



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การเคลือบสารสกัดสมุนไพรบนไส้บรรจุไส้กรอก
เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

Coating Spice Extracts on Sausage Casing
to Inhibit Foodborne Pathogens

โดย

ดร. จิตศิริ ราชตะนະພັນ

ตุลาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การเคลือบสารสกัดสมุนไพรบนไส้กรอก
เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

Coating Spice Extracts on Sausage Casing
to Inhibit Foodborne Pathogens

ดร. จิตศิริ ราชตะนันทน์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980155

ชื่อโครงการ: การเคลือบสารสกัดสมุนไพรบนไส้บรรจุไส้กรอกเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

ชื่อนักวิจัย: ดร. จิตศิริ ราชตะนະพันธุ์

E-mail Address: fagicrt@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม 2549 - ตุลาคม 2551

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ไปใช้ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ โดยทดสอบประสิทธิภาพการของน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรไทย 5 ชนิด ในการยับยั้งจุลินทรีย์แบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะและแบคทีเรียกรดแลคติก รวม 30 สายพันธุ์ โดยใช้ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) จากเทคนิค agar dilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยกระชายและมะกรูด สารสกัดเอทานอลจากกระชายและขิง มีฤทธิ์ยับยั้ง *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. โดยไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นประโยชน์ในไส้กรอกเปรี้ยว ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าสารสกัดเอทานอลของสมุนไพร จากนั้นทำการเคลือบไส้บรรจุไส้กรอก คือ ไส้สด ไส้คอลลาเจน และไส้เซลโลโลส โดยแช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 50 เท่า ของค่า MIC และทดสอบประสิทธิภาพการเป็นไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ส่วนไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในขณะที่ไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหมยมะกรูด ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. Weltevreden* การใช้ไส้บรรจุที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหมยมะกรูดช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกเปรี้ยวในระหว่างการเก็บรักษาได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม โดยไม่มีผลกระทบต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ ดังนั้น ไส้สดหรือไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหมยมะกรูดจึงมีศักยภาพในการเป็นไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้กับไส้กรอกเปรี้ยวหรือประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อื่นต่อไป

คำสำคัญ: สมุนไพร น้ำมันหอมระเหย ไส้บรรจุ ไส้กรอกเปรี้ยว แบคทีเรียก่อโรค

ABSTRACT

Project Code: MRG4980155

Project Title: Coating Spice Extracts on Sausage Casing to Inhibit Foodborne Pathogens

Investigator: Mrs. Chitsiri Rachtanapun, Ph.D.

E-mail Address: fagicrt@ku.ac.th

Project Period: July 2006 - October 2008

The purpose of this study was to evaluate the potential of applying antimicrobial casing on meat product. Antimicrobial activity of 11 essential oils (EO), 5 herbal ethanolic extracts against 30 strains of foodborne pathogenic bacteria and lactic acid bacteria (LAB) were determined using minimum inhibitory concentration (MIC) by agar dilution technique. Fingerroot essential oil (EOF), kaffir lime essential oil (EOK), fingerroot ethanolic extract and ginger ethanolic extract were active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., but inactive on LAB in particular the beneficial strains of fermented meat. Furthermore, essential oils had stronger inhibitory effect than ethanolic extracts. After that coated antimicrobial extract on sausage casing was prepared by soaking fresh, collagen and cellulose casing in either EO or ethanolic extracts at concentration 0, 10 and 50 fold of the MIC value, then the antimicrobial activity was determined by using agar diffusion method. Fresh casing coated with 5% EOF inhibited *B. cereus*, *S. aureus* and *S. Typhimurium*; collagen casing coated with 5% EOF inhibited Gram positive bacteria such as *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *S. aureus*; and collagen casing coated with 5% EOK inhibited Gram negative bacteria such as *E. coli*, *S. Typhimurium* and *S. Weltevreden*. Casing coated with either EOF or EOK reduced pathogenic bacterial numbers on fermented sausage lower than control, without changing LAB numbers. Thus, fresh or collagen casing coated with EOF or EOK has potential to be used as antimicrobial casing. It could be used on fermented sausage and also apply to other meat products.

Keyword: Spice, Essential oil, Casing, Fermented sausage, Pathogenic bacteria

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
อุปกรณ์และวิธีการ	3
ผลการทดลองและวิจารณ์	10
สรุปผลการทดลอง	42
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	43
เอกสารอ้างอิง	44
Output จากโครงการวิจัย	47

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยว สูตรที่ 1	10
2 ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยว สูตรที่ 2	11
3 สมบัติทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยวที่สำรวจจากท้องตลาด	11
4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหย	14
5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกของน้ำมันหอมระเหย	15
6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของสารสกัดสมุนไพร	17
7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกของสารสกัดสมุนไพร	18
8 ขนาดไซนัยบ่งของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียกรดแลคติก	23
9 ขนาดไซนัยบ่งของน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียกรดแลคติก	25
10 ขนาดไซนัยบ่งของสารสกัดเอทานอลของกระชายจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อ โรคและแบคทีเรียกรดแลคติก	27
11 ขนาดไซนัยบ่งของสารสกัดเอทานอลของขิงจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและ แบคทีเรียกรดแลคติก	29
12 ค่า pH ของไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหย เก็บรักษาเป็น ระยะเวลา 3 วัน	30
13 ค่า pH ของไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้คอลลาลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหย เก็บ รักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน	30
14 ค่า a_w ในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้คอลลาลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการ เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน	31
15 ค่า a_w ในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้คอลลาลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการ เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน	31
16 จำนวนแบคทีเรียที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลลาลาเจนที่เคลือบ น้ำมันหอมระเหยในการบรรจุหลังเก็บรักษา 3 วัน	35

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	ปริมาณ <i>Salmonella</i> spp. ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน	36
18	ปริมาณ <i>E. coli</i> ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน	37
19	ปริมาณ <i>S. aureus</i> ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน	38

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar dilution	7
2 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน	40
3 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน	40
4 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน	41
5 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน	41

บทนำ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเนื่องจากมีรสชาติที่อร่อยและรับประทานง่าย โดยทั่วไปไส้กรอกเปรี้ยวประกอบด้วยส่วนผสมที่สำคัญ ได้แก่ เนื้อหมู มันหมู ข้าวสุก เกลือ กระเทียมและไส้ที่ใช้บรรจุซึ่งอาจผลิตจากไส้สดหรือไส้คอลลลาเจน เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์สด ไส้กรอกเปรี้ยวจะมีระยะเวลาการเก็บรักษานานกว่า เนื่องจากฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของกระเทียม (Sallam *et al.*, 2004) การเติมเกลือที่มีผลต่อการลดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (Water activity; a_w) และที่สำคัญ คือ มีการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ทำให้อาหารมีความเป็นกรดสูงขึ้นหรือทำให้ค่า pH ของอาหารลดต่ำลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียไม่สามารถเจริญได้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงพบการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในไส้กรอกเปรี้ยวได้ ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยในอาหาร ดังนั้นการควบคุมและลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกเปรี้ยวจึงเป็นเรื่องที่สำคัญ จากการศึกษาพบว่า การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารบ่อยครั้งเกิดจากการปนเปื้อนจากวัตถุดิบหรือการปนเปื้อนบริเวณสัมผัสภายนอกผิววนอก โดยเฉพาะไส้กรอกเปรี้ยวมีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิ *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* จากวัตถุดิบและวิธีการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรเพื่อด้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพร โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้และช่วยยืดอายุเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น ดังรายงานของ Aureli *et al.* (1992) พบว่าน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ อบเชย กานพลู ออริกาโน พิมเสนได้และไทม์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Listeria innocua* เมื่อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ยิ่งไปกว่านี้เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยของโรสแมรี่ในเนื้อหมูปด สามารถลดปริมาณของ *L. monocytogenes* ได้ 100 เท่าหลังจากเก็บเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ต่อมา Sallam *et al.* (2004) รายงานความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกระเทียมในไส้กรอกไก่ว่า การเติมกระเทียมสดลงในไส้กรอก (30 กรัม/กิโลกรัม) หรือ กระเทียมผง (9 กรัม/กิโลกรัม) สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศในการเจริญ (Aerobic plate count) นอกจากนี้ยังสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาไส้กรอกออกไปได้ 21 วัน ทั้งยังสามารถลดกลิ่นหืนในไส้กรอกได้ ในปีเดียวกัน Yadav *et al.* (2004) พบว่าสารสกัดจากขมิ้นที่ระดับความเข้มข้น 0.4% (v/v) และ 0.8% (v/v) ยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* ในเนื้อไก่สับละเอียด พร้อมทั้งยืดอายุ

การเก็บรักษาได้ 2 และ 4 วันที่อุณหภูมิตู้เย็น ตามลำดับ และล่าสุด Busatta *et al.* (2008) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากมารโจรัม (*Marjoram*) (*Origanum marjorana*) เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในไส้กรอก ได้แก่ *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* sp., *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherchia coli* และ *Salmonella Choleraesuis* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากมารโจรัมมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งได้แก่ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.069 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องมาจาก terpinen-4-ol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในมารโจรัมออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

สำหรับสมุนไพรไทย Thongson *et al.* (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยกระชายยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่ความเข้มข้น 0.4% (v/v) ด้วยวิธี agar dilution และเมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยกระชายความเข้มข้น 0.2% ในน้ำแอมป์เปิล สามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/มิลลิลิตร ของ *L. monocytogenes* Scott A และ *S. Typhimurium* DT104 ให้อยู่ในปริมาณที่ตรวจไม่พบภายใน 1-2 วัน นอกจากนี้ Oonmetta-aree และคณะ (2006) พบว่าน้ำมันหอมระเหยข่ายับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 0.325 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี agar diffusion และในปีเดียวกัน Pattaratanawadee และคณะ (2006) รายงานว่าสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเฮกซะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะสารสกัดกระชายที่ 10% (v/v) ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ได้ภายใน 9 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านี้ปทุม (2551) ได้พัฒนาฟิล์มต้านจุลินทรีย์จากซีน (Zein) ที่เติมน้ำมันหอมระเหยกระชายร่วมกับกระชาย เพื่อยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* Scott A และยืดอายุการเก็บรักษาโบโลญ่าได้อย่างน้อย 2 วัน

ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหยในอาหารแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายประการ อาทิ ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ ชนิดและองค์ประกอบของอาหาร เป็นต้น ทั้งยังมีข้อจำกัดด้านสีและกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยที่อาจส่งผลกระทบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส จะเห็นได้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการเติมลงไปโดยตรงในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ซึ่งเข้ากันได้ดีกับกลิ่นของสมุนไพร อย่างไรก็ตามยังไม่พบการนำไปประยุกต์ใช้บนไส้กรุก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมาใช้ในเคลือบไส้กรุกเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก โดยใช้ไส้กรอกเบียร์เป็นโมเดลอาหาร

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษในไส้กรอกเปรี้ยว
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบสารสกัดสมุนไพรบนผิวของไส้บรรจุ
3. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบนผิวไส้กรอกเปรี้ยว
4. ศึกษาผลกระทบของสารสกัดสมุนไพรที่เคลือบบนผิวไส้บรรจุต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติในการหมักไส้กรอกเปรี้ยว

