รายงานฉบับสมบูรณ์

"การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ"

โดย

รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ส่วนที่ 3)

สัญญาเลขที่ RDG5120013

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ"

โดย

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

โครงการ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ส่วนที่ 3

การนำกล้าเชื้อโปรไบโอติกมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อนวัตกรรมใหม่ คือ แหนมกึ่งแห้ง

แผนการดำเนินงานข้อที่ 5.1 และ 5.2

การทดลองที่ 1 การนำกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

การทดลองที่ 2 การใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Lb. salivarius* D 4, *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ในแหนมเนื้อโคกึ่งแห้ง

สารบัญ

	หน้า
แผนการดำเนินงาน	3
สรุปขั้นตอนการดำเนินงาน	4
การทดลองที่ 1 การนำกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง	
บทคัดย่อ	5
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	5
วิธีการดำเนินงาน	7
ผลการทดลองและวิจารณ์	9
สรุปผลการทดลอง	18
การทดลองที่ 2 การใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Lb. salivarius* D 4, *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ในแหนมเนื้อโคกึ่งแห้ง	19
บทคัดย่อ	19
วิธีการดำเนินงาน	20
ผลการทดลองและวิจารณ์	27
สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38

แผนการดำเนินงาน

กิจกรรม	ปีที่						ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	1		2		3		
5. การศึกษาคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนวตกรรมใหม่ 5.1 นำกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ผ่านการทดสอบในผลิตภัณฑ์เนื้อ (*In vitro*) มาใช้ในการผลิต ผลิตภัณฑ์เนื้อนวตกรรมใหม่ คือ แหนมกึ่งแห้ง 5.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและจุลชีววิทยา รวมถึงทดสอบด้านประสาทสัมผัสการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งโปรไบโอติก					●	●	1. ได้ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ แหนมกึ่งแห้งและทราบถึงคุณภาพที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อ โปรไบโอติก เปรียบเทียบกับ ที่ผลิตโดยใช้เชื้อตามธรรมชาติ และที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อจากต่างประเทศ 2. ได้ทราบผลการยอมรับนวตกรรมใหม่จากผู้บริโภค 3. ทราบวิธีการในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในโอกาสต่อไป วิธีการที่สามารถจดเป็นลิขสิทธิหรือสิทธิบัตรในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในเชิงการค้า 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 2 เรื่อง

สรุปขั้นตอนการดำเนินงาน

กิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ความสำเร็จ	หมายเหตุ
5. การศึกษาคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนวตกรรมใหม่ 5.1 นำกล้าเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ผ่านการทดสอบในผลิตภัณฑ์เนื้อ (*In vitro*) มาใช้ในการผลิต ผลิตภัณฑ์เนื้อนวตกรรมใหม่คือ แหนมกึ่งแห้ง 5.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและจุลชีววิทยา รวมถึงทดสอบด้านประสาทสัมผัสการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งโปรไบโอติก	1. ได้ผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ แหนมกึ่งแห้งและทราบถึงคุณภาพที่ผลิตโดยการเติมกล้าเชื้อโปรไบโอติก เปรียบเทียบกับที่ผลิตโดยใช้เชื้อตามธรรมชาติ และที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อจากต่างประเทศ 2. ได้ทราบผลการยอมรับนวตกรรมใหม่จากผู้บริโภค 3. ทราบวิธีการในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในโอกาสต่อไป วิธีการที่สามารถจดเป็นอิขสิทธิหรือสิทธิบัตรในการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อนวัตกรรมแบบกึ่งแห้งโปรไบโอติกในเชิงการค้า 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 2 เรื่อง	/ / / x	

การทดลองที่ 1 การนำกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้กล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่มีผลต่อลักษณะของแหนมเนื้อสุกรกึ่งแห้ง โดยผลิตแหนมเป็น 2 สูตร คือ สูตรที่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์เริ่มต้น ซึ่งในแต่ละสูตรนั้นจะทำการผลิตแหนมที่มีหนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูหั่นเส้นและหนังหมูบด จากนั้นศึกษาคุณสมบัติของแหนมโดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก ค่าความเป็นกรดด่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และการทดสอบทางประสาทสัมผัส ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมกล้าเชื้อ ($P<0.05$) และมีการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างอย่างรวดเร็ว เมื่อพิจารณาผลของลักษณะหนังหมูที่ใช้ คือ หนังหมูบดและหนังหมูหั่นเส้นร่วมกับการหมักแหนมที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า การผลิตแหนมโดยใช้หนังหมูบดมีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์กรดแลกติกสูงกว่าและค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าแหนมที่ใช้หนังหมูหั่นเส้นแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ผลของการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และความชื้นพบว่า กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนทางด้านลักษณะทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดทั้งกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อมากกว่าผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้หนังหมูหั่นเส้นทั้งกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นเล็กน้อยและปริมาณกรดทั้งหมดมากขึ้น เนื่องจากการอบแห้งทำให้น้ำระเหยออกจากแหนมทำให้ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่น้ำหนักแหนมที่นำมาตรวจสอบในน้ำหนักเดียวกันมีมากขึ้นตามไปด้วยแต่ค่าความเป็นกรดด่างไม่แตกต่างกันมากนัก

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แหนมเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ซึ่งกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ยังคงอาศัยแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนมาจากเนื้อสัตว์ และเครื่องปรุงต่างๆ ที่จะทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของแหนม ซึ่งการหมักที่อาศัย

เพียงแบคทีเรียแลค ติกที่มีอยู่ในธรรมชาตินั้น อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ ในปัจจุบันจึงมีการนำเอาเชื้อแลค ติกบริสุทธิ์มาใส่ในตอนเริ่มต้นของกระบวนการหมัก เพื่อช่วยให้ผู้ผลิตมั่นใจได้ว่าจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และยังช่วยลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลงด้วย และเนื่องจากพฤติกรรมในการบริโภคแหนมนั้น นิยมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อน จึงเป็นความเสี่ยงที่ผู้บริโภคจะได้รับอันตรายจากเชื้อที่อาจก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในแหนมได้ เช่น เชื้อซัลโมเนลลา ที่มักมีการปนเปื้อนอยู่ในเนื้อหมู (อดิศร และคณะ, 2548) ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต จึงมีการศึกษาที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น และพบว่าการนำเชื้อแลคติกบริสุทธิ์มาใช้ในตอนเริ่มต้นของการหมักนั้น นอกจากจะให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีสม่ำเสมอแล้ว ยังช่วยในเรื่องการลดจำนวนเชื้อที่ก่อโรคอีกด้วย ดังรายงานการวิจัยของอดิศร (2533) และเรณู (2539) ที่พบว่าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใส่ลงไปนั้นสามารถลดจำนวนของเชื้อซัลโมเนลลาได้ และจากการศึกษาของ ศิพัตน์ (2539) และ Petchsing และ Woodburn (1990) รายงานว่าการใช้เชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นสามารถลดปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ด้วย ในปัจจุบัน เนื่องจากมีผู้นิยมบริโภคแหนมกันมากขึ้น จึงมีการผลิตแหนมออกมาจำหน่ายกันมากตามท้องตลาด ซึ่งการผลิตแหนมออกมามากแล้วจำหน่ายไม่หมด และเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ แหนมจะมีคุณภาพที่ผู้บริโภคไม่ต้องการ กล่าวคือ จะ มีน้ำจากการหมักแหนมออกมามาก ผลิตภัณฑ์จะมีความเปรี้ยวมากขึ้น และเนื้อสัมผัสจะเปลี่ยนไปโดยมีความเหนียวลดลง (สมบุญ , 2518) ทำให้เกิดการสูญเสีย ต่อผู้ผลิต และสิ้นเปลืองทรัพยากรโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยเพิ่มการแปรรูปแบบกึ่งแห้ง (semi-dried) ของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวหลังจากที่หมักได้ที่ แบบซาลามีของประเทศในแถบยุโรป จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บที่ยาวนานขึ้น และผลิตภัณฑ์แหนมหมักแบบกึ่งแห้งนี้ ยังสะดวกต่อการเก็บ และพกพาไปรับประทานในที่ต่างๆได้สะดวกยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้ ในการศึกษาจึงทำการแปรรูปผลิตภัณฑ์แหนมอีกครั้งการหมักด้วยการลดปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ โดยผ่านกระบวนการทำแห้งในตู้อบ ให้ได้ผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง (semi-dried Nham) ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบการยอมรับของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งนี้จากกระบวนการหมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งได้รับการตรวจสอบว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต Pediocin PA-1 ซึ่งมีผลช่วยในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการหมักแหนม (Swetwiwathana และคณะ, 2004) เทียบกับแหนมที่หมักโดยวิธีตามธรรมชาติโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ โดยดูผลของการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นมาใช้ในการผลิต และผลของการทำแห้งที่มีต่อเชื้อก่อโรค อย่างซัลโมเนลลา ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และอาจเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่ทำขึ้นโดยมีพื้นฐานมาจากผลิตภัณฑ์พื้นบ้านของไทย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบใช้ในการผลิต

2.1.1 เนื้อหมูส่วนสะโพก (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

2.1.2 หนังหมู (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

2.1.3 ข้าวสุก (ข้าวหอมมะลิ ตราหงษ์ทอง)

2.1.4 กระเทียม (ตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง)

2.1.5 เกลือ (ตราชฎา)

2.1.6 น้ำตาล (ตรามิตรผล)

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

P. pentosaceus TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหนมและได้รับการยืนยันว่าผลิต pediocin PA-1 (Swetwiwathana, 2005) บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว MRS broth (Merck) เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง และใช้ MRS agar + 1.0 % $CaCO_3$ เป็นอาหารแข็งสำหรับเก็บเชื้อแบบ deep tube

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

2.3.1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติค *P. pentosaceus* TISTR 536 โดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในMRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

