุม เก็บแบบปกติมีค่าเท่ากับ 0.500, 1.055 และ 0.856 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ ขณะที่เก็บแบบสุญญากาศมีค่า เท่ากับ 0.989, 1.047 และ 0.487 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ

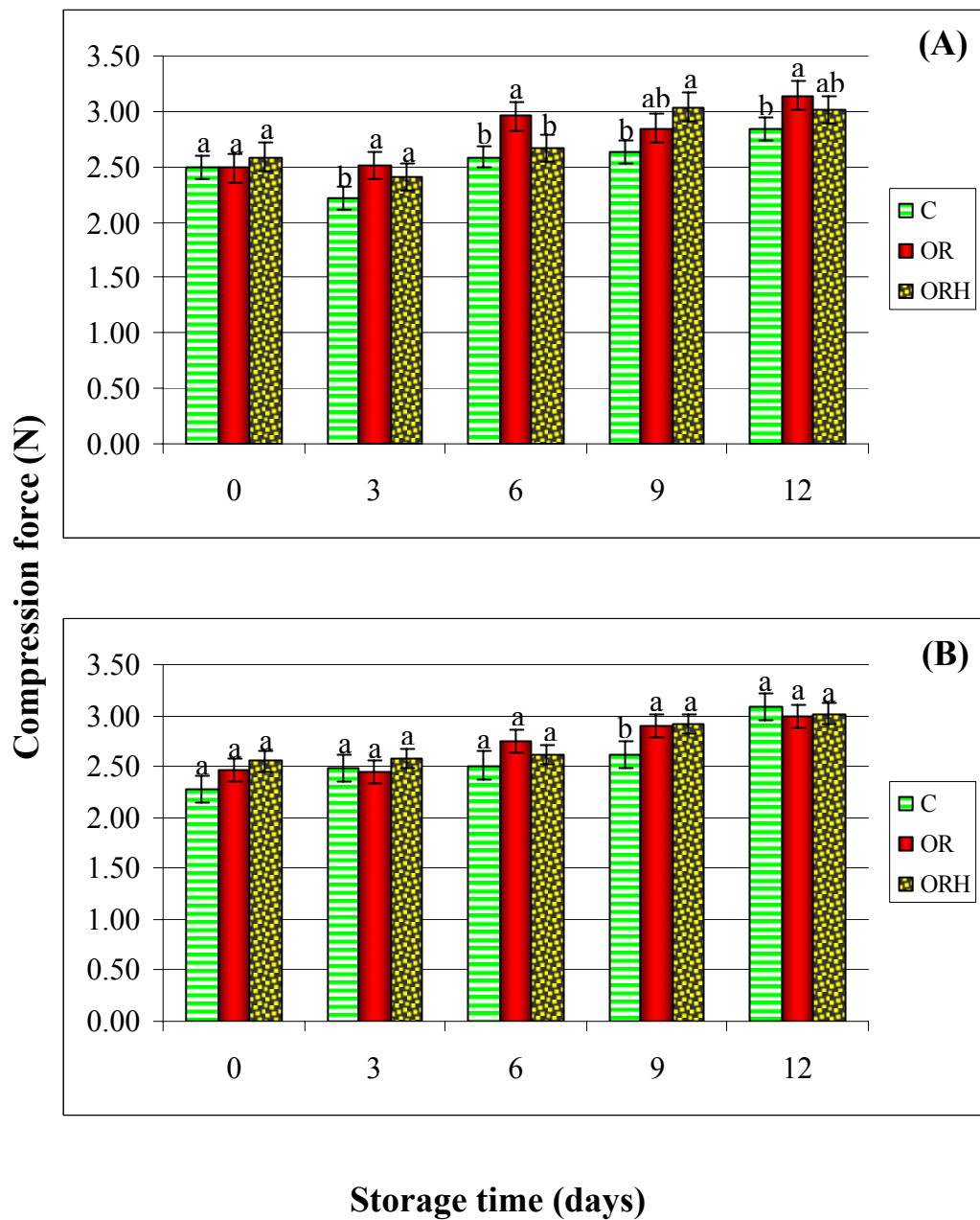
เนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารสกัดโรสแมรี แสดงดังรูป 4.13 พบว่า ลูกชิ้นไก่ที่ผสม สารสกัดโรสแมรีทุกชนิด มีค่าแรงต้านทานการกดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการ เก็บรักษาทั้งสองสภาวะการบรรจุ แสดงว่าการใช้สารสกัดโรสแมรีผสมลงใน batter ของลูกชิ้นนั้น ไม่มีผลต่อค่าแรงต้านทานการกดที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น ($p > 0.05$) เทียบกับ ลูกชิ้นควบคุม



รูป 4.11 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ;
 A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่าง
 กันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), $n=8$



รูป 4.12 ปริมาณ hexanal ($\mu\text{g/g}$ sample) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 6$



รูป 4.13 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ผสมสารสกัดโรสแมรี่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 12$