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว สุ่มซื้อตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวจากร้านค้าในตลาดสด รถเข็นริมถนน และซูเปอร์มาร์เก็ตบริเวณรอบมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ทันที หรือเก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10°C) ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ณะรอการตรวจสอบ

การผลิตไส้กรอกเปรี้ยว เตรียมส่วนผสมไส้กรอกเปรี้ยว (ไส้กรอกเปรี้ยวสูตร 1 ประกอบด้วย เนื้อหมู 1 กิโลกรัม มันแข็งและหนังหมู (3:1) 400 กรัม กระเทียมปอกเปลือก 50 กรัม ลูกผักชีป่น 2 กรัม เกลือ 25 กรัม น้ำตาล 10 กรัม พริกไทยป่น 5 กรัม และข้าวเจ้าหุงสุก 500 กรัม ไส้กรอกเปรี้ยวสูตร 2 ประกอบด้วย หมูเนื้อแดง 225 กรัม มันหมูแข็ง 187.5 กรัม ข้าวสุก 437.5 กรัม กระเทียมปอกเปลือก 43.75 กรัม เกลือ 10 กรัม น้ำตาล 8.75 กรัม พริกไทย 5 กรัม น้ำกระเทียมดอง 8.75 กรัม ซอสถั่วเหลือง 6.25 กรัม และหนังหมูหั่นเป็นเส้น 37.5 กรัม) ผสมส่วนผสมที่เตรียมไว้ในแต่ละสูตรให้เข้ากัน บรรจุส่วนผสมลงในไส้หมูสดด้วยเครื่องอัดไส้กรอก มัดไส้กรอกเป็นปล้องๆ ด้วยเชือกแล้วนำมาผึ่งลม ทำการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและจุลินทรีย์ทุกวันจนกระทั่งค่า pH ลดลงถึง 4.5 จึงหยุดตรวจ ทำการทดลองสูตรละสองซ้ำ

การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยว ตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวทั้งที่ผลิตเองและสุ่มซื้อจากท้องตลาด นำมาตรวจสอบค่า pH, ค่า a_w และเพาะเชื้อจุลินทรีย์เพื่อตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์กรดแลคติกที่มีบทบาทในการหมักไส้กรอกเปรี้ยวและจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. โดยอ้างอิงวิธีการจาก Vanderzant และ Splittstoesser (1992) สำหรับจุลินทรีย์กรดแลคติกทำการแยกเชื้อ (Isolation)

เพื่อนำไปทดสอบความไวต่อสารสกัดสมุนไพรในขั้นต่อไป การวิเคราะห์ค่า a_w ของไส้กรอกเปรี้ยวหาได้โดยนำตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวแต่ละตัวอย่างใส่ลงใน chamber ของเครื่องวัดค่า a_w โดยตั้งอุณหภูมิของเครื่องไว้ที่ 25 °C ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ของการเก็บรักษา สำหรับค่า pH ของไส้กรอกเปรี้ยวจะทำการวิเคราะห์ โดยชั่งตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว 5 กรัม และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH

น้ำมันหอมระเหย ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจำนวน 11 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด (Thai-Chinese Flaver and Fragrance Co., Ltd, อัญญา, ประเทศไทย) ได้แก่ ขิง (*Ginger, Gingeral officinale* Linn.) ข่า (*Galangale, Alpinia galangal* Swartz.) ขมิ้นชัน (*Turmeric, Curcuma longa* Linn.) กระชาย (*Fingerroot, Boesenbergia pandurata* Roxb.) กระเพรา (*Holy basil, Ocimum sanctum* L.) ตะไคร้ (*Lemon grass, Cymbopogon citratus* Stapf) ตะไคร้หอม (*Citronella, Cymbopogon nardus* Rendle) ผลมะกรูด (*Kaffir lime, Citrus hystrix* DC.) ใบมะกรูด (*Kaffir lime leaf, Citrus hystrix* DC.) พริกไทยดำ (*Black pepper, Piper nigrum* Linn.) และโหระพา (*Sweet basil, Ocimum basilicum* Linn.)

การเตรียมสมุนไพรสด สมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ กระชาย ขิง ข่า ขมิ้นชันและมะกรูด โดยซื้อสมุนไพรสดจากตลาดไท สำหรับสมุนไพรตระกูลเหง้า ทำการตัดแต่งเอาส่วนที่เน่าออก ล้างดินที่ติดสมุนไพรเหล่านี้ออกโดยการแช่ในน้ำประปาเป็นเวลา 10 นาที ล้างและแบ่งเบาๆ จากนั้นนำสมุนไพรไปแช่ในสารละลายไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 50 ppm เป็นเวลา 20 นาทีและล้างด้วยน้ำสะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ ผานเป็นชิ้นบางประมาณ 3 x 1 x 0.5 ลบ.ซม. สำหรับมะกรูดนำมาล้างทำความสะอาดดังวิธีข้างต้น แล้วนำมาปอกเอาเฉพาะเปลือก ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสมุนไพรที่ผ่านการอบแห้งเก็บในถุงซิปลปริมาณ 200 กรัมต่อถุง ผนึกให้สนิทตามรอยซิปลและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18°C ตลอดการทดลอง

การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงหรือ Ultrasound Assisted Extraction การเตรียมสารสกัดหยาบของสมุนไพรอ้างอิงจากวิธีการของ Thongson *et al.* (2004) และ เอกรินทร์ (2550) โดยชั่งสมุนไพรแห้ง 20 กรัม บั่นให้ละเอียดครั้งละ 10 กรัม ด้วยเครื่องปั่น (Blender; Warning model 32BL80, USA) สุ่มชั่งสมุนไพร 10 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250

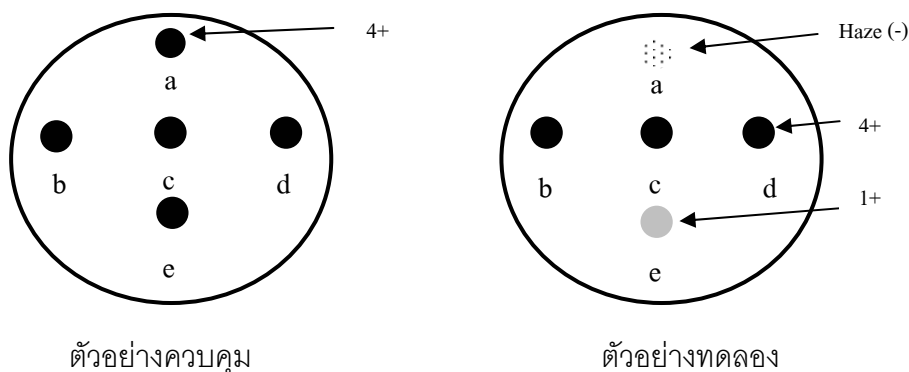
มิลลิลิตร เติมนีเอทานอล 50% (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำ 2 ตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้น นำสารละลายดังกล่าวไปสกัดด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Soniprep; Sanyo model MSS150.CX.3.1, Japan) ที่กำเนิดความถี่ 23 kHz ความเข้ม 15 แอมพลิจูด (Amplitude) เป็นเวลา 5 นาที โดยจุ่มโพรบลงไป 3 ส่วน 4 ของปริมาตรตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร สารละลายสกัดใน ปีกเกอร์นั้นจะถูกแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง (4 °C) เพื่อป้องกันความร้อนสะสมระหว่างการสกัด กรองเอากากสมุนไพรรวมออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนใสที่กรองได้จากตัวอย่างทั้งสองเท รวมกัน นำตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator; Buchi, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 45 °C จนตัวอย่างเหลือปริมาตรเล็กน้อย แล้วนำ สารสกัดมาเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลาง (Centrifuge; Heraeus instrument, Denmark) ที่ความเร็ว 1,258 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงใช้ฟาสเจอร์บีเปตดูด สารละลายนั้นใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอล 50% (v/v) เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดมากรองแบบปลอดเชื้อผ่านเมมเบรน ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร สารสกัดส่วนนี้ประมาณ 25 มิลลิลิตร จะถูกบรรจุในขวด vial ขนาด 30 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -18 °C ก่อนนำไปทดสอบต่อไป

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งสารสกัด สมุนไพรรวมประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 จำนวน 4 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ 2380, 2486, 2576 และ 2582), *Salmonella* Typhimurium ชนิด wild type จำนวน 1 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ 13311) และ *Salmonella* Weltevreden จำนวน 1 สายพันธุ์ *Escherichia coli* 780 และ *Escherichia coli* O157:H7 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Listeria monocytogenes* 5 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ 101, 108, 310, Scott A และ V7) *Bacillus cereus* 1 สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* 1 สายพันธุ์ และแบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* 4 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ 844, 850, PD26 และ PD110) *Lactobacillus cellobiosus* 4 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ RE33, PD40, PD55 และ PD112) *Lactobacillus johnsonii* NE6-1 และ *Pediococcus pentosaceus* NE15-1 และแบคทีเรียแลคติกที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างอาหารได้กรอกเบียร์วอีก จำนวน 5 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 30 สายพันธุ์

เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดทำการเก็บรักษาบน agar slant ที่อุณหภูมิ 4 °C และเมื่อทำการทดลองจึงทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบได้แก่ *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 °C ยกเว้น *B. cereus* เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำสามครั้ง ในครั้งที่สามใช้เวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *L. monocytogenes* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เติม 0.6% yeast extract (TSBYE) ที่อุณหภูมิ 37 °C แบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus pentosaceus* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว De Man, Rogosa, Sharpe (MRS; Merck, Darmstadt, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากธรรมชาติ ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentrations, MIC) โดยใช้เทคนิค agar dilution วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ NCCLS (2002) และอ้างอิงจาก เอกรินทร์ (2550) โดยเริ่มจากนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่หมอมเหลวและปรับอุณหภูมิประมาณ 50°C ปริมาตร 13 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับระดับความเจือจางของสารสกัดตามต้องการ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสารทดสอบเข้มข้นระหว่าง 0.1-10 % (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อ รोजนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงและกำหนดอายุการเจริญที่ 18 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 7 log CFU/มิลลิลิตร หยดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปตให้เป็นวงกลม 5 ตำแหน่งๆ ละเชื้อ (Spot inoculation) (ภาพที่ 1) ให้วงกลมอยู่ในระยะห่างที่เท่ากันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ในการทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Trypticase soy agar (TSA) ผสมกับสารสกัดของสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหยเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella* spp. ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด trypticase soy agar ที่เติม 0.6% (w/v) yeast extract (TSAYE) ผสมกับสารสกัดของสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหยใช้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ผสมสารสกัดของสมุนไพรหรือน้ำมันหอมระเหยใช้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก

จากนั้นหยดเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว รอสารละลายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งประมาณ 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ยกเว้น *B. cereus* เพราะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจการเจริญของแบคทีเรียที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากเพาะเชื้อ บันทึกการเจริญของแบคทีเรียจากความหนาแน่นของโคโลนี ให้คะแนนบวกลบหมายถึงเจริญได้น้อย (+) เริ่มจาก 1+, 2+, 3+ ถึงเจริญได้มากที่สุด 4+ เทียบกับตัวอย่างควบคุม คือเชื้อชนิดเดียวกัน เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ไม่เติมสารสกัดภายในสภาวะเดียวกัน (Thongson *et al.*, 2004; 2005) ในภาพที่ 1 โคโลนี b, c และ d ในตัวอย่างทดลอง คือ โคโลนีของแบคทีเรียทดสอบกับสารสกัด มีความหนาแน่นของโคโลนีใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม บันทึกผลเป็น 4+ คะแนน บวกลดลงเรื่อยๆ เมื่อความหนาแน่นของโคโลนีลดลง ดังเช่นตัวอย่างทดลองโคโลนี e บันทึกผลเป็น 1+ และเมื่อไม่พบการเจริญของแบคทีเรียหรือพบแบคทีเรียขึ้นเป็นจุดเล็กๆกระจายตัวกัน (haze) ให้คะแนนเป็นลบ (-) เช่น โคโลนี a ในตัวอย่างทดลอง ในที่นี้ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใน 48 ชั่วโมง (Wan *et al.*, 1998; Canillac and Mourey, 2001; Branen and Davidson, 2004) ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ



ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar dilution

การเตรียมได้บรรจุด้านจุลินทรีย์และการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมได้บรรจุทั้งสามชนิดได้แก่ ได้สด ได้คอลลาเจน และได้เซลลูโลส ตัดเป็นวงกลมโดยมีพลาสติกแข็งเป็นต้นแบบด้วยกรรไกรให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 12.20 มิลลิเมตร แช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 0, 10 และ 50 เท่าของค่า MIC ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยกระชาย ความเข้มข้น 0.1%, 1% และ 5% (v/v) น้ำมันหอมระเหยมะกรูด ความเข้มข้น 0.5%, 5% และ 25% (v/v) สารสกัดเอทานอลของกระชาย ความเข้มข้น 0.5%, 5% และ 25%

(v/v) และสารสกัดเอทานอลของขิง ความเข้มข้น 3% และ 30% (v/v) ตามลำดับ ระยะเวลาการแช่ 1 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง โดยน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดสมุนไพรจะใช้น้ำในการเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ และแยกเก็บรักษาไว้บรรจุที่แช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างกันในภาชนะพลาสติกปิดสนิทที่บ่มแสงที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับตัวอย่างควบคุมในการทดลองของสารสกัดสมุนไพรทำได้โดยนำใส่บรรจุทั้งสามชนิดแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 50% (v/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมงโดยเก็บรักษาในภาชนะพลาสติกปิดสนิทที่บ่มแสงที่อุณหภูมิ 4 °C เช่นเดียวกัน จากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดของเหลวส่วนเกิน

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของใส่บรรจุด้วยวิธี agar disc diffusion โดยทดสอบกับใส่ทั้งสามชนิดที่ผ่านการแช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดเอทานอลแต่ละความเข้มข้น ระยะเวลาการแช่สารเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง มาทดสอบ โดยทำการ swab เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 4 log CFU/มิลลิลิตร บนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด และนำใส่บรรจุดังกล่าว มาวางลงไปบนอาหารที่ทำการ swab เชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด และวัดบริเวณโซนใสโดยวัดรวมกับเส้นผ่าศูนย์กลางของใส่ด้วย vernia caliper (Vernier caliper; Mitutoyo, Series No. 530-104, Japan) ทำการทดลอง 2 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย

การเตรียมใส่บรรจุด้านจุลินทรีย์สำหรับบรรจุใส่กรอกเปรี้ยว ทำการเคลือบสารด้านจุลินทรีย์บนใส่บรรจุโดยนำใส่สด ใส่คอลลาเจน และใส่เซลลูโลส ไปแช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นดังนี้คือ น้ำมันหอมระเหยมะกรูดที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 25% (v/v) น้ำมันหอมระเหยกระชายความเข้มข้น 0.1, 1 และ 5% (v/v) สารสกัดเอทานอลของกระชายความเข้มข้น 0.5, 5 และ 25% (v/v) และสารสกัดเอทานอลของขิงความเข้มข้น 3 และ 30% (v/v) ตามลำดับ ระยะเวลาในการแช่สาร 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้แกนพลาสติกเป็นสอดเข้าไประหว่างใส่บรรจุเพื่อป้องกันการเกาะติดกันของใส่ สำหรับตัวอย่างควบคุมจะไม่มีน้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพร จากนั้นจึงนำมาบรรจุส่วนผสมของใส่กรอก

สำหรับการผลิตไส้กรอกเปรี้ยวดัดแปลงจากวิธีของชิดชม (มปป.) ทำได้โดยนำเนื้อหมูบด 2.5 กิโลกรัม ผสมกับเกลือ 50 กรัม ผงเพรก 2.5 กรัม และโซเดียมอิริโทรเบต 0.875 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมมันแข็งลงไป 1 กิโลกรัม แล้วนวดให้เข้ากันอีกครั้ง เติมน้ำตาลทราย 12.5 กรัม พริกไทย 12.5 กรัม ลูกผักชีป่น 7.5 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมกระเทียม 200 กรัม และ ข้าวเจ้าสุก 625 กรัมลงไป คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำไปบรรจุโดยใช้ไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ จากนั้นเก็บตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวเพื่อตรวจสอบค่า pH, ค่า a_w และจำนวนจุลินทรีย์ โดยทำการวิเคราะห์ทุกวันจนกระทั่งค่า pH ลดลงต่ำกว่า 4.5 จึงยุติการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยว ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรบนไส้บรรจุโดยดัดแปลงวิธีการของ Houben *et al.* (2005) โดยแบ่งไส้บรรจุแต่ละชนิดคือ ไส้สด ไส้คอลลาเจน และไส้เซลลูโลส ออกเป็นสองส่วนคือส่วนที่แช่น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดสมุนไพรกับส่วนที่ไม่แช่

การประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยเทคนิค spread เพลท จุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียทั้งหมด โดยนำตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวของทุกตัวอย่างทดลอง ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ในถุงตีป่น เติมน้ำละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางให้ได้ระดับ 1:10 นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วเจือจางตามลำดับๆ ละ 10 เท่า โดยนำมา 1 มิลลิลิตร ต่อสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อที่ระดับความเจือจางที่ต้องการ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird Parker (BP; Merck, Germany), Xylose lysine deoxycholate (XLD; Oxoid, England), Chromocult (Merck, Germany), MRS และ TSA เพื่อทดสอบปริมาณเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli* แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ จากนั้นใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจนแห้ง นำไปบ่มโดยกลับจานเพาะเชื้อคว่ำลง โดยอาหาร MRS บ่มในโถสุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ BP, XLD, Chromocult และ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนอาหารทุกชนิดที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียกรดแลคติก *S. aureus*, *Salmonella* spp. และ *E. coli* ที่รอด

ชีวิตในหน่วย log CFU ต่อได้กรอกเปรี้ยว 1 กรัมโดยทำการวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 และความแตกต่างระหว่างวิธีที่โดย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของได้กรอกเปรี้ยว จากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและทางจุลินทรีย์ของได้กรอกเปรี้ยวที่ผลิตในห้องปฏิบัติการทั้งสองสูตร (ตารางที่ 1-2) พบว่าระยะเริ่มต้นของการเก็บรักษาได้กรอก (วันที่ 0) ได้กรอกเปรี้ยวมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.99 ค่า pH อยู่ในช่วง 5.6-5.7 และพบจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ปนเปื้อนในวัตถุดิบ โดยเฉพาะ *S. aureus* พบจำนวนสูงถึง 10^4 - 10^5 CFU/g ในขณะเดียวกันก็พบแบคทีเรียกรดแลคติกในจำนวนสูงถึง 10^8 CFU/g แต่เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ได้กรอกเปรี้ยวจะมีค่า a_w , pH และจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคลดลง ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์กรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จึงสามารถสร้างกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ เป็นผลทำให้ pH ในอาหารลดลง นอกจากนี้ยังเมื่อได้กรอกเปรี้ยวมี pH < 4.4 จำนวน *Salmonella* sp. จะลดลงจนตรวจไม่พบ อย่างไรก็ตามยังคงพบ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของได้กรอกเปรี้ยว สูตรที่ 1

วันที่เก็บรักษา (วัน)	a_w	pH	แบคทีเรียกรดแลคติก (CFU/g)	<i>S. aureus</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> sp. (ต่อตัวอย่าง 25 g)
0	0.99	5.6	4.1×10^8	2.3×10^5	พบ
1	0.99	4.6	3.9×10^8	4.1×10^5	พบ
2	0.96	4.3	4.9×10^8	3.8×10^4	ไม่พบ

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยว สูตรที่ 2

วันที่เก็บรักษา (วัน)	a_w	pH	แบคทีเรียกรดแลคติก (CFU/g)	<i>S. aureus</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> sp. (ต่อตัวอย่าง 25 g)
0	0.99	5.7	3.3×10^8	4.5×10^5	พบ
1	0.98	4.4	3.8×10^8	9.0×10^4	พบ/ไม่พบ
2	0.96	4.1	2.8×10^8	<100	ไม่พบ

ลักษณะทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยวที่สุ่มซื้อตามท้องตลาดจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากซูเปอร์มาร์เก็ตจำนวน 4 ตัวอย่าง ตลาดสดและรถเข็นจำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าค่า a_w อยู่ในช่วง 0.98 – 0.99 (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ทั่วไปสามารถเจริญได้ดี ค่า pH ของไส้กรอกจากโรงงานอุตสาหกรรม (ตัวอย่าง A-D) อยู่ในช่วง 4.2-4.7 ในขณะที่ไส้กรอกเปรี้ยวจากตัวอย่างรถเข็นและตลาดสด (ตัวอย่าง E-J) มีค่า pH กว้างกว่า คือ 4.1-5.9 ซึ่งในสภาวะที่มี pH สูงกว่า 4.6 อาจก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยในอาหาร จากผลการตรวจทางจุลชีววิทยาพบว่ามีเพียงตัวอย่าง A, C และ D ที่ผ่านเกณฑ์ด้านจุลินทรีย์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ไส้กรอกเปรี้ยว ที่ระบุเกณฑ์ *Salmonella* sp. ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัมและ *S. aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม (มผช., 2546)

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและจุลินทรีย์ของไส้กรอกเปรี้ยวที่สำรวจจากท้องตลาด

ตัวอย่าง	A_w	pH	แบคทีเรียกรดแลคติก (CFU/g)	<i>S. aureus</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> sp. (ต่อตัวอย่าง 25 g)
A	0.98	4.6	3.6×10^8	< 10 ESPC	ไม่พบ
B	0.99	4.7	6.1×10^8	10 ESPC	ไม่พบ
C	0.99	4.4	8.9×10^8	< 10 ESPC	ไม่พบ
D	0.99	4.2	1.3×10^8	< 10 ESPC	ไม่พบ
E	0.98	4.1	4.3×10^8	1.7×10^3	ไม่พบ
F	0.99	5.7	6.5×10^8	1.8×10^3	พบ
G	0.99	5.7	1.7×10^8	1.9×10^3	พบ
H	0.99	5.6	3.4×10^8	6.0×10^3 ESPC	พบ
I	0.98	5.9	1.3×10^8	3.6×10^2	ไม่พบ
J	0.99	4.6	7.8×10^8	1.5×10^2	ไม่พบ