2.3.1.2 การผลิตแหนม ผลิตแหนมโดยแบ่งเป็น 2 สูตร คือ สูตรที่มีการเติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น และไม่มีการเติมเชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้น ซึ่งในแต่ละสูตรนั้นจะทำการผลิตแหนมที่มีหนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2 x 3 x 20 มิลลิเมตร และหนังหมูบดที่ผ่านรูตะแกรงขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เตรียมส่วนผสมในแต่ละสูตรตามปริมาณที่แสดงในตารางที่ 3.1 ในสูตรที่ไม่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นนั้นให้นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมในเครื่องผสม (Kitchen Aid) นวดจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 3 นาที) แต่ถ้าเป็นสูตรที่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น ให้ผสมส่วนผสมทั้งหมดก่อนประมาณ 1 นาที จากนั้นจึงเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นลงไป นวดต่อจนส่วนผสมเหนียว (ประมาณ 2 นาที) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบรรจุโดยใช้ไส้บรรจุแบบเซลลูโลส (Cellulose casing) ให้แต่ละแท่งมีความยาวประมาณ 6 นิ้ว จากนั้นรีดเอาอากาศออกมัดหัวท้ายให้แน่น นำไปบรรจุในถุงสุญญากาศ ปิดผนึกให้เป็นแบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่องบรรจุ

แบบสุญญากาศ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุกๆวัน เป็นเวลา 3วัน

เตรียมตัวอย่างแหนมโดยมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการผลิตแหนม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมู	650
หนังหมู	350
ข้าวสุก	60
กระเทียม	50
เกลือ	25
น้ำตาล	5
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต	3
โซเดียมแอสคอร์เบท	0.5
โซเดียมไนไตรท์	0.100

ที่มา: Swetwiwathana และคณะ (1999a)

2.3.1.3 วิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของตัวอย่างแหนม

1) วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

2) การวัดค่าพีเอช (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

3) การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 1984 โดย นภา, 2529)

4) การวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (ตามคู่มือการใช้งานของเครื่อง NAVASINA EEJA-3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

การทดลองในข้อ 1-4 วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อกสมบูรณ์ (Random Complete Block Design : RCBD) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan New's Multiple Range Test (DMRT)

2.3.2 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของแหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ใช้ผู้ทดสอบที่ชอบบริโภคแหนมจำนวน 20 คน ดำเนินการทดสอบโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) โดยการทดสอบผู้ชิมประเมินผลในด้าน สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ซึ่งแบ่งเป็น 9 ระดับ คือ 9 = ชอบมากที่สุด และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (9-point hedonic scale) นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของคะแนนเฉลี่ยโดย Duncan New's Multiple Range Test

2.3.3 ความเป็นไปได้ของการใช้เชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้น และการอบแห้งแหนมต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 70 คน ดำเนินการทดสอบโดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design โดยการทดสอบผู้ชิมประเมินผลในด้าน สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ 5 = ชอบมากที่สุด และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (5-point hedonic scale)

นำคะแนนที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA)

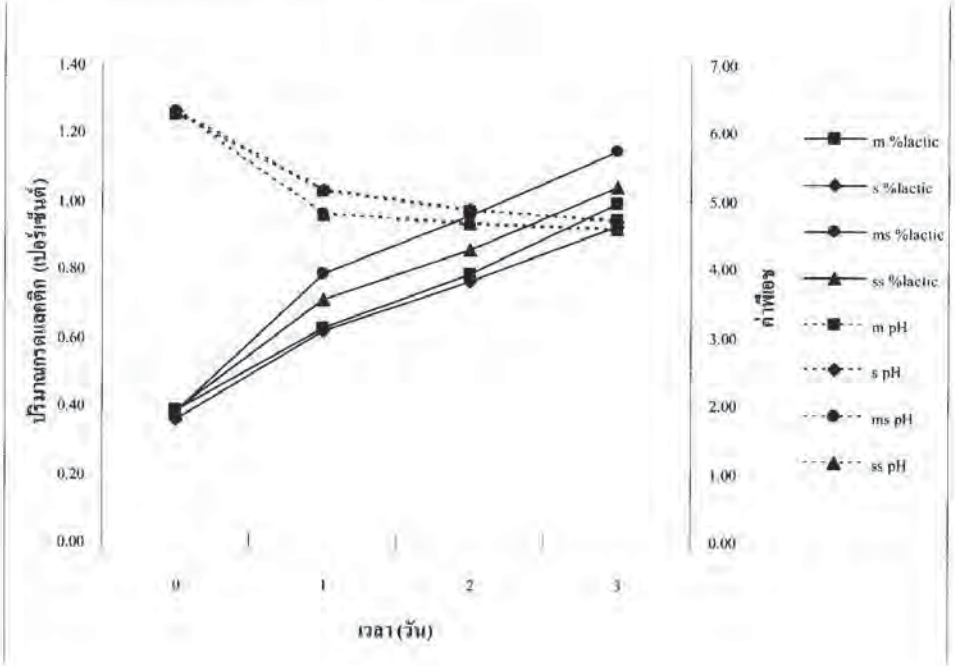
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลของการใช้เชื้อแลคติคบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม

3.1.1 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนม

กระบวนการหมักแหนมโดยธรรมชาตินั้นมักเกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ซึ่งมักจะมีทั้งที่สร้างกรดได้ และทำให้อาหารเน่าเสีย จุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้ดี และพบในระยะแรกของการหมัก มักเป็นพวก homofermentative coccoi เช่น *P. cerevisiae* , *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งเชื้อประเภทนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างเป็นกรดแลคติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ทำให้ค่าพีเอชของแหนมลดลง (บุษกร, 2545) และจากการทดลองผลิตแหนมโดยแบ่งลักษณะของหนังหมูที่ใช้เป็น 2 ลักษณะ คือ หนังหมูแบบบดผ่านรูตะแกรงขนาด 5 มิลลิเมตร และหนังหมูหั่นเส้นขนาดประมาณ 2x3x20 มิลลิเมตร ทำการหมักโดยใช้แบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* T1STR 536 เป็นกล้าเชื้อในการหมักโดยเติมลงไปประมาณ 10^6 เซล/กรัม ในส่วนผสมก่อนทำการหมักเปรียบเทียบกับการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่าค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของแหนมแต่ละสูตรมีความแตกต่างกัน (รูปที่ 1) กล่าวคือ ในวันที่ 0 ของการหมัก ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากกระบวนการหมักยังไม่เกิดขึ้น แต่หลังจากที่หมักแหนมได้ 1 – 3 วัน พบว่าการหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อจะทำให้เปอร์เซ็นต์กรด

แลค ติกเพิ่มสูงขึ้น และค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยเฉพาะในวันที่ 1 ของการหมัก จะพบการเพิ่มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และการลดลงของพีเอชอย่างรวดเร็ว ในวันต่อมาจะสังเกตได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก และค่าพีเอชไม่มากนัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า แหนมที่มีการหมักโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกลงไป ทำให้จำนวนของแบคทีเรียแลคติกมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น สามารถเปลี่ยนแหล่งพลังงานจากคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกได้ในจำนวนมากกว่า จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วและต่ำกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่เมื่อการหมักใช้ระยะเวลานานขึ้น กรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นและทำให้ค่าพีเอชลดลง ทำให้การเจริญของแบคทีเรีย แลคติกช้าลงด้วย จึงทำให้ในระยะการหมักช่วงหลังมีการเปลี่ยนแปลงค่าเปอร์เซ็นต์กรด และค่าพีเอชน้อยกว่าในช่วงระยะเวลาในตอนแรก (Swetwiwathana และคณะ, 1999a) เมื่อพิจารณาผลของลักษณะหนังหมูที่ใช้ คือ หนังหมูบด และ หนังหมูหั่นเส้น ร่วมกับการหมักแหนมที่เติม และไม่เติมกล้าเชื้อ (รูปที่ 1) พบว่าทั้งการหมักแบบที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อให้ผลของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกและค่าพีเอชในลักษณะเดียว กัน กล่าวคือ ในการผลิตแหนมที่ใช้หนังหมูบด มีแนวโน้มของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่สูงกว่าและค่าพีเอชที่ต่ำกว่าแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูหั่นเส้น แต่ในทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า การใช้หนังหมูบดนั้นจะทำให้แหนมรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ลดช่องว่างระหว่างเนื้อหมู และหนังหมูได้มากกว่าการใช้หนังหมูเส้น จึงทำให้กระบวนการหมัก เกิดขึ้นได้ดีกว่า



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์แหนม

หมายเหตุ M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกของผลิตภัณฑ์แหนม

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณกรดแลคติก (เปอร์เซ็นต์)			
	M	**S**	**MS**	**SS**
0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
1	0.6 ± 0.1^{b}	0.6 ± 0.0^{b}	0.8 ± 0.1^{a}	0.7 ± 0.1^{ab}
2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1
3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1

หมายเหตุ a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

3.1.2 ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้น ของผลิตภัณฑ์แหนม

ผลของการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น (ตารางที่ 3) พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากไส้บรรจุที่ใช้นั้นเป็นไส้บรรจุแบบพลาสติกซึ่งอากาศและน้ำไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ เมื่อทำการบรรจุแหนมในไส้พลาสติกแล้ว จึงนำไปบรรจุในถุงพลาสติกสุญญากาศ แล้วทำการดูดอากาศออกให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศ เพื่อให้เกิดการหมักแบบไม่มีอากาศ เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นเนื้อหมูและส่วนผสมต่างๆ เกาะตัวกัน ทำให้มีน้ำที่เกิดจากกระบวนการหมักบางส่วนซึมผ่านไส้บรรจุออกมา เนื่องจากไส้บรรจุที่ใช้เป็นแบบพลาสติกที่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ ทำให้น้ำดังกล่าวออกมาอยู่ในถุงพลาสติกที่ยังคงอยู่ในสภาวะสุญญากาศ เกิดสมดุลของน้ำภายในถุงพลาสติก ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้และค่าความชื้น จึงทำให้แหนมทุกสูตรมีค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และค่าความชื้นที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์แหนม