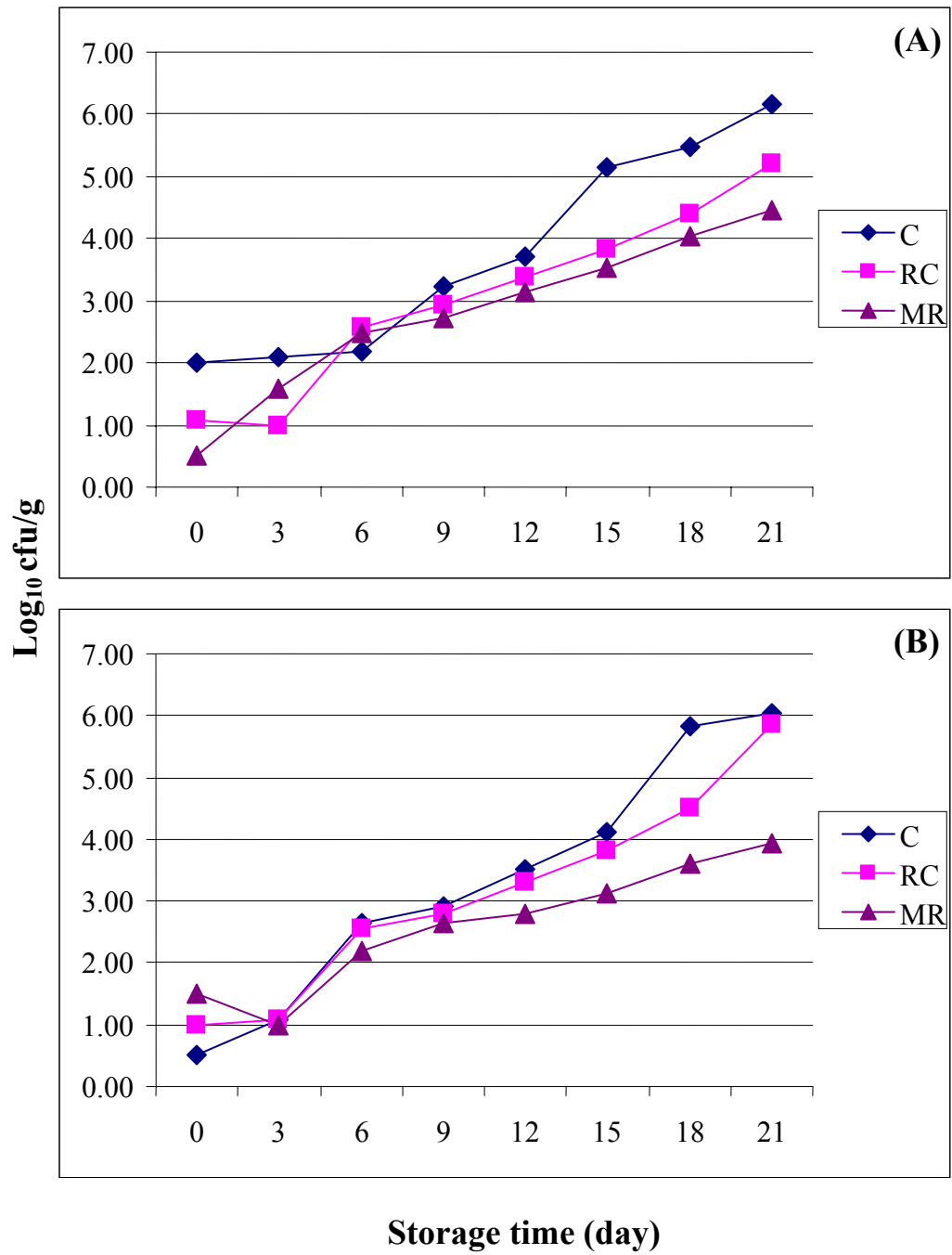
4.4.4 ผลการใช้สารแบคทีริโอซินร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่สำหรับผลิตลูกชิ้นไก่

การศึกษาการใช้ร่วมกันระหว่างสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ เพื่อเป็นสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial) และสารต้านออกซิเดชัน (antioxidation) ในลูกชิ้น 2 ชนิดคือ ลูกชิ้นผสมสารสกัดโรสแมรี่แล้วเคลือบสารแบคทีริโอซิน (mixed with rosemary extract and coated with bacteriocins; RC) และลูกชิ้นผสมสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ (mixed with bacteriocins and rosemary extract; MR)