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร วัดได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentrations; MIC) โดยน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์สูงจะมีค่า MIC ต่ำ ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งกลุ่มน้ำมันหอมระเหยเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีค่า MIC น้อยกว่า 0.5% จัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์สูง กลุ่มที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-1% จัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ปานกลาง และกลุ่มที่มีค่า MIC มากกว่า 1% จัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำ

น้ำมันหอมระเหยจากกระชาย กระเพรา ตะไคร้ ผลมะกรูดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมลบซึ่งได้แก่ *S. Typhimurium*, *S. Weltrevedan*, *E. coli* 780 และ *E. coli* O157:H7 ได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 4 น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ใบมะกรูด และโหระพา มีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลาง ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากขิง ข่า ขมิ้นชันและพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *S. Typhimurium* สายพันธุ์ 13311 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ปกติจะมีความต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ใบมะกรูด และโหระพาดีกว่าสายพันธุ์ DT104 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหลายชนิด ยิ่งไปกว่านี้ *S. Weltrevedan* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดโรคมามากที่สุดในประเทศไทย (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004) มีความต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา ตะไคร้และใบมะกรูดมากกว่าซาลโมเนลลาสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด

น้ำมันหอมระเหยจากขิง ข่า กระชาย กระเพรา ตะไคร้ ตะไคร้หอม มะกรูด ใบมะกรูด โหระพา และพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกซึ่งได้แก่ *B. cereus*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ดี พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีที่สุด โดยมีค่า MIC 0.1% รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยกระชาย มีค่า MIC 0.1-0.2% อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกของน้ำมันหอมระเหยจากขิง ข่าและตะไคร้หอมขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย โดยพบว่า *S. aureus* มีความต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดสูงกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม

Lipopolysaccharide จึงทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความแข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Ouattara และคณะ, 1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบจำนวน 15 สายพันธุ์นั้น มีที่มาจากหลายแหล่ง อาทิ แบคทีเรียที่แยกเชื้อจากตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวที่สุ่มซื้อในตลาด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกรหัส 2, A1, A2, B, D, NE6-1 และ NE15-1 ซึ่งยังไม่ได้รับการจำแนกจีโนมและสปีชีส์ ส่วน *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ 844 และ 850 ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากตัวอย่างแหนมและไส้กรอกเปรี้ยวตามลำดับ สำหรับ *L. plantarum* สายพันธุ์ PD26 และ PD110 *L. cellobisus* สายพันธุ์ RE33, PD40, PD55 และ PD112 ได้รับจากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแลคติก พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขิง ขมิ้นชัน กระชาย กระเพรา ตะไคร้ ตะไคร้หอม ใบมะกรูด และโหระพา มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกดี (MIC <0.5%) (ตารางที่ 5) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากข่าและผลมะกรูดมีฤทธิ์ในการยับยั้งปานกลางคือมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.5-0.8% น้ำมันหอมระเหยจากพริกไทยดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งน้อย มีค่า MIC อยู่ในช่วง 3%

จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระชายและผลมะกรูดมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว เนื่องจากน้ำมันกระชายที่ระดับความเข้มข้น 0.1% มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะ *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบการปนเปื้อนในไส้กรอกเปรี้ยว แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากผลมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบหลายสายพันธุ์ อาทิ *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 780, *S. Typhimurium* อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยกระชายและผลมะกรูดเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหย

จุลินทรีย์ทดสอบ		MIC (% , v/v)										
		ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	กระเพรา	ตะไคร้	ตะไคร้หอม	ผลมะกรูด	ใบมะกรูด	พริกไทยดำ	โหระพา
Salmonella Typhimurium												
DT104 strain	2380	10	>10	>10	0.2	0.3	0.1	0.2	0.4	0.5	>10	0.3
	2486	10	>10	>10	0.4	0.2	0.1	2	0.5	0.5	>10	0.2
	2576	10	>10	>10	0.4	0.5	0.5	2	0.5	2	>10	0.5
	2582	10	>10	>10	0.2	0.4	0.5	0.5	0.5	2	>10	0.4
Typical strain	13311	10	>10	>10	0.4	0.5	0.5	5	0.5	2	>10	0.5
Salmonella Weltrevredan		>10	>10	>10	2	5	>10	0.5	0.6	>10	>10	0.9
Escherichia coli O157:H7		>10	>10	>10	2	0.5	0.2	0.1	0.5	0.5	1	0.5
Escherichia coli 780		>10	>10	>10	2	3	>10	0.2	0.5	>10	>10	0.4
Listeria monocytogenes												
strain	101	0.8	0.7	8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	1	0.3
	108	0.8	0.2	8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	1	0.1
	310	0.5	0.7	8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	1	0.3
	Scott A	0.8	0.7	8	0.1	0.3	0.1	0.1	0.5	0.1	1	0.3
	V7	0.5	0.7	8	0.1	0.2	0.1	0.1	0.4	0.1	1	0.3
Bacillus cereus		8	<0.1	>10	0.2	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	1	0.2
Staphylococcus aureus		8	1	>10	0.1	0.1	0.1	2	0.5	0.5	1	0.2

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกของน้ำมันหอมระเหย

จุลินทรีย์ทดสอบ		MIC (% , v/v)										
		ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	กระเพรา	ตะไคร้	ตะไคร้หอม	ผลมะกรูด	ใบมะกรูด	พริกไทยดำ	โหระพา
Lactobacillus plantarum												
strain	844	0.2	0.7	0.2	0.3	0.07	0.08	0.08	0.5	0.2	3	0.2
	850	0.2	0.7	0.2	0.2	0.07	0.07	0.07	0.5	0.2	3	0.2
	PD26	0.2	0.7	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.8	0.1	3	0.1
	PD110	0.2	0.7	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.8	0.1	3	0.1
Lactobacillus cellobiosus												
strain	RE33	0.2	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.8	0.1	3	0.1
	PD40	0.2	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.8	0.1	3	0.1
	PD55	0.2	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.08	0.2	3	0.1
	PD112	0.2	0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.8	0.2	3	0.1
Lactobacillus johnsonii NE6-1		0.6	0.5	1	0.2	0.07	0.07	0.07	0.5	0.3	3	0.07
Pediococcus pentosaceus NE 15-1		0.3	2	0.2	0.2	0.07	0.08	0.07	0.6	0.2	3	0.07
Lactic acid bacteria												
รหัส	2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.08	0.08	0.08	0.2	0.2	3	0.08
	A1	0.1	0.08	0.03	0.2	0.05	0.08	0.05	0.4	0.2	0.6	0.05
	A2	0.1	0.08	0.05	0.2	1	1	0.08	0.2	0.2	0.6	1
	B	0.6	2	2	0.4	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	1	0.1
	D	0.1	0.6	0.6	0.4	0.1	0.08	0.08	0.6	0.2	2	0.1

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพร เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar dilution สารสกัดเอทานอลของสมุนไพร ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้นชัน กระชาย และเปลือกมะกรูด พบว่า ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของสารสกัดสมุนไพรตระกูลเหง้าในผลในทำนองเดียวกับน้ำมันหอมระเหย กล่าวคือ สารสกัดกระชายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคดีที่สุดเนื่องจากมีค่า MIC ต่ำที่สุด (ตารางที่ 6) และมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบอย่างเห็นได้ชัด ดังเห็นได้จากสารสกัดเอทานอลของกระชายยับยั้ง *L.monocytogenes*, *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.3%-0.5% (v/v) แต่ค่า MIC ระดับนี้ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียกรดแลคติก รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลของขิงยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.7%-3%(v/v) แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียกรดแลคติกเช่นเดียวกับสารสกัดเอทานอลของกระชาย สำหรับสารสกัดเอทานอลของข่า ขมิ้น และเปลือกมะกรูดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด โดยค่า MIC ของแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียกรดแลคติก อยู่ในช่วง 0.1%-3% (v/v) , 9%-10% (v/v) และ 6%-9% (v/v) ตามลำดับ

แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อสารสกัดสมุนไพรตระกูลเหง้าสูงกว่าแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยเฉพาะสารสกัดกระชายและขมิ้นชันให้ค่า MIC $\geq 10\%$ เป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ 6 และ 7) จะเห็นได้ว่าสารสกัดกระชายและขิงมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก จึงคัดเลือกสารสกัดกระชายและขิงเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของสารสกัดสมุนไพร

จุลินทรีย์ทดสอบ		MIC (% v/v)				
		ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	เปลือกมะกรูด
<i>Salmonella</i> Typhimurium						
DT104 strain	2380	10	10	10	10	NT
	2486	9	10	8	8	NT
	2576	8	9	8	9	NT
	2582	9	10	9	10	NT
Typical strain	13311	9	10	10	10	>10
<i>Salmonella</i> Weltevredan		9	>10	>10	10	>10
<i>Escherichia coli</i> O157:H7		9	10	10	10	NT
<i>Escherichia coli</i> 780		9	>10	>10	10	>10
<i>Listeria monocytogenes</i>						
strain	101	1	6	0.9	0.3	6
	108	1	5	0.9	0.2	NT
	310	2	5	2	0.3	NT
	Scott A	2	4	2	0.3	NT
	V7	2	5	2	0.4	NT
<i>Bacillus cereus</i>		0.4	6	1	0.2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>		2	7	3	0.3	9

หมายเหตุ NT = ไม่ได้ทำการทดสอบ (No test)

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกของสารสกัดสมุนไพร

จุลินทรีย์ทดสอบ		MIC (% v/v)				
		ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	เปลือกมะกรูด
<i>Lactobacillus plantarum</i>						
strain	844	0.5	9	>10	>10	>10
	850	1	7	10	10	>10
	PD26	10	10	>10	10	NT
	PD110	10	10	>10	10	NT
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>						
strain	RE33	10	10	>10	>10	NT
	PD40	10	10	>10	10	NT
	PD55	>10	10	>10	>10	NT
	PD112	>10	10	>10	10	NT
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NE6-1		10	7	>10	>10	9
<i>Pediococcus pentosaceus</i> NE 15-1		>10	0.1	9	0.7	>10
Lactic acid bacteria						
strain	2	5	7	8	6	NT
	A1	10	7	9	>10	NT
	A2	>10	7	>10	>10	NT
	B	>10	7	>10	>10	NT
	D	10	8	10	10	NT

หมายเหตุ NT = ไม่ได้ทำการทดสอบ (No test)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดกระชาย (ตารางที่ 4 และ 6) พบว่า น้ำมันหอมระเหยกระชายจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดกระชาย การที่ความไวของแบคทีเรียต่างชนิดกันต่อการทดสอบสารสกัดชนิดเดียวกันนี้ต่างกันมาก อธิบายได้ว่าการใช้เอทานอล 50% (v/v) ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรนั้นสามารถสกัดสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) ออกมามาก ประกอบกับความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์

ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบ ทำให้สารมีฤทธิ์ดังกล่าวจะถูกป้องกันโดยลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูง ดังนั้นเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบจึงสามารถสกัดกั้นโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพรที่มีสมบัติชอบน้ำไม่ให้ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้โดยง่าย ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงต้านทานต่อสารสกัดสมุนไพรในนี้ได้ดีมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งผนังเซลล์ไม่มี LPS (Cloete, 2003; Thongson *et al.*, 2005; Onmetta-aree *et al.*, 2006) ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำสูงสามารถเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของไขมันบางกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจึงสามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์และทำลายองค์ประกอบของเซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ จากเหตุผลนี้สามารถกล่าวได้ว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นกับ วิธีการสกัด หรือชนิดของสารสกัดที่ใช้ นอกจากนี้ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันยังขึ้นกับ ความเข้มข้นและอัตราส่วนของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ (Active compounds) ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช แหล่งที่ทำการเพาะปลูก เวลาในการเก็บเกี่ยว ตลอดจนสภาวะการแปรรูปและการเก็บรักษา (Zivanovic *et al.*, 2005) รวมไปถึงชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุเคลือบน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย ไส้บรรจุที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด คือ ไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชาย โดยที่ความเข้มข้น 0.1% ยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* ขนาดโซนยับยั้งเท่ากับ 26.30, 24.70 และ 23.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ดีขึ้นตามลำดับ และยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. Weltevreden* ที่ความเข้มข้น 1% โดยไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *L. plantarum* 844 และ 850, *P. pentosaceus* NE 15-1 และ *L. johnsonii* NE 6-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่สารเป็น 24 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ลดต่ำลงโดยสังเกตจากโซนยับยั้งที่มีขนาดเล็กลง สำหรับไส้สดและไส้เซลลูโลส พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้อยกว่าไส้คอลลาเจน และส่วนใหญ่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่ความเข้มข้น 5%

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่ามีเพียงไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* 13311 โดยพบว่าการแช่ในความเข้มข้น 1% (v/v) ระยะเวลาในการแช่สาร 1 ชั่วโมง มีขนาดโซนยับยั้งเท่ากับ 20.40 มิลลิเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 5% (v/v) จะมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีขึ้น

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุเคลือบน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด ไส้สดที่แช่น้ำมันหอมระเหยมะกรูดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคคือ *B. cereus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *S. Typhimurium* และ *S. aureus* โดยมีโซนยับยั้งขนาด 21.10, 20.18 และ 14.15 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) โดยที่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตไส้กรอกเปรี้ยว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น

นอกจากนี้ไส้คอลลาเจนที่แช่น้ำมันหอมระเหยมะกรูดความเข้มข้น 0.5% ยับยั้ง *S. Typhimurium*, *E. coli* 780 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 5% ยับยั้ง *S. Weltevreden* ซึ่งเป็นซาลโมเนลลาสายพันธุ์ที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งในประเทศไทย (Bangtrakulnonth *et al.*, 2004) และ *L. plantarum* เป็นที่น่าสังเกตว่าไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูดยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังเห็นได้จาก *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ไม่ถูกยับยั้งโดยไส้ที่เคลือบในน้ำมันหอมระเหยมะกรูดความเข้มข้น 25% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ที่เตรียมจากไส้สดและไส้คอลลาเจนเคลือบในน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไส้เซลลูโลส เนื่องจากไส้สดและไส้คอลลาเจน มีประสิทธิภาพดีในการดูดซับน้ำมันหอมระเหยอันเป็นผลมาจากไส้สดและไส้คอลลาเจนที่สังเคราะห์จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหนังสัตว์มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถดูดซับสารเข้าไปภายในโครงสร้างได้และสารสามารถแพร่ออกมาได้ดีเนื่องจากความแตกต่างของแรงดันออสโมติกภายในไส้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับไส้เซลลูโลสสังเคราะห์จากเซลลูโลสของพืช ทำให้ดูดซับสารไว้ได้น้อยจึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์น้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ระหว่างน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดและน้ำมันหอมระเหยกระชายที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 5% (v/v) ระยะเวลาแช่ 1 ชั่วโมง พบว่าไส้

สดเคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายมีประสิทธิภาพดีกว่าเคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูด เพราะสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ดีกว่า ในขณะที่ได้คอลลาเจนให้ผลแตกต่างกัน ดังนี้ ได้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าโดยเฉพาะ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ส่วนได้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูดยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิด *E. coli*, *S. Weltevreden* และ *S. Typhimurium* ได้ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากสารออกฤทธิ์ (Active compounds) ของน้ำมันหอมระเหยที่เกาะติดบนไส้สดและไส้คอลลาเจนอาจมีความแตกต่างกันทั้งในด้านชนิดและปริมาณ

นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการแช่สาร 1 ชั่วโมงโดยส่วนใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าการแช่สาร 24 ชั่วโมง เนื่องจากอาจมีการสูญเสียสารออกฤทธิ์บางชนิดระหว่างการแช่ ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ระยะเวลาแช่ 24 ชั่วโมงลดลง

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุเคลือบสารสกัดเอทานอลของกระชาย ไส้ทั้งสามชนิด ได้แก่ ไส้สด ไส้คอลลาเจนและไส้เซลลูโลสที่เคลือบสารสกัดเอทานอลของกระชายมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงถึง 25% (ตารางที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยแล้ว สารสกัดเอทานอลของกระชายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุเคลือบสารสกัดเอทานอลจากขิง จากผลการทดลองพบว่าไส้ทั้งสามชนิดที่แช่สารสกัดเอทานอลจากขิงความเข้มข้น 3% และ 30% (v/v) ระยะเวลาการแช่สาร 1 และ 24 ชั่วโมง ส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น *B. cereus* ที่ถูกยับยั้งโดยไส้สดและไส้เซลลูโลสที่แช่สารสกัดเอทานอลจากขิง ความเข้มข้น 30% 24 ชั่วโมง และไส้คอลลาเจนที่แช่ในความเข้มข้น 3% 1 ชั่วโมง (ตารางที่ 11) แต่อย่างไรก็ตาม ไส้คอลลาเจนที่แช่สารสกัดเอทานอลจากขิงความเข้มข้น 3% (v/v) ระยะเวลาการแช่สาร 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* 780 และ *S. Weltevreden* โดยมีโซนยับยั้งขนาด 12.48 และ 12.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จะเห็นว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์บนไส้บรรจุขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเอทานอลของสมุนไพร ชนิดของไส้ ระยะเวลาในการแช่สาร รวมถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไส้บรรจุชนิดต่างๆที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชาย น้ำมันหอมระเหยมะกรูด สารสกัดเอทานอลของกระชาย และสารสกัดเอทานอลของขิงพบว่าน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหยมะกรูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะได้ดีที่สุด โดยที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นประโยชน์ต่อการหมักได้กรอกเปรี้ยว ดังนั้นจึงนำไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหยมะกรูดไปประยุกต์ใช้เป็นไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial casing) เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์ได้กรอก

ตารางที่ 8 ขนาดโซนยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์ทดสอบ	ชนิดได้บรรจุ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
		ใส่น้ำมัน			ใส่น้ำมันผสม			ใส่น้ำมันผสม			
		ความเข้มข้น (%v/v)	0.1	1	5	0.1	1	5	0.1	1	5
เวลา (ชั่วโมง)											
S. Typhimurium 13311	1	-	20.40	26.30	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	14.50	-	-	-	-	-	-	-
S. Weltevreden	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	14.55	14.88	-	-	-	-
E. coli 780	1	-	-	-	14.13	13.98	13.88	-	-	-	-
	24	-	-	17.95	13.90	13.28	14.43	-	-	-	-
L. monocytogenes 101	1	-	-	-	-	20.35	24.70	-	-	-	22.80
	24	-	-	20.73	-	14.83	18.70	-	-	-	13.30
B. cereus	1	-	-	22.25	-	16.00	26.30	-	-	-	-
	24	-	12.85	12.40	14.80	15.65	19.30	-	-	-	15.53

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของไส้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 8 (ต่อ) ขนาดโซนยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากกระชายในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์ทดสอบ	ชนิดได้บรรจุ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
		ความเข้มข้น (%v/v)	สดได้			ได้คอลลาเจน			ได้เซลล์โลส		
			0.1	1	5	0.1	1	5	0.1	1	5
เวลา (ชั่วโมง)											
S. aureus	1	- ²	-	26.05	14.35	13.20	23.50	-	-	21.00	
	24	-	-	-	-	-	15.20	-	-	13.98	
L. plantarum 844	1	- ²	-	21.20	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L. plantarum 850	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	13.10	13.25	-	-	-	-	-	-	
L. johnsonii NE 6-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	14.48	-	-	-	
P. pentosaceus NE 15-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของไส้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 9 ขนาดโซนยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียทดสอบ	เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
		ได้บรรจุ	ได้สด			ได้คอลลาเจน			ได้เซลลูโลส		
		ความเข้มข้น (%v/v)	0.5	5	25	0.5	5	25	0.5	5	25
S. Typhimurium 13311	1	12.38	13.28	20.18	13.90	19.15	19.08	-	-	15.00	
	24	12.95	13.80	12.90	-	-	17.05	-	-	14.35	
S. Weltevreden	1	-	-	16.40	-	13.2	14.3	-	-	14.15	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E. coli 780	1	-	-	-	14.35	14.75	15.20	-	-	14.50	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L. monocytogenes 101	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	12.35	16.85	-	13.25	18.45	-	-	14.93	
B. cereus	1	18.65	21.15	21.10	12.55	16.00	16.75	-	-	-	
	24	12.78	16.1	20.33	15.05	19.50	26.90	-	15.90	23.55	

หมายเหตุ ¹เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 9 (ต่อ) ขนาดโซนยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียทดสอบ		ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
		ใส่วรรจุ	ใส่น้ำ			ใส่น้ำคอกปลา			ใส่น้ำเกลือ		
		ความเข้มข้น (%v/v)	0.5	5	25	0.5	5	25	0.5	5	25
	เวลา (ชั่วโมง)										
<i>S. aureus</i>	1	12.95	12.40	14.15	-	-	-	-	-	-	
	24	- ²	12.65	13.50	-	13.50	19.45	-	-	16.50	
<i>L. plantarum</i> 844	1	- ²	12.55	12.70	-	12.60	12.85	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	14.00	-	-	13.35	
<i>L. plantarum</i> 850	1	-	-	-	-	12.30	12.30	-	-	-	
	24	-	-	12.75	-	-	-	-	-	-	
<i>L. johnsonii</i> NE 6-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	12.70	12.70	13.00	-	-	-	-	-	-	
<i>P. pentosaceus</i> NE 15-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของใส่วรรจุ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 10 ขนาดโซนยับยั้งของสารสกัดเอทานอลของกระชายในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
	ใส่วรรจุ	ใส่น้ำ			ใส่น้ำคอลลอยด์			ใส่น้ำเกลือ		
	ความเข้มข้น (%v/v)	0.5	5	25	0.5	5	25	0.5	5	25
	เวลา (ชั่วโมง)									
S. Typhimurium 13311	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Weltevreden	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli 780	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. monocytogenes 101	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. cereus	1	-	-	14.80	-	12.40	14.88	-	-	13.54
	24	-	-	18.30	-	-	20.55	-	-	-