ระยะเวลาหมัก	ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้				ค่าความชื้น(เปอร์เซ็นต์)			
(วัน)	M^{ns}	S^{ns}	MS^{ns}	SS^{ns}	M^{ns}	S^{ns}	MS^{ns}	SS^{ns}
0	0.97	0.97	0.96	0.97	69.7	71.1	69.8	71.2
1	0.97	0.97	0.96	0.96	71.2	70.2	69.8	70.3
2	0.96	0.97	0.96	0.96	70.2	70.1	70.0	70.1
3	0.96	0.96	0.96	0.96	69.5	70.3	70.1	70.4

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

3.2 คุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของแหนมที่มีการใช้ และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ผลการทดลองหมักแหนมโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง และทำลายเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนมากับเนื้อหมู โดยเปรียบเทียบกับการหมักแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ซึ่งพบว่า การหมักแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้น จะสามารถลดเชื้อซัลโมเนลลาได้มากกว่าการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ รวมถึงการยืนยันผลการลดลงของ *S.* Anatum ที่พบมากในผลิตภัณฑ์แหนม และเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าทนต่อสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด เมื่อใช้แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม (Swetwiwathana และคณะ, 1999b) จึงพอสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะนำ *P. pentosaceus* TISTR 536 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยจากเชื้อในกลุ่มซัลโมเนลลา ด้วยเหตุนี้จึงทำการทดลองผลิตแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เปรียบเทียบกับแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ โดยใช้สูตรหนังหมู 2 ลักษณะ คือ หนังหมูบด และหนังหมูเส้น ผ่านการหมักครบ 3 วัน มาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 ท่าน ให้คะแนนความชอบ 9 ระดับ (ตารางที่ 4) พบว่าผู้บริโภคให้การยอมรับแหนมหนังหมูบดที่หมักโดยมีการเติมกล้าเชื้อมากที่สุดในด้านเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมมากที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอื่นทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่า แหนมหนังหมูบดมีลักษณะของเนื้อสัมผัสที่เป็นเนื้อเดียวกันมากกว่าหนังหมูเส้น และเมื่อมีการเติมกล้าเชื้อลงไปทำให้การหมักเกิดขึ้นได้ดีกว่า ลักษณะเนื้อ

สัมผัสจึงแน่นกว่าสูตรอื่น ๆ สำหรับความเปรี้ยวและกลิ่นรสพบว่าแหนมทุกสูตรที่ทำการทดลองไม่มีความแตกต่างกันกันทางสถิติ ($p>0.05$) และสำหรับสีของผลิตภัณฑ์ในการทดลองพบว่าสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อได้รับคะแนนความชอบน้อยกว่าในสูตรที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ซึ่งสีของผลิตภัณฑ์แหนมเกิดจากสารไนไตรท์แตกตัวให้สารไนตริก ออกไซด์ โดยมีแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวช่วยสารนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน เกิดเป็นสารไนโตรโซไมโอโกลบิน (เยาวลักษณ์, 2536) ซึ่งเป็นสารที่ให้สีชมพู พบว่าแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดที่มีการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อได้รับคะแนนความชอบมากกว่าการใช้หนังหมูเส้น ที่เป็นแหนมแบบดั้งเดิม

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม

ตัวอย่าง	คะแนน					
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่นรส^{ns}	ความเปรี้ยว^{ns}	เนื้อสัมผัส	การยอมรับโดยรวม
M	6.9^{a}	6.6^{a}	6	5.3	5.7^{b}	6.2^{a}
S	6.4^{ab}	6.8^{a}	5.3	5.3	4.5^{c}	5.4^{b}
MS	6.5^{a}	6.2^{ab}	5.6	6.1	6.6^{a}	6.4^{a}
SS	5.6^{b}	5.8^{b}	5.6	6.1	5.3^{cb}	5.9^{ab}

หมายเหตุ a,b,c,d หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($p>0.05$)

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

S หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^{6}$ cfu/g

SS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูเส้นในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^{6}$ cfu/g

3.3 ผลของการใช้กล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นและการทำแห้ง

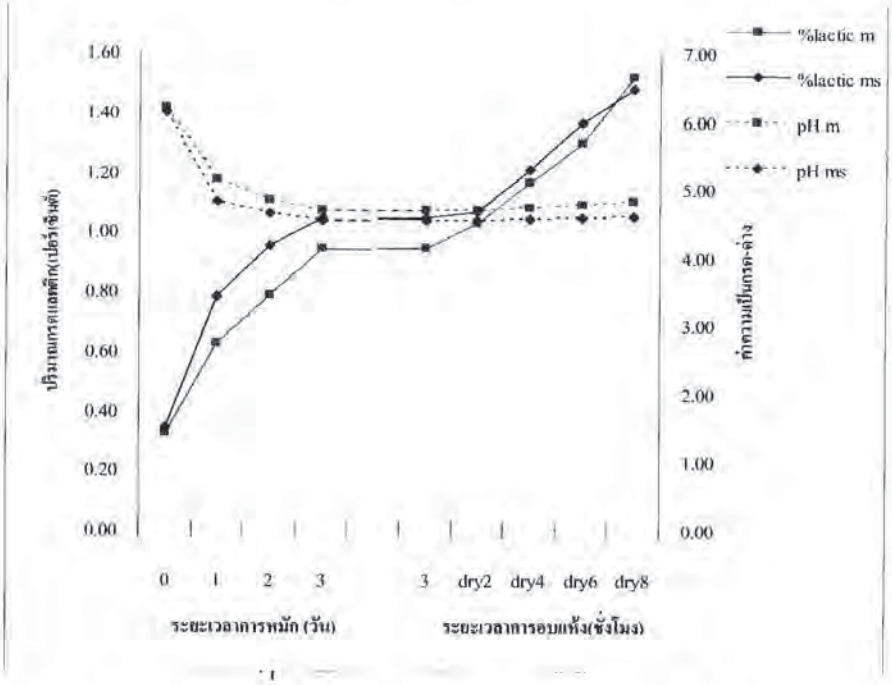
3.3.1 ค่าพีเอชและเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมในข้อ 3.2 พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดทั้งที่มีการเติมกล้าเชื้อ และไม่มีการเติมกล้าเชื้อมากกว่าผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูหั่นเส้นที่ผลิตโดยมีการเติมกล้าเชื้อ และไม่มีการเติมกล้าเชื้อ จึงเลือกแหนมที่ผลิตโดยใช้หนังหมูบดทั้งสองสูตรมาผลิตเป็นแหนมกึ่งแห้งโดยนำแหนมทั้งสองสูตรที่ผ่านการหมักครบ 3 วัน มาลองทำการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่จะลด

ความชื้นของผลิตภัณฑ์ให้น้อยลง เป็นการยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์แหนมให้ยาวนานขึ้น และลดยังช่วยการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคอย่างเชื้อซัลโมเนลลาที่อาจหลงเหลืออยู่ภายหลังการหมัก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ แบบกึ่งแห้งที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น

การทดลองที่ผลิตแหนมโดยใช้หนังหมูบดมีการเติมกล้าเชื้อและไม่มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่าแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นจะให้กรดในปริมาณที่สูงกว่า (1.05 เปอร์เซ็นต์) แหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (0.94 เปอร์เซ็นต์) เมื่อหมักครบ 3 วัน (รูปที่ 2) ทั้งนี้เนื่องมาจากว่าการเติมกล้าเชื้อในตอนเริ่มต้นการหมักนั้น ทำให้มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ แบคทีเรียแลคติกเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกจากกระบวนการหมัก ซึ่งแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในปริมาณมากกว่านี้ ทำให้ผลิตกรดแลคติกในปริมาณมาก จึงส่งผลให้ค่าพีเอชลดต่ำลงมากกว่าการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ กล่าวคือ แหนมที่มีการหมักโดยเติมกล้าเชื้อมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วกว่าแหนมที่หมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (รูปที่ 2) (Swetwiwathana *et al.*, 1999b) โดยแหนมที่เติมกล้าเชื้อมีค่าพีเอชลดลงจาก 6.13 เป็น 4.81 หลังจากนั้นค่าพีเอชยังคงลดต่ำลงแต่จะไม่ลดลงอย่างรวดเร็วเหมือนใน 24 ชั่วโมงแรก และมีค่าพีเอชหลังการหมักครบ 3 วัน คือ 4.54 เมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ผลิตโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อพบว่ามีค่าพีเอชตอนเริ่มต้นการหมัก 6.18 หลังการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยค่าพีเอชลดลงเป็น 5.14 เมื่อการหมักสิ้นสุดมีค่าพีเอชสุดท้าย 4.68 ซึ่งสูงกว่าค่าพีเอชของแหนมที่หมักโดยมีการเติมกล้าเชื้อ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดและค่าพีเอชอย่างมากและรวดเร็วนี้เกิดขึ้นในช่วงแรกของการหมักเท่านั้น ส่วนในวันสุดท้ายของการหมักค่าพีเอชและปริมาณกรดจะไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในผลิตภัณฑ์สามารถเจริญได้ดีในช่วงแรก และเมื่อมาระยะหนึ่งสภาพการหมักเริ่มไม่เหมาะแก่การเจริญ กล่าวคือ กรดที่สร้างขึ้นในปริมาณมากทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกเอง รวมถึงจุลินทรีย์อื่นที่อยู่ในการหมักด้วย เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ที่ไปผ่านการอบแห้ง พบว่า ค่าพีเอชสูงขึ้นเล็กน้อยทั้งในสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อ เนื่องมาจากว่าค่าพีเอชเป็นการวัดความสามารถในการแตกตัวให้โปรตอน (H^+) เมื่อละลายน้ำ แต่ผลิตภัณฑ์แหนมเมื่อนำไปทำแห้งมีผลทำให้เนื้อสัมผัสของแหนมแข็งขึ้น การที่น้ำจะซึมเข้าเนื้อของแหนมจะไม่ดีเท่ากับตอนก่อนอบ ปริมาณกรดที่อยู่ในเนื้อจะออกมาในปริมาณที่น้อยลง จึงทำให้ค่าพีเอชที่วัดได้มีค่าสูงขึ้น ผลของปริมาณกรดที่เพิ่มสูงขึ้นหลังการอบนี้เนื่องมาจากตัวอย่างหลังผ่านการอบแห้งจะมีปริมาณเนื้อสารที่มากกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการอบแห้งที่เทียบน้ำหนักตัวอย่างที่เท่ากัน จึงทำให้ได้ตัวอย่างที่มีปริมาณกรดที่มากกว่าในน้ำหนักที่เท่ากัน เมื่อทำการไตเตรทจึงทำให้มีกรดที่ทำปฏิกิริยากับด่างในปริมาณที่มากขึ้น จึงมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์กรดมีค่าสูงขึ้น ซึ่งการอบแห้งของตัวอย่างแหนมที่ใช้เวลาอบแห้งมากขึ้น จึงทำให้มีการระเหยน้ำ

