



รายงานฉบับสมบูรณ์

**“การนำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”**

โดย

รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

ผศ.ดร. คมแข พิลาสสมบัติ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 3)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

โดย

รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผศ.ดร.คมแห	พิลาสมบัติ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับ
ผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

Potential of Using Probiotic Bacteria as Starter Culture in Innovative
Fermented Meat Products for Functional Food

โดย

รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

ผศ. ดร. คมแข พิลาสมบัติ

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 3)

**การศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินกับกรดแลคติก
ในการลดเชื้อ *S. Typhimurium***

(แผนการดำเนินงาน ข้อ 2.2)

(ส่วนที่ 1 เล่มที่ 3)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
วิธีการทดลอง	29
ผลการทดลองและวิจารณ์	36
สรุปผลการทดลอง	66
ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	81
ภาคผนวก ข	84

แผนการดำเนินงานข้อ 2.2

บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้ทำการศึกษาผลของการใช้สารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการลดเชื้อ *S. Typhimurium* จากการสำรวจเนื้อโคในตลาดในกรุงเทพมหานคร พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* sp. สามสายพันธุ์ *S. Senftenberg* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด (19.3%) รองลงมาเป็น *S. Anatum* (15.6%) และ *S. Weltevreden* (11.0%) ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำสารแบคทีเรียโอซินและกรดแลกติกมาศึกษาเพื่อลดเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ดังกล่าว การศึกษาผลของกรดแลกติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อซัลโมเนลลาในหลอดทดลองในเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่ากลุ่มอาหาร TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 สามารถยับยั้งและทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์

เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเนื้อโคผลที่ได้พบว่าเป็นไปในแนวทางเดียวกัน คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 ความเข้มข้น 1,600 AU/ml จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ความเข้มข้น 1,600 AU/ml นี้มีค่า pH ต่ำที่สุดจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด และมีค่าความสว่างของสี (L^*) มากที่สุด เนื้อในกลุ่มนี้จึงดูมีสีซีดมากที่สุด เนื่องมาจากการที่ค่า pH ต่ำลงมากเท่าไรก็จะส่งผลให้เนื้อมีสีซีดเนื่องจากความเป็นกรดที่เกิดจากค่า pH ที่ต่ำจะส่งผลให้กล้ามเนื้อของเนื้อโคเกิดการเสื่อมสภาพ ไม่สามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ จึงทำให้มีน้ำซึมออกมาบริเวณผิวหนังเนื้อมากเนื้อโคจึงดูมีสีซีด นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสูงที่สุด เนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคนั้นเกี่ยวข้องกับค่า pH โดยค่า pH ที่ต่ำจะทำให้ค่า pH ในเนื้อโคต่ำลงจนใกล้จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ทำให้กล้ามเนื้อทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อเสียสภาพ และเป็นผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อในส่วนไมโอไฟบริลเกิดการหดตัว เป็นเหตุให้เนื้อสัตว์อุ้มน้ำได้น้อยลงเกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น

ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคโดยวิธี Different from control โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน ทดสอบทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค พบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเนื้อโคที่สัมผัสกรดแลกติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทนำ

ความสำคัญและที่มา

ในปัจจุบันโรคอุจจาระร่วงเป็นโรคหนึ่งที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของวงการแพทย์และการสัตวแพทย์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แต่แบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สำคัญในโรคนี้คือ เชื้อซัลโมเนลลา โดยเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ในคนและสัตว์ การได้รับเชื้อนี้โดยบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปทำให้เกิดอาการท้องร่วง ดังได้มีรายงานการศึกษาวិจัยการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในวัตถุดิบที่นำมาผลิตอาหารหลายชนิด เช่น รายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในไก่สดและเครื่องในไก่ (Jerngklinchan *et al.*, 1994) ในไข่ไก่ (Saitanu *et al.*, 1994) ในเนื้อหมูที่จำหน่ายในท้องตลาด (อดิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ, 2548)

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

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

รายงานของ Snijders และคณะ (1985) พบว่าการใช้กรดแลคติกที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1% จะทำให้เนื้อโคมีสีซีดจางลง นอกจากกรดแลคติกจะมีผลต่อสีของเนื้อสัตว์แล้วยังพบว่ามีผลต่อกลิ่นรสของเนื้ออีกด้วยโดยพบว่าการใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 1% จะส่งผลให้เนื้อโคมีกลิ่นรสดีขึ้น (Hamby *et al.*, 1987; Prasai *et al.*, 1991.) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการนำ Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (Swetwathana, 2005) มาใช้ร่วมกรดแลคติกเพื่อลดการใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติก เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาคาดว่าจะเป็นทางเลือกใหม่ของผู้ประกอบการในการเลือกสารถนอมอาหารที่มาจากรธรรมชาติและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

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

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

ตามปกติเนื้อที่ได้จากสัตว์มีสุขภาพดี ไม่เป็นโรค จะปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมักเป็นผลมาจากการปนเปื้อนในระหว่างฆ่าชำแหละ ล้าง เลาะกระดูก เคลื่อนย้าย และเก็บรักษา จุลชีววิทยาที่ต้องเฝ้าระวังมิให้มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงมากนัก ประกอบด้วย

- 1) มีคที่ใช้แทงสัตว์ มีคต้องสะอาด ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก ต้องไม่มีเลือดปนเปื้อน เพราะจะทำให้แบคทีเรียแพร่กระจายไปยังเนื้อส่วนอื่นๆ
- 2) ขนและร่างกายของสัตว์ จุลินทรีย์มักอยู่ตามขนและซอกมุมอับต่างๆตามร่างกายสัตว์ เช่น ใต้ปีก ขาพับ เป็นต้น ในขณะที่ใช้มีคแทง จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผ่านเข้าไปสู่ภายในของเนื้อสัตว์ ในขณะที่ถอนขนหรือล้าง จุลินทรีย์บริเวณขนและซอกมุมอับจะแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆของซากเนื้อได้โดยง่าย ด้วยเหตุนี้จึงต้องใช้สารฆ่าเชื้อในการล้างซากเนื้อหลังฆ่า
- 3) ทางเดินอาหารของสัตว์ จุลินทรีย์อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ตามธรรมชาติ ผู้ชำแหละเนื้อที่ไม่ชำนาญ จะทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสรั่วกระจายสูง เป็นผลให้ยากแก่การควบคุม ดังนั้นวิธีชำแหละ จึงเป็นจุลชีววิทยาจุดหนึ่งที่ต้องทำการเฝ้าระวัง
- 4) มือผู้ชำแหละ เป็นแหล่งที่นำไปสู่การแพร่กระจายที่สำคัญอีกจุดหนึ่ง แม้ว่าผู้ชำแหละจะสวมถุงมือ แต่ไม่ได้หมายความว่าสามารถตัดวงจรการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ลงได้ โดยเฉพาะการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์จากสัตว์ตัวหนึ่งไปยังตัวอื่นๆโดยผ่านมือหรือถุงมือของผู้ชำแหละ
- 5) ภาชนะและอุปกรณ์ ภาชนะและอุปกรณ์ที่มีการสัมผัสกับเนื้อสัตว์ต้องล้างให้สะอาดก่อนที่จะนำมาใช้ การใช้ซ้ำของอุปกรณ์โดยไม่ผ่านการล้างทำความสะอาดเป็นการเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนข้ามสายพานลำเลียงเนื้อสัตว์เป็นจุดหนึ่งที่ต้องรักษาความสะอาดอย่างยิ่ง เพื่อมิให้เป็นแหล่งแพร่กระจายจุลินทรีย์ต่อไปในผลิตภัณฑ์
- 6) การเคลื่อนย้ายและการเก็บรักษา ต้องปฏิบัติตามกรรมวิธีการผลิตที่ดี เช่น การควบคุมอุณหภูมิขณะเคลื่อนย้ายและเก็บรักษา มีการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมและจากการปนเปื้อนข้าม
- 7) ท่อน้ำเหลือง ตามปกติในท่อน้ำเหลืองจะมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ท่อน้ำเหลืองแทรกอยู่ตามเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์ ถ้าวิธีการชำแหละไม่เหมาะสม ท่อน้ำเหลืองแตกกระจาย ก็จะแพร่กระจายเชื้อไปยังส่วนอื่นๆของเนื้อสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตนั้น แม้จะมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องควบคุม และก่อให้เกิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้แก่ *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Yersinia enterocolitica, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* เชื้อเหล่านี้อาจปนเปื้อนมาจากตัวสัตว์และในระหว่างกระบวนการผลิต

นอกจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแล้ว การเน่าเสียของเนื้อสัตว์เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ก็เกิดเนื่องจากเนื้อสัตว์มีค่าความเป็นกรดต่ำ, ปริมาณความชื้น และสารอาหารเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหนังของเนื้อจะเน่าเสียก่อน ส่วนอื่นสืบเนื่องจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศขึ้นที่พบมาก คือ *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Morexella* และ *Aeromonas*

เนื้อก่อนโตการเน่าเสียจะเกิดขึ้นที่บริเวณรอบๆกระดูกก่อน ทำให้เนื้อเปรี้ยว เรียก ว่า bone taint หรือ sours แบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุ ได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* และ *Enterococcus* สำหรับเนือบดการเน่าเสียมักเกิดจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศเป็นสำคัญ ก่อนที่เนื้อจะเน่าเสีย จะพบจุลินทรีย์ที่สร้างเม็ดสี (pigment) เป็นจำนวนมาก ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแบคทีเรียจำพวกสร้างสปอร์ แต่หลังจากเนื้อเน่าเสียแล้วจะพบแบคทีเรียที่ไม่สร้างเม็ดสี แบคทีเรียท่อนสั้น ดิคลีแกรมลบ และเจริญที่อุณหภูมิต่ำ แต่ถ้านำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ จะเจริญด้วยแบคทีเรียจำพวก *Pseudomonas*, *Acinetobacter* และ *Morexella* ไม่ได้ จึงไม่ปรากฏบนจานเพาะเชื้อ นอกจากจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามและเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการจึงจะพบการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เนื้อที่หั่นเป็นชิ้นๆ เช่น สเต็ก หรือเนื้อก้อนเล็กๆสำหรับนำไปทำเป็นเนื้ออบ การเน่าเสียมักเกิดขึ้นบริเวณผิวหนังของชิ้นเนื้อ ถ้ามีความชื้นเหมาะสมและปราศจากสารยับยั้ง หรือมีวัตถุดิบเสียอันมีผลทำให้แบคทีเรียเจริญไม่ดี กรณีนี้อาจพบเชื้อราและยีสต์ได้ และเมื่อเนื้อเริ่มเน่าแล้ว บริเวณผิวจะฉีกเพราะเกิดเมือกขึ้น Ayres (1960) พบว่าเนื้อจะเริ่มมีกลิ่นผิดปกติ เมื่อตรวจพบจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศบนผิวหนังได้ประมาณ $7.0-7.5 \log \text{ cfu/cm}^2$ และเนื้อจะเริ่มเกิดเมือกเมื่อตรวจนับจุลินทรีย์บนผิวหนังได้ $7.5-8.0 \log \text{ cfu/cm}^2$ การเกิดเมือกบนเนื้อสดเป็นปัญหาการเน่าเสียของเนื้อที่เก็บในตู้เย็นมากที่สุด

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่มักพบในเนื้อสัตว์ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสียโดยทำการเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนในเนื้อทำให้เกิดรสเปรี้ยวและ เนื้อมีสีเขียวคล้ำนอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Corynebacterium* spp. และ *Clostridium* spp. และยังมีเชื้อราที่มักเจริญบนเนื้อสัตว์ เช่น *Mucor* spp., *Geotrichum* spp., *Sporotrichum* spp. และ *Cladosporium* spp.

1. การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา (Salmonellae)

1.1 ความสำคัญของเชื้อซัลโมเนลลา

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

1.2 แหล่งที่พบเชื้อซัลโมเนลลา

แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของเชื้อซัลโมเนลลา คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง หรือเชื้อซัลโมเนลลาอาจพบอยู่ตามร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จากลำไส้แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยในสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหาร สู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักร การขนส่งสัตว์และอาหารระหว่างประเทศทำให้เชื้อกระจายไปทั่วโลก

1.3 การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์

คนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแห่งแรก (primary habitat) ของเชื้อ ซัลโมเนลลาการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า salmonellosis เกิดได้ทั้งในคนและสัตว์จะพบได้ในเนื้อสัตว์สืบเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางเดินอาหาร

เนื้อสัตว์ดิบมักพบการปนเปื้อน ด้วยเชื้อซัลโมเนลลาซึ่งมักก่อให้เกิดการระบาดของโรค salmonellosis การปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นได้ทั้งบริเวณในชั้นกล้ามเนื้อและบริเวณผิวหนังของเนื้อสัตว์ โดยการปนเปื้อนเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจากอุจจาระมาสู่เนื้อสัตว์ในระหว่างการฆ่า ในสัตว์ใหญ่ เช่น แกะ โค และกระบือ การปนเปื้อนมักเกิดในขั้นตอนการฆ่า ผ่าซาก ซ้ำแหละ ตัดแต่ง และการขนย้ายเนื้อสัตว์ ข้อกำหนดมาตรฐานอาหารตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) ระบุว่า อาหารประเภทเนื้อดิบ และผลิตภัณฑ์เนื้อต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม แต่ยังคงมีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ทั้งในและต่างประเทศอยู่มาก ดังรายงานต่อไปนี้

สุมาลี บุญมา และคณะ (2539) ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์เนื้อวัว ได้แก่ ลูกชิ้นเนื้อวัวและเนื้อแดดเดียว จำนวน 40 ตัวอย่างพบว่าการปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลา 67.5% และในปี 2540 ยังได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ และเนื้อสุกร อัน ได้แก่ ไส้กรอก ลูกชิ้น หมแฮม กุนเชียง ไก่ขย และหมูยอ รวมทั้งสิ้น 200 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายตามห้างสรรพสินค้า และตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดนนทบุรีพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลา 32 ตัวอย่าง (16%) โดยเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ 8 ตัวอย่าง และเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสุกร 24 ตัวอย่าง โดยสายพันธุ์ที่พบได้แก่ *S. Heidelberg*, *S. Anatum*, *S. Rissen*, *S. Hadar*, *S. Panama*, *S. Enteritidis*, *S. Amsterdam*, *S. Newport*, *S. London*, *S. Tennessee* และ *S. Livingston*

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

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

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

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

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

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

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

Orji และคณะ (2005) ได้ทำการสำรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในมูลไก่ 120 ตัวอย่าง, เนื้อโคสด 96 ตัวอย่าง, ผักก้นเปื้อนของคนขายเนื้อ 96 ตัวอย่าง และเยือกที่ใช้ในร้านขายเนื้อ 96 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าพบ *S. Paratyphi A* จากมูลไก่ 12.5%, 4.2% จากเนื้อสด และ 2.1%, 4.2% จาก ผักก้นเปื้อนและเยือกเนื้อตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบซัลโมเนลลาสายพันธุ์อื่น ๆ อีก คือ *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhi* และ *S. Agona*

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

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

จากข้อมูลข้างต้นทำให้เราได้ทราบว่า เชื้อซัลโมเนลลา ยังคงสามารถปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ได้ในปริมาณสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของเชื้อในระหว่างกระบวนการผลิตและการแปรรูปเนื้อสัตว์ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งในขั้นตอนการฆ่าและการตกแต่งเนื้อสัตว์ แม้ว่าการลอก และการล้างซากจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาบนซากเนื้อสัตว์ได้ แต่เชื้อก็สามารถเจริญและปนเปื้อนบนซากได้จากอุปกรณ์ในการกำจัดขน และจากลำไส้ระหว่างการชำแหละ (Gill and Brayant, 1993) จากการศึกษาของ Forsythe และ Hayes (1998) พบว่าหลังการฆ่าสัตว์จะมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อซัลโมเนลลา ที่บริเวณผิวหนังของเนื้อสัตว์เนื่องจากการตัดแต่ง และเมื่อนำไปส่งต่อที่ร้านค้าต่างๆพบว่าการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นถึง 20% นอกจากนี้สัญลักษณ์ส่วนบุคคลของบุคลากรที่อยู่ในโรงงานก็เป็นอีกสาเหตุที่สำคัญที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อลงสู่เนื้อสัตว์ โดยอรุณ บำรุงกุลนนท์ และคณะ (2545) ได้ทำการสำรวจผู้เป็นพาหะโดยทำการตรวจเชื้อซัลโมเนลลา และไวรัสโอโนจุจาระของพนักงานในกลุ่มของโรงงานผลิตอาหารแช่แข็งจำนวน 9,465 ตัวอย่าง พบผู้เป็นพาหะเชื้อซัลโมเนลลาเฉลี่ยร้อยละ 8.88

2. การใช้แบคทีเรียโอซินในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

2.1 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocin)

คือสารประกอบโปรตีนที่แบคทีเรียหลายสายพันธุ์สร้างขึ้นเองตามธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic Acid Bacteria (LAB) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคทีเรียโอซิน ทั้งในรูปการยับยั้งการเจริญหรือการทำลาย และสามารถสลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์ เช่น ทริปซิน อัลฟา-ไคโมทริปซิน โปรติเอส เป็นต้น จึงไม่มีผลตกค้างหลังบริโภค ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินกำลังได้รับความสนใจเนื่องจากในผู้บริโภคได้หันมาให้ความสำคัญเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น ต้องการผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์ อีกทั้งต้องการผลิตภัณฑ์ที่เป็นปราศจากสารปรุงแต่ง (additive-free) เพื่อเป็นการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคผู้ผลิตจึงต้องพยายามหาทางเลือกใหม่ๆ ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค การใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารจึงถือเป็นมิติใหม่ของการถนอมอาหาร ที่ให้ข้อดีทั้งในแง่ของการควบคุมคุณภาพอาหารและป้องกันการระบาดของอาหารเป็นพิษ แบคทีเรียโอซิน มีกิจกรรมยับยั้งทั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ทำให้สามารถใช้ได้อย่างเหมาะสมในอาหารที่เสื่อมเสียง่าย เช่น เนื้อสัตว์ และ ผลิตภัณฑ์นม การใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เนื่องจากกลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินสามารถถูกลดทอนลงได้ตามสภาพแวดล้อมที่เป็นจริง

2.2 แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria)

คือ แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญในการผลิตอาหารหมักหลายประเภท มีรายงานพบว่าแบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์ที่พบ ในอาหารหมักสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ สารแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีที่ต่างกัน Bacteriocin มีความสามารถหรือคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดรวมไปถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* ทำให้ Bacteriocin มีความสามารถในการเป็นสารถนอมอาหาร ปัจจุบันแบคทีเรียโอซิน แบ่งออกเป็น 4 ประเภท (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 1

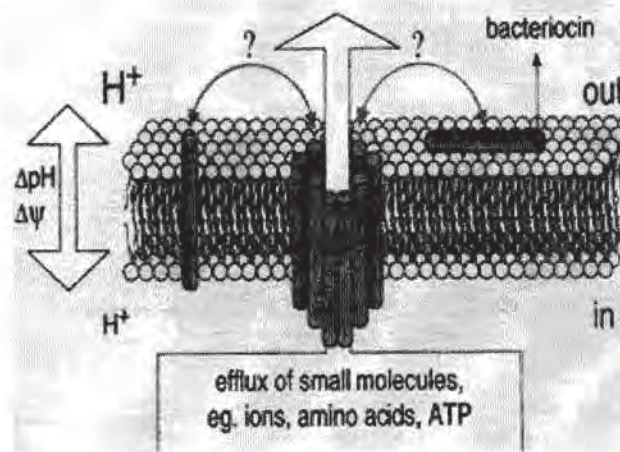
ตารางที่ 1 List of recently characterized bacteriocins

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

ตารางที่ 1 (ต่อ)

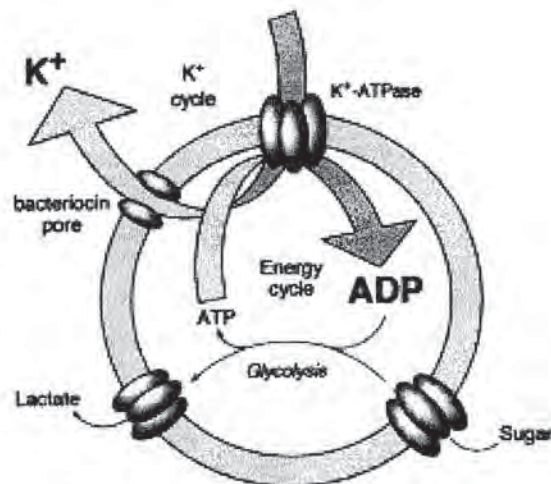
Source and producer strain	Bacteriocin
<u>Fruits and vegetables</u>	
<i>Lc. lactis</i>	Lactocin, Nisin, Lactococcin K
<i>Lb. plantarum</i>	Plantaricin C19
<i>Le. mesenteroides</i>	Leucocin BC2
<i>Leuconostoc</i> sp. J2	Leuconocin J
<i>P. parvulus</i>	Pediocin PA-1
<i>E. faecium</i>	Enterocin 900 and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

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



ภาพที่ 1 General model for mechanism of pore formation by bacteriocins

ที่มา : McAuliffe *et al.* (2001)



ภาพที่ 2 Proposed model of cell killing by pore-forming bacteriocin

ที่มา : Jack *et al.* 1995.

ตารางที่ 2 Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria

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

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

^bThis category has been excluded from Nes' Classification (Nes *et. al.*, 1996).

ที่มา : Garneau *et al.* (2002)

แบคทีเรียแลคติกที่ต่างสายพันธุ์กันจะสร้างแบคเทอรีโอซินที่คล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างในการยับยั้งจุลินทรีย์ การใช้แบคเทอรีโอซินในการถนอมอาหารอาจเป็นไปได้ทั้งในรูปแบบของการผลิตที่พบอยู่แล้ว หรือการนำไปเติมในอาหารระหว่างกระบวนการผลิต จึงเป็นที่น่าสนใจว่าแบคเทอรีโอซินนั้นเป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นตามธรรมชาติเพื่อยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันโดยมีกลไกที่สำคัญในการยับยั้งคือ แบคเทอรีโอซินเป็นสารประกอบเปปไทด์ที่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการรั่วขององค์ประกอบเซลล์ตามมา (ภาพที่ 1) ซึ่งอันตรกิริยาระหว่างแบคเทอรีโอซินและเยื่อหุ้มเซลล์มีหลายขั้นตอนก่อให้เกิดสารคอมเพล็กซ์ที่เป็นสาเหตุ กลไกการทำงานของแบคเทอรีโอซินได้สร้างสภาวะที่ไม่สมดุลของ Portion Motive Force (PMF) ให้เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่ง PMF จะประกอบไปด้วยสารต่างๆ คือ เกรเดียนต์พีเอช (pH gradient ; ΔpH) และ electrostatic component (the membrane potential ; $\Delta \Psi$) ซึ่งจะเร่งให้เกิดการสังเคราะห์ ATP และสะสมไอออนรวมทั้งสารเมตาบอไลต์ต่างๆ ในเยื่อหุ้มเซลล์ ความไม่สมดุลของ PMF ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยแบคเทอรีโอซินจะทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการไหลออกของสารที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น ไอออน กรดอะมิโนและ ATP ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของเซลล์เกิดการบาดเจ็บและทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Hill, 1995; Nes *et al.*, 1996; Ennahar *et al.*, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003) จากการที่รูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์จะทำให้เกิดการรั่วของ โพแทสเซียมไอออน (K^+) ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการรับกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์เซลล์จะตายในที่สุดเนื่องจากโพแทสเซียมไอออนซึ่งเป็นส่วนประกอบของ K^+ - ATPase ด้รั่วออกไปจากเซลล์จึงเป็นการเร่งให้เกิดการสลาย ATP จาก ATPase เพิ่มมากขึ้น

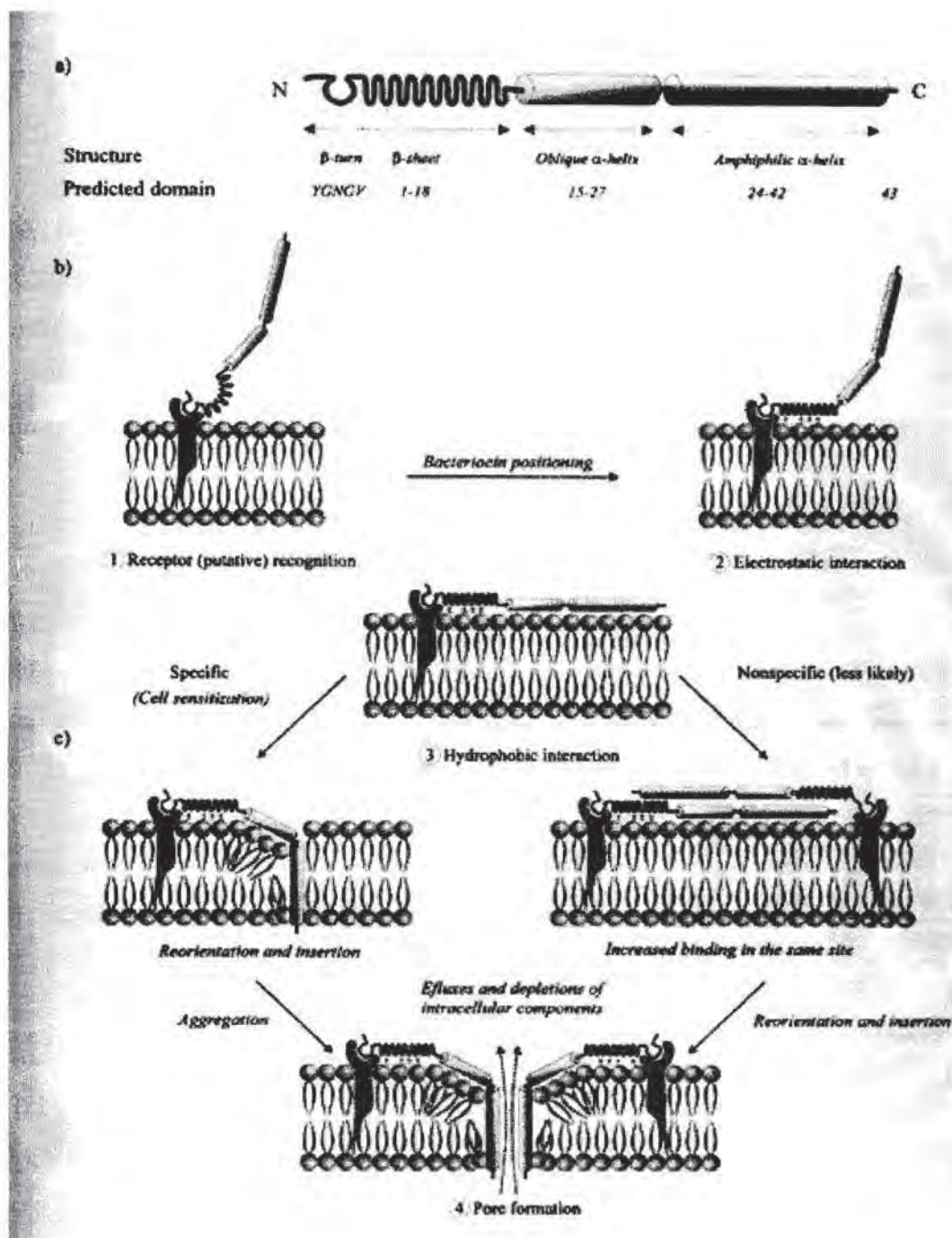
(Skaugen *et al.*, 1994), ดังแสดงในภาพที่ 2

กลไกการการเกิดรูรั่วของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์นั้นเริ่มจากการเกิด Electrostatic interaction ระหว่าง ปลายทางด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ของแบคเทอรีโอซินซึ่งเป็นสารพวก hydrophobic ที่มีประจุบวกกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย โดยมี anionic lipid ของไซโตพลาสซึมเมมเบรน (cytoplasmic membrane) เป็นตัวรับ (receptor) ตัวแรก ส่วนปลายทางด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-termina) ของแบคเทอรีโอซินนั้นจะมีความเป็น hydrophobic มากกว่าปลายทางด้านหมู่อะมิโน และเกิด hydrophobic interaction กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย หลังจากการเกิด hydrophobic interaction แล้วแบคเทอรีโอซินจะมีพลังงานมากขึ้นและจะแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทางด้านหมู่คาร์บอกซิล ตามมาด้วยการเกิดการรวมตัวกันเกิด water-fill pores ซึ่งกลไกนี้อธิบายได้ดังภาพที่ 3

ในปัจจุบันมีแบคเทอรีโอซินเพียงตัวเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกคือ นิสิน (nisin) โดยได้มีงานทดลองพบว่าจาก 40 สายพันธุ์ของ *Lactococcus lactis* สามารถผลิตนิซินได้ถึง 35 สายพันธุ์

(Hurst, 1981) แต่ในปัจจุบัน ได้มีการทำการวิจัยอย่างมากมายเพื่อค้นหาแบคทีเรียโอซินชนิดใหม่ๆ ที่เหมาะสมและปลอดภัยในการใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร และพบว่าแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIa ได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีสเปกตรัมของกิจกรรมการยับยั้งที่แคบยิ่งขึ้นและมีความจำเพาะสูงต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย ไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์อื่นในระบบนิเวศเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Pediocin PA-1/AcH ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและระบบการผลิตได้หลากหลาย

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



ภาพที่ 3 Schematic representation for bacteriocin and membrane interactions

- bacteriocin predicted structural domain
- possible interaction of each domain with the target membrane surface
- bacteriocin insertion and formation of hydrophilic pores

ที่มา: Ennahar *et al.* (2000)

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

Pediococcus pentosaceus TISTR 536 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากหมั้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้านของไทย มีคุณสมบัติในการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด (Swetwathana, 2005) รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Enterococcus faecalis* เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้สูงสุด 6,400 AU/ml ใน MRS broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (Swetwathana and Lotong, 1999; Swetwathana et al. 2000) ซึ่งต่อมาเชื่อดังกล่าวได้รับการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* และสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นเป็น class II bacteriocin ในกลุ่ม Pediocin PA-1 (Swetwathana et al. 2004; (Swetwathana, 2005) แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกด้วยกัน ซึ่งPediocin PA-1 ที่ผลิตได้จาก *P. pentosaceus* TISTR 536 จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกันแต่ไม่ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* (Swetwathana and Lotong, 1999; Swetwathana et al. 2000) จากรายงานการศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินในการยับยั้งและทำลายกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่ทนต่อการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินพบว่า แบคเทอริโอซินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวได้ถ้ามีปัจจัยอื่นร่วมด้วยที่เรียกว่า synergistic effect เช่น มีสภาพความเป็นกรดสูง มีไฮโดรไลติกเอนไซม์ มีสารยับยั้งพวกไนโตรเจน EDTA หรือมีสารพวก chelating agent เป็นส่วนประกอบ เป็นต้น (Hanlin et al. 1993; Stevens et al. 1991; Helander et al. 1997; Swetwathana et al. 2001) ในปัจจุบันนอกเหนือจากโนซินแล้ว Pediocin PA-1/ AcH เป็นแบคเทอริโอซินที่ได้จาก Lactic Acid Bacteria ที่มีการศึกษามากที่สุด

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

สำคัญต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยได้มีงานวิจัยสนับสนุนเกี่ยวกับการใช้ Pediocin AcH ในผลิตภัณฑ์อาหารมากมาย คือ