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของใส่วรรจุ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 10 (ต่อ) ขนาดโซนยับยั้งของสารสกัดเอทานอลของกระชายในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹									
	ได้บรรจุ	ไล่สด			ไล่คอลลาเจน			ไล่เซลล์โลส		
	ความเข้มข้น (%v/v)	0.5	5	25	0.5	5	25	0.5	5	25
	เวลา (ชั่วโมง)									
<i>S. aureus</i>	1	- ²	-	-	-	-	-	-	-	12.88
	24	-	-	-	-	-	14.30	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 844	1	- ²	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 850	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> NE 6-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> NE 15-1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของไล้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 11 ขนาดโซนยับยั้งของสารสกัดเอทานอลของพืชในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹					
	ไส้สด		ไส้สด		ไส้คอลลาเจน	
	ความเข้มข้น %,v/v)	3	30	3	30	30
	เวลา (ชั่วโมง)					
<i>S. Typhimurium</i> 13311	1	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
<i>S. Weltevreden</i>	1	-	-	12.35	12.40	-
	24	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> 780	1	-	-	12.48	12.43	-
	24	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> 101	1	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	1	-	-	12.35	12.38	-
	24	-	16.00	-	17.70	14.63

หมายเหตุ ¹เส้นผ่าศูนย์กลางของไส้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ตารางที่ 11 (ต่อ) ขนาดโซนยับยั้งของสารสกัดเอทานอลของขิงในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) ¹						
	ไส้สด	ไส้สด		ไส้คอลลาเจน		ไส้เซลล์โลส	
	ความเข้มข้น (%v/v)	3	30	3	30	3	30
	เวลา (ชั่วโมง)						
<i>S. aureus</i>	1	- ²	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 844	1	- ²	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 850	1	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> NE 6-1	1	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> NE 15-1	1	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ¹ เส้นผ่าศูนย์กลางของไส้ = 12.20 มิลลิเมตร, ² - = ไม่มีโซนยับยั้ง

ค่า pH และค่า a_w ในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุในไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ ค่า pH ระหว่างการเก็บรักษาไส้กรอกเปรี้ยวในแต่ละตัวอย่างทดลองรวมถึงตัวอย่างควบคุม ระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 อยู่ในช่วง 5.9-4.2 (ตารางที่ 12 และ 13) โดยพบว่าค่า pH ในวันที่ 0 มีค่าระหว่าง 5.8-5.9 และหลังจากเก็บรักษาจนถึงวันสุดท้ายพบว่าค่า pH ลดลงถึง 4.2 โดยค่า pH ที่ลดลงเนื่องมาจากการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในไส้กรอกเปรี้ยว โดยค่า pH หรือช่วง pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *S. aureus* คือ 4.2-9.3 (Bergdoll, 1989) สำหรับ *E. coli* และ *Salmonella* spp. สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ต่ำกว่า 4.2 และ 4.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกคือ 7.0 แต่สามารถที่จะเจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 4.0 (Fox *et al.*, 2000)

ตารางที่ 12 ค่า pH ของไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา	ไส้สด	ไส้สดเคลือบน้ำมัน	ไส้สดเคลือบน้ำมัน
		หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด
0	5.9	5.8	5.9
1	4.5	4.6	4.6
2	4.5	4.5	4.5
3	4.4	4.2	4.3

ตารางที่ 13 ค่า pH ของไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้คอลลาลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา	ไส้คอลลาลาเจน	ไส้คอลลาลาเจนเคลือบ	ไส้คอลลาลาเจนเคลือบ
		น้ำมันหอมระเหย	น้ำมันหอมระเหย
		กระชาย	มะกรูด
0	5.8	5.9	5.9
1	4.5	4.5	4.5
2	4.4	4.5	4.5
3	4.2	4.2	4.3

สำหรับค่า a_w ของไส้กรอกเปรี้ยวในทุกตัวอย่างการทดลอง รวมถึงตัวอย่างควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทำการตรวจวัดทุกวันตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่ามีค่าระหว่าง 0.94-0.96 (ตารางที่ 14 และ 15) โดยที่ค่า a_w ในช่วงนี้เหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ เช่น *S. aureus* มีค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญระหว่าง 0.83-0.99 สำหรับ *E. coli* ค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 0.95-0.99 และ ค่า a_w ต่ำสุดที่ *Salmonella* spp. สามารถเจริญได้คือ 0.91 ยิ่งไปกว่านี้แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งต้องการปริมาณน้ำอิสระมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 0.93-0.96 (Fox *et al.*, 2000) ดังนั้นค่า a_w ของไส้กรอกเปรี้ยวที่ผลิตในห้องปฏิบัติการจึงไม่มีผลต่อการการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. และแบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 14 ค่า a_w ในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา	ไส้คอลลาเจน	ไส้คอลลาเจนเคลือบ น้ำมันหอมระเหย	ไส้คอลลาเจนเคลือบ น้ำมันหอมระเหย
		กระชาย	มะกรูด
0	0.96	0.96	0.96
1	0.95	0.95	0.95
2	0.95	0.95	0.95
3	0.94	0.95	0.95

ตารางที่ 15 ค่า a_w ในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา	ไส้สด	ไส้สดเคลือบน้ำมัน หอมระเหยกระชาย	ไส้สดเคลือบน้ำมัน หอมระเหยมะกรูด
0	0.96	0.96	0.96
1	0.95	0.95	0.95
2	0.95	0.95	0.94
3	0.94	0.94	0.94

ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของไส้บรรจุที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยในไส้กรอกเปรี้ยว จากผลการทดสอบพบว่าในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดและไส้คอลลลาเจนที่ไม่เคลือบสารยับยั้งจุลินทรีย์ (คอนโทรล) มีจำนวน *Salmonellae* ลดลง 2.2 และ 1.9 log CFU/กรัม ตามลำดับ หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน (ตารางที่ 16) เมื่อพิจารณาผลของ pH ร่วมกับจำนวน *Salmonellae* ที่ลดลงในแต่ละวันพบว่า ค่า pH ลดลงในช่วงวันที่ 0-2 ของการเก็บรักษา ส่งผลให้เชื้อลดลง (ตารางที่ 16) โดยเชื้อมีแนวโน้มลดลงในแต่ละวันที่เก็บรักษาและลดลงสูงสุดในวันที่มี pH ต่ำกว่า 4.4 ดังจะเห็นได้จากในวันที่ 3 ไส้สดที่ไม่เคลือบน้ำมันหอมระเหยมี pH 4.5 *Salmonellae* ลดจำนวนลง 2.2 log CFU/กรัม (ตารางที่ 12 และ 17) ส่วนไส้คอลลลาเจนที่ไม่เคลือบน้ำมันหอมระเหยเมื่อมี pH 4.4 *Salmonellae* ลดจำนวนลง 2.4 log CFU/กรัม (ตารางที่ 13 และ 17) ดังนั้นการลดลงของ *Salmonellae* ในตัวอย่างคอนโทรลเกิดจาก pH ที่ลดลง มีรายงานว่าค่า pH ต่ำที่สุดที่ *Salmonellae* เจริญได้อยู่ที่ 4.05 และเชื้อเจริญได้ในช่วง pH 4-9 (Jay *et al.*, 2005)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์แต่ละชนิด ไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดและไส้คอลลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายมีจำนวน *Salmonellae* ลดลงสูงสุด โดยลดลงถึง 2.5 log CFU/กรัม ภายใน 1 วัน (ตารางที่ 17) หลังจากนั้นการลดลงของ *Salmonellae* จะคงที่ กล่าวคือ จำนวน *Salmonellae* ที่เหลือรอดในผลิตภัณฑ์มีจำนวนคงที่ ยกเว้นในไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหย มีจำนวนเชื้อที่ลดลงในวันที่ 3 น้อยกว่าวันที่ 2 แสดงว่าเชื้อ *Salmonellae* มีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นในวันสุดท้าย ทั้งนี้อาจเนื่องจากเนื่องจากความสามารถในการปรับตัวทนต่อกรดได้มากขึ้นและสามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมากขึ้น กล่าวคือสามารถปรับตัวทนต่อสารต้านจุลินทรีย์ได้มากขึ้นนั่นเอง ดังรายงานของ Foster (1995) พบว่า *Salmonella* Typhimurium สามารถทนต่อพีเอชที่ต่ำกว่า 4 ได้ หลังจากการผ่านสภาวะการปรับตัวในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดมาก่อน ซึ่งกระบวนการปรับตัวนี้เรียกว่า acid-tolerance response (ATR) โดยเซลล์มีการสร้างโปรตีนที่ตอบสนองต่อสภาวะกรด หรือเรียกว่า acid shock inducible proteins (ASPs)

สำหรับ *E. coli* ในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดและไส้คอลลลาเจนที่ไม่เคลือบสารยับยั้งจุลินทรีย์ (คอนโทรล) มีจำนวนลดลง 1.3 และ 1.1 log CFU/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 16) *E. coli* เริ่มมีจำนวนลดลงในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา (ตารางที่ 18) และลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ซึ่งเป็นอิทธิพลจาก pH ของไส้กรอกเปรี้ยวที่ลดลงจนมีค่าในช่วง 4.2-4.4 ทั้งนี้เนื่องจาก *E. coli* เจริญได้ในช่วง pH 4.5-9.0 (Jay *et al.*, 2005) การใช้ไส้บรรจุที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยมีบทบาทต่อการลด

E. coli เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหยมะกรูด ลดจำนวน *E. coli* ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 16) อย่างไรก็ตามเป็นนัยสังเกตว่าไส้สดที่เคลือบน้ำมันกระชายลด *E. coli* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา (ตารางที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์น่าจะเกิดจากการสารถอกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยกระชายที่เคลือบอยู่บนไส้สด สำหรับไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูด สามารถลด *E. coli* ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยกระชาย ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วน *S. aureus* ในไส้สดและไส้คอลลาเจน ที่ไม่เคลือบสารยับยั้งจุลินทรีย์ (คอนโทรล) มีจำนวนลดลง 4.4 และ 4.7 log CFU/กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 16) โดยเชื้อมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในวันที่ 1 และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 จนไม่สามารถตรวจพบ (มีจำนวนต่ำกว่า 1 logCFU/g) ทั้งนี้การลดลงของเชื้อเกิดจากอิทธิพลของ pH โดยค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. aureus* อยู่ในช่วง 4.2-9.3 (Bergdoll, 1989) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ พบว่าไส้สดเคลือบน้ำมันหอมระเหยลด *S. aureus* ดีกว่าคอนโทรลถึง 1.0-1.2 logCFU/กรัม ในวันที่ 2 โดยไส้สดเคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูดมีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำมันหอมระเหยกระชายเล็กน้อย ส่วนไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูดลด *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ 1.2 logCFU/กรัม และไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายลดได้ 0.9 logCFU/กรัม ในขณะที่คอนโทรลลดเพียง 0.3 logCFU/กรัม จะเห็นได้ว่าการใช้ไส้บรรจุเคลือบน้ำมันหอมระเหยช่วยลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในอาหารในระหว่างการเก็บรักษา จึงสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของเฮอรัลด์เทคโนโลยีเพื่อลดจำนวนหรือควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้