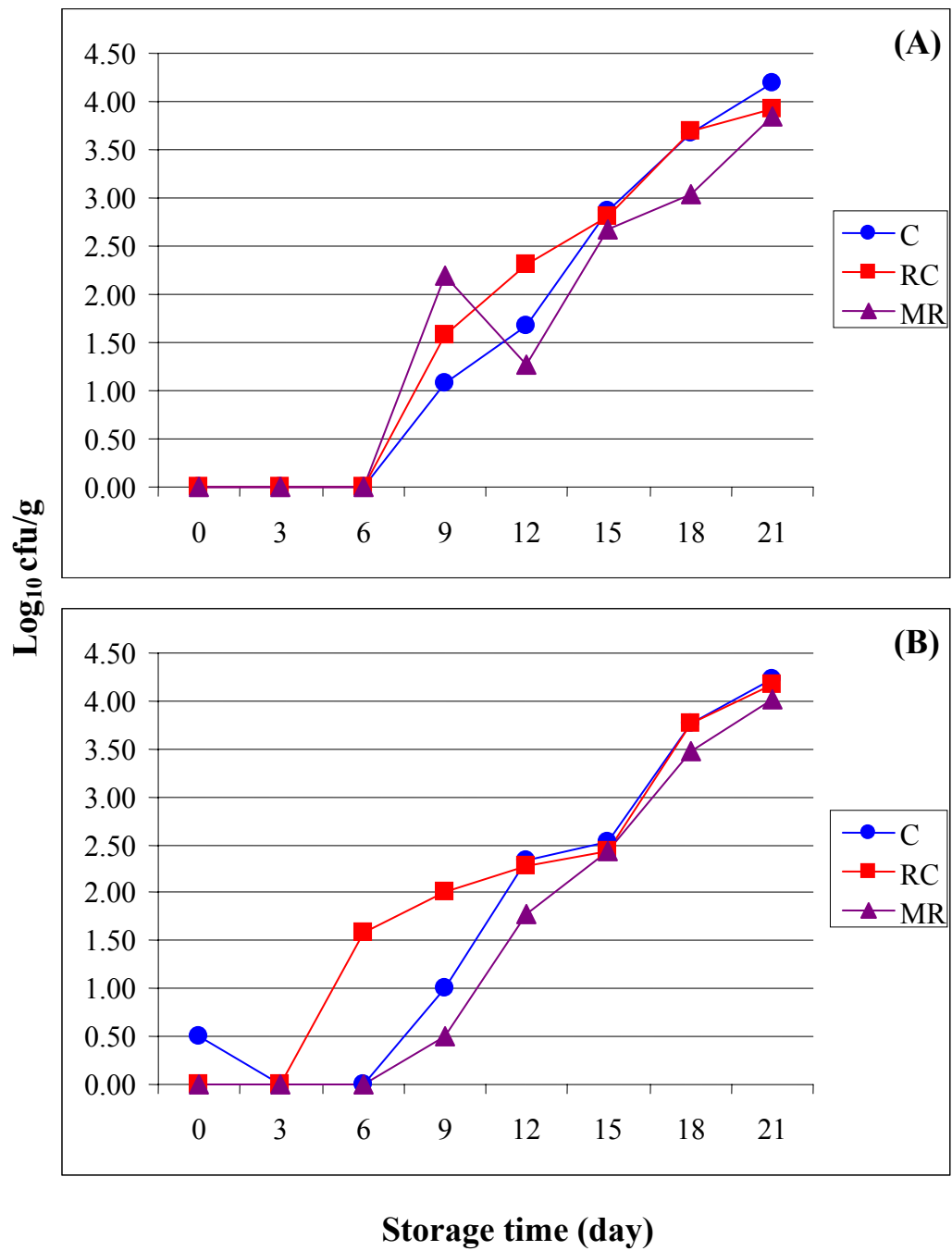
ลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึง 5 log cfu/g (ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เกินมาตรฐานกำหนด) ของสภาวะการบรรจุแบบปกติ (รูป 4.14A) ในวันที่ 15 ขณะที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่ RC และ MR มีปริมาณน้อยกว่าลูกชิ้นควบคุม โดยที่ลูกชิ้น MR มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า RC และลูกชิ้นควบคุม คือ 3.54, 4.83 และ 5.14 log cfu/g ตามลำดับ แสดงว่า ลูกชิ้น MR มีอายุการเก็บนานกว่า 21 วัน และลูกชิ้น RC สามารถเก็บได้ประมาณ 20 วัน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมประมาณ 14 วัน และสภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศ (รูป 4.14B) สามารถเก็บได้ 21 วัน 19 วัน และ 16 วัน ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารสกัดโรสแมรี่ (oleoresin rosemary Herbalox[®], ORH) 0.5% ร่วมกับสารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง (freeze drying crude bacteriocins, FDCB) 0.2% ผสมเพิ่มในส่วนผสมของลูกชิ้น (ลูกชิ้น MR) สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ดีกว่าการใช้สารสกัดโรสแมรี่ (oleoresin rosemary Herbalox[®], ORH) 0.5% แล้วเคลือบด้วย heated crude bacteriocins supernatant (HCBS) (ลูกชิ้น RC) ทั้งนี้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในวันที่ 15 ของสภาวะการบรรจุแบบปกติลูกชิ้น MR มีปริมาณลดประมาณ 1.54 log cycle และในวันที่ 18 สภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศ มีปริมาณลดประมาณ 2.21 log cycle เมื่อเปรียบเทียบกับลูกชิ้นควบคุม

ปริมาณเชื้อ LAB ทั้งหมดในลูกชิ้นไก่ แสดงดังรูป 4.15 พบว่า ปริมาณ LAB ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่เก็บที่ 4°C สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 6 เป็นต้นไป ลูกชิ้น RC และลูกชิ้น MR มีปริมาณ LAB น้อยกว่าลูกชิ้นควบคุม ทั้งในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศตลอดระยะเวลาการเก็บ 21 วัน จากผลการทดลองนี้แสดงว่า สามารถใช้สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่แทนสารต้านจุลินทรีย์จากเคมี ที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในการยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ได้



รูป 4.14 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) ป่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของ ลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging



รูป 4.15 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) บ่มเพาะเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดไวรัสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging

ผลการวัดค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้ร่วมกันระหว่างสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ (ตารางที่ 4.5) มีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างลูกชิ้นที่ผสมด้วยสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่กับลูกชิ้นควบคุม ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาและในสภาวะการบรรจุที่แตกต่างกัน โดยที่ค่า pH ของลูกชิ้นควบคุมและลูกชิ้นที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ มีค่า pH ต่างกันเล็กน้อยอยู่ในช่วง $\pm 0.02-0.04$ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาของลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 4°C ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH

ตารางที่ 4.5 ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

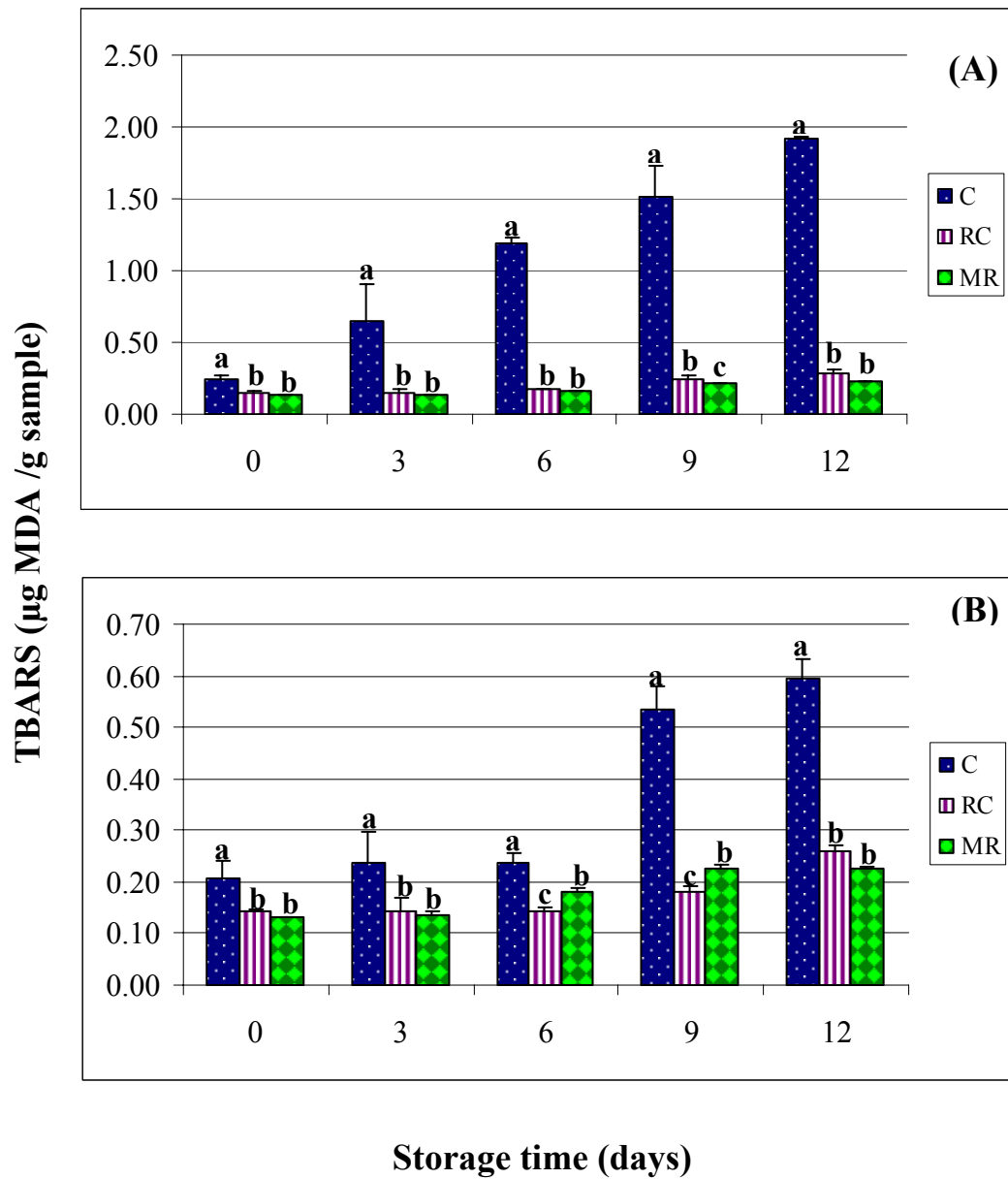
Storage time (days)	pH					
	Aerobic Packaging			Vacuum Packaging		
	C	RC	MR	C	RC	MR
0	6.21a ⁽¹⁾	6.18b	6.17b	6.19a	6.17ab	6.15b
3	6.17b	6.19a	6.20a	6.21a	6.21a	6.20a
6	6.19b	6.20ab	6.21a	6.21a	6.21a	6.21a
9	6.19b	6.21a	6.22a	6.23a	6.22a	6.23a
12	6.15a	6.17b	6.10c	6.17a	6.17a	6.10b
15	6.16b	6.17a	6.18a	6.14a	6.15a	6.15a
18	6.15b	6.17a	6.17a	6.18a	6.19a	6.18a
21	6.11b	6.13a	6.12a	6.14a	6.14a	6.13a

⁽¹⁾ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

n= 6

ผลการใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ในลูกชิ้นไก่ ในการด้านการเกิดออกซิเดชัน แสดงถึงค่า TBARS (รูป 4.16) พบว่า ลูกชิ้นไก่ควบคุมมีค่า TBARS สูงกว่าลูกชิ้น RC และลูกชิ้น MR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่ระยะเวลาการเก็บที่ 12 วัน ของสภาวะการบรรจุแบบปกติลูกชิ้นควบคุมมีค่า TBARS สูงที่สุดเท่ากับ 1.42 $\mu\text{g MDA/g}$ ขณะที่ค่า TBARS ของลูกชิ้น RC และลูกชิ้น MR มีค่าเท่ากับ 0.29 และ 0.23 $\mu\text{g MDA/g}$ ตามลำดับ และสภาวะการบรรจุ