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

Kalchayanand (1990) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ Pediocin AcH ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อวัวสด โดยนำตัวอย่างเนื้อโคไปสัมผัสกับเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* (5×10^3 cfu/ml) แล้วนำมาสัมผัสสาร Pediocin AcH ความเข้มข้น 1240 AU/g แล้วบรรจุในภาชนะสุญญากาศ เก็บที่ 3 °C ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างเนื้อโคที่สัมผัส Pediocin AcH จะพบเชื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 2 log cycle เมื่อครบ 8 สัปดาห์ และเมื่อครบ 12 สัปดาห์พบว่ากลุ่มตัวอย่างพบเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* น้อยกว่า 1 log cycle

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

Swetwathana และคณะ (2002) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของสาร Pediocin PA-1 ที่ผลิตมาจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในการใช้เป็นก้ำเชื้อในระหว่างการหมักແหมม เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Anatum* โดยในการศึกษาได้แบ่งผลิตภัณฑ์ແหมม ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่เติมก้ำเชื้อ กลุ่มที่ใช้ Pediocin PA-1 ที่ผลิตจาก *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นก้ำเชื้อ และกลุ่มสุดท้ายใช้ *P. pentosaceus* JCM 5890 ซึ่งไม่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียโอซินเป็นก้ำเชื้อ ผลที่ได้พบว่าการใช้ การใช้เชื้อที่ผลิต Pediocin PA-1 เป็นก้ำเชื้อจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Anatum* ได้ดีที่สุด โดยขึ้นกับปริมาณเชื้อปริมาณเชื้อที่เติมลงไป โดยพบว่าถ้าเชื้อมีปริมาณน้อย (8-10 cfu/g) จะสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 4 ในขณะที่ถ้าปริมาณเชื้อมาก (80-100 cfu/ml) จะใช้เวลา 5 วัน

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

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

3. การใช้กรดแลกติกในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

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

กรดอินทรีย์เป็นสารที่พบอยู่ในธรรมชาติ ในอาหารชนิดต่างๆ หรือในบางครั้งอาจมีการเติมใส่ลงในอาหาร เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้นๆให้ยาวนานขึ้น กรดอินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติก, กรดแลกติก, กรดโพิโอไนก, กรดซอร์บิก และ กรดเบนโซอิก ส่วนกรดซิตริก, กรดแคปพริก, กรดฟูมาลิก และ กรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัด แต่ถูกนำมาใช้ในแง่ของรสชาติมากกว่า กรดอินทรีย์มีอยู่มากมายหลายชนิด สำหรับกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการฆ่าและและการแปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ คือ กรดแลกติก

ตารางที่ 3 ค่าคงที่ของการแตกตัว (pK_a) ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ

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

ที่มา: Doores (1993)

3.1 กรดแลกติก

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

คุณสมบัติของกรดแลกติก

1. เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีอยู่ในอาหารทั่วไปในเนื้อสัตว์ก็มีการผลิตกรดแลกติกด้วยโดยมีการเปลี่ยนจากไกลโคเจนให้เป็นกรดแลกติก
2. เป็นสารที่ไม่เป็นพิษและรับรองความปลอดภัยในการใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา
3. มีรสกรดอ่อนๆ ต่างจากกรดชนิดอื่นๆ ทำให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อสัตว์แล้วไม่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของเนื้อสัตว์มากนัก โดยเฉพาะด้าน สีและกลิ่น

4. ไม่กลบหรือลบกลิ่นรสของสารให้กลิ่นรสอื่นๆเมื่อใส่ลงในเนื้อสัตว์
5. มีบทบาทเด่นชัดด้านการถนอมอาหาร และควบคุมปริมาณจุลินทรีย์
6. กลิ่นของกรดแลคติกละลายน้ำได้ดี ทำให้ซึมเข้าไปในเนื้อสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว

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

1. ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในซากสัตว์
2. เพิ่มอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์

3.2 กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยใช้กรดแลคติก

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

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

3.3 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์เมื่อใช้กรดแลกติก

การใช้กรดแลกติกกับส่วนต่างๆของเนื้อสัตว์ จะมีผลต่อคุณภาพของเนื้อสัตว์ โดยพบว่า จะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายในและลักษณะภายนอกของเนื้อสัตว์ได้ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายใน

เป็นการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในอวัยวะต่างๆ เช่น เนื้อสันใน เนื้อไม่ติดซี่โครง เนื้อสะโพก เนื้อที่มีก้อนเลือด เนื้อที่ค่อ เป็นต้น โดยต้องใช้ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่เหมาะสมเพราะถ้าใช้ความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้สีของเครื่องในซีดจางอย่างเห็นได้ชัด แต่ถ้าน้อยเกินไปอาจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้

2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก

2.1 สี

ทำให้เกิดการซีดจางของเนื้อสัตว์ จนบางครั้งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และความซีดจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดแลกติก โดย Stivarius และคณะ (2002) ได้ทำการทดลองโดยนำเนื้อโคที่แช่เชื้อ *E. coli*, *S. Typhimurium*, coliforms และ aerobic plate count จากนั้นนำมาแช่ในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 82 °C และสารละลายกรดแลกติก 5% และสังเกตผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และทดสอบทางประสาทสัมผัส ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่แช่ในสารละลายกรดแลกติกให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, coliforms และ aerobic plate count แต่ทำให้เนื้อโคมีสีซีดลง

2.2 กลิ่น

การใช้กรดแลกติกจะให้ผลดีในแง่ของกลิ่นซากในแง่ของกลิ่นเนื้อสัตว์ โดยการใช้กรดแลกติกความเข้มข้น 5% จะไม่มีผลต่อความผิดปกติของกลิ่นเลย (Hamby *et al.*, 1987) คมแข พิลาสสมบัติ (2540) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* ในหลอดทดลอง โดยใช้ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ 1 2 และ 3% (v/v) ผลที่ได้พบว่า เชื้อ *S. Derby* จะลดลงอย่างสมบูรณ์เมื่อเชื้อสัมผัสกับสารละลายกรดแลกติกนาน 48 24 และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Staph. aureus*

นั้น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) ในการใช้กรดแลกติกทั้งสามระดับดังกล่าว แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาที่สารละลายกรดแลกติกสัมผัสกับเชื้อนานขึ้น จะพบแนวโน้มการลดลงมากขึ้น และมากที่สุดที่ 48 ชั่วโมง

หุสดี ดังวัชรินทร์ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติก ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* บนเนื้อสันนอกสุกร โดยใช้ เนื้อสุกรปลอดเชื้อที่มีน้ำหนัก 100-200 กรัมต่อชิ้น ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ *S. Derby* ให้มีปริมาณเชื้อ เริ่มต้นประมาณ 5 log cfu/g และเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 3 log cfu/g โดยแบ่งชิ้นเนื้อสุกรเป็นกลุ่มควบคุม คือไม่สัมผัสสารละลายและกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 2% (v/v) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 15 °C และสุ่มเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 วัน ผลที่ได้พบว่า การเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ 4 °C นั้นกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Derby* และ *Staph. aureus* ได้ดีกว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่การเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ 15 °C ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Derby* ได้ แต่สำหรับเชื้อ *Staph. aureus* พบว่ากลุ่มที่สัมผัส กรดแลกติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้นาน 7 วัน

Anderson และ Marshall (1990) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ จุลินทรีย์ของกรดแลกติก โดยใช้กรดแลกติก 1%, กรดอะซิติก 2%, กรดซิตริก 0.25% และกรด แอสคอร์บิก 0.1% สัมผัสกับเนื้อวัวที่มีการสัมผัสเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรด (0-3%) และใช้อุณหภูมิต่างกัน (20-700°C) ผลที่ได้พบว่าสามารถลดเชื้อ ในกลุ่ม aerobic bacteria, *E. coli* และ *S. Typhimurium* และพบว่าค่า pH ที่ผิวหน้าเนื้อวัวลดจาก 5.2 เหลือ 4.3 เมื่อใส่กรด 3% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

Blaise และคณะ (1997) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรด ความเข้มข้นระหว่าง 0.1%-1% (w/v) 5 ชนิด คือกรดอะซิติก, กรดเบนโซอิก , กรดแลกติก, กรด โฟฟิโอนิกและ กรดซอร์บิกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *B. thermosphacta*, *C. piscicola*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake*, *P. fluorescens* และ *S. liquefaciens* ผลที่ได้พบว่าการใช้กรดอะซิติก จะ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด ตามมาด้วยกรดโฟฟิโอนิก กรดแลกติกและ กรดซิตริกตามลำดับ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่า เชื้อในกลุ่ม lactobacillus จะมีความทนต่อการยับยั้งของ กรดมากที่สุด ตามมาด้วยเชื้อ *P. fluorescens* และเชื้อ *S. liquefaciens* ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *B. thermosphact*, *C. piscicola* จะถูกยับยั้งด้วยกรดได้มาก

Yang และ Slavik (1998) ได้รายงานถึงผลการลดจำนวนของเชื้อ *S. Typhimurium* ไป 1.7-2.0 log cfu ในเนื้ออกไก่ โดยได้นำเนื้อไปแช่ในสารละลายไตรโซเดียมฟอสเฟต 10% , ซิตริลโพ ริดีเนียมคลอไรด์ 0.5%, กรดแลกติก 2% และ โซเดียมไบซัลเฟต 5% Yasmina และคณะ (2002) ได้ ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างกระบวนการฆ่า และศึกษาผลของการใช้

สารไนซิน, กรดแลคติก รวมทั้งสารผสมของสารละลายดังกล่าวในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้สารไนซิน 500 IU/ml, กรดแลคติก 1.5% รวมทั้งสารผสมของสารละลายดังกล่าวพ่นลงบนซากเนื้อโคและทำการ swab บริเวณซอกคอ ส่วนอก และ บริเวณใต้ หลังจากกระบวนการ ลอกหนัง ผ่าซากและล้างซาก โดยกลุ่มควบคุมจะไม่พ่นสารละลายลงไป ผลจากการศึกษาพบเชื้อจำพวก aerobic plate counts (APCs), total coliforms และ *E.coli* มากที่สุดบริเวณซอกคอหลังกระบวนการผ่าซาก และพบเชื้อน้อยสุดหลังกระบวนการลอกหนังและการใช้สารละลายผสมจะมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดโดยลดได้มากถึง 2 log units

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

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

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

1.1 เนื้อโคที่ใช้ในการทดลอง

เนื้อโคที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่เนื้อสะโพก ซึ่งมาจากเขียงเนื้อในตลาดเขตพระโขนง, เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.2.1 *Pediococcus pentosaceus* TISTR536 (Swetwathana, 2005)

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

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

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

1.2.5 เชื้อ *Listeria innocua* LTH 3096

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Scharlau)

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

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rambach agar (Merck)

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Iron(TSI) agar slant (Criterion)

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

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) slant,plate (Criterion)

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) (Criterion)

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

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

2.10 Meat extract (Scharlau)

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

2.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Hektoen Enteric(HE) agar (Merck)

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

- 2.14 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth(TTB) (Merck)
- 2.15 Yeast Extract (Merck)
- 2.16 โซเดียมคลอไรด์ (BDH)
- 2.17 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 และ 95%
- 2.18 กรดแลคติก (Purac)

3. เครื่องมือ

- 3.1 Autoclave (บริษัท HIRAYAMA รุ่น HICLAVE HVE-25)
- 3.2 Incubator (บริษัท Heraeus รุ่น UT 6420)
- 3.3 Hot air oven (บริษัท Memmert)
- 3.4 Laminar air flow carbinet (บริษัท Microflow รุ่น ABS 1200)
- 3.5 pH meter (บริษัท Mettler toledo)
- 3.6 Microwave (บริษัท LG รุ่น MS-1822C)
- 3.7 Micropipette (บริษัท eppendorf Research)
- 3.8 เครื่องชั่งชนิดอิเล็กทรอนิกส์ (บริษัท OHAVS รุ่น ARC 1)
- 3.9 กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท OLYMPUS รุ่น CH 30)
- 3.10 Vortex (บริษัท Vortex mixer รุ่น VM-300)
- 3.11 เครื่องแก้วอื่นๆ
- 3.12 เครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300)

4. วิธีการดำเนินงาน

4.1 ศึกษาปริมาณและชีวภาพของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขต พระโขนง, เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิและเขตมีนบุรี

สุ่มตรวจตัวอย่างเนื้อโคที่จำหน่ายในตลาดสดจำนวน 32 ตัวอย่างนำมาตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี standard conventional method (AOAC International ,1984) นำสายพันธุ์ที่พบมาก 3 สายพันธุ์มาศึกษาต่อไปในหัวข้อ 3.2.2

วิธีการทดลอง

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

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

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

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

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

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

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

- 1) เลี้ยงเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-24 ชม.
- 2) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 x g นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็น Supernatant fluidไว้
- 3) กรองผ่าน sterile filter ขนาด 0.2- μ m-pore-size เก็บที่ 5 องศาเซลเซียส

- 4) ตรวจสอบความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซินที่เชื้อผลิตโดยวิธี agar spot test

4.2.2 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซิน

- 1) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Listeria innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
- 2) ถ่ายเชื้อ *Listeria innocua* 10 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE (0.75% agar w/v) 5 มิลลิเมตรที่หลอมแล้ว
- 3) เทอาหาร TSAYE ที่ถ่ายเชื้อแล้วทับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ทิ้งไว้ในตู้เย็นอย่างน้อยประมาณ 10 นาทีให้ไม่มีหยดน้ำบนผิวหน้าอาหาร
- 4) นำแบคทีเรียโอซิน Pediocin ที่สกัดเตรียมไว้ในข้อ 3.2.2.1 มาทำการทดสอบความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซินที่ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตได้โดยทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 จากนั้นหยดสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3) บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลการเกิด clear zone นำค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่เกิด clear zone มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซินที่เชื้อผลิต โดยใช้หน่วย Activity Unit ต่อมิลลิเมตร (AU/ml)

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

ขั้นตอนการทดลอง

แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่สัมผัสสารเคมี)
- กลุ่มที่ 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml
- กลุ่มที่ 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์
- กลุ่มที่ 5. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml
- กลุ่มที่ 6. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีPediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

วิธีการทดลอง

1) เตรียมสารละลายเชื้อ *S. Senftenberg*, *S. Weltevreden* และ *S. Anatum* ให้มีความเข้มข้น 10^4 CFU/ml

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

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

4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นับจำนวนเชื้อ

6) นำโคโลนีที่นับได้จากอาหาร TSA และ XLD มาวิเคราะห์ปริมาณ injured cell จากสูตร

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

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

4.4.1 การเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโค

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

4.4.2 การวางแผนการทดลอง

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

โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A คือกลุ่มของสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค 6 กลุ่ม

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาที่ทำการศึกษา ได้แก่ วันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8

สารเคมีที่ใช้ในการสัมผัสสาร แบ่งเป็น 6 กลุ่มการทดลอง ได้แก่

กลุ่มที่ 1. เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (ไม่สัมผัสสารเคมี)

กลุ่มที่ 2. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ

Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 4. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5. สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ

Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

กลุ่มที่ 6. สัมผัส Pediocinความเข้มข้น 1,600 AU/ml

วิธีการทดลอง

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

2) แบ่งตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการเดิมเชื้อแล้วเป็น 6 กลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มที่ 2-6 นำมาสัมผัสกับสารเคมีที่ระบุไว้เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างทั้ง 6 กลุ่มมาบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติก PE เก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3) เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 นำตัวอย่างชิ้นเนื้อโคมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธีตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี spread plate บนอาหาร TSA และ XLD

4) นำตัวอย่างทั้ง 6 กลุ่มข้างต้น วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของชิ้นเนื้อในวันที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 ของการเก็บรักษาด้วยเครื่อง pH meter และนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่องเครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300)

5) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS analysis of variance)

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

เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อโค ขนาด $5 \times 5 \times 1$ ตารางเซนติเมตร แบ่งชิ้นเนื้อออกเป็น 6 กลุ่มการทดลองดังที่แสดงในหัวข้อ 4.2 นำชิ้นเนื้อสัมผัสสารละลายเป็นเวลานาน 5 นาที และผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 15 นาที นำชิ้นเนื้อบรรจุแบบสุญญากาศในถุงพลาสติก PE เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อตรวจหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในวันที่ 0, 2, 4, และ 8 ของการเก็บรักษา