ออกจากตัวอย่างมากขึ้น ยิ่งทำให้ผลของปริมาณกรดที่น้ำหนักแหนมที่นำมาตรวจสอบในน้ำหนักเดียวกันมีมากขึ้นตามไปด้วย แต่ค่าพีเอชนั้นไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก และค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

หมายเหตุ 0 หมายถึง ส่วนผสมแหนมที่ยังไม่ผ่านการหมัก

3 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน

dry2 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 2 ชั่วโมง

dry4 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 4 ชั่วโมง

dry6 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 6 ชั่วโมง

dry8 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 8 ชั่วโมง

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ

P. pentosaceus TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

3.3.2 ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้น ของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง พบว่า แหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ไม่ว่าอยู่ในช่วงการหมักก่อนอบแห้ง และหลังการอบแห้งครบ 8 ชั่วโมง เนื่องมาจากไส้บรรจุที่ใช้เป็นพลาสติกที่ยอมให้อากาศ และน้ำผ่านเข้าออกได้ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ที่แล้วมาอบแห้ง โดยนำออกจากถุงสุญญากาศ แหนมที่ผลิตโดยมีการเติมกล้าเชื้อ และไม่มีการเติมกล้าเชื้อมีค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และ ค่าความชื้นที่ไม่แตกต่างกันที่ระยะเวลาอบแห้งเท่ากัน การอบแห้งนานขึ้นทำให้น้ำในผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง (ตารางที่ 5) ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ของผลิตภัณฑ์ที่อบแห้งนาน 8

ชั่วโมง มีค่า 0.935 ซึ่งลดลงจากตอนเริ่มต้นประมาณ 0.03 และมีค่าความชื้น 50-51 เปอร์เซ็นต์ ลดต่ำลงจากตอนเริ่มต้นประมาณ 18-19 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้ไส้บรรจุแบบที่ยอมให้น้ำ และอากาศผ่านได้นี้ เหมาะกับผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาอบแห้ง เพราะสามารถนำเข้าอบได้เลยโดยไม่ต้องแกะผลิตภัณฑ์ออกจากไส้บรรจุที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการผลิต

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้ และค่าความชื้นของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

เวลาที่ใช้ในการผลิต	ค่าวอร์เตอร์แอคติวิตี้		ค่าความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	
	M^{ns}	MS^{ns}	M^{ns}	MS^{ns}
0	0.97	0.98	70.4	69.7
3	0.96	0.97	68.5	68.8
dry2	0.96	0.96	60.4	59.1
dry4	0.94	0.95	57.5	56.4
dry6	0.94	0.94	54.8	54.0
dry8	0.94	0.94	51.3	50.9

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

0 หมายถึง แหนมที่ยังไม่ผ่านการหมัก

3 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน

dry2 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 2 ชั่วโมง

dry4 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 4 ชั่วโมง

dry6 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 6 ชั่วโมง

dry8 หมายถึง แหนมที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 3 วัน และผ่านการอบแห้ง 8 ชั่วโมง

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^6$ cfu/g

3.3.3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ผลการทดสอบการอบแห้งแหนมกึ่งแห้งที่หมักครบ 3 วัน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าแหนมหลังอบที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 6 ชั่วโมงมีรูปลักษณะที่เหมาะสมที่สุด อีกทั้งยังปลอดภัยจากเชื้อก่อโรคอย่างซัลโมเนลลา และถึงแม้ว่าการอบแห้งที่ระยะเวลาอื่นจะปราศจากเชื้อดังกล่าวเช่นกัน แต่ที่ระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ยังคงมีปริมาณน้ำมากไป และที่ 8 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะที่แข็งเกินไป จึงได้ทำการนำแหนมที่ผ่านการอบแห้งดังกล่าวไปทำการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบ 70 คน ให้คะแนนความชอบ 5 ระดับ ในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนลักษณะปรากฏที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) โดยให้คะแนนในสูตรที่มีการเติมกล้าเชื้อมากว่า (ตารางที่ 6) เนื่องมาจากว่าการใช้กล้า

เชื้อในการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่าการไม่เติมกล้าเชื้อ เมื่อนำไปอบแห้งจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อมีช่องว่างระหว่างชิ้นเนื้อมากกว่า สำหรับลักษณะอื่นๆ คือ สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส การยอมรับโดยรวม พบว่าแหนมที่ผลิตทั้งเติม และไม่เติมกล้าเชื้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้พอสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 นี้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมเพื่อให้ได้แหนมที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคมากยิ่งขึ้น การอบแห้งหลังจากการหมักครบ 3 วันโดยใช้กล้าเชื้อ แล้วมาทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้งแบบใหม่ที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากกว่าแหนมที่ไม่ใช้กล้าเชื้อ อีกทั้งยังได้แหนมผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลลาที่ปนเปื้อนและหลงเหลืออยู่หลังการหมัก และวิธีการผลิตไม่ยุ่งยากนัก อีกทั้งยังเป็นการช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์แหนมสดที่อาจเหลือมากตามท้องตลาดให้เป็นแหนมกึ่งแห้งรูปแบบใหม่ให้แก่ผู้ผลิตได้นำไปใช้ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมกึ่งแห้ง

ตัวอย่าง	คะแนน					
	ลักษณะปรากฏ	สี^{ns}	กลิ่นรส^{ns}	ความเปรี้ยว^{ns}	เนื้อสัมผัส^{ns}	การยอมรับโดยรวม^{ns}
M	3.2^{b}	3.5	3.4	3.4	3.3	3.5
MS	3.6^{a}	3.5	3.2	3.5	3.1	3.4

หมายเหตุ a,b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($p>0.05$)

M หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิต และหมักโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

MS หมายถึง แหนมที่ใช้หนังหมูบดในการผลิตที่มีการเติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 $2x10^{6}$ cfu/g

3.4 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้น *P. pentosaceus* TISTR 536และการทำแห้งของผลิตภัณฑ์แหนมโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้บริโภคชอบแหนมสูตรหนังหมูบดในด้านเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวมมากกว่าหนังหมูเส้น เมื่อนำแหนมหนังหมูบดมาทำการผลิตแบบกึ่งแห้งเปรียบเทียบระหว่างการหมักโดยเติมและไม่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 พบว่า ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบในเรื่องของลักษณะปรากฏของแหนมกึ่งแห้งที่เติมกล้าเชื้อมากกว่าแหนมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ($p \leq 0.05$) แต่ในลักษณะอื่น ๆ คือ สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งข้อมูลการศึกษาดังกล่าว และขั้นตอนการผลิตแหนมกึ่งแห้งนี้ อาจเป็นแนวทางหนึ่งให้โรงงานผลิตแหนมสามารถนำไปใช้ดัดแปลงผลิตภัณฑ์ให้เป็นแหนมกึ่งแห้งนวัตกรรม ซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และเป็นการช่วยยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตมากจนล้นตลาดให้ยาวนานขึ้น และมีความปลอดภัยต่อการบริโภคจากเชื้อซัลโมเนลลามากกว่าแหนมที่สดแบบดั้งเดิม

การทดลองที่ 2 การใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Lb. salivarius* D 4, *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 ในแหนมเนื้อโคกึ่งแห้ง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการใช้กล้าเชื้อโปรไบโอติก *Lb. salivarius* D 4, *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 เป็นกล้าเชื้อในแหนมเนื้อโคกึ่งแห้ง โดยศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก Coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ยังตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มและการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมากกว่ากลุ่มควบคุมในระหว่างการหมัก แต่ภายหลังการอบที่อุณหภูมิ 50 °C พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่ม ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามภายหลังการอบพบการลดลงของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในวันที่ 1 ของการหมัก ส่วนเชื้อ Coliforms พบว่า ในวันแรกกลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อ Coliforms มากที่สุด ($P<0.05$) แต่ภายหลังการอบพบเชื้อ Coliforms ในปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งจำนวนเชื้อ Coliforms ไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) ในการทดลองครั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มในระหว่างกระบวนการหมัก แต่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มอื่น เช่นเดียวกันกับปริมาณกรดแลกติก พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR มีแนวโน้มน้อยกว่ากลุ่มอื่น

ผลจากการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัส พบว่าทุกกลุ่มมีค่าการยอมรับใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) ทั้งในด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำกล้าเชื้อโปรไบโอติกที่แยกได้มาใช้ในการผลิตแหนมเนื้อโคกึ่งแห้ง ซึ่งนับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด

1. อุปกรณ์และวิธีการ

1.1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1.1 *Lb. salivarius* D 4 ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์และเนื้อสัตว์ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.1.2 *P. pentosaceus* TISTR 536 ได้มาจากโครงการวิจัย คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.1.3 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์และเนื้อสัตว์ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.1.4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์และเนื้อสัตว์ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตแหนมเนื้อโค (น้ำหนักรวม 12.3 กิโลกรัม)

1. เนื้อโค	10	kg
2. ข้าวสุก	800	g
3. กระเทียม	800	g
4. ผงชูรส	20	g
5. พริกสด	400	g
6. น้ำตาลทราย	40	g
7. เกลือฟอสเฟต	20	g
8. ผงเพรก	220	g

1.3. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการผลิตแหนม

1. ไส้บรรจุ collagen และเชือกมัด
2. เครื่องอัดแหนม
3. เครื่องบดเนื้อ รูบดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 mm.
4. เครื่องวัดอุณหภูมิ