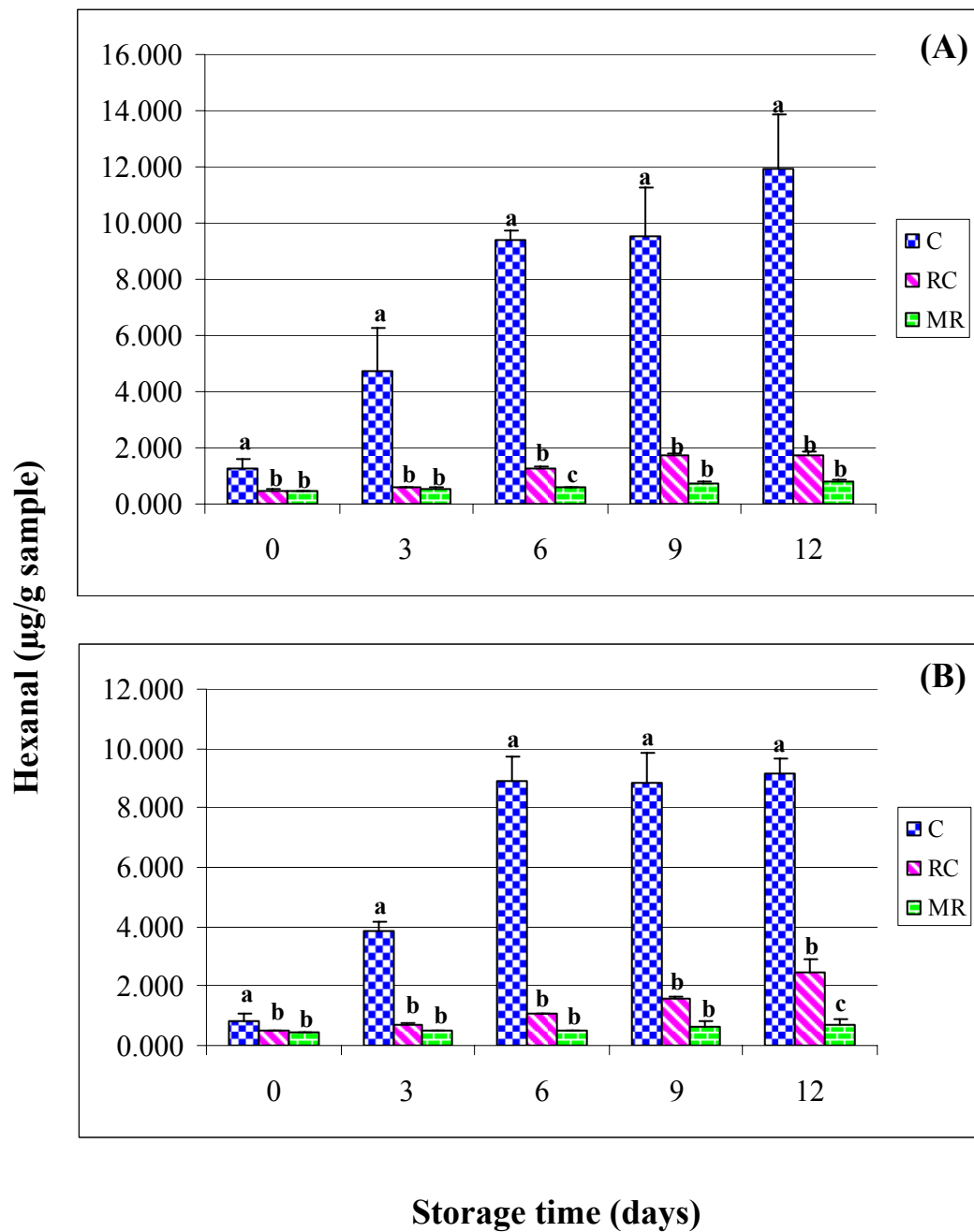
แบบสุญญากาศค่า TBARS ของลูกชิ้นควบคุมมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ ลูกชิ้น RC และลูกชิ้น MR โดยมีค่าเท่ากับ 0.60, 0.26 และ 0.23 $\mu\text{g MDA/g}$ ตามลำดับ