อย่างไรก็ตาม การทดลองในระบบอาหารมีข้อจำกัดหลายประการ อาทิ องค์ประกอบของอาหาร เช่น โปรตีนไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น องค์ประกอบเหล่านี้จะทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ลดลง โดยโปรตีนและไขมันจะไปจับกับส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย ทั้งยังปกป้องจุลินทรีย์จากสารต้านจุลินทรีย์ได้อีก ทำให้ต้องใช้สารต้านจุลินทรีย์ในปริมาณที่มากขึ้น (Shelef, 1983) และเมื่อต้องใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่เป็นน้ำมันหอมระเหยเพิ่มมากขึ้นอาจทำให้กลิ่นรสของอาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ตารางที่ 16 จำนวนแบคทีเรียที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยในการบรรจุหลังจากการเก็บรักษา 3 วัน

จุลินทรีย์ทดสอบ	ปริมาณแบคทีเรียที่ลดลง (log CFU/กรัม) ¹					
	ไส้สดเคลือบน้ำมัน			ไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมัน		
	ไส้สด	หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด	ไส้คอลลาเจน	น้ำมันหอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด
<i>Salmonella</i> sp.	2.2 ^{bA}	2.5 ^{cB}	1.9 ^{aB}	1.9 ^{aB}	2.5 ^{cB}	2.2 ^{bB}
<i>E. coli</i>	1.3 ^{bB}	1.5 ^{cA}	1.6 ^{cA}	1.1 ^{aA}	1.3 ^{bA}	1.6 ^{cA}
<i>S. aureus</i> ²	4.4 ^{bC}	5.4 ^{dC}	5.6 ^{eC}	4.7 ^{aC}	4.6 ^{cC}	4.1 ^{aC}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างในแนวนอน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างในแนวตั้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

¹ หมายถึง จำนวนเชื้อเริ่มต้นในวันแรก – วันสุดท้ายของการเก็บรักษา

² หมายถึง จำนวนเชื้อเริ่มต้นในวันแรก – วันที่สองของการเก็บรักษา

ตารางที่ 17 ปริมาณ *Salmonella* spp. ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหย ทำการเก็บรักษา 3 วัน

วันที่เก็บรักษา	ปริมาณ <i>Salmonella</i> spp. ที่ลดลง ¹ (log CFU/กรัม)					
	ไส้สดเคลือบน้ำมัน		ไส้สดเคลือบน้ำมัน		ไส้คอลล่าเจนเคลือบน้ำมัน	
	ไส้สด	หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด	ไส้คอลล่าเจน	หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด
0	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A
1	1.5 ^{aB}	2.5 ^{dB}	1.5 ^{aB}	1.7 ^{bB}	2.5 ^{dB}	1.9 ^{cB}
2	1.4 ^{aB}	2.8 ^{cC}	2.5 ^{bD}	2.4 ^{bC}	2.5 ^{bB}	2.5 ^{bD}
3	2.2 ^{bC}	2.5 ^{cB}	1.9 ^{aC}	1.9 ^{aB}	2.5 ^{cB}	2.2 ^{bC}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

¹ หมายถึง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในวันที่ 0 – ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในแต่ละวันของแต่ละตัวอย่างทดลอง

ตารางที่ 18 ปริมาณ *E. coli* ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลล่าเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยทำการเก็บรักษา 3 วัน

วันที่เก็บรักษา	ปริมาณ <i>E. coli</i> ที่ลดลง ¹ (log CFU/กรัม)					
	ไส้สดเคลือบน้ำมัน			ไส้คอลล่าเจนเคลือบน้ำมัน		
	ไส้สด	หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด	ไส้คอลล่าเจน	น้ำมันหอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด
0	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A
1	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A
2	0.2 ^{bB}	1.1 ^{eB}	0.7 ^{dB}	0.1 ^{aB}	0.5 ^{cB}	0.7 ^{dB}
3	1.3 ^{bC}	1.5 ^{cC}	1.6 ^{cC}	1.1 ^{aC}	1.3 ^{bC}	1.6 ^{cC}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

¹ หมายถึง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในวันที่ 0 – ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในแต่ละวัน

ตารางที่ 19 ปริมาณ *S. aureus* ที่ลดลงในไส้กรอกเปรี้ยวเมื่อใช้ไส้สดและไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยในการบรรจุหลังจากการเก็บรักษา 3 วัน

วันที่เก็บรักษา	ปริมาณ <i>S. aureus</i> ที่ลดลง (log CFU/กรัม)					
	ไส้สดเคลือบน้ำมัน		ไส้สดเคลือบน้ำมัน		ไส้คอลลาเจนเคลือบ	
	ไส้สด	หอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด	ไส้คอลลาเจน	น้ำมันหอมระเหยกระชาย	หอมระเหยมะกรูด
0	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A	0.0 ^A
1	1.0 ^{cB}	1.2 ^{dB}	1.8 ^{eB}	0.3 ^{aB}	0.9 ^{bB}	1.2 ^{dB}
2	4.4 ^{bC}	5.4 ^{dC}	5.6 ^{eC}	4.7 ^{cC}	4.6 ^{cC}	4.1 ^{aC}
3	5.4 ^{bD}	nd	nd	nd	nd	4.8 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

¹ หมายถึง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในวันที่ 0 – ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบในแต่ละวัน

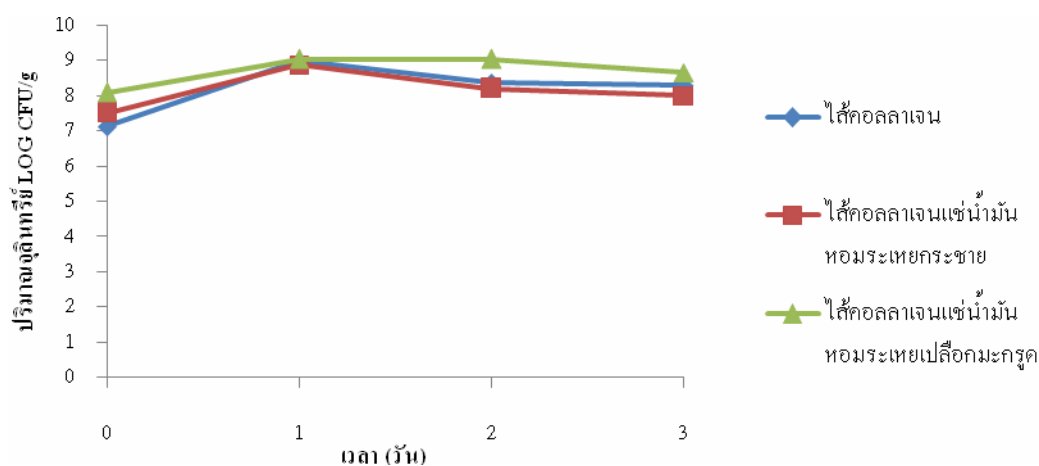
Nd = ตรวจไม่พบ (Detection limit ≤ 1 log CFU/กรัม)

ผลของไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุในไส้สด (คอนโทรล) ไส้สดเคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหยมะกรูดไม่แตกต่างกัน โดยมีจำนวนประมาณ $8 \log \text{CFU/กรัม}$ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน (ภาพที่ 2) ส่วนไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุในไส้คอลลาเจน (คอนโทรล) มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่าไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยเล็กน้อย (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามไส้กรอกเปรี้ยวในไส้บรรจุทุกชนิดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ $7-8 \log \text{CFU/กรัม}$ จึงกล่าวได้ว่าน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว

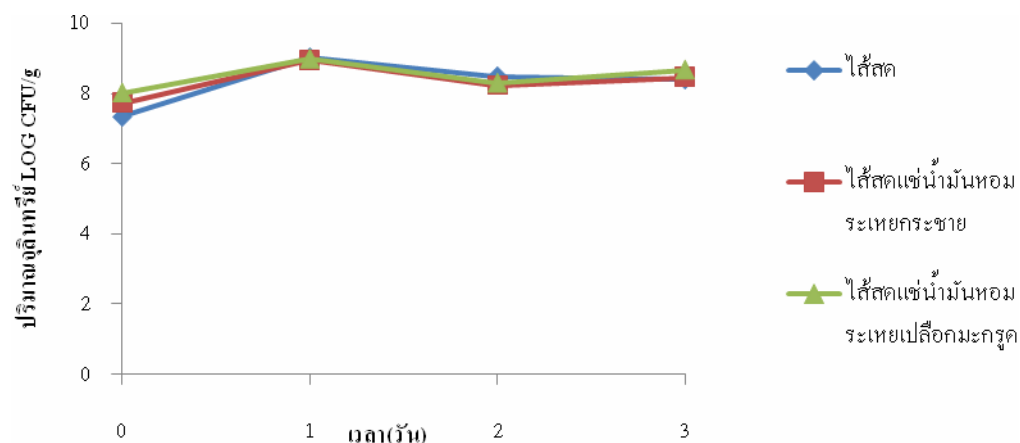
แม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกับ *B. cereus* และ *S. aureus* แต่สามารถต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยได้มากกว่า อาจเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobe) จึงมีกลไกในการเจริญและยับยั้งเชื้อต่างจาก *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้ชอบเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน นอกจากนี้คาดว่าเวลาที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้นั้นน่าจะมาจากผนังเซลล์ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น เนื่องจากต้องทนอยู่ในสภาวะกรดที่ตัวเองสร้างขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถต้านทานสารต้านจุลินทรีย์ได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Cloete (2003) ได้ ดั้งสมมติฐานว่า จุลินทรีย์บางชนิด อาจมีกลไกบางอย่างเพื่อป้องกันสารยับยั้งไม่ให้เข้าไปภายในเซลล์ หรือพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียจะทำให้แอนตรกิริยากับสารยับยั้งให้มีสภาพเป็นกลาง ทำให้คุณสมบัติของสารยับยั้งเปลี่ยนไป หรือหากสารยับยั้งเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ เอนไซม์ภายในเซลล์จะเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของสารยับยั้งทำให้ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ หรือในบางกรณีเซลล์แบคทีเรียจะมีการปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันให้มีความต้านทานต่อสารยับยั้งสูงขึ้นก็เป็นได้ ดังนั้นการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้ทำให้เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการหมักไส้กรอกเปรี้ยวเป็นอย่างมาก

ผลของไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) มีปริมาณคงที่ ที่ $7.8 - 8.3 \log \text{CFU/กรัม}$ ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บรักษาในทุกตัวอย่างทดลอง (ภาพที่ 4 และ 5) เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดนั้นมีแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลักซึ่งมีจำนวนประมาณ $7-8 \log \text{CFU/กรัม}$ และรวมถึง *Salmonella*