1.4. อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (Biohazard, U.S.A)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (BD, U.S.A)
3. เครื่องเขย่า (Shaking Incubator: VS-8408 SFN, Korea)
4. เครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomucher Bag Mixer 400 interscience, France)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Fx-2000i, Japan)
6. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (KMC-1300V, Korea)
7. ไมโครเวฟ (TRX-249M, Korea)
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, Hirayama, Japan)
9. ไมโครปิเปต (Micropipette, Eppendorf, Germany)
10. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven: Memmert, Belgium)
11. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (SANDENIntercool, Thailand)
12. ไมโครปิเปต ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
14. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็น

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. MRS broth (Merck, Germany)
2. Agar (Criterion, U.S.A)
3. $CaCO_3$ 0.5% (Scharlau Chemie S.A., Spain)
4. Chromocult (Merck, Germany)
5. Salmonella-Shigella (SS) agar (Merck, Germany)
6. Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD) agar (Merck, Germany)
7. Salmosyst broth base (SB) (Merck, Germany)
8. Baird - Parker' s media with egg yolk telluite (Merck, Germany)
9. โซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (QReC, New zealand)
10. แอลกอฮอล์ 70 และ 95 %
11. $CaCO_3$ 0.5 %
12. Plate Count Agar (Merck, Germany)
13. Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar) (Criterion, U.S.A)
14. Triple Sugar iron (TSI) agar slant (Merck, Germany)
15. Lysine indole motility (LIM) medium (Merck, Germany)

16. α-Napthol ความเข้มข้น 5 % (Merck, Germany)

17. Methyl Red Voges Proskawer Broth (MR-VP, Merck, Germany)

18. Kovac's indole reagent (Merck, Germany)

19. สารละลาย Kovac (Merck, Germany)

20. α-Napthol ความเข้มข้น 5 % (Merck, Germany)

2. วิธีการทดลอง

2.1. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อโค

เนื้อโคที่นำมาทำแหนม โดยนำเนื้อโคไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำมาทำแหนม

2.2 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

2.2.1 เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ จากสต๊อกเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาละลายน้ำแข็งดูดเชื้อปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS + 1% NaCl broth 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเชื้ออีกครั้งตามวิธีการดังกล่าว และใช้อาหาร MRS agar + 0.5% $CaCo_3$ + 1% NaCl เป็นอาหารแข็งสำหรับเก็บเชื้อแบบ deep tube

2.2.2 เชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากลำไส้เป็ดซึ่งมีคุณสมบัติผลิต แบคเทอริโอซินชนิด abp 118 β ที่เก็บในเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Merck, Germany) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร กลีเซอรอล 30 % 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อจำนวนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่ม 16–18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงนำใส่ลงในแหนมในปริมาณ 10^6 cfu/g โดยใส่เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อแหนม 1 กิโลกรัม

2.2.3 เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหนมเนื้อหมู ซึ่งมีคุณสมบัติผลิตแบคเทอริโอซินชนิด pediocin PA-1 (Swetwiwathana *et al.* 2005) ที่เก็บในเลี้ยงเชื้อ MRS broth (Merck, Germany) เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% โดยใส่เชื้อ 500 ไมโครลิตร และ กลีเซอรอล 30 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อจำนวนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16–18 ชั่วโมง จากนั้น

ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่ม 16–18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.3 ขั้นตอนการผลิตแหนม (ดัดแปลงจาก จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. 2553)

2.3.1 เตรียมแหนมน้ำหนักรวม 12.3 กิโลกรัม ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ คือ เนื้อโคบด 10 กิโลกรัม ข้าวสุก 800 กรัม กระเทียมสด 800 กรัม ผงเพรก 220 กรัม ฟอสเฟต 20 กรัม น้ำตาลทราย 40 กรัม โมโนโซเดียมกลูตาเมท 20 กรัม และพริกสด 400 ผสมส่วนผสมทั้งหมดแล้วนวดเป็นเวลา 10 นาที จนส่วนผสมเหนียว

2.3.2 สำหรับสูตรควบคุม นำแหนมที่ผสมเรียบร้อยแล้ว เข้าเครื่องอัดลงในไส้คอลลาเจนปริมาณแท่งละ 50 กรัมต่อแท่ง มัดปลายของไส้ทั้งสองด้านให้แน่นด้วยเชือกมัด

2.3.3 สำหรับสูตรที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเมื่อผสมแหนมในขั้นตอนที่ 3.1 เรียบร้อยแล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณ 10^6 cfu/g ลงในส่วนผสมของแหนม นวดให้กระจายทั่วแหนมเป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำแหนมที่ผสมแล้วเข้าเครื่องอัดแหนมอัดลงไส้คอลลาเจนแท่งละ 50 กรัมต่อแท่ง มัดปลายทั้งสองด้านด้วยเชือก โดยมีทั้งหมด 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุม ไม่เติมกล้าเชื้อ กลุ่มที่ 2 เติมกล้าเชื้อทางการค้า pacovis RCI-47 กลุ่มที่ 3, 4, 5 และ 6 เติมกล้าเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2, Sb 2, *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *Lb. salivarius* D 4

2.3.4 นำตัวอย่างแหนมทั้ง 6 สูตรเข้าตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6 และ 8) นำไปบ่มที่สภาวะไร้ออกซิเจนโดยใส่ถุงบรรจุแบบสุญญากาศ ทำการวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยา ได้แก่ Coliforms, *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติก ในวันที่ 0, 1, 2, 3 และ 4, โดยวันที่ 4 มีการสุ่มตรวจในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, และ 8 นอกจากนั้นยังทำการตรวจเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างทุกวันตลอดระยะเวลาการหมัก (วันที่ 0, 1, 2, 3 และ 4) และการอบ (ชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6 และ 8)

2.4 การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์ของแหนมเนื้อโค

2.4.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Coliforms และ *E. coli* ด้วยอาหาร Chromocult ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (2006)

สุ่มตัวอย่างแหนม 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อเท น้ำยาเจือจางปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก 1 - 2 ระดับ ตามความเหมาะสม โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 1:10 ในขั้นต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาเจือจาง NaCl 0.85 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่า

หลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง ให้เข้ากันดี จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปนี้ คือ 10^{-3} และ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนอาหารโดยวิธี spread plate เมื่อหน้าของอาหารแห้งตัวนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง การตรวจผลโดยโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร Chromocult ที่มีสีชมพูเป็น Coliforms ส่วนโคโลนีที่เป็นสีม่วงเป็น *E. coli* สำหรับโคโลนีที่สงสัยทำการทดสอบ IMViC test (indole, MR, VP และ citrate) โดยนำจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ *E. coli* มาเก็บโคโลนีเดี่ยวจำนวน 2 โคโลนี และถ่ายลงใน Plate Count Agar slant หลอดละ 1 โคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบแบ่งออกเป็น

1. การทดสอบ indole โดยการถ่ายเชื้อจากอาหาร plate count agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptophan broth แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเติมสารละลาย kovac จำนวน 0.2 - 0.3 มิลลิลิตร ถ้าให้ผลบวกจะปรากฏสีแดงที่ส่วนบนของ tryptophan broth

2. การทดสอบ methyl red และ acetoin (MR-VP) โดยการถ่ายเชื้อจากอาหารใน plate count agar slant ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้

สำหรับ MR ให้เติมสารละลาย methyl red 2 - 3 หยด ลงในสารละลายเชื้อประมาณ 2 มิลลิลิตร ผลบวกจะเกิดสีแดง

สำหรับ VP ให้ถ่ายเชื้อประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 0.1 มิลลิลิตรของ 5 เปอร์เซ็นต์ α-napthol ลงในสารละลายแอลกอฮอล์ และ 40% ของสารละลาย KOH ลงไป ผสมทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงผลบวกจะให้สีชมพูแดง

2.4.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (1995)

นำตัวอย่างแหนมจำนวน 25 กรัม ใส่ลงใน Salmosyst broth base (SB) 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจาก SB 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม Salmosyst selective supplement tablets (SBST) 1 เม็ด เขย่าให้เม็ด SBST ละลายใน SB จนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเขี่ยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง โดยใช้อาหาร XLD agar และ SS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. มาทดสอบทางชีวเคมีโดยการถ่ายโคโลนีต้องสงสัยลงในอาหาร TSI และ LIM

การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี

ดูปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIM medium เชื้อ *Salmonella* spp. จะให้คุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

K = การเกิด alkaline ปลายหลอด (slant) ของอาหาร TSI จะมีสีแดง

A = การเกิด acid ก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S^+ = ในหลอดอาหาร TSI จะเกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่ง *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะให้ผล +

H_2S^- = ในหลอดอาหาร TSI จะไม่เกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์

Gas^+ = มีฟองอากาศดันวุ้นของอาหาร TSI เนื่องจาก *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและแก๊สเพียงเล็กน้อย

Gas^- = ไม่มีฟองอากาศดันวุ้นของอาหาร TSI

$Lysine^+$ = อาหารจะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. มีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้นมีผลทำให้ brom cresol purple ซึ่งใช้เป็น indicator ในอาหารดังกล่าวและมี pH เป็นกลาง มีสีม่วงเข้มมากยิ่งขึ้นซึ่ง *Salmonella* spp. จะมีเอมไซม์นี้

$Lysine^-$ = หลอดอาหารจะมีสีเหลืองเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. ไม่มีเอนไซม์ lysine decarboxylase ไปย่อย lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีค่า pH ต่ำมากขึ้น มีผลทำให้สีม่วงของ brom cresol purple เปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง

$Indole^+$ = จะมีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac

$Indole^-$ = จะไม่มีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac ซึ่ง *Salmonella* spp. ไม่มีเอมไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ Kovac

$Motile^+$ = หลอดอาหาร LIM จะขุ่นทั้งหลอด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp.ส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ดังนั้น เมื่อทำการ stab เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการเคลื่อนที่จากรอย stab ไปทุกทิศทุกทางจึงทำให้หลอดขุ่น