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

เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ ขนาด 5 x 5 x 1 ตารางเซนติเมตร แบ่งชิ้นเนื้อออกเป็น 6 กลุ่ม การทดลอง โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อสัมผัสสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที และวางชิ้นเนื้อไว้นานประมาณ 30 นาที นำมาทดสอบประสาทสัมผัสทางด้าน สีและกลิ่นของเนื้อโคสด โดยใช้การทดสอบแบบ Different from control โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คนในการทดสอบใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD)

4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาปริมาณและซีโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง,เขตประเวศ,เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิ และเขตมีนบุรี

จากการสุ่มตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกที่จำหน่ายในตลาดสดในเขตบางกะปิ มีนบุรี พระโขนง อ่อนนุช ประเวศและลาดกระบัง 35 ตัวอย่างโดยทำการตรวจโดยวิธีมาตรฐานของการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอาหาร (standard conventional method) เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment โดยใช้ Tetrathionate (TT) broth และ Rapport-Vassiliadis (RV) medium กับขั้นตอน isolation โดยใช้ Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, Rambach agar และ Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) medium พบว่า ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (74.3%) เป็นการตรวจพบจากการใช้ TT เป็น selective enrichment บ่มที่ 43 °C จำนวน 19 ตัวอย่าง (73.1%) TT บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จำนวน 16 ตัวอย่าง (61.5%) และจากRV บ่มที่อุณหภูมิ 42 °C จำนวน 9 ตัวอย่าง (34.6%) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อวัวชำแหละจำหน่ายปลีก โดยวิธีมาตรฐานจากขั้นตอน selective enrichment

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

ตารางที่ 5 จำนวนเซโรวาร์ต่างๆ ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ตรวจพบจากเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

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

ผลการศึกษาปริมาณและเซโรวาร์ของเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคสดจากตลาดในเขตพระโขนง, เขตประเวศ, เขตลาดกระบัง, เขตบางกะปิ และเขตมีนบุรี โดยใช้วิธี standard conventional method ในการตรวจ โดยทำการสุ่มตรวจตัวอย่างเนื้อโค 35 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่าจากการศึกษาตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลา 26 ตัวอย่าง (74.3%) ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อนำซัลโมเนลลาทั้งหมด 26 ตัวอย่าง 109 หลอดทดสอบมาตรวจยืนยันซีโรวาร์จาก WHO *Salmonella-Shigella* center สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบเชื้อซัลโมเนลลาทั้งหมด 20 เซโรวาร์ โดยพบ *S. Senftenberg* มากที่สุด 21 หลอดตัวอย่าง (19.3%) รองลงมาคือ *S. Anatum* 17 หลอดตัวอย่าง (15.6%) และ *S. Weltevreden* 12 หลอดตัวอย่าง (11.0%) ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งผลในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโคนั้นใกล้เคียงกับในเนื้อหมู โดย อิศร เสวตวิวัฒน์ และคณะ (2548) ได้รายงานการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อหมูสดที่จำหน่ายในตลาด พบเชื้อซัลโมเนลลา 88.0% และพบเชื้อรวม 19 เซโรวาร์ โดยพบ *S. Anatum* เป็นซีโรวาร์ที่ตรวจพบมากที่สุด รองลงมาคือ *S. Rissen*, *S. Panama* และ *S. Stanley* ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อไก่สดและเนื้อหมูสดถึงร้อยละ 66 และ 90 ตามลำดับ (Jernklinchan *et al.*, 1994; Bangtrakulnonth *et al.*, 1994)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าในเนื้อโคสดที่จำหน่ายในท้องตลาดทั่วไปนั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้การปนเปื้อนอาจเกิดขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนในการฆ่า ผ่าซาก ชำแหละ ตัดแต่งของเนื้อสัตว์ (Florjanc *et al.*, 1992; Berends *et al.*, 1993; Berends *et al.*, 1995) โดยในขั้นตอนตั้งแต่สัตว์เข้าไปในโรงฆ่านั้นมีโอกาสที่เชื้อซัลโมเนลลาจะปนเปื้อนได้หลายทางด้วยกัน เริ่มจากการใช้น้ำร้อนลวกซากซึ่งในกระบวนการนี้จะสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ในระดับหนึ่ง (Chau *et al.*, 1977; Gill and Bryant, 1992) อย่างไรก็ตาม ถ้าอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ลวกซากต่ำกว่า 62 องศาเซลเซียส จะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะมีเชื้อจุลินทรีย์ส่วนหนึ่งยังคงมีชีวิตรอดและปนเปื้อนในกระบวนการต่อไป (Sorqvist and Danielsson-Tham, 1990) ในกระบวนการถนอมขนนั้นเป็นจุดที่จะเกิดการปนเปื้อนที่ต่อเนื่องจากกระบวนการลวกซาก (Simonsen *et al.*, 1987; Borch *et al.*, 1996) โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการถนอมขนนั้นจะรีดเอาอูจาระของสัตว์ออกมาจากบริเวณก้น ซึ่งจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอุปกรณ์ที่ใช้โดยเฉพาะเชื้อซัลโมเนลลา (Borch *et al.*, 1996) การใช้ความร้อนเพื่อลนให้ขนออกจากตัวสัตว์นั้น Gracey (1986) ได้รายงานว่าความร้อนที่อุณหภูมิ 1300-1500 องศาเซลเซียสจะลดการปนเปื้อนที่บริเวณผิวหนังของซากสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ในบริเวณอื่นๆ อาจยังมีชีวิตรอดอยู่ (Berends *et al.*, 1997; Gill, 1998) และอยู่รอดไปจนถึงขั้นตอนการขัด (Simonsen *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1999) ในกระบวนการตัดแต่งซาก มี 2 ขั้นตอนที่เป็นจุดที่มักก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ คือ การชำแหละ และการเอาเครื่องในออก (Gill and Jones, 1997) อย่างไรก็ตามขั้นตอนในการผ่าซากก็มักเป็นขั้นตอนที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน โดยเฉพาะ

เชื้อซัลโมเนลลาในซากสัตว์ (Sorensen *et al.*, 1999; Hald *et al.*, 2001) นอกจากนั้นอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ที่มีใช้ในโรงฆ่าสัตว์ รวมทั้งสุขอนามัยของผู้ฆ่าก็ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในซากสัตว์ด้วย (Hald *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1999)

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

2. ศึกษาการบดเจ็บของเชื้อ *S. Senftenberg*, *S. Anatum* และ *S. Weltevreden* จากการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

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

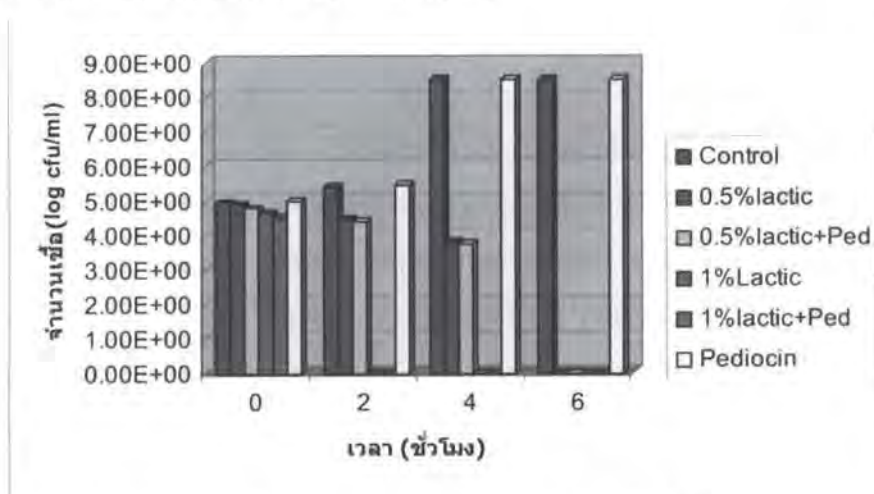
2.1 ผลของการใช้กรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella Weltevreden* ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

จากผลการทดลองในภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารละลายกรดและสาร Pediocin PA-1 จะมีปริมาณเชื้อ *S. Weltevreden* เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา และเมื่อมาพิจารณา TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% และสารละลายกรดแลกติก 1% ที่มีการเติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 จะพบว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่า โดยพบว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% นั้นจะสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 6 ของการศึกษา ในขณะที่ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 1% นั้นพบว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรด 0.5% โดยสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้อย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการศึกษา ส่วน TSB ที่เติมสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว นั้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ซึ่งจากภาพที่ 4 จะพบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงประมาณ 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

การใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดเพียงอย่างเดียวเพียงเล็กน้อย โดยดูจากผลการศึกษาในกลุ่มที่มีการเติมสารละลายกรดแลกติก 0.5 และ 1% จะเห็นว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดความเข้มข้นทั้งสองร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดเพียงอย่างเดียวตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษาและการใช้สารละลายกรดแลกติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S. Weltevreden* ได้มากที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษาและสามารถยับยั้งเชื้อได้สมบูรณ์ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษาเช่นเดียวกับการใช้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว

ผลการทดลองจากตารางที่ 6 จะแสดงให้เห็นถึงการใช้สารละลายกรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อ *S. Weltevreden* ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดทั้ง 0.5 และ 1% นั้นจะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเชื้อที่มากกว่าการใช้สารละลายกรดเพียงอย่างเดียวทั้งสองกลุ่ม โดยเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกที่เพิ่มมากขึ้นจะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์เซลล์บาดเจ็บเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเติม pediocin PA-1 เข้าไปก็จะทำให้พบเซลล์บาดเจ็บมากขึ้นกว่าการใช้สารละลายกรดเพียงอย่างเดียวเพียงเล็กน้อย การเกิดเซลล์บาดเจ็บจะมากขึ้นจนถึง 100% ซึ่งหมายความว่าตรวจไม่พบเชื้อ *S. Weltevreden* หรือเชื้อตายอย่างสมบูรณ์ในตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูง 1% ในเวลา 2 ชม. ส่วนตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก 0.5% จะเกิดเซลล์บาดเจ็บ 100% หรือเชื้อตายอย่างสมบูรณ์ในเวลา 6 ชม. ขณะที่ในกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว นั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ลดลงเรื่อยๆ และตรวจ

ไม่พบเซลล์บาดเจ็บ เนื่องจากเซลล์เจริญแข็งแรงสมบูรณ์ เมื่อบ่มเชื้อไว้นาน 4 ชม. ซึ่งผลที่ได้จะเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ตารางที่ 6 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

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

C คือ TSB ที่ไม่ผสมสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

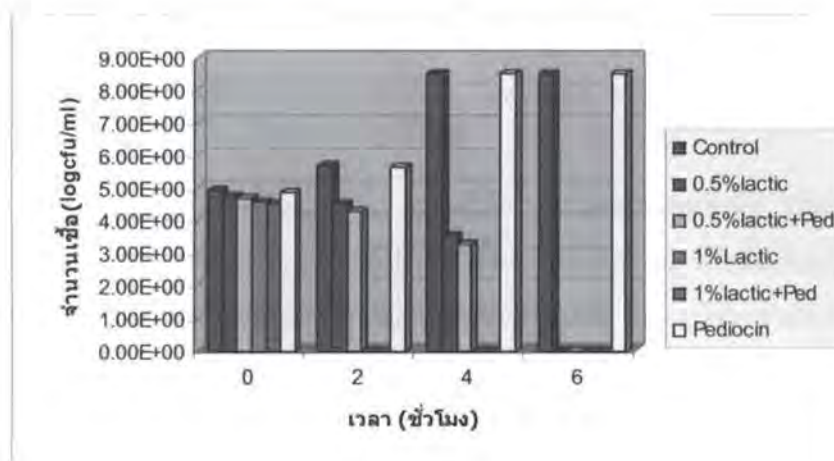
P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

2.2 ผลของการใช้กรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อการยับยั้งและการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Anatum ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ผลการทดลองในภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่า การใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับการใช้สารแบคทีริโอซินชนิด Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน โดยพิจารณาใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% และ 1% ที่เติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 พบว่าในทั้งสองกลุ่มการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ผลในการยับยั้งดีกว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา ส่วนกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวจะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อโดยจะมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา

ส่วนผลการทดลองในตารางที่ 7 นั้นให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในภาพที่ 5 และเช่นเดียวกับผลที่มีต่อเชื้อ *S. Weltevreden* คือการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์มากกว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกหรือการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาจาก TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติกทั้งสองกลุ่ม คือ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5 และ 1% จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% นั้นเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 57.0 63.8 และ 100 % ในชั่วโมงที่ 0 2 และ 4 ตามลำดับ ส่วนใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 นั้น เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 58.2 67.2 และ 100% ในชั่วโมงที่ 0 2 และ 4 ตามลำดับ ใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 1% นั้นเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จาก 73.1 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษา ส่วนใน TSB ที่มีการเติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วยนั้น การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 75.3 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษาเช่นกัน

ในกลุ่มควบคุมและ TSB ที่เติมสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวจะมีเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ลดลงเรื่อยๆตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาในเชื้อ *S. Weltevreden*



ภาพที่ 5 ผลของการใช้กรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Anatum* ในหลอดทดลอง (*In vitro test*)

ตารางที่ 7 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella Anatum* ในหลอดทดลอง (*In vitro test*)

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

C คือ TSB ที่ไม่ผสมสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

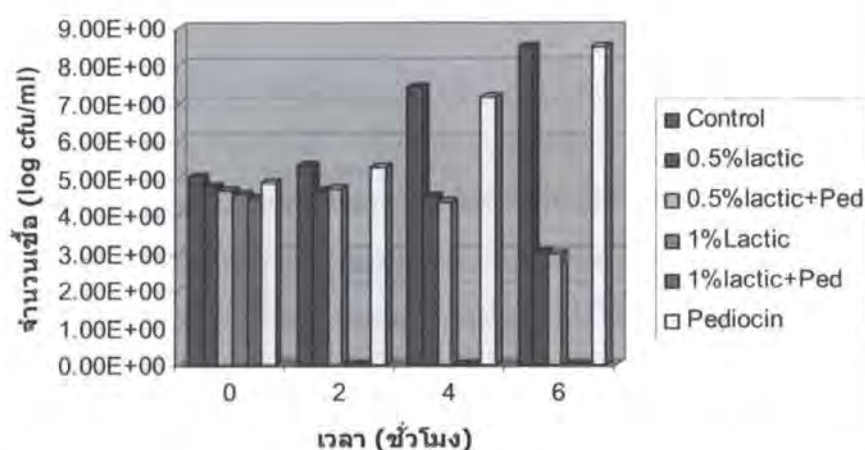
1% lac+Ped คือ TSB ที่สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%ร่วมกับ Pediocin PA-1