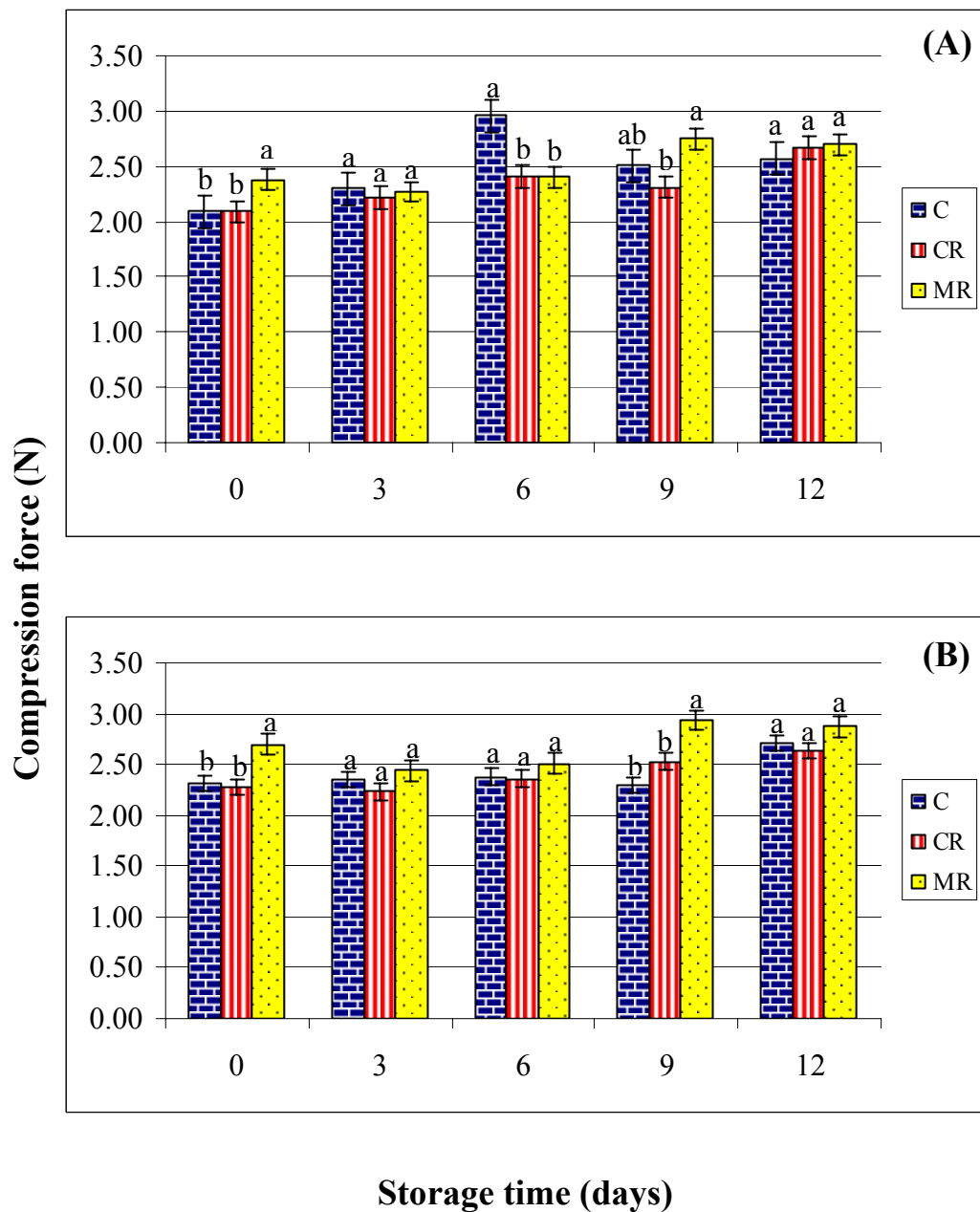
รูป 4.16 ค่า TBARS ($\mu\text{g MDA/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีเรียโอสลินและสารสกัดโรสแมรีในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 8$

ปริมาณ hexanal ในลูกชิ้นไก่แสดงดังรูป 4.17 โดยปริมาณ hexanal ของลูกชิ้นควบคุมมีค่าที่สูงที่สุดเท่ากับ 11.937 $\mu\text{g/g}$ (บรรจุแบบปกติ) เมื่อเทียบกับลูกชิ้นที่ใช้สารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์เหมือนกับปริมาณ TBARS คือ ถ้ามีปริมาณ TBARS สูงก็จะมีปริมาณ hexanal สูงขึ้นเช่นกันในทุก ๆ ตัวอย่างที่ระยะเวลาการเก็บวันเดียวกัน ($r^2 = 0.85$; $p < 0.05$) และเมื่อพิจารณาผลร่วมกันระหว่างสารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ต่อปริมาณ hexanal พบว่าลูกชิ้น MR มีปริมาณ hexanal ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา 12 วันนั้นต่ำกว่าลูกชิ้น CR และแตกต่างจากลูกชิ้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในวันที่ 12 (บรรจุแบบปกติ) มีค่าลดลงจากลูกชิ้น CR และลูกชิ้นควบคุม คิดเป็น 54.52% และ 94.46% ตามลำดับ และแบบสุญญากาศลูกชิ้นมีปริมาณ hexanal สูงที่สุดไปต่ำที่สุดคือ ลูกชิ้นควบคุม ลูกชิ้น RC และลูกชิ้น MR โดยมีค่าเท่ากับ 9.179, 2.462 และ 0.681 $\mu\text{g/g}$ ตามลำดับ

เนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ แสดงดังรูปที่ 4.18 พบว่า ลูกชิ้นไก่ที่ผสมสารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ทุกชนิด มีค่าแรงต้านทานการกดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ($p < 0.05$) ในบางวันของการเก็บรักษาที่บรรจุแบบปกติ แต่สำหรับแบบสุญญากาศลูกชิ้นผสมสารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่โดยรวมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ต่อค่าแรงต้านทานการกด (N.) เทียบกับลูกชิ้นควบคุม แต่ลูกชิ้น MR มีแรงกดสูงกว่าลูกชิ้น RC และลูกชิ้นควบคุมเล็กน้อยตลอดระยะเวลาเก็บรักษา