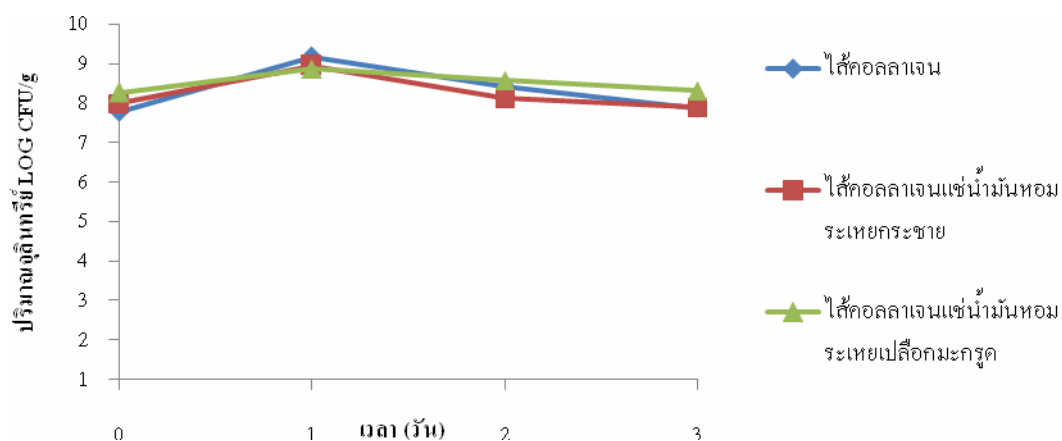
spp., *E. coli*, *S. aureus* และจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ดังนั้น ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจึงมีค่าสูงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา



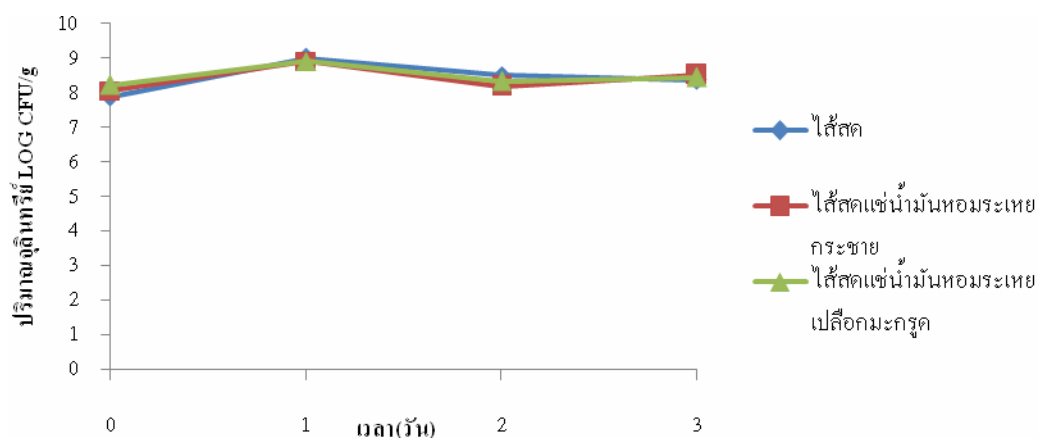
ภาพที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยใส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน



ภาพที่ 3 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยใส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน



ภาพที่ 4 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน



ภาพที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวที่บรรจุด้วยไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดตามระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน

สรุปผลการทดลอง

ไส้กรอกเปรี้ยวที่สำรวจจากท้องตลาดและที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ มีค่า a_w 0.98-0.99 ค่า pH สุดท้ายในผลิตภัณฑ์ในช่วง 4.1-5.9 และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นพาหะชนิด *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ที่สุ่มซื้อจากท้องตลาด

น้ำมันหอมระเหยกระชาย น้ำมันหอมระเหยมะกรูด สารสกัดเอทานอลจากกระชายและสารสกัดเอทานอลจากขิง มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวก ได้แก่ *L. monocytogenes*, *B. cereus* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *Salmonella* spp. โดยไม่ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นประโยชน์ในการทำไส้กรอกเปรี้ยว แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดเอทานอลของกระชายและขิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยจากกระชายและมะกรูด

ชนิดไส้บรรจุและชนิดน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยไส้สดที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชาย 1 ชั่วโมง ยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ส่วนไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันกระชายยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในขณะที่ไส้คอลลาเจนเคลือบน้ำมันหอมระเหยมะกรูด ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. Weltevreden*

แม้ว่าจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกเปรี้ยวมีแนวโน้มลดลงเมื่อ pH ลดลงถึงค่า 4.4 แต่ยังคงพบ *S. aureus*, *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา 3 วัน การใช้ไส้บรรจุที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายและน้ำมันหอมระเหยมะกรูดช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคในไส้กรอกเปรี้ยวในระหว่างการเก็บรักษา และไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นไส้สดหรือไส้คอลลาเจนที่เคลือบน้ำมันหอมระเหยกระชายหรือน้ำมันหอมระเหยมะกรูดจึงมีศักยภาพในการเป็นไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ในไส้กรอกเปรี้ยวหรือประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อื่นต่อไป

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. วัตถุประสงค์ในการทำไส้กรอกเบรียวควรมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ที่ดี เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Background flora) ซึ่งอาจรบกวนผลการทดลอง นอกจากนี้ จำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะขณะผลิตและระหว่างการเก็บรักษาไส้กรอกเบรียวให้คงที่ เช่น อุณหภูมิ และความชื้นในอากาศระหว่างการเก็บรักษา เป็นต้น
2. การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิคแบบดั้งเดิมเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย เวลา แรงงานและอาจให้ผลไม่แม่นยำ ควรตรวจสอบด้วยจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR จะให้ผลรวดเร็วและแม่นยำมากกว่า หรืออาจดูการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในไส้กรอกเบรียวที่บรรจุด้วยไส้บรรจุด้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค DGGE
3. หากมีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยในไส้บรรจุจะช่วยให้สามารถอธิบายผลการทดลองได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ชิดชม อีรวงษ์. ม.ป.ป. การทำลูกชิ้นหมูอนามัย กุนเชียง หมูยอ. สถาบันอาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปทุม อรุณวัชรินทร์. 2551. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากสมุนไพรในฟิล์มบริโคได้ เพื่อ
ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมบริโค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2546. **ไส้กรอกอีสาน**. มผช. 144/2546.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม . 2537. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมไส้
กรอกอีสาน สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.**
กรุงเทพฯ
- เอกรินทร์ ภัทรธนาดี. 2550. การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียง
ความถี่สูงและประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้ง
จุลินทรีย์ในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Adegoke, G.O. and B. A. Odesola. 1996. Storage of microbial maize and cowpea and
inhibition of agents of biodeterioration using the powder and essential oil of
lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Int. Biodeterioration & Biodegradation* .
81 -84.
- Aureli, P., A. Costantini and S. Zolea. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential
oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55(5): 344-348.
- Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong, C. Pulsrikarn, P. Sawanpanyalert, R.S.
Hendriksen, M.A. Danilo, L.F. Wong, and F.M. Aarestrup. 2004. *Salmonella*
serovars from humans and other sources in Thailand 1993-2002. *Emerging*
Infect. Dis. 10 (1): 131-136.
- Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*, pp. 463-523. In M.P Doyle, ed.
Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.

- Brannen, J.K. and P.M. Davidson. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **Int. J. Food Microbiol.** 90: 63-74.
- Busatta, C., R.S. Vidal, A.S. Popiolskia, A.J. Mossi, C. Dariva, M.R.A. Rodrigues, F.C. Corazza, M.L. Corazza, J. V. Oliveira and R.L. Cansian. 2007. Application of *Origanum majorana* L. Essential oil as an Antimicrobial Agent in Sausage. **Food Microbiol.** 25: 207-211.
- Canillac, N. A. Mourey. 2001. Antimicrobial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiol.** 18: 261-268.
- Cloete, T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **Int. Biodet. Biodeg.** 51: 277-282.
- Foster, W. J. 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Critical reviews in microbiol.** 21(4): 215-237.
- Houben, J.H., W.A.M. Bakker and G. Keizer. 2005. Effect of trisodium phosphate on slip and textural properties of hog and sheep natural sausage casings. **Meat Sci.** 69: 209–214.
- Jay, J.M., M.J. Loessner and D.A. Golden. 2005. Modern Food Microbiology. 7th ed. Springer Science + Business Media, Inc., NY.
- NCCLS. 2002. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals.** 2nd ed. M31-A2. 22(6).
- Oonmetta-aree, J., T. Suzuki, P. Gasaluk and G. Eumkeb. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. **LWT.** 39(10): 1214-1220.
- Ouattara, R.E.S., R.A. Holley, G.J.P. Piette and A. Begin. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **Int. J. Food Micro.** 37: 155–162.

- Pattaratanawadee, E., C. Rachatanapun, P. Wanchaitanawong and W. Mahakarnchanakul. 2006. Antimicrobial Activity of Spice extracts against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40: 159-165.
- Sallam, K.I., M. Ishioroshi and K. Samejima. 2004. Antioxidant and antimicrobial effect of garlic in chicken sausage. **LWT.** 37(8): 849-855.
- Shelef, L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. **J. Food Safety.** 6: 29–44.
- Thongson, C., P. M. Davidson, W. Mahakarnchanakul and P. Vibulsreth. 2005. Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104. **J. Food Prot.** 68(10): 2054-2058.
- Thongson, C., P.M. Davidson, W. Mahakarnchanakul and J. Weiss. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. **Lett. Appl. Microbiol.** 39(5): 401-406.
- Vanderzant, C and D.F. Splittstoesser. 1992. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1219p.
- Wan, J., A. Wilcock and Convery, M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **J. Appl. Microbiol.** 84(2): 152-158.
- Yadav, A.S., N.K. Paney and R.P. Singh. 2004. Antimicrobial effect of turmeric extract against *Aeromonas hydrophila* in extending refrigerated shelf-life of minced chicken meat. **Indian J. Anim. Sci.** 74(11): S8.
- Zivanovic, S., S. Chi and F.A. Draughon. 2005. Antimicrobial activity of essential oils incorporated in chitosan films. **J. Food Sci.** 70:M45-M51.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ไว้ในสัญญาโครงการ
 - ชื่อเรื่องที่จะตีพิมพ์: Antimicrobial activity of sausage casing coated with spice extracts
 - ชื่อวารสารที่จะตีพิมพ์: Journal of Food Protection (impact factor 2.154) หรือ Trends in Food Science and Technology (impact factor 2.534) หรือวารสารวิชาการระดับชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ -
 - เชิงนโยบาย -
 - เชิงสาธารณะ -
 - เชิงวิชาการ
 - เป็นส่วนหนึ่งในการเรียนการสอนเนื้อหา Natural antimicrobials วิชา 052361 Principle in Food Microbiology และ 052542 Hygienic Problems in Food
3. อื่นๆ
 - เสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการภาคโปสเตอร์ เรื่อง การต้านจุลินทรีย์ของไส้กรอกที่แช่น้ำมันหอมระเหยเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46