$Motile^-$ = หลอดอาหาร LIM จะมีการเจริญบริเวณรอย stab เท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบรอย stab จะใสทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ จึงเจริญบริเวณรอย stab เท่านั้น

2.4.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Staphylococcus aureus* ดัดแปลงจากวิธีของ BAM (2001)

ชั่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อเทน้ำยาเจือจางปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก1-2 ระดับตามความเหมาะสมโดยใช้ปิเปตเชื้อดูดตัวอย่างเจือจาง 1:10 ในขั้นต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาเจือจาง NaCl 0.85 % ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง ให้เข้ากันดี จะได้

ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} (1:100) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปนี้ คือ 10^{-3} (1:1,000) และ 10^{-4} (1:10,000) ตามลำดับ ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนอาหาร Baird – Parker ที่เติมด้วย egg yolk และ tellulite ที่ระดับความเจือจางละ 3 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว ตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับความเจือจางที่ต้องการ หากทำการเขี่ยเชื้อแล้วตัวอย่างไม่ซึมลงไปในวุ้นให้วางจานเพาะในตู้บ่มนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงกลับจานเพาะเชื้อคว่ำลง นำเชื้อเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-48 ชั่วโมง ตรวจนับเฉพาะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* โดยโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* มีลักษณะกลมนูน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร มีตะกอนขุ่นรอบๆ โคโลนี ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ lecithinase ทำให้เกิดปฏิกิริยากับเลซิทินในไข่แดงที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดตะกอนของเกลือฟอสเฟต เห็นเป็นตะกอนขุ่น ที่เรียกว่า opaque หรือ creamy zone และมักพบโซนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อถัดจาก opaque zone ในตัวอย่างอาหารแช่แข็งและอาหารแห้ง โคโลนีของเชื้ออาจเกิดสีดำช้ากว่าปกติและขอบไม่เรียบได้

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของ *Staphylococcus aureus* ดัดแปลงจากวิธีของ BAM (2001)

Subculture เชื้อลงใน Brain heart infusion broth (BHI broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเชื้อในหลอดที่มี BHI broth และหลอดอาหาร TSA slant (สำหรับการทดสอบซ้ำ) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูด Coagulase plasma with EDTA ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อที่มี BHI broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องมาจากเอนไซม์ Coagulase (Coagulase positive) ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น ซึ่งอาจจะมีลักษณะต่างๆ กัน

2.4.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2006)

สุ่มตัวอย่างแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ผสมด้วยน้ำยาเจือจางปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 : 10 ทำจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว ทั้ง 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร MRS Agar ที่เติม $CaCO_3$ (0.5%) ลงจานเพาะเชื้อปริมาตรจานละ 15 - 20 มิลลิลิตรที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี และรายงานผลเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี

2.5 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพของแหนมเนื้อโค

2.5.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acid) ดัดแปลงจากวิธีการของ นภา โล่ห์ทอง (2529)

นำตัวอย่างแหนมที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดมา 3 กรัม หรือ *ตัวอย่างจากแบบจำลองการหมักแหนม 3 มิลลิลิตร บดแหนมให้ละเอียด แล้วเติมด้วยน้ำกลั่นที่ทำ* การต้มเพื่อไล่คาร์บอนไดออกไซด์แล้ว ลงไป 50 มิลลิลิตร นำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์โดยเติมฟีนอล์ฟธาลีนลงไป 2-3 หยด แล้วนำไปทำการไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH จนกระทั่งได้จุดยุติ (end point) เป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ NaOH แล้วนำไปคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดตามสูตร ทำการตรวจทุกวันของกระบวนการการหมักแหนม

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1{,}000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH ที่ใช้

2.5.2. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ดัดแปลงจากวิธีการของ นภา โล่ห์ทอง (2529)

นำตัวอย่างแหนมที่จะทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างปริมาณ 3 กรัม บดแหนมให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร นำส่วนใสไปทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ ทำการตรวจทุกวันของกระบวนการการหมักแหนม

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

แหนมกึ่งแห้ง คือ แหนมที่เกิดกระบวนการหมัก 3 วัน ภายหลังการหมักนำแหนมไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งขึ้น แต่กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกยังคงสามารถมีชีวิตรอดในแหนม จึงเป็นการเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคและเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ไม่รับประทานแหนมดิบ

3.1 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในแหนมกึ่งแห้ง

จากการทดลองกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่เติมกล้าเชื้อ โดยให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นจากการใช้เชื้อธรรมชาติที่มีอยู่ในวัตถุดิบ กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อทางการค้าโดยเติมกล้าเชื้อชื่อทางการค้า *Pacovis* RCI-47 ส่วนอีก 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติกที่แยกได้โดยศูนย์เครือข่ายและการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ ได้แก่ เชื้อ *Lc. lactic* subsp. *lactis* P 2, *P. pentosaceus* TISTR 536, *Lc. lactic* subsp. *lactis* Sb 2 และ *Lb. salivarius* D4 ผลจากตารางที่ 7 พบว่า กลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเริ่มต้นน้อยที่สุด ($P<0.05$) เมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อทุกกลุ่ม ในขณะที่กลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อ P 2, Sb 2 และ D 4 มีแนวโน้มจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกมากกว่าแหนมกึ่งแห้งกลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อทางการค้าและกล้าเชื้อ P 536 เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นพบจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มการทดลองจนถึงวันที่ 4 ก่อนการอบ อย่างไรก็ตามเมื่อนำแหนมไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 8 ชั่วโมง พบการลดลงของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเล็กน้อยโดยทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ซึ่งมีค่าระหว่าง 7.18-7.56 log cfu/g จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ากล้าเชื้อ P 2, Sb 2 และ D 4 สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 42, 42 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ P 2, Sb 2, D 4 และ P 536 สามารถทนต่อค่า pH เท่ากับ 4.8 ได้นาน 4 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อแบคทีเรียกรดแลกติก (log cfu/g) ในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก		ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8)
Control	4.50±0.46^{c}	8.08±0.60^{c}	7.98±0.64	7.18±0.78
Pacovis RCI - 47	5.23±0.56^{b}	8.70±0.22^{a}	8.23±0.49	7.34±0.59
P 2	5.87±0.12^{a}	8.35±0.20^{b}	8.06±0.47	7.40±0.73
P 536	5.18±0.66^{b}	8.35±0.22^{b}	8.11±0.13	7.27±0.67
Sb 2	5.52±0.71^{ab}	8.37±0.30^{b}	8.17±0.72	7.40±0.74
D 4	5.69±0.28^{a}	8.31±0.27^{b}	8.20±0.59	7.56±0.40

$^{a-b}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

3.2 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนโคลิฟอร์มในแหนมกึ่งแห้ง

จากผลการทดลองในตารางที่ 8 พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มในวันแรกในกลุ่มควบคุมสูงที่สุดคือ 4.51 log cfu/g ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ โดยจำนวนโคลิฟอร์มเริ่มต้นในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมีจำนวนใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) ซึ่งกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ Sb 2 มีแนวโน้มจำนวนโคลิฟอร์มเริ่มต้นต่ำสุด แต่เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นในวันที่ 1 และ วันที่ 4 (ก่อนการอบแหนม) พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนโคลิฟอร์ม อย่างไรก็ตามเมื่อแหนมผ่านการอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบการลดลงของเชื้อโคลิฟอร์มโดยในกลุ่มที่เติมกล้าเชื้อ P 2 จะพบอัตรา

การลดลงของโคลิฟอร์มที่มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Sb 2 และ D 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ส่วน P 536 และ กล้าเชื้อทางการค้ามีผลต่อการลดลงของเชื้อน้อยที่สุดในกลุ่มของการใช้กล้าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้พบว่าการใช้กล้าเชื้อทุกเชื้อในการหมักจะให้ผลในการลดปริมาณโคลิฟอร์มได้ดีกว่าการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ ซึ่งการหมักแบบธรรมชาติสามารถลดโคลิฟอร์มได้เพียง 0.10 log cfu/g ขณะที่ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทางการค้าและที่ผลิตแบคเทอริโอซินสามารถลดปริมาณโคลิฟอร์มได้ 0.73 log cfu/g (กล้าเชื้อทางการค้า) ถึง 2.79 log cfu/g (เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactic* P2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มที่ผลิตแบคเทอริโอซินในการหมักอาหารจะช่วยในการควบคุมความปลอดภัยในระหว่างการหมักและยังสามารถยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์หมักนั้นๆ ได้ (Deegan *et al.*, 2006; O'Sullivan *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Swetwiwathana *et al.* (2007) ยังพบว่าการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจะช่วยควบคุมคุณภาพการหมักแหนมให้ปลอดภัยจากเชื้อซัลโมเนลลาได้มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ผลิตแบคเทอริโอซิน แต่อย่างไรก็ตามการใช้กล้าเชื้อในการหมักแหนม ไม่ว่ากล้าเชื้อนั้นจะผลิตหรือไม่ผลิตแบคเทอริโอซิน จะช่วยให้การหมักแหนมปลอดภัยมากกว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ และจากการทดลองของ Veerawatanayotin *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.* Anatum และ *S.* Ratchaburi ในแบบจำลองการหมักแหนม พบว่าการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลคติกนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคเทอริโอซิน ซึ่งสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้นมีผลในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลาการบ่ม 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้หมด ดังนั้นแบคเทอริโอซินและในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดสูงมีผลทำให้เซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคเกิดความเครียดและเกิดการบาดเจ็บหลังจากนั้นเซลล์แบคทีเรียสามารถฟื้นตัว (recover) และเจริญเติบโตต่อไปได้ ในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำส่งผลในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย สภาพที่มีกรดมากเกินไปจึงไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และ Cleveland *et al.* (2001) รายงานว่าการที่สารยับยั้งแบคทีเรียไม่ทำลายการเจริญของตัวมันเอง เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจะมีระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันตัวเองจากแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวอีกประการหนึ่งของแบคเทอริโอซิน จากการทดลองของ ชนัญญา กงทะสร (2547) ได้ศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการใช้กรดแลคติกต่อการลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร โดยใช้แบคเทอริโอซินชนิด pediocin PA-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 พบว่าการใช้กรดแลกติก 1% เพียงอย่างเดียวนั้นไม่ทำให้ปริมาณเชื้อ *S.* Derby ลดลงได้มากขึ้น ส่วนการใช้ pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวนั้นจะต้องใช้ที่ระดับความ