P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

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

จากผลการทดลองในภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมซึ่งคือ TSB ไม่มีการเติมสารละลายกรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีปริมาณเชื้อ *S. Senftenberg* เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษา และเมื่อมาพิจารณา TSB ที่มีการใช้สารละลายกรดแลกติก 0.5% และสารละลายกรดแลกติก 1% ที่มีการเติมและไม่เติมสาร Pediocin PA-1 จะพบว่า TSB ที่มีการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีกว่า โดยพบว่าใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% นั้นจะมีการลดลงของปริมาณเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 โดยลดลงจาก 4.8 log cfu/ml เหลือ 3.0 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 6 แต่ใน TSB ที่เติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วยจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีกว่า คือ ปริมาณของเชื้อจะลดลงจาก 4.6 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 0 เหลือเพียง 2.9 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 6 อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ใช้สารละลายกรดแลกติก 1% นั้นพบว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรด 0.5% โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *S. Senftenberg* ได้อย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงแรกของการศึกษา ส่วนกลุ่มที่เติมสารละลาย Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว นั้นพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ ซึ่งจากภาพที่ 6 จะพบว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงประมาณ 8 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 4 ของการศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 ต่อเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S. Senftenberg* ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 3 คือการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้ผลเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยพิจารณาเปรียบเทียบใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลกติก 0.5% เพียงอย่างเดียว พบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มจาก 45.5 83.8 94.2 และ 96.1% ในชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 6 ตามลำดับ แต่เมื่อมีการเติมสาร Pediocin PA-1 ร่วมด้วย พบว่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มจาก 49.2 89.2 96.5 และ 98.1% ในชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 6 ตามลำดับ และเช่นเดียวกับผลการยับยั้งเชื้อในภาพที่ 6 การใช้สารละลายกรดแลกติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะให้เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ดีที่สุดคือ เปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์จะเพิ่มจาก 55.3 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 100% ในชั่วโมงที่ 2 ของการศึกษา ซึ่งจากการศึกษานี้ พอสรุปได้ว่า เชื้อ *S. Senftenberg* เป็นสายพันธุ์ที่ทนความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ 0.5% ได้ดีกว่าเชื้อ *S. Weltevreden* และ *S. Anatum* ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ 1% สามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ภายใน 2 ชม. ทั้งสามสายพันธุ์ ไม่ว่าจะผสม pediocin PA-1 หรือไม่ก็ตาม



ภาพที่ 6 ผลของการใช้กรดแลคติกร่วมกับแบคทีเรียโอสินPediocin PA - 1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ตารางที่ 8 ผลของการใช้กรดแลคติกและสารPediocin PA-1 ต่อการบาดเจ็บของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในหลอดทดลอง (*In vitro* test)

ระยะเวลา การเก็บ (ชม.)	ค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์					P
	C	0.5% lactic	0.5% lac+Ped	1% lactic	1% lac+Ped	
0	30.3	45.5	49.2	50.2	55.3	4.8
2	26.8	83.8	89.2	100.0	100.0	50.3
4	0	94.2	96.1	100.0	100.0	49.3
6	0	96.5	98.1	100.0	100.0	0

C คือ TSB ที่ไม่ผสมสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือ TSB ที่ผสมสารละลาย Pediocin PA-1

จากการทดลองในหัวข้อที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 นั้นสรุปได้ว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% และ สาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ และเพิ่มเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อ *S. Weltevreden*, *S. Anatum* และ *S. Senftenberg* ได้ดีที่สุดเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างนี้สามารถยับยั้งเชื้อและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการทดลองในทั้งสามหัวข้อจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่ผลของการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองสรุปได้ว่าการใช้สารละลายกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด รองลงมา คือ *S. Weltevreden* และ *S. Senftenberg* ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาในการศึกษาของเชื้อ *S. Anatum* (ในหัวข้อ 2.2) พบว่า ในช่วงเวลาที่ 4 ของการศึกษามีการลดปริมาณเชื้อ *S. Anatum* เหลือเพียง 3.5 และ 3.2 log cfu/ml ใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ตามลำดับ และก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์อย่างสมบูรณ์ใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติกและ TSB ที่ผสมสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ส่วน *S. Weltevreden* (ในหัวข้อที่ 2.1) นั้น ในช่วงเวลาที่ 4 ของการศึกษานั้นยังคงมีปริมาณเชื้อเหลืออยู่ 3.8 และ 3.7 log cfu/ml ใน TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ตามลำดับของเชื้อ *S. Weltevreden* แต่ในเชื้อ *S. Weltevreden* นี้พบว่าในทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างจะพบค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เพียง 51.2 และ 71.0 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า *S. Weltevreden* เป็นเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ที่มีความทนต่อความเป็นกรดมากที่สุด ในทั้ง 3 สายพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับในเชื้อ *S. Senftenberg* (ในหัวข้อที่ 2.3) พบว่าปริมาณเชื้อยังสามารถตรวจพบถึงช่วงเวลาที่ 6 ของการศึกษาในทั้งสองกลุ่มการทดลอง คือ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้น คือ 3.0 และ 2.8 log cfu/ml แต่การบาดเจ็บของเซลล์จะเกิดอย่างสมบูรณ์ในทุกกลุ่มตัวอย่างที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% และ TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จึงสรุปได้ว่า *S. Senftenberg* เป็นเชื้อซัลโมเนลลาสายพันธุ์ที่มีความทนต่อความเป็นกรดมากที่สุด ในทั้ง 3 สายพันธุ์

ทั้งนี้จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 จะเห็นได้ว่าการใช้สารผสมของสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในทั้ง TSB ที่ใช้ความเข้มข้นกรดแลคติก 0.5 % และ 1% จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ได้ดีกว่าเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงตัวเดียว โดยการทำลายเชื้อส่วนใหญ่และการบาดเจ็บของเซลล์มีผลมาจากกรดแลคติกที่เติมลงใน TSB จากนั้น Pediocin PA-1 จะเป็นตัวเสริมทำให้เซลล์บาดเจ็บตายลงเร็วขึ้น ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของ Pediocin PA-1 ที่มีอยู่ ถ้ามีปริมาณมากก็จะทำให้เซลล์บาดเจ็บตายมากกว่า Pediocin

PA-1 ที่มีปริมาณน้อย ซึ่งการศึกษาสอดคล้องกับ Stevens และคณะ (1991) ซึ่งได้กล่าวอ้างว่าประสิทธิภาพของสาร nisin เพียงอย่างเดียว โดยไม่ใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบ เช่น *E. coli* 0157:H7 และ *Salmonella* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yasmina และคณะ (2002) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับกรดแลคติก จะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จำพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต total coliforms และ *E. coli* ในเนื้อโคสดได้ดีกว่าการใช้สาร nisin หรือกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ Mustapha และคณะ (2002) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับสารละลายกรดชนิดต่างๆจะสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในเนื้อโคได้ดีกว่าการใช้สาร nisin หรือสารละลายกรดเพียงอย่างเดียว โดยการใช้สารผสมระหว่างสาร nisin ร่วมกับสารละลายกรดนั้นสามารถลดเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อโคเหลือประมาณ $2-3 \log \text{ cfu/cm}^2$ โดยใช้เชื้อเริ่มต้น $7 \log \text{ cfu/cm}^2$ ทำการทดลอง 28 วัน เก็บรักษาเนื้อโคที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อในกลุ่ม *Pediococcus* จะจัดอยู่ใน class IIa ซึ่งจะให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก และมักไม่ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะมีส่วนของ outer membrane ซึ่งมีส่วนประกอบที่เรียกว่า porine ซึ่งเป็นส่วนที่สารที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 600 Da ผ่านเข้าไปได้ แต่แบคทีริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria โดยทั่วไปจะมีน้ำหนักประมาณ 3 Kda ซึ่งใหญ่เกินกว่าที่จะผ่านเข้าไปในส่วนของ porine (Klaenhammer, 1993) จึงทำให้สาร Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งจัดเป็น lactic acid bacteria ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ ดังผลการทดลองข้างต้นจะพบว่าในทั้ง 3 สายพันธุ์ของเชื้อซัลโมเนลลากลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว นั้นไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้นำสารละลายกรดแลคติกมาใช้ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลา เนื่องจากสารละลายกรดที่ใช้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วน outer membrane ของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลา ทำให้ส่วน outer membrane ถูกทำลายเกิดรูรั่วทำให้สาร Pediocin PA-1 สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาได้และทำให้เกิดการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นสูงกว่า จะสามารถยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีกว่า โดยจากการทดลอง TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อและเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์ที่ดี กว่า TSB ที่เติมสารละลายกรดแลคติก 0.5% ทั้งนี้เนื่องจากผลของระดับ pH ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการลดจำนวนจุลินทรีย์

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

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

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

ผลการศึกษานับเชื้อ *S. Anatum* ในกลุ่มตัวอย่างเนื้อโค ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษา จากผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่า เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วน เนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นพบว่าการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

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

ตารางที่ 9 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Anatum ในเนื้อโคแช่หั่นและจำหน่ายปลีกที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา การเก็บ (วัน)	จำนวนเชื้อ <i>S. Anatum</i> (log cfu/g)			
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lac+Ped
0	5.3 ^{Ba}	5.1 ^{ABa}	5.0 ^{ABa}	5.0 ^{Aa}
2	5.2 ^{Ba}	4.9 ^{ABa}	4.8 ^{ABa}	4.5 ^{Aa}
4	5.1 ^{Ba}	4.9 ^{ABa}	4.7 ^{ABa}	4.5 ^{Aa}
6	5.2 ^{Ba}	4.7 ^{ABa}	4.6 ^{ABa}	3.1 ^{Aa}
8	5.2 ^{Bb}	3.2 ^{ABb}	3.1 ^{ABb}	1.6 ^{Ab}
				5.2 ^{Ba}
				5.5 ^{Ba}
				5.5 ^{Ba}
				5.2 ^{Ba}
				5.2 ^{Bb}

ตัวอักษร A-C แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

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

จำนวนเชื้อ *S. Senftenberg* ในตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าสารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถลดจำนวนจำนวนเชื้อ *S. Senftenberg* ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษาจากผลการทดลองในตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Senftenberg* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นพบว่าการลดลงของเชื้อใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม จำนวนเชื้อ *S. Senftenberg* ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1 , เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1 มีจำนวนเชื้อลดลงเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการศึกษา (ชั่วโมงที่ 0) และพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 0.5 1.8 3.2 และ 3.3 log cfu/g ตามลำดับในวันที่ 8 ของการเก็บรักษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 10 ผลของการลดเล็ดตกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Senftenberg ในเนื้อโคที่ฆ่าและจะจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา การเก็บ (วัน)	จำนวนเชื้อ <i>S. Senftenberg</i> (log cfu/g)				P
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped
0	5.3 ^{1a}	5.3 ^{1a}	4.9 ^{1a}	4.8 ^{1a}	4.7 ^{1a}
2	5.3 ^{1a}	4.9 ^{1a}	4.8 ^{1a}	4.8 ^{1a}	4.7 ^{1a}
4	5.3 ^{1a}	4.8 ^{1a}	4.7 ^{1a}	4.6 ^{1a}	4.5 ^{1a}
6	5.3 ^{1a}	4.7 ^{1a}	4.7 ^{1a}	4.4 ^{1a}	3.7 ^{1a}
8	5.3 ^{1b}	4.8 ^{1b}	3.1 ^{1b}	1.6 ^{1b}	1.5 ^{1b}

ตัวอักษร ก-ค และแสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

3.3 ผลของการใช้กรดแลคติกและ Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าว ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโค

จำนวนเชื้อ *S. Weltevreden* ในตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าสารละลายกรดแลคติกและสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะสามารถลดจำนวนจำนวนเชื้อ *S. Weltevreden* ลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในวันที่ 8 ของการศึกษา จากผลการทดลองในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Weltevreden* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 %, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% และสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ตามลำดับ ส่วนเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้น ไม่พบว่ามีผลลดลงของเชื้อเท่ากับกลุ่มควบคุม

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

ตารางที่ 11 ผลของการลดเล็ดตกและ Pediocin PA-1 ต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Weltevreden ในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีกเก็บที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา การเก็บ (วัน)	จำนวนเชื้อ <i>S. Weltevreden</i> (log cfu/g)					P
	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	
0	5.1 ^{na}	5.0 ^{na}	5.0 ^{na}	4.8 ^{na}	4.8 ^{na}	5.3 ^{na}
2	5.3 ^{nb}	4.6 ^{nb}	4.7 ^{nb}	4.6 ^{nb}	4.6 ^{nb}	5.3 ^{nb}
4	5.3 ^{nab}	4.8 ^{nab}	4.8 ^{nab}	4.6 ^{nab}	4.6 ^{nab}	5.4 ^{nab}
6	5.3 ^{nb}	4.7 ^{nb}	4.6 ^{nb}	4.6 ^{nb}	4.6 ^{nb}	5.3 ^{nb}
8	5.3 ^{nc}	4.6 ^{nc}	4.5 ^{nc}	4.5 ^{nc}	4.4 ^{nc}	5.3 ^{nc}

ตัวอักษร ก-ค แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a - c แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือกลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.1, 3.2 และ 3.3 ผลที่ได้พบว่าไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองในหัวข้อ 2.2 คือ เนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ คือ *S. Weltevreden*, *S. Anatum* และ *S. Senftenberg* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด และสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. Anatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมา คือ *S. Senftenberg* และ *S. Weltevreden* ตามลำดับ (ซึ่งการทดลองในหัวข้อ 2.2 *S. Senftenberg* จะทนกรดแลกติกที่ 0.5% ได้ดีที่สุด) โดยในวันที่ 8 ของการศึกษานั้นเนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ของเชื้อ *S. Anatum* จะสามารถลดปริมาณเชื้อได้ถึง 3.4 log reduction ส่วน *S. senftenberg* และ *S. Weltevreden* นั้นในตัวอย่างเนื้อโคเดียวกันนี้จะสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 3.2 และ 0.4 log reduction ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาในหัวข้อ 2.2 เช่นกัน คือ เชื้อ *S. Anatum* ก็เป็นสายพันธุ์ที่มีความทนต่อกรดน้อยที่สุด นอกจากนั้นจากการศึกษายังพบอีกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติก Pediocin PA-1 นั้นจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลา ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลกติก หรือการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงสารเดียวในทุกกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสารละลายกรด แลกติกทั้ง 0.5 และ 1% และการใช้สาร Pediocin PA-1 เพียงสารเดียวนั้นพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ (ตารางที่ 4, 5 และ 6) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Zhang และ Mustapha (1999) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้สาร nisin ร่วมกับสารจำพวก metal chelators เช่น EDTA จะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก เนื่องจาก EDTA จะก่อให้เกิดความเสียหายกับส่วน outer membrane ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนั้นจะทำให้สาร nisin ซึ่งปกติมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะ ผ่านเข้าไปในส่วนของ outer membrane ของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ สามารถเข้าสู่เซลล์และก่อให้เกิดการทำลายเซลล์เชื้อได้ (Abce *et al.*, 1995) นอกจากนั้นขึ้น และ ประภาพร ขอไพบุลย์และคณะ (2548) ได้รายงานว่าการใช้ กรดแอสคอร์บิก 1% ร่วมกับการตกตะกอน นิค 1.5% จะสามารถลดจำนวนเชื้อ *S. Derby* ได้ 0.67 log cycle และควบคุมการเจริญของเชื้อได้ 5 วัน และได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ Pediocin เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์เนื้อสด ซึ่งพบว่า การใช้ Pediocin ใน ผลิตภัณฑ์เนื้อสดจะให้ผลดีกว่าการใช้สาร nisin ทั้งๆที่ สาร nisin น่าจะให้ ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อสดโดยทั่วไปได้ดีกว่า เนื่องมาจาก nisin จะถูก inactivated ด้วยสาร glutathione ในปฏิกิริยา glutathione S-transferase ซึ่งโดยทั่วไป glutathione มักจะพบในเนื้อสด และปฏิกิริยาดังกล่าวนี้อาจลดประสิทธิภาพของ nisin นอกจากนั้น ยังมีรายงานว่า nisin จะมีประสิทธิภาพต่ำในผลิตภัณฑ์เนื้อสดเนื่องจากค่า pH ที่สูง และ สารประกอบบางชนิดที่อยู่ในเนื้อ เช่น phospholipids, fat content เป็นต้น (Rayman *et al.*, 1983; De Vuyst and Vandamme, 1994; Davies *et al.*, 1999) Swetwathana และ คณะ (2002) ได้ รายงานว่าการใช้ Pediocin PA-1 ซึ่งผลิตมาจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้ำเชื้อใน

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

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

จากผลการทดลองในตารางที่ 12 ค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยค่า pH จะเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ตั้งแต่วันที่ 2 ของการศึกษา