รูป 4.17 ปริมาณ hexanal ($\mu\text{g/g sample}$) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีรีโอซินและสารสกัดโรสแมรี ในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 4$



รูป 4.18 ค่าแรงต้านทานการกด (compression force, N) ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้สารแบคทีเรียโชนและสารสกัดโรสแมรี่ในการผลิตเก็บที่อุณหภูมิที่ 4°C; A= บรรจุแบบ aerobic packaging, B= บรรจุแบบ vacuum packaging; ตัวอักษรที่แตกต่างกันในกราฟ= มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), $n = 12$

4.4 สรุปผลการทดลอง

สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และสารสกัดโรสแมรี่ สามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติ และแบบสุญญากาศได้นานกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม เมื่อพิจารณามาตรฐานการปนเปื้อนของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ไม่ยอมรับในอาหารคือ 5.0 log cfu/g พบว่า ลูกชิ้นที่เคลือบสารแบคทีริโอซิน ลูกชิ้นที่ผสมสารแบคทีริโอซิน ลูกชิ้นที่ผสมสารสกัดโรสแมรี่ และลูกชิ้นที่ใช้ทั้งสารแบคทีริโอซิน และสารสกัดโรสแมรี่มีอายุการเก็บรักษาได้นานกว่า 9-15 วัน ของระยะเวลาการเก็บของลูกชิ้นควบคุม และการผสมสารสกัดโรสแมรี่ในลูกชิ้นไก่ สามารถลดอัตราการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่า ลูกชิ้นลูกชิ้นควบคุม โดยในวันที่ 12 ของการเก็บรักษาลูกชิ้นที่ผสมด้วยสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] มีค่า TBARS และปริมาณ hexanal ต่ำที่สุดเทียบกับลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.05$) ค่า pH และค่าด้านทานการกดของลูกชิ้นมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ดังนั้นสารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 และสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] สามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์และสารต้านออกซิเดชัน เพื่อยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ได้

4.5 รายการอ้างอิง

นิธิยา รัตนานนท์. (2545). เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.
สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2533). มาตรฐานผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อวัว ลูกชิ้นหมู และลูกชิ้นไก่ (มอก.1009-2533). สถาบันอาหาร.

สุริยรัตน์ เงินดวง. (2545). การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahn, J., Grün, I.U., and Mustapha, A. (2007). Effect of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiol.** 24: 7-14.

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

Anonymous. (2002). Antioxidant. Encyclopedia of Bioscience. The McGraw-Hill Co., Inc. [Online]. Available: <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Antioxidant+food>.

Anonymous. (2007). *Bacillus cereus*. Food safety: Ireland [On-line]. Available: www.fsai.ie/publications/factsheet/factsheet_bacillus_cereus.pdf.

- A.O.A.C. (1997). **Official Methods of Analysis**. 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Washington D.C.
- Borch, E., Kant-Muermans, M., and Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **Food Microbiol.** 33: 103-120.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F.N., and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocin from Lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **J. Biosci. Bioen.** 87: 705-716.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., and Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. **Meat Sci.** 69: 371-380.
- Holy, A.V., Holzapfel, W.H., and Dykes, G.A. (1992). Bacterial populations associated with Vienna sausage packaging. **Food Microbiol.** 9: 45-53.
- Huang, S.C., Shiau, C.Y., Liu, T.E., Chu, C.L., and Hwang, D.F. (2005). Effect of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. **Meat Sci.** 70: 613-619.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Sci.** 49 :139-150.
- Inatani, R., Nakatani, N., and Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) and their derivatives. **Agric. Biol. Chem.** 47: 521-528.
- Keokamnerd, T., Acton, J. C., Han, I. Y., and Dawson, P. L. (2008). Effect of commercial rosemary oleoresin preparations on ground chicken thigh meat quality packaged in a high-oxygen atmosphere. **Poultry Sci.** 87:170-179.
- Khalid F., Siddiqi R., and Mojgani N., (1999). Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of Lactobacilli. **Med. J. Islamic Acad. Sci.** 12: 67-71.
- Kun, S., Rezessy-Szabó, J.M., Nguyen, Q.D., and Hoschke, A. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. **Process Biochem.** 43: 816-821.

- Lalas, S., and Dourtoglou, V., (2003). Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. **JAOCs**. 80: 579-583.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4084-4090.
- Lee, J.W., Park, K.S., Kim, J.G., Oh, S.H., Lee, Y.S., Kim, J.H., and Byun, M.W. (2005). Combined effect of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. **Radiation Phys. Chem.** 72: 49-56.
- Martinez, L., Djenane, D., Cilla, I., Beltran, J.A., and Roncale, P. (2006). Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. **Food Chem.** 94: 219-225.
- Martinez, L., Cilla, I., Beltran, J. A., and Roncales, P. (2007). Effect of illumination on the display life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. Influence of the addition of rosemary, ascorbic acid and black pepper. **Meat Sci.** 75: 443-450.
- McDonald, R.E., and Hultin, H.O. (1987). Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. **J. Food Sci.** 52: 15-21.
- Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P., and Hill, C. (1999). Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. **J. Food Prot.** 62: 1011-1016.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C., and Hardisson de la Torre, A. (2002). Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. **Meat Sci.** 62: 237-243.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.del.C., and de la Torre, A.H. (2006). Effect of a bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. **Meat Sci.** 72: 57-61.
- Samelis, J., Bjorkroth, J., Kakouri, A., and Rementzis, J. (2006). *Leuconostoc carnosum* associated with spoilage of refrigerated whole cooked hams in Greece. **J. Food Protec.** 69: 2268-2273.
- Sankuntaw, N., Suranarakun, W., Phumkhachorn, P., and Rattanachaikunsopon, P. (2008). Partial characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus* SK 5.1: antimicrobial

spectrum and optimal incubation time for bacteriocin production [On-line]. Available:
http://www.scisoc.or.th/stt30/sec_b/paper/stt30_B0024.pdf.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, 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.