เข้มข้น 640 AU/ml ขึ้นไปจึงจะให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้น หรือหากใช้ในระดับต่ำกว่านี้ (320 AU/ml) จะต้องปล่อยให้เชื้อสัมผัสสารนานถึง 12 ชั่วโมงก่อน แต่ถ้าใช้กรดแลกติก 1% ร่วมกับ pediocin PA-1 แล้ว พบว่าประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *S.* Derby เพิ่มสูงขึ้นมากเนื่องจาก synergistic effect ระหว่างกรดแลกติก และ pediocin PA-1 แต่อย่างไรก็ตามการอบแหนมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความร้อนอาจไม่ได้สัมผัสกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกโดยตรง เนื่องจากว่าแหนมมีเนื้อโค และวัตถุดิบต่างๆ ที่ใช้ ซึ่งส่วนใหญ่ความร้อนจะสัมผัสกับบริเวณด้านนอกของแหนม จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งโคลิฟอร์มได้มากนัก โดย Schraft and Watterworth (2005) กล่าวว่า โคลิฟอร์มซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultatively anaerobic) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 35 องศาเซลเซียส จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการใช้สารผสมองสารละลายกรดแลกติกร่วมกับสาร Pediocin PA-1 ในอาหาร TSB ที่ใช้กรดแลกติกเข้มข้น 0.5 % และ 1 % จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซัลโมเนลลาและก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกหรือสาร Pediocin PA-1 เพียงตัวเดียว เนื่องจากสารละลายกรดที่ใช้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วน outer membrane ของเซลล์เชื้อซัลโมเนลลา ทำให้ส่วน outer membrane ถูกทำให้เกิดรูรั่วทำให้สาร Pediocin PA-1 สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ซัลโมเนลลาได้และทำให้เกิดการทำลายและการบาดเจ็บของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่ง Stevens *et al.* (1991) กล่าวว่า ประสิทธิภาพของสาร nisin เพียงตัวเดียว โดยไม่ใช้ร่วมกับสารเคมีอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพต่ำต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบ เช่น *E. coli* 0157:H7 และ *Salmonella* spp.

ตารางที่ 8 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อจำนวนโคลิฟอร์ม (log cfu/g) ในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก		ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8)
Control	4.51±1.03^{a}	6.09±0.27^{a}	5.63±0.13^{a}	4.61±0.17^{a}
Pacovis RCI - 47	3.89±0.66^{b}	4.62±0.36^{c}	4.76±0.65^{c}	3.16±0.58^{ab}
P 2	4.06±0.64^{b}	4.98±0.30^{b}	4.87±0.31^{bc}	1.27±1.97^{c}
P 536	3.91±0.64^{b}	5.66±0.75^{ab}	5.46±0.66^{ab}	4.66±0.10^{a}
Sb 2	3.68±0.21^{b}	5.65±0.68^{ab}	4.55±0.19^{c}	1.72±2.66^{ac}
D 4	3.74±0.23^{b}	5.18±0.69^{cd}	5.47±0.71^{ab}	2.30±1.89^{ac}

$^{a-b}$ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{a-c}$ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

ตารางที่ 9 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่ออัตราการลดลงของโคลิฟอร์ม (log cfu/g) ในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก	ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 1	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8)
Control	1.58	1.12	0.10
Pacovis RCI - 47	0.73	0.87	0.73
P 2	0.92	0.81	2.79
P 536	1.75	1.55	0.75
Sb 2	1.97	0.87	1.96
D 4	1.44	1.73	1.44

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

3. ผลของกล้าเชื้อต่อค่าความเป็นกรดด่างในแหนมกึ่งแห้ง

ค่าความเป็นกรดด่างของแหนมเนื้อโคในระหว่างกระบวนการหมักวันแรกทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันคือมีค่าระหว่าง 5.30-5.57 เมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 3 วัน ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างต่อเนื่องในทุกกลุ่ม แต่ค่าความเป็นกรดด่างในทุกกลุ่มมีค่ามากกว่า 4.6 ซึ่งตามมาตรฐาน มกอช. กำหนดว่าค่าความเป็นกรดด่างในแหนมต้องไม่เกิน 4.6 ภายหลังการหมัก 3 วัน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่ากล้าเชื้อ P 2, Sb 2, D 4 และ P 536 สามารถทนต่อค่า pH เท่ากับ 4.8 ได้นาน 4 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่า กลุ่มควบคุมมีแนวโน้มค่าความเป็นกรดด่างสูงที่สุด (4.95) ในขณะที่กลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อ *Pacovis* RCI – 47, P 2, P 536, Sb 2 และ D 4 มีค่า 4.78, 4.73, 4.98, 4.76 และ 4.89 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำแหนมไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบการแนวโน้มการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างเป็นยกเว้นแหนมกึ่งแห้งที่ใช้กล้าเชื้อ P 536 ซึ่งยังคงมีค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงค่าในวันที่สามของการหมัก ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และ 11 โดยในวันแรกของการหมัก ค่า pH จะไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากกระบวนการหมักยังไม่เกิดขึ้นและหลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วและเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ค่า pH มีแนวโน้มลดลงน้อยกว่า

ในช่วงแรกของการหมัก เนื่องมาจากกรดแลกติกที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลกติกทำให้ค่า pH ลดลงและแบคทีเรียกรดแลกติกเจริญช้าลงด้วย จึงทำให้ในช่วงหลังของการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH น้อยกว่าในช่วงแรกของการหมัก (พรพิมล เทียนทอง. 2548)

ตารางที่ 10 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อค่า pH ในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก				ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 ชั่วโมงที่ 8)
Control	5.57±1.18^{a}	4.92±0.91	4.66±0.88	4.95±0.17^{a}	4.61±0.38^{ab}	4.48±0.62^{j}
Pacovis RCI – 47	5.30±1.62^{c}	4.79±0.75	4.76±0.46	4.78±0.07^{bc}	4.35±0.65^{b}	4.50±0.20^{ij}
P 2	5.35±1.61^{bc}	4.94±0.48	4.77±0.47	4.73±0.09^{c}	4.47±0.22^{ab}	4.51±0.45^{ij}
P 536	5.52±1.42^{ab}	5.00±0.87	4.77±0.76	4.98±0.24^{a}	4.74±0.45^{ab}	4.80±0.13^{i}
Sb 2	5.52±1.39^{ab}	4.86±0.68	4.70±0.44	4.76±0.12^{c}	4.40±0.55^{b}	4.60±0.20^{ij}
D 4	5.42±1.60^{abc}	4.80±0.98	4.86±0.38	4.89±0.17^{ab}	4.84±0.33^{a}	4.65±0.09^{ij}

$^{a-b}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

$^{a-c}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

ตารางที่ 11 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่ออัตราการลดลงของค่า pH ในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก			ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8)
Control	0.65	0.91	0.62	0.96	1.09
Pacovis RCI – 47	0.51	0.54	0.52	0.95	0.8
P 2	0.41	0.58	0.62	0.88	0.84
P 536	0.52	0.75	0.54	0.78	0.72
Sb 2	0.66	0.82	0.76	1.12	0.92
D 4	0.62	0.56	0.53	0.58	0.77

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR

536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

4. ผลของการใช้กล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในแหนมกึ่งแห้ง

จากตารางที่ 12 พบปริมาณกรดทั้งหมดในแหนมทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน ($P>0.05$) เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นพบปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มจนภายหลังการอบแหนม 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบปริมาณกรดทั้งหมดและอัตราการเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 13) ของปริมาณกรดทั้งหมดในกลุ่มที่ใช้กล้าเชื้อมากกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเปลี่ยนแหล่งพลังงานคาร์โบไฮเดรตจากวัตถุดิบไปเป็นกรดแลกติกได้ในปริมาณมากกว่า จึงทำให้กลุ่มที่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกโดย Holck *et al.* (2011) กล่าวว่า กล้าเชื้อที่สามารถผลิตกรดได้พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด facultative heterofermentative ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติก และกรดอะซีติกได้ การใช้น้ำตาลกลูโคส (0.4-0.7%) เป็นส่วนผสมในการผลิตผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เพื่อทำให้เป็นที่แน่ใจว่าจะเกิดการสร้างกรดแลกติกออกมาอย่างรวดเร็วและเพียงพอที่จะทำให้กระบวนการหมักเป็นไปอย่างสมบูรณ์ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกปริมาตร 10^6 log cfu/g ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก จะทำให้มีแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มจำนวนมากขึ้นถึง 10^8-10^9 cfu/g และมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงถึง 4.7-4.8 ภายใน 2-3 วัน ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงอย่างรวดเร็วนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการหมัก และกระบวนการหมักที่มีอุณหภูมิและสภาวะการหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลกติกอีกทั้งยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Nissen and Holck. 1998)

ตารางที่ 12 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่อปริมาณกรดทั้งหมดในแหนมกึ่งแห้ง

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก				ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่0)	วันที่ 4 ชั่วโมงที่ 8)
Control	0.60±0.26	0.96±0.31^{ab}	0.86±0.31^{d}	1.09±0.27	1.26±0.27^{cf}	1.01±0.34^{b}
Pacovis RCI – 47	0.59±0.09	0.84±0.21^{b}	1.21±0.32^{a}	0.99±0.68	1.21±0.31^{ab}	1.13±0.42
P 2	0.68±0.11	0.81±0.24^{b}	1.13±0.38^{a}	1.08±0.60	1.34±0.21^{a}	1.22±0.42
P 536	0.65±0.17	0.83±0.23^{b}	0.86±0.31^{b}	1.08±0.12	1.20±0.30^{ab}	1.17±0.48
Sb 2	0.59±0.19	1.01±0.23^{a}	1.11±0.20^{a}	1.21±0.31	1.12±0.17^{b}	1.12±0.43
D 4	0.64±0.17	0.92±0.16^{ab}	0.93±0.21^{b}	1.21±0.28	1.33±0.27^{ab}	1.21±0.42