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เริ่มการทดลอง (วันที่ 0) และลดลงเรื่อยๆ และพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีการลดลงของค่า pH มากที่สุด โดยมีค่า pH ต่ำสุด คือ 4.9 ในวันที่ 8 ของการทดลอง รองลงมา คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรด แลคติก 0.5 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % โดยมีการลดลงของค่า pH 0.23 0.17 0.15 และ 0.09 ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 8 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุมนั้นพบว่าค่า pH จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตั้งแต่เริ่มการศึกษา (วันที่ 0)

จากผลการทดลองในตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าค่า pH ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกและเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้นจะลดลงในแนวทางที่สอดคล้องกับการลดลงของเชื้อซัลโมเนลลาในหัวข้อที่ 2 และ 3 เนื่องจากค่า pH ที่ลดต่ำลงจะมีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ โดยความเป็นกรดที่มากขึ้นจะสามารถยับยั้งเชื้อและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อของกรดก็ขึ้นกับระดับ pH ความสามารถในการแตกตัว (pK_a) และความจำเพาะเจาะจงของกรดในการทำลายจุลินทรีย์ (Gill and Newton, 1982) ส่วนกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสสารละลายPediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวพบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลา

ตารางที่ 12 ผลของการดัดแปรและ Pediocin PA-1 ต่อค่า pH ในเนื้อโคที่แช่และจำหน่ายปลีกที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา		ค่า pH ของเนื้อโค				
การเก็บ (วัน)	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	5.54 ^{la}	5.39 ^{la}	5.38 ^{la}	5.23 ^{la}	5.18 ^{la}	5.47 ^{la}
2	5.51 ^{nb}	5.36 ^{nb}	5.35 ^{nb}	5.20 ^{nb}	5.15 ^{nb}	5.54 ^{nb}
4	5.53 ^{nb}	5.35 ^{nb}	5.33 ^{nb}	5.18 ^{nb}	5.10 ^{nb}	5.60 ^{nb}
6	5.54 ^{nb}	5.32 ^{nb}	5.28 ^{nb}	5.10 ^{nb}	5.06 ^{nb}	5.56 ^{nb}
8	5.55 ^{nb}	5.30 ^{nb}	5.23 ^{nb}	5.06 ^{nb}	4.95 ^{nb}	5.63 ^{nb}

ตัวอักษร ก-ง แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านการผสมผสานเคมีที่สัมพันธ์กับเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่ผสมผสานละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่ผสมผสานละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่ผสมผสานละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือ กลุ่มเนื้อโคที่ผสมผสานละลายPediocinPA-1

จากผลการศึกษาค่า pH ในกลุ่มตัวอย่างที่สัมผัสสารละลายต่างๆ ทั้ง 6 กลุ่ม ผลที่ได้พบว่า เนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลกติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำที่สุด ในทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง โดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.9-5.2 ตั้งแต่เริ่มจนถึงสิ้นสุดการศึกษา (วันที่ 0 – วันที่ 8) รองลงมาคือเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 1% เนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลกติก 0.5 % และสาร Pediocin PA-1 เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 0.5 % เนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุม โดยผลของค่า pH ที่ได้จากการศึกษาจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ และค่าเปอร์เซ็นต์การบาดเจ็บของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ในหลอดทดลอง (หัวข้อ 2) และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาทั้งสามสายพันธุ์ในตัวอย่างเนื้อโคสด (หัวข้อ 3) โดยในตัวอย่างที่มีค่า pH ต่ำที่สุดซึ่งก็คือเนื้อโคที่สัมผัสกับสารละลายผสมของกรดแลกติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาได้ดีที่สุด และเนื้อโคที่มีค่า pH สูง คือ กลุ่มที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 และกลุ่มควบคุม จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่ต่ำ

เมื่อพิจารณาค่า pH ในเนื้อโคที่ทำการศึกษาจะพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 จะมีค่า pH ต่ำกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก หรือเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 เพียงสารเดียวทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ทั้งกรดแลกติกและสาร Pediocin PA-1 ต่างก็มีความเป็นกรด จึงมีผลให้ค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคลดต่ำลงมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samelis และคณะ (2001) ที่ทำการทดลองโดยใช้กรดอะซิติกร่วมกับสารแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus sake* ในการลดปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อสด พบว่าการใช้กรดอะซิติกร่วมกับแบคทีริโอซินในระดับสูงขึ้นส่งผลให้การลดลงของค่า pH ในตัวอย่างสูงขึ้น

5. ผลของการใช้กรดแลกติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อค่าความสว่างของสี (L^*)ของเนื้อโค

ผลการศึกษาค่าความสว่างของสี (L^*) โดยใช้เครื่องวัดสี (Minolta Chromameter CR-300) ในตัวอย่าง เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกและสารPediocin PA-1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 วัน ดังแสดงในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าในเนื้อโคแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin นั้นจะมีค่าความสว่างของสี(L^*) แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาที่แสดงในตารางที่ 13 นั้น ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้นจะให้ค่าความสว่างของสี (L^*) มากที่สุด คือ 50.46 รองลงมา คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 1% เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 0.5% ร่วมกับสารPediocin PA-1 เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติก 0.5 % และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 โดยมีค่าความสว่างของสี (L^*) เท่ากับ 49.78 48.55 46.66 และ 45.98 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมนั้นจะมีค่าความสว่างของสีน้อยที่สุด คือ 45.41

ตารางที่ 13 ผลของกรดแลกติกและ Pediocin PA-1 ต่อค่าสี (L*) ในเนื้อโคขุนและจำหน่ายปลีกที่ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา การเก็บ (วัน)	ค่าความสว่างของสี (L*) ของเนื้อโค				P
	C	0.5% lactic	0.5% lac+Ped	1% lactic	1% lac+Ped
0	44.43 ^{na}	45.03 ^{ab}	45.46 ^{na}	46.33 ^{ab}	47.43 ^{na}
2	44.69 ^{ab}	45.63 ^{ab}	45.14 ^{ab}	47.48 ^{ab}	47.32 ^{ab}
4	44.10 ^{na}	45.71 ^{ab}	47.32 ^{na}	48.48 ^{ab}	48.65 ^{na}
6	45.06 ^{ab}	45.37 ^{ab}	47.38 ^{ab}	48.62 ^{ab}	50.06 ^{ab}
8	45.41 ^{na}	46.66 ^{ab}	48.55 ^{na}	49.78 ^{ab}	50.46 ^{na}

ตัวอักษร ก-ค แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a,b แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลกติกความเข้มข้น 1%

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

P คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลาย Pediocin PA-1

ผลการศึกษาอิทธิพลของสารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อค่าความสว่าง (L^*) ของสีเนื้อโคนั้น พบว่าค่าความสว่างของสีเนื้อโคจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกรดเพิ่มมากขึ้นหรือเมื่อค่า pH ของตัวอย่างเนื้อโคนั้นต่ำลง ซึ่งจากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 13 จะแสดงให้เห็นว่าในเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมของสารละลายกรดแลคติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 นั้นจะมีค่าความสว่างของสี (L^*) สูงที่สุด ซึ่งจะสัมพันธ์กับผลในหัวข้อ 4 คือในเนื้อโคนี้จะมีค่า pH ต่ำที่สุดเนื่องมาจากการที่ใช้สารละลายผสมของสารทั้งสองจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่ำลงในตัวอย่างเนื้อโคต่ำลง และจากผลการศึกษาจะพบอีกว่าค่าความสว่างของสีเนื้อโค (L^*) จะเพิ่มสูงขึ้นตลอดการศึกษาในทุกกลุ่มตัวอย่างซึ่งผลที่ได้จะสอดคล้องกับ Kotula และ Thelappurath (1994) ซึ่งได้รายงานไว้ในตัวอย่างเนื้อโคสดที่มีค่า pH ต่ำจะพบว่ามีค่าความสว่างของสีเนื้อ (L^*) สูง และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Jimenez-Villarreal และคณะ (2003) ที่พบว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 2 % ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อโคสดพบว่าสารละลายกรดแลคติกจะทำให้ตัวอย่างเนื้อโคมีสีซีดลง (ค่า L^* สูงขึ้น) และ Jimenez-Villarreal และคณะ ยังพบอีกว่าค่า pH จะสัมพันธ์กับค่าความสว่างของสี (L^*) oxymyoglobin content และค่า (a^*) Desmond และ Troy (2001) ได้ทำการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างไส้กรอกแฟรงเฟอर्टอร์ที่สัมผัสกับสารละลายกรดแลคติก 0.05 mol/L ผลที่ได้พบว่าตัวอย่างไส้กรอกจะมีสีซีดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่ง Bayles และคณะ (1996) ได้ให้เหตุผลว่าเมื่อค่า pH ของเนื้อลดต่ำลงจะมีผลทำให้โปรตีนที่อยู่ในกล้ามเนื้อเกิดการเสื่อมสภาพทำให้เนื้อไม่สามารถเก็บกักน้ำเอาไว้ได้ ทำให้เนื้อมีน้ำซึมออกมาที่ผิวหน้าเนื้อมาก ทำให้ค่าความสว่างของสีเนื้อ นอกจากนี้ Arganosa และ Marriott (1989) ได้ให้เหตุผลที่เมื่อตัวอย่างเนื้อสัตว์ที่สัมผัสสารละลายกรดแล้วจะมีสีซีดลงเนื่องจาก สารละลายกรดจะเร่งให้เกิดการเปลี่ยนจากไมโอโกลบินเป็นเมทไมโอโกลบินซึ่งจะทำให้เนื้อมีสีซีดลง

6. ผลของกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคขุนและจำหน่ายปลีก

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

จากผลการทดลองที่แสดงในตาราง 14 พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคมากที่สุด คือ 0.6 ตั้งแต่เริ่มการศึกษา (วันที่ 0) รองลงมาคือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโค 0.6 0.3 และ 0.3 ตามลำดับ และค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามวันในการเก็บรักษา โดยพบว่าในวันที่ 8 ของการเก็บรักษานั้นเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย น้ำหนักของเนื้อโคเพิ่มขึ้นเป็น 2.1 ส่วนในกลุ่มเนื้อโคอื่นๆ ก็มีการเพิ่มการสูญเสีย น้ำหนักเช่นเดียวกัน คือ 1.8 1.4 และ 0.9 ในเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5 % ตาม ลำดับ ส่วนในเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin PA-1 นั้นค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย น้ำหนักของเนื้อโคนั้นใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 14 ค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียโปรตีนของตัวอย่างเนื้อโคที่ผ่านการจุ่มสารละลายในกลุ่ต่างๆ ภายหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา		เปอร์เซ็นต์การสูญเสียไขมันของตัวอย่างเนื้อโค				
การเก็บ (วัน)	C	0.5% lactic	0.5%lac+Ped	1%lactic	1%lac+Ped	P
0	0.1 ^{na}	0.3 ^{nb}	0.3 ^{nb}	0.6 ^{nb}	0.6 ^{nb}	0.1 ^{na}
2	0.1 ^{na}	0.4 ^{nb}	0.5 ^{nb}	0.6 ^{nb}	0.7 ^{nb}	0.2 ^{na}
4	0.1 ^{nb}	0.5 ^{nb}	0.9 ^{nb}	0.7 ^{nb}	0.9 ^{nb}	0.2 ^{nb}
6	0.2 ^{nb}	0.6 ^{nb}	1.0 ^{nb}	1.6 ^{nb}	1.7 ^{nb}	0.2 ^{nb}
8	0.2 ^{nc}	0.9 ^{nc}	1.4 ^{nc}	1.8 ^{nc}	2.1 ^{nc}	0.2 ^{nc}

ตัวอักษร ก-ค แสดงความแตกต่างทางสถิติทางด้านกลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค และ a - c แสดงความแตกต่างทางสถิติทางระยะเวลาในการเก็บรักษา

C คือ กลุ่มเนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)

0.5% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%

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

1% lactic คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%

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

P คือ กลุ่มเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

ผลของการใช้สารละลายกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโค ผลที่ได้พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมของสารละลายกรดแลคติก 1% และสาร Pediocin PA-1 จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักกรดแลคติกมากกว่ากลุ่มตัวอย่างอื่นๆ คือ 2.1 ในวันที่ 8 ของการศึกษา เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างนี้มีค่า pH ต่ำกว่าทุกกลุ่มเนื้อโค ซึ่งการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคขึ้นกับค่า pH ของสารละลาย โดยสารละลายที่มีค่า pH ต่ำจะทำให้ค่า pH ภายในเซลล์กล้ามเนื้อลดลงใกล้เคียงกับค่าไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อเสียสภาพ และเป็นผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อในส่วนไมโอไฟบริลเกิดการหดตัว เป็นเหตุให้เนื้อสัตว์อุ้มน้ำได้น้อยลงเกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น (Arganosa และ Marriot, 1989) และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเนื้อโค ที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดแลคติกและสาร Pediocin PA-1 กับเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดเพียงอย่างเดียวจะพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมจะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากค่า pH ที่ต่ำกว่า และความเข้มข้นของกรดที่สูงกว่า ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Mendonca และคณะ (1989) ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายผสมระหว่างกรดอะซิติก 3 % และโซเดียมกลูไนด์ 1.5 % สารละลายผสมระหว่างกรดแลคติก 3 % และเกลือโซเดียมแอสคอร์เบต 3 % จะมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสูงกว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 3 % เพียงสารเดียว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ประภาพร ขอไพบุลย์ และคณะ (2548) พบว่าการใช้สารผสมของสารโปแตสเซียมซอร์เบต 5% และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต 8 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Derby* โดยที่มีการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อน้อยที่สุดและไม่ทำให้เนื้อเกิดสีซีด ดังนั้นการใช้สารอื่นๆร่วมกับกรดแลคติกหรือสาร Pediocin PA-1 ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาโดยที่ไม่ทำให้เนื้อเกิดการสูญเสียน้ำหนักและสีซีดจึงเป็นอีกแนวทางที่ควรทำการศึกษาต่อไป

7. ผลของการใช้กรดแลคติกและPediocin PA-1จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค

ผลทางคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโคทั้ง 5 กลุ่ม คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5%, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.5% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 %, เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 และเนื้อโคที่สัมผัสสาร Pediocin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้ผู้ทดสอบ 30 คนและใช้วิธี different from control ในการทดสอบ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าในแต่ละกลุ่มตัวอย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยผลจากตารางที่ 15 พบว่าเนื้อโคทุกกลุ่มจะมีความแตกต่างในด้านสีของเนื้อ และกลิ่นกรดแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสสารเคมีใดๆเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 15 ผลของกรดแลคติกและ Pediocin PA-1 ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นในเนื้อโคชำแหละจำหน่ายปลีก

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

ตัวอักษร ก-ขแสดงความแตกต่างทางสถิติทางค่ากลุ่มสารเคมีที่สัมผัสเนื้อโค

C	คือ เนื้อโคที่ไม่สัมผัสสารละลาย (กลุ่มควบคุม)
0.5% lactic	คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%
0.5% lac+Ped	คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5% ร่วมกับ Pediocin PA-1
1% lactic	คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1%
1% lac+Ped	คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้น 1% ร่วมกับ Pediocin PA-1
P	คือ เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายPediocinPA-1

ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโคโดยใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 30 คน ใช้วิธี Different from control ในการทดสอบพบว่าผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างทางด้านสีและกลิ่นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเนื่องมาจากเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกที่ใช้ในการศึกษา คือ 0.5 และ 1 % นั้นเป็นความเข้มข้นกรดที่ไม่สูงมากนัก ดังนั้นในเนื้อโคแต่ละกลุ่มจึงพบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และในเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมระหว่างกรดแลกติก 1 % และสาร Pediocin PA-1 นั้นจะพบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมมากที่สุด คือตัวอย่างเนื้อที่มีสีซีดและมีกลิ่นกรดมากที่สุด เนื่องจากสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดสูงไปทำลายโปรตีนในกล้ามเนื้อ ทำให้สีของเนื้อซีดลง ผลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Jimenez-Villareal และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโคสด โดยนำตัวอย่างเนื้อโคสัมผัสสารละลายกรดแลกติก 2 % พบว่าผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างโดยรวมทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมได้