The Meat Standards Committee of ARMCANZ. (2003). Vacuum-packed meat: storage life and spoilage. Agricultural and Resource Management Council of Australia and New Zealand [On-line]. Available: **www.meatupdate.csivo.au**.

Viana, E.S., Gomide, L.A.M., and Vanetti, M.C.D. (2005). Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. **Meat Sci.** 71: 696-705.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในลูกชิ้น และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีจำนวนประชากรสูง (dominant microbial flora) เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) ได้ทั้งหมด 3 สายพันธุ์คือ *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus saprophyticus* และ *Bacillus* spp. strain PN-3 มีจำนวนประชากรเท่ากับ 3%, 12% และ 85% ตามลำดับ และเมื่อใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบความสามารถในยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จำนวน 5 สายพันธุ์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยวิธี agar well diffusion พบว่า เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินคือ *Stap. saprophyticus* และ *Bacillus* spp. strain PN-3

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุด จาก 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *Pediococcus acidilactici* TISTR 424 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 พบว่า สารแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบดีที่สุดคือ สารแบคทีริโอซิน (CBS) จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ซึ่งมีคุณสมบัติที่มีความเสถียรต่อความร้อนได้ถึง 100°C เป็นเวลา 20 นาที และมีความเสถียรต่อช่วง pH 2-7 จะสูญเสียประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงครึ่งหนึ่งที่ pH 8 เทียบกับที่ pH 6.5 และสูญเสียประสิทธิภาพการยับยั้งทั้งหมดที่ pH 9 เป็นต้นไป นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินชนิดผงแห้ง (FDCB) มีประสิทธิภาพการยับยั้งมากกว่า CBS และชนิดของเหลวข้น (CCB) โดยมีค่าการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 6,400, 5,333.3 และ 3,200 AU/ml ตามลำดับ

การใช้สารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ในการยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่ โดยการเคลือบ การผสมอย่างใดอย่างหนึ่ง และการใช้สารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน เพื่อดำเนินการเจริญของจุลินทรีย์ และการดำเนินการเกิดออกซิเดชันของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาวะการบรรจุแบบปิดปกติ และแบบสุญญากาศ ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทางเคมีได้แก่ ค่า pH ค่า TBARS และปริมาณ hexanal

และทางกายภาพวิเคราะห์เนื้อสัมผัสแสดงค่าแรงต้านทานการกดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 12-21 วัน พบว่า

การเคลือบและการผสมสารแบคทีเรียโอสลินในลูกชิ้น สามารถลดการเจริญของจุลินทรีย์ของลูกชิ้นได้ดีกว่าลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.05$) โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 9 และ 15 วันตามลำดับ เมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม มีค่า TBARS ไม่แตกต่างกับลูกชิ้นควบคุมตลอดระยะเวลาเก็บรักษา ส่วนค่า pH และเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นทุกชนิดมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยตลอดระยะเวลาเก็บรักษา

การผสมสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] ในลูกชิ้น สามารถลดการเกิดออกซิเดชันได้ดีที่สุดโดยมีค่า TBARS และปริมาณ hexanal ในปริมาณต่ำกว่าลูกชิ้นควบคุม ($p < 0.01$) และมีปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนน้อยกว่าลูกชิ้นควบคุม ค่า pH และเนื้อสัมผัสมีค่าใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

การใช้สารแบคทีเรียโอสลินชนิด FDCB ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 และสารสกัดโรสแมรี่ชนิด oleoresin rosemary Herbalox[®] ผสมในส่วนผสมลูกชิ้นไก่ เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นได้นานกว่าลูกชิ้นควบคุม เนื่องจากเป็นการเสริมฤทธิ์การทำงานในการต้านจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอสลิน และการต้านออกซิเดชันของสารสกัดโรสแมรี่ สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วัน ทั้ง 2 แบบการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บได้นานกว่าลูกชิ้นควบคุมประมาณ 1 สัปดาห์

ประวัติผู้เขียน

นางสาวมาลัยพร ศรีวิระ เกิดเมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดนครราชสีมา เริ่มศึกษาระดับชั้นประถมที่โรงเรียนชุมชนบ้านศิระละเลิง ชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 และต่อระดับชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนบุญวัฒนา ศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2540 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543 จากนั้นในปี พ.ศ. 2544-2546 ทำงานในตำแหน่งเจ้าหน้าที่วิจัยและพัฒนา ที่บริษัท เจียแม็ง จำกัด นครราชสีมา ภายหลังได้ศึกษาต่อในระดับระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปี พ.ศ. 2546