$^{a-h}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

ตารางที่ 13 ผลของการเติมกล้าเชื้อต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมด

กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาการหมัก			ระยะเวลาการอบ (50 °C)	
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 0)	วันที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8)
Control	0.36	0.26	0.49	0.66	0.41
Pacovis RCI – 47	0.25	0.62	0.4	0.62	0.54
P 2	0.13	0.45	0.4	0.66	0.54
P 536	0.18	0.21	0.43	0.55	0.52
Sb 2	0.42	0.52	0.62	0.53	0.53
D 4	0.28	0.29	0.57	0.69	0.57

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

เมื่อทำการตรวจสอบหาเชื้อในกลุ่มที่เป็นดัชนีย์บ่งชี้ถึงสุขลักษณะการผลิต เช่น *Escherichia coli* โดยวิธี spread plate เริ่มต้นระดับความเจือจาง 1 : 10 และเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในผลิตภัณฑ์ เช่น *Staphylococcus aureus* โดยวิธี spread plate เริ่มต้นระดับความเจือจาง 1 : 10 พบว่า ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาทั้งหมดตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว ดังตารางที่ 14 และ 15 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังตรวจไม่พบซัลโมเนลลา โดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่าง 25 กรัม จากตัวอย่างทั้งหมดอีกด้วย (ไม่ได้แสดงผลวิเคราะห์) ซึ่งเป็นไปได้ว่า การศึกษาในครั้งนี้ ได้ใช้เนื้อโคชำแหละจากแหล่งที่มีสุขลักษณะและการจัดการเตรียมตัวอย่างที่ดี รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตก่อนการหมัก ผ่านการลวกด้วยน้ำร้อนก่อนการเตรียมใส่กล้าเชื้อแต่ละครั้ง จึงทำให้ไม่พบเชื้อกลุ่มดังกล่าวในการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงก่อนการหมักในวันที่ 0

ตารางที่ 14 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อจำนวนเชื้อ *Escherichia coli* ในผลิตภัณฑ์แหนมแห้ง

กลุ่มทดลอง	วันที่ 0	วันที่1	วันที่ 4 (ชม.)				
			0	2	4	6	8
Control	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Pacovis RCI – 47	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
P 2	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
P 536	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
D 4	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Sb 2	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าจากการตรวจที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อจากการ spread plate บนอาหาร Chromocult ที่ระดับความเจือจาง 1:10

ตารางที่ 15 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อจำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus* ใน ผลิตภัณฑ์แหนมแห้ง

กลุ่มทดลอง	วันที่ 0	วันที่1	วันที่ 4 (ชม.)				
			0	2	4	6	8
Control	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Pacovis RCI – 47	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
P 2	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
P 536	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
D 4	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Sb 2	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าจากการตรวจที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อจากการ spread plate บนอาหาร Baird Parker medium ที่ระดับความเจือจาง 1:10

5. ผลของการใช้กล้าเชื้อต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสในแหนมกึ่งแห้ง

จากจำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสเบื้องต้นจำนวน 30 คน พบว่า ผู้บริโภคให้ความชอบต่อสีของผลิตภัณฑ์จากตัวอย่างแหนมเนื้อที่เติมกล้าเชื้อ Sb 2 มากที่สุด รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างที่ไม่เติมกล้าเชื้อและตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ P 536 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อทางการค้า ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบทางด้านสีต่ำที่สุด แต่กลิ่น ผู้ทดสอบให้ความชอบในตัวอย่างแหนมเนื้อที่เติมกล้าเชื้อ P 536 มากที่สุด รองลงมาได้แก่ แหนมเนื้อที่เติมกล้าเชื้อ Sb 2 สำหรับเนื้อสัมผัส ผู้บริโภคให้คะแนนต่อแหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ Sb 2 มากที่สุด รองลงมาได้แก่ แหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ P 536 ส่วนลักษณะสัมผัสนั้น ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบในแหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ P 536 รองลงมามีถึง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ แหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ Sb 2 แหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ P 2 และ แหนมเนื้อที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ เมื่อถามถึงความชอบของผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 ที่ทำการศึกษา พบว่า ผู้ทดสอบให้ความชอบในแหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ Sb 2 มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ แหนมเนื้อที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ แหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ P 536 และ P 2 ตามลำดับ โดยผู้บริโภคไม่ยอมรับแหนมเนื้อที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมจากต่างประเทศมากที่สุด ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์แหนมแห้ง

กลุ่มทดลอง	สี	กลิ่น	รสชาติ	ลักษณะเนื้อสัมผัส	โดยรวม
Control	3.67	3.18	3.52	3.45	3.55
Pacovis RCI-47	2.37	3.20	3.15	3.37	3.15
P 2	2.95	3.20	3.40	3.45	3.52
P 536	3.38	3.30	3.52	3.63	3.52
D 4	3.13	3.02	3.22	3.27	3.27
Sb 2	3.82	3.25	3.57	3.45	3.68

Control = แหนมหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมกล้าเชื้อ, *Pacovis* RCI-47 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อผสมทางการค้า, P 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2, P 536 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, D 4 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus salrivarius* D 4, Sb 2 = แหนมที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

หมายเหตุ คะแนน 1 = ไม่ชอบมาก
คะแนน 2 = ไม่ชอบ
คะแนน 3 = เฉยๆ
คะแนน 4 = ชอบ
คะแนน 5 = ชอบมาก

4. สรุป

จากข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พอสรุปได้ว่ากล้าเชื้อต่างประเทศที่ต้องนำเข้าไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในการผลิตแหนมแบบไทย เนื่องจากนอกจากจะมีราคาสูง เชื้อที่ได้อาจไม่สามารถทนต่อองค์ประกอบในการผลิตแหนม จึงทำให้ผู้ทดสอบไม่ยอมรับ การใช้กล้าเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลา เช่น *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 และ P 2 และที่คัดแยกได้จากแหนมซึ่งเป็นอาหารหมักของไทย เช่น *P. pentosaceus* TISTR 536 เชื้อเหล่านี้เป็นที่ยอมรับพอ ๆ กับแหนมเนื้อที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ และทดสอบแล้วว่ามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้พัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักให้มีตัวเลือกในท้องตลาดมากยิ่งขึ้น ไม่ว่าจะเป็นด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ รวมถึงคุณประโยชน์ในด้านโปรไบโอติกจากตัวกล้าเชื้อที่ใช้ นอกจากนี้ ถ้าเชื้อกลุ่มดังกล่าวมีการสนับสนุน ผลักดันให้เป็นที่นิยมใช้ในกลุ่มผู้ผลิตแล้ว อาจมีอุตสาหกรรมการผลิตกล้าเชื้อขายในประเทศมากขึ้น และไม่จำเป็นต้องนำเข้ากล้าเชื้อจากต่างประเทศ

5. เอกสารอ้างอิง

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ. 2553. เอกสารประกอบการอบรมการแปรรูปเนื้อสัตว์ ครั้งที่ 3. ระหว่างวันที่ 29 ตุลาคม - 1 พฤศจิกายน 2553 คณเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 95 หน้า.

ชนัญญา กงทะสร. 2547. "ผลของแบคเทอริโอซินร่วมกับกรดแลคติกต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นภา โล่ห์ทอง. 2529. ปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 425 หน้า.

พรพิมล เทียนทอง. 2548. "ผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ต่อเชื้อซาลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมแบบดั้งเดิมและการผลิตแหนมกึ่งแห้ง." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า คุณทหารลาดกระบัง.

เยาวลักษณ์ สรุพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เรณู ทวิชชาติวิทยากุล. 2539. "ผลของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Anatum." วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิพัตม์ รักษ์เผ่า. 2539. "ผลของเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมต่อการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus*." วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2518. "การศึกษาจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการในระหว่างการทำแหนม." วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. "ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อ *Salmonella* ในการหมักแหนม." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

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

AOAC. 1995. "Chaper 17 AOAC Official Method 17.9.01." p. 55. In Cunniff, P. Official methods of analysis of AOAC international. Virginia: AOAC international.

AOAC. 2006. "Chaper 17 AOAC Official Method 966.23c(a)-24." p. 5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC international. Maryland: AOAC international.

BAM. 2001. "Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 12 on *Staphylococcus aureus*." U.S. Food and Drug Administration. January. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM. 1/09/2011

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

Deegan,L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. 2006. Bacteriocins : Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int. Dairy J.** 16 : 1058-1071.

Holck, A.L., Axelsson, L., Rode, T.M., Høy, M., Måge, I., Alvseike, O., L'Abée-Lund, T. M., Omer, M.K., Granum, P. E. and Heir, E. 2011. "Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages." **Meat Sci.** 89 : 286-295.

Jay, J.M. 2000. Modern Food Microbiology. 6th. ed. Chapman & Hall. London.

Nissen, H. and Holck, A. 1998. "Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage." **Food Microbiol.** 15 : 273-279.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochemie**. 84 : 593-604.

Petchsing, U. and Woodburn, M.J. 1990. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli in nham* (Thai- style fermented pork sausage). **Int. J. Food Microbiol.** 10(3-4): 183-192.

Schraft, H. and Watterworth, L.A. 2005. "Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3Mk Petrifilm plates with standard plating procedures." **J. Microbiol. Meth.** 60 : 335-342.

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.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., and Fischer, A. 1999a. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. **Fleischwirtschaft**. 1 : 26-29.

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

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2004. "Effect of garlic and nitrite on Pediocin PA-1 production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the growth of *Salmonella* Anatum in stimulated nham fermentation." *In* **Proceedings of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development**.. Bangkok, Thailand. 25-26 August 2004

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

Veerawatanayotin, S., Jindaprasert, A., Pilasombut, K., Sethakul, J. and Swetwiwathana, A. 2010. "Effect of Pediocin PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and *S.* Ratchaburi in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) Model Broth." *In* **Proceeding of 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)**. Jeju, Korea. August 2010.