สรุปผลการทดลอง

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

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

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

4. จากการศึกษพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ความเข้มข้น 1,600 AU/ml นี้มีค่า pH ต่ำที่สุดจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด และมีค่าความสว่างของสี (L^*) มากที่สุด เนื้อในกลุ่มนี้จึงดูมีสีสดมากที่สุดเนื่องมาจากการที่ค่า pH ลดต่ำลงมากเท่าไรก็จะส่งผลให้เนื้อมีสีสดเนื่องจากความเป็นกรดที่เกิดจากค่า pH ที่ต่ำจะส่งผลให้กล้ามเนื้อของเนื้อโคเกิดการเสื่อมสภาพ ไม่สามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ จึงทำให้มีน้ำซึมออกมาบริเวณผิวหนังเนื้อมากเนื้อโคจึงดูมีสีสด

5. การศึกษาผลของกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวต่อการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาต่อเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักในเนื้อโค พบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 % ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 จะมีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อ

โคสูงที่สุด เนื่องจากการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อโคนั้นเกี่ยวข้องกับค่า pH โดยค่า pH ที่ต่ำจะทำให้ค่า pH ในเนื้อโคต่ำลงจนใกล้จุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point) ทำให้กล้ามเนื้อทำให้โปรตีนในกล้ามเนื้อเสียสภาพ และเป็นผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อในส่วนไมโอไฟบริลเกิดการหดตัว เป็นเหตุให้เนื้อสัตว์อุ้มน้ำได้น้อยลงเกิดการสูญเสีย น้ำมากขึ้น

6. ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเนื้อโคโดยวิธี Different from control โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน ทดสอบทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อโค พบว่าผู้ชิมไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเนื้อโคที่สัมผัสกรดแลคติก สาร Pediocin PA-1 และสารผสมของสารละลายดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้สาร Pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับสารละลายกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อโคที่ดีกว่าการใช้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำสาร Pediocin PA-1 มาประยุกต์ใช้ในเนื้อสัตว์จึงเป็นอีกแนวทางที่น่าจะทำการศึกษาค่อยไปทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียแม้จะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แต่ก็มีความไวต่อสารเคมีต่างกันเช่นในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อซัลโมเนลลาแต่ละซีโรวาร์จะมีความไวต่อสารละลายกรดและสาร Pediocin PA-1 ต่างกัน ดังนั้นในการทำการวิจัยครั้งต่อไปนั้นจะทำการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดควรทำการศึกษาถึงความไว (sensitive) ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ ต่อสารที่จะใช้ยับยั้งเพื่อประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนในเนื้อโคในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *S. Senftenberg* *S. Anatum* และ *S. Weltevreden* เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าแยกได้จากมนุษย์ ดังนั้นการปนเปื้อนจึงอาจมาจากผู้ขายเนื้อจึงควรมีการให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยที่ถูกต้องแก่ผู้ขายเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในเนื้อโค

การใช้กรดแลคติก 1% ร่วมกับสาร Pediocin PA-1 นั้นจะให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* *S. Senftenberg* และ *S. Weltevreden* ในเนื้อโคได้ดีที่สุดแต่สารละลายกลุ่มนี้ก็จะทำให้เนื้อโคมีสีซีด และมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่ากลุ่มเนื้อโคที่ใช้สารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือที่ความเข้มข้นเดียวกันแต่ไม่ได้ผสมสาร Pediocin PA-1 ซึ่งทำให้เนื้อโคไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรลดความเข้มข้นของสารละลายกรดแลคติกลง หรืออาจใช้สารที่มีสมบัติอุ้มน้ำและมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่นการใช้สารผสมของ โพรแตสเซียมซอร์เบทกับไตรโซเดียมฟอสเฟต ซึ่งจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *S. Derby* และเกิดการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อน้อยที่สุดและไม่ทำให้เนื้อเกิดสีซีด (ประภาพร ขอไพบูลย์ และคณะ,2548)

การศึกษาถึงผลของกรดแลคติก 1% กับ Pediocin PA-1 ที่มีต่อเชื้อซัลโมเนลลาที่คัดแยกได้จากเนื้อโคแล้วทำให้เกิดการปนเปื้อนลงในเนื้อโค ซึ่งศึกษาในสภาพการเก็บเนื้อในรูปแบบสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิต่ำ อาจไม่ตรงกับเป้าหมายที่เป็นการจำหน่ายแบบทั่วไปที่จำหน่ายแบบไม่ได้บรรจุสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจึงควรนำเป้าหมายของการจำหน่ายจริงมาพิจารณาในการศึกษาครั้งต่อไป

บรรณานุกรม

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2543. “อาหารพร้อมปรุงในซูเปอร์มาร์เก็ต ปลดภัยจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษจริงหรือ?” รายงานประจำปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์: 91.
- คมแห พิลาสสมบัติ. 2540. “ การลดปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนผิวซากสุกรที่ผ่านขบวนการฆ่ามาตรฐานและไม่มาตรฐานโดยใช้สารละลายกรดแลกติกและคลอรีน” วิทยานิพนธ์ปริญญาโทสาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จุฑารัตน์ เลียนกั้วา. 2545. “ ผลของกรดกลูโคนิก กรดแอสคอร์บิก และสารไนซินต่อการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Derby และ เชื้อ *E.coli* ในเนื้อสุกร.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2536. เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาทางอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร วันที่ 24 สิงหาคม 2536.
- ประภาพร ขอไพบูลย์, ทิพรดี คงสุวรรณ, และเขวลักษณ์ สุรพันธ์พิษฐ์. 2548. “ ผลของไตรโซเดียมฟอสเฟตเซพเทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมซอร์เบต ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. Derby* บนผิวเนื้อสุกร.” หน้า 86. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสาขาสัตวบาล/สัตวศาสตร์/ สัตวแพทย์ ครั้งที่ 5. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มุสดี ตั้งวัชรินทร์, จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, ประภาพร ขอไพบูลย์ และ ทิพย์วรรณ ปริญญาศิริ. 2545. “ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Derby และ *Staphylococcus aureus* บนเนื้อสุกร” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 20(2): 1-9.
- วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. “การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อโปรไบโอติก.” วารสารจารย์พา. 45.
- สุเมธทา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 470 หน้า.
- สุมาลี บุญมา, อรุณ บำงตระกูลนนท์, นพรัตน์ หมานริน และ ชุทพจน์ อมาตยกุล. 2539. “การตรวจเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ โดยวิธี SCM และ MSRV.” อาหาร. 26 : 88-97.
- สุมาลี บุญมา, นพรัตน์ หมานริน, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, และ อรุณ บำงตระกูลนนท์. 2540. “การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่และเนื้อหมู.” ว. เกษตรศาสตร์. 31:413-418.

- อดิศร เสวตวิวัฒน์, วราวุฒิ คุรุสง, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, และ อรุณ บำตระกุลนนท์. 2548. “เปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในขั้นตอน selective enrichment และ isolation ในการตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อหมูสดจำหน่ายปลีก.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1) :1-13.
- อรุณ บำตระกุลนนท์, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์, สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. “การสำรวจเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอุจจาระของพนักงานในโรงงานผลิตอาหารแช่แข็ง.” เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 13 วันที่ 15-16 พฤษภาคม 2545 ณ โรงแรม มิวราติส แกรนด์ คอนเวนชั่น.
- Abee, T., Krockel, L., and Hill, C., 1995. “Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning.” **Int. J. Food. Microbiol.** 28: 169-185.
- Anderson, M.E., and Marshall, R.T. 1990. “Reducing microbial populations on beef tissue: concentration and temperature of an acid mixture.” **J. Food Sci.** 55: 903.
- Anderson, M.E., Marshall, R.T., and Dickson, J.S. 1992. “Efficacies of acetic, lactic and two mixed acids in reducing numbers of bacteria on surfaces of lean meat.” **J. Food. Safety.** 12: 139.
- AOAC International. 1984. Official method of analysis. 14th.ed. Association of Analyticalchemist. Arlington, Verginia.
- Arganosa, G. C., and Marriott, N. G. 1989. “Organic acids as tenderizers of collagen in restructured beef.” **J. Food. Sci.** 54: 1173-1176.
- Arumugaswamy, R.K., Rusul, G., Abdul Hamid, S. N., and Cheah, C.T. 1995. “Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia.” **Food Microbiology.** 12:3-8.
- Bangtrakulnoth, A., Boonmar, S., Luengyosluechakul, S., Musum, M., and Sutanthavibul, J. 1994. “Study of pig salmonellosis in Thailand .” **Proc. 13 th IPVS congress.** Bangkok : tiranasar press.
- Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Sawanpanyalert, P., Hendriksen, R.S., Wong, D., and Aarestrup, F.M. 2004. “*Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002.” **Emerging Infectious Diseases.** 10(1): 131-136.
- Bari, M. L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., and Kawamoto, S. 2005. “Combined Efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce.” **J. Food Prot.** 68: 1381-1387.

- Baumann, H. E., and Foster, E.M., 1956. "Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick." **Am.J.Clin.Nutr.** 33: 2426-243
- Bayles, D. O., Annous, B. A., and Wilkinson, B. J. 1996. " Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in responses to temperature down shock and growth at low temperatures." **Appl. Environ. Microbiol.** 62(3): 1116-1119.
- Berends, B.R., Snijders, J.M.A. and Van Logtestijn, J.G., 1993. "Efficacy of current EC meat inspection procedures and some proposed revisions with respect to microbiological safety: A critical review." **Vet. Rec.** 133: 411-415.
- Berends, B.R., Burt, S.A., Snijders, J.M.A., 1995. "Critical control points in relation to breaking *Salmonella* and *Listeria* cycles in pork production." In: Burt, S.A., Bauer, F. (Eds.). *New challenges in Meat Hygiene: Specific Problems in Cleaning and Disinfection*. European Consortium for the Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology (ECCEAMST), Utrecht, The Netherlands. Pp. 11-17.
- Berends, B.R., Knapen, F.V., Mossel, D.A.A., Snijders, J.M.A and Burt, S.A. 1997. " Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. On pork carcasses." **Int. J. Food. Microbiol.** 36: 199-206.
- Berends, B.R., Knapen, F.V., Mossel, D.A.A., Burt, S.A., and Snijders, J.M.A. 1998. " *Salmonella* spp. On pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors." **Int. J. Food. Micro.** 44:207-217.
- Bhunja, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1987a. "Partial purification and characterization of antimicrobial substances from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*." **IFT 87 Program and Abstracts. Annual Meeting, Institute of food technologists, Las Vegas, June 16-19.** Abstract no.143.
- Bhunja, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1987b. "Direct detection of and antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis." **J.Ind.Microbiol.** 2: 319-322.
- Bhunja, A. K., Kim, W.J., Johnson, M.C., and Ray, B. 1988. "Purification, characterization and Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*." **J.Appl.Bacteriol.** 65: 261-268.
- Binkin, N., Scuderi, G., Novaco, F., Giovanardi, G.L., Paganelli, G., Ferrari, G., Cappelli, A., Ravaglia, L., Zilioli, F., Amadei, V., and Magliani, W. 1993. "Egg-related *Salmonella* Enteritidis, Italy, 1991." **Epidemiol. Infect.** 100: 277-287.

- Blaise, O., Ronald, E. S., Richard, A. H., Gabriel, J. P., and Andre, B. 1997. "Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria." **J.Food.Prot.** 60(3): 246-253.
- Blood, R.M. 1975. "Lactic acid bacteria in marinated herring" In *Lactic acid bacteria in beverages and food*. J.G. Carr, C.V. Cutting, and G.C. Whiting, eds., pp.195-208. Academic Press, Inc. New York.
- Borch, E., Nesbakken, T., and Christensen, H. 1996. "Hazard identification in swine slaughter to with respect foodborne bacteria." **Int. J. Food. Microbiol.** 30:9-25.
- Cardinale, E., Perrier Gross-Claude, J.D., Tall, F., Gueye, E.F., and Salvat G. 2005. "Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal." **Int. J.FoodMicro.** 103:157-165.
- Chau, P.Y., Shortridge, K.F., and Huang, C.T. 1977. "*Salmonella* in pig carcasses for human consumption in Hong Kong: a study on the mode of contamination." **J. Hyg. (Camb.)** 78: 253-260.
- Chen, H., and Hoover, D.G. 2003. "Bacteriocins and their food applications." **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 2: 82-100.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." **Int. J. Food. Microbiol.** 63: 13-20.
- Collin, C.H. 1995. "Collins and Lyne's microbiological methods." Oxford, UK: Butterworth-Heinemann.
- Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.W., Williams, G.C., Thomas, L.V., and Delves-Broughton, J. 1999. "Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage." **J. Food. Prot.** 62: 1004-1010.
- De Vuyst, L., Vandamme, E., 1994. "Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis and application. In: de Vuyst, L., Vandamme, E. (Eds.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications*, Blacki Academic and Profesional, London, pp. 151-221.
- Desmond, E.M., and Troy, D.J. 2001. "Effect of lactic acid and citric acid on low-value beef used for emulsion-type meat products." **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** 34: 374-379.
- Doores, S. 1993. "Organic acids." In Branen, A.L., and Davidson, P.M. (ed). *Antimicrobial in foods*. Pp. 75-103. Marcel Dekker, Inc, Newyork
- Doyle M.P., Beuchat L.R., and Montville T.J. 1997. "Food microbiology:Fundamentals and frontiers." Am. Soc. Microbiol. Washington D.C.

- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. 2000. "Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.
- Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A., and Saldana-Lozano, J. 1999. "Prevalence of *Salmonella* in Chorizo and its survival under different storage temperatures." **Food Microbiology**. 16: 479-486.
- Facklam, R., Hollis, D., and Collins, M.D. 1989. "Identification of gram-positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria." **J.Clin.Microbiol.** 27: 724-730.
- Florjanc, P., Eggenkamp, A.E., Burt, S.A., Berends, B.R., and Snijders J.M.A., 1992. "The effects of disinfection on the prevalence of *Salmonella* spp. And *Listeria* spp. In the cutting room of a pig slaughterhouse." VVDO-report H9214. Department of the Science of Food of Animal Origin (VVDO), Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands.
- Forsythe, S.J., and Hayes, P.R. 1998. "Food hygiene, microbiology and HACCP." 3rd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.
- Garneau, S., Martin, N. I., and Vederas, J. C. 2002. "Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **Biochemie**. 84: 577-592.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., and Monfort, J.M. 1993. "Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages." **J. Appl. Bact.** 75: 142-148.
- Gill, C.O. 1998. "Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In : Davies, A.R., Board, R.G. (Eds.), The microbiology of meat and poultry. Blackie Academic, London, pp. 118-157.
- Gill, C. O., and Badoni, M. 2004. "Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses." **Int. J. Food Micro.** 91:43-50.
- Gill, C.O., and Brayant, J. 1992. "The contamination of pork with spoilage bacteria during chilling and cutting of pig carcasses." **Int. J. Food Microbiol.** 16: 51-62.
- Gill, C.O., and Brayant, J. 1993. "The presence of *Escherichia Coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass deharing equipment." **Food Microbiol.** 10: 337-344.
- Gill, C. O., and Jones, T., 1997. "Assessment of the hygienic characteristics of process for dressing pasteurized pig carcasses." **Food. Microbiol.** 14: 81-91.
- Gracey, J.F. 1986. "Preservation of meat." In: Gracey, J.F. (Ed.) , Meat Hygiene. Balliere Tindall, London, pp. 248-278.

- Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., Von Altrock, A., Limpitakis, N., and Thorberg, B. 2001. "The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. In: *Salmonella* in pork. Epidemiology, control and the public health impact. Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, pp. 115-152.
- Hamby, P.L., Savell, J.W., Acuff, G.R., Vanderzant, C., and Cross, H.R. 1987. "Spary-chilling and carcass decontamination systems using lactic acid and acetic acid." **Meat Sci.** 21:1-14
- Hanlin, M.B., Kalcayanand, N., Ray, D., and Ray, B. 1993. "Bacteriocin of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity." **J. Food. Prot.** 56: 252-255.
- Haydar, O., Yeliz, Y., Ozlem, K., Ahmet, K., Muammer, G., and Gokhan, I. 2006. "Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on beef" **Food control.** 17: 299-303.
- Harrison, A.P., and Hanson, P.A. 1950. "The bacterial flora of the cecal feces of healthy turkeys." **J.Bacteriol.** 54: 197-210.
- Helander, J. M., Von, W. A., and Mattila-Sandholm, M. 1997. "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria." **Trends in Food Sciences & Technology.** 8: 146-150.
- Hill, C. 1995. "Bacteriocin: natural antimicrobials from microorganisms." 23-29. in **G.W. Goulol(ed.) new Methods of food preservation.** Blackie Academic & Professional, London.
- Hoover, D.G., and Steenson, L.R. 1993. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". Academic Press, San Diego.
- Hurst, A. 1981. "Nisin." **Adv. Appl. Microbiol.** 27: 85-123. Ingram, M., and Simonsen, B., 1980. "Meat and meat products." In International Commission on Microbiological specifications for Foods, Microbial ecology of foods. Vol.2. Academic Press, New York.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995. "Bacteriocins of Gram-positive bacteria." **Microbiol. Rev.** 59:171-200.
- Jernklinchan, J., Koowatannanukul, K., and Saittanu, K. 1994. "Occurrence of *Salmonella* in raw broilers and their products in Thailand." **J. Food Prot.** 57: 808-810.

- Jimenez-Villarreal, J. R., Pohlman, F. W., Johnson, Z. B., and Brown, A. H. 2003. " Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium, lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef." **Meat Science** 65: 1055-1062.
- Kalchayanand, N. 1990. "Extension of shelf-life of vacuum-packaged refrigerated fresh beef by bacteriocins of lactic acid bacteria. Philosophy thesis, University of Wyoming, Laramie.
- Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-85.
- Kotula, K. L., and Thelappurath, R. 1994. " Microbial and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solution." **J. Food. Prot.** 57(8): 665-670.
- Kusunoki, J., Hashimoto, Y., Hirai, A., Itoh, T., Kai, A., Yanagawa, Y., Ohato, K., Kudoh, Y. and Nakamura, A. 1995. "Characterization of *Salmonella ser. enteritidis* isolated from food poisoning in Tokyo by epidemiological markers." XXV Congress of the World Veterinary Association (Abstracts). 3-9 September, 1995, Yokohama, Japan, P. 249.
- Lafon-Lafourcade, S. 1983. "wine and brandy" In Biotechnology, Volume 5. G. Reed, ed., pp. 81-163. Verlag Chemie, Weinheim Deerfield Beach, Florida.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. 2001. " Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action . **FEMS Microbiol. Rev.** 25: 285-308.
- Medden, H.R., Espie, W.E., Moran, L., Mabride, J., and Scates, P. 2001. "Occurrence of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. On beef carcasses." **Meat Science.** 58: 343-346.
- Mendonca, A. F., Molins, R. A., Kraft, A. A., and Walker, H. W. 1989. " Microbiological chemical and physical changes in fresh vacuum packed pork treated with organic acids and salts." **J. Food. Sci.** 54: 18-21.
- Motlagh, A. M., Holla, S., Johnson, M.C., Ray, B., and Field, R.A.. 1992. "Inhibition of *Listeria* spp. In sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilaciti* H." **J. Food Prot.** 55:337-343.
- Moy, G., Hazzard, A., and Kaferstein, F. 1997. " Improving the safety of street-vended food." **World Health Statistiss Quarterly.** 50: 124-131.
- Mrema, N., Mpuchane, S., and Gashe, B. A. 2004. "Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana." **Food Control.** 17(3): 207-212.

- Mundt, J.O., Beattie, W.G., and Weiland, F.R. 1969. "Pediococci residing on plants." **J. Bacteriol.** 98: 938-942.
- Mustapha, A., Ariyapitipun, T., and Clarke, A.D. 2002. "Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-Packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin." **J. Food. Sci.** 67(1): 262-267.
- Naidu, A.S.. 2000. "Natural food antimicrobial systems". CRC Press, New York.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., and Holo, H. 1996. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria." **Antonie van Leeuwenhoek.** 70: 113-128.
- Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Pela'ez-Mart'inez, M. C., and Harrison de la torre, A. 2001. "Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry." **Meat Science.** 62: 237-243.
- Nielsen, W. J., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. 1990. "Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2142-2145.
- Orji, M.U., Onuigbo, H.C., and Mbata, T.I. 2005. "Isolation of Salmonella from poultry droppings and other environmental sources in Awka, Nigeria." **Int. J. Inf. Dis.** 9: 86-89.
- Oshold, W., Shin, H.K., Dresel, J., and Leistner, L. 1984. "Improving the storage life of carcasses by treating their surfaces with an acid spray." **Fleischwirtschaft.** 64: 828.
- Panisello, P.J., Roison, R., Quantick, P.C., and Rosalind, S. 2000. "Application of foodborne diseases outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems." **Int. J. Food. Micro.** 59: 221-234.
- Prasai, R.K., Acuff, G.R., Lucia, L.M., Hale, D.S., Savell, J.W., and Morgan, J.B. 1991. "Microbiological effects of acid decontamination of beef carcasses at various location in processing." **J.Food. Prot.** 54: 868-872.
- Rainbow, C. 1975. "Beer spoilage lactic acid bacteria" In Lactic acid bacteria in beverages and food. J.G. Carr, C.V. Cutting, and G.C. Whiting, eds., pp. 149-158 Academic press, New York.
- Rayman, ., Malik, N., and Hurst, A., 1983. "Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in model cured meat system." **Appl. Environ. Microbiol.** 46:1450-1452.

- Rose, B.E., Hill, W.E., Umholtz, R., Ransom, G.M., and James, W.O. 2002. "Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States of America, 1998 through 2000." **J. Food. Prot.** 65: 937-947.
- Rozbeh, M., Kalchayanand, N., Field, R. A., Johnson, M.C., and Ray, B.. 1993. "The influence of biopreservatives on bacterial level of refrigerated vacuum packaged beef ." **J. Food. Safety.** 13: 99-111.
- Saitana, K., Koowatananukul, C., Jerngklinchan, J., and Sasipreeyajan, J. 1994. " Detection of *Salmonellae* in hen eggs in Thailand. Southeast Asia." **J. Trop. Med. Public Health.** 25(2) : 324-327.
- Samelis, J. J., Sofos, J. N., Kendal, P. A., and Smith, G. C. 2001. " Influence of the natural microbial flora on the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* in a model system of fresh meat decontamination Fluids." **Appl. Environ. Microbiol.** 67(6): 2410-2420.
- Shcillinger, U., and Lücke, F.K. 1990. "Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products." **Fleischwirtsschaf.** 70: 1296-1299.
- Shcillinger, U., and Holzapfel, W.H.. 1990. "Antibacterial activity of carnobacteria." **Food Microbial.** 7: 305-310.
- Simonsen, B., Christensen, J., Baggesen, J.H.B., Robert, T.A., Tompkin, R.B., and Silliker, J.H. 1987. "Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). **Int. J. Food. Microbiol.** 4: 227-247.
- Skaugen, M., Nissen-Meyer, J., Jung, G., Stevanovic, S., Sletten, K., Abildgaard, C.I.M. and Nes, I.F., 1994. "In vivo conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide." **J. Biol. Chem.** 269 (27): 183-27185.
- Smulders, F.J.M., and Woolthus, C.H.J. 1983. "Influence of two levels of hygiene in the microbiological condition of veal as a product of two slaughtering/processing sequences." **J.Food.Prot.** 46: 1032 .
- Snijders, J.M.A., Van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A., and Smulders, F.J.M. 1985. "Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedure." **The Quarterly Veterinary.** 277 - 282.

- Solberg, O., Hegna, I. K., and Clausen, O.G. 1975. "*Pediococcus acidilactici* NCIB 6990, a new test organism for microbiological assaying of pantothenic acid. **J. appl. Bacteriol.** 39: 119 - 120.
- Sorqvist, S., and Danielsson-Tham, M., 1990. "Survival of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia* spp. In scalding water used in pig slaughter. **Fleischwirtsch.** 70: 1451-1454.
- Sorensen, L.L., Sorensen, R., Klint, K., and Nielsen, B. 1999. "Presistent environment strains of *Salmonella infantis* at two Danish slaughterhouses, two case stories. **In: Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and control of *Salmonella* in pork.** 285-286. 4-7 August., Washington, DC
- Sorensen, O., Van Donkersgoed, J., Mcfall, M., Manninen, K., Gensler, G., and Ollis, G. 2002. "*Salmonella* spp. Shedding by Alberta beef cattle and detection of *Salmonella* spp. In ground beef. **J. Food. Prot.** 65: 484-491.
- Stevens, K. A., Sheldon, B.W., Kelps, N. A., and Klaenhammer, T.R. 1991. "Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria ." **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3613-3615.
- Stivarius, M. R., Pohlman F. W., Mcelyea K.S., and Waldroup, A.L. 2002. "Effects of hot water and lactic acid treatment of beef trimmings prior to grinding on microbial, instrumental color and sensory properties of ground beef during display." **Meat Science.** 60:327-334.
- Sugihara, T. F. 1985. "Microbiology of breadmaking." In *Microbiology of fermented foods*. B.J.B.Wood, ed., Vol.1, pp. 249-261. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- Swetwiwathana, A. 2005. "Microbiological quality enhancement of Thai fermented meat product (Nham) using Nham-associated pediocin-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)." Philosophy Degree thesis, Kyushu University, Japan.
- Swetwiwathana, A., and Lotong, N. 1999. "Selection of bacteriocin producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat)." **Proceeding of International Conferences on ASIAN Netwoprk on Microbial Researchers.** November 29 December 1, 1999. Chiangmai, Thailand. PIII/16:543-548.

- Swetwiwathana, A., Lotong, N., and Sonomoto, K. 2000. "Isolation and selection of thermotolerant bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat) ." **Proceeding of the 2nd Seminar of Thai and Japanese Coordinator Meeting** . Yamaguchi University, Japan.
- Swetwiwathana, A., Lotong, N., Fischer, A., and Sonomoto, K. 2001. " Potential for use of isolated bacteriocin –producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from nham (Thai fermented meat) to control the growth of *Salmonella* Anatum (An *In-Vitro Study*) ." **The 45th International Congress of Meat Science and Tecnology (ICoMST) Proceeding, Volume II: 18-19, August 26-31, 2001.** Krakow, Poland.
- Swetwiwathana, A., Lotong, N., and Fischer, A. 2002. " Use of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) to control *Salmonella* Anatum in nham (Thai fermented meat)" **The 48th International Congress of Meat Science and Tecnology (ICoMST) Proceeding, Volume II:966-967, August25-30, 2002.**Rome, Italy.
- Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2004. "Identification of Pediocin PA-1 producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from nham (Thai fermented meat)." **The 50th International Congress of Meat Science and Technology, August 8th – 13th 2004.** Helsinki, Finland.
- Teuber, M., and Geis, A. 1981. "The family Streptococcaceae(nonmedical aspects)." In The prokaryotes. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, Eds.,Vol.2, pp. 1614-1630. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Thatcher, F.S., and Clark. (eds). 1968. " Microorganisms in foods: Their significance and methods of enumeration." University of Toronto press, Toronto, Ontario. 434 p.
- Thomas, T.D. 1987. "Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in cheddar cheese. **N.Z.J.Dairy Sci. Technol.** 22: 25-38.
- Thomas, T.D., Mckay, L.L., and Morris, H.A. 1985. "Lactate metabolism by pediococci isolated from cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 908-913.
- Threlfall, E.J., and Chart, H. 1993. "Inter-relationships between strains of *Salmonella* Enteritidis." **Epidemiol. Infect.** 11: 1-8.
- Van, M. J., and Shies, M. E. 2000. "Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria." **Natl. Prod. Rep.** 17: 323-335.

- Van Belkum, M.J., and Stiles, M.E. 2000. "Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria." **Nat. Prod. Rep.** 17: 323-335.
- Van Nierop, W., Duse, A.G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S., and Bloomfield, S.F. 2005. "Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*." **Int. J. Food Microbiol.** 99: 1-6.
- Yang Z., LI Y., and Slavik, M. 1998. "Use of antibacterial spray applied with an inside-outlet birdwasher to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses." **J. Food. Prot.** 61: 829-832.
- Yasmina, B., Kenna, F., and Enrique, M. S. 2002. "Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses." **J. Food. Prot.** 65(11): 1780-1783.
- Yu, S.L., Bolton, D., Laubach, C., Kline, P., Oser, A., and Palumbo, S.A. 1999. "Effect of dehairing operations on microbiological quality of swine carcasses." **J. Food. Prot.** 62: 1478 - 1481.
- Zhang, S., and Mustapha, A. 1999. "Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 numbers on vacuum packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA." **J. Food. Prot.** 62: 1123-1127.

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ และ การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย น้ำหนักของชิ้นเนื้อ

การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

1.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella Weltevreden*

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

1.2 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella Anatum*

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

1.3 การเตรียมตัวอย่างเชื้อ *Salmonella Senftenberg*

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

การหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อ (Mendonca et al., 1989)

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

$$\begin{aligned}
 \text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} &= \frac{X_3 - X_4 - X_2}{X_1} \times 100 \\
 &= \frac{(p + c + m) - (m) - (p)}{X_1} \times 100
 \end{aligned}$$

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อในแต่ละกลุ่มการทดลองในวันที่ 0 2 4 6 และ 8 ของการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะเฉพาะของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Trypticase Soy Broth (TSB)

ประกอบด้วย

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

Tetrathionate Broth (TTB)

ประกอบด้วย

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

Rappaport Vassiliadis (RV)

ประกอบด้วย

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

Rambach (Rm) agar

ประกอบด้วย

peptone	8.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
Sodium deoxycholate	1.0 ก.
Chromogenic mix	1.5 ก.
Propylene glycol	10.5 ก.
Agar-agar	15.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Hektoen Enteric (HE) agar

ประกอบด้วย

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

Xylose-Lysin-Desoxycholate (XLD) agar

ประกอบด้วย

yeast extract	3.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
D(+)xylose	3.5 ก.
Lactose	7.5 ก.

Sucrose	7.5 ก.
Lysine	5.0 ก.
Sodium deoxycholate	2.5 ก.
Sodium thiosulfate	6.8 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.8 ก.
Phenol red	0.08 ก.
Agar-agar	13.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Modified Sami-Solid Rappapost Vassiliadis (MSRV) medium

ประกอบด้วย

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

Triple Sugar Iron (TSI) agar slant

ประกอบด้วย

peptone from casein	15.0 ก.
Peptone from meat	5.0 ก.
Meat extract	3.0 ก.
Yeast extract	3.0 ก.
Sodium chloride	5.0 ก.
Lactose	10.0 ก.
Sucrose	10.0 ก.
D(+)-glucose	1.0 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.5 ก.
Sodium thiosulfate	0.5 ก.

Phenol red	0.024 ก.
Agar-agar	12.0 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Lysine-Indole-Motility (LIM) medium

ประกอบด้วย	
peptone from meat	5.0 ก.
Yeast extract	3.0 ก.
D(+)-glucose	1.0 ก.
L-lysine monohydrochloride	10.0 ก.
Sodium thiosulfate	0.04 ก.
Ammonium iron(III) citrate	0.5 ก.
Bromocresol purple	0.02 ก.
Agar-agar	12.5 ก.
น้ำกลั่น	1000 มล.

Trypticase soy agar (TSA)

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

MRS agar

ประกอบด้วย	
Peptone from casein 10.0	10.0 ก.
Meat extract	8.0 ก.
yeast extract	4.0 ก.
D(+)-glucose	20.0 ก.
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0 ก.
Tween [®] 80	1.0 ก.

di-ammonium hydrogen citrate	2.0 g.
Sodium acetate	5.0 g.
Magnesium sulfate	0.2 g.
Manganese sulfate	0.04 g.
Agar-agar	14.0 g.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Hektoen Enteric (HE) agar



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



ภาพที่ 3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลลาบนอาหาร Rambach agar



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



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