การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

Microbial Selection for Production of Fermented Sausage

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์

Patcharin Sartsitisak

เลขหมู่ TS1914.S3 พ.ว 2538 ฉ.2

Order Key.....

BIB Key.....

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Food Technology

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

ผู้เขียน นางสาวพัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ)

.....กรรมการ
(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ)

.....กรรมการ
(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)

.....ลาศึกษาต่อ.....กรรมการ
(อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

ผู้เขียน นางสาวพัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

การหมักไส้กรอกที่มีส่วนผสมประกอบด้วยเนื้อหมู มันแข็ง ข้าวเจ้าหุงสุก พริกไทย กระเทียม ลูกผักชี เกลือ น้ำตาล และสารประกอบไนไตรท์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงจาก 5.80 เป็น 4.50 มีปริมาณกรดในรูปกรดแลกติกจากร้อยละ 0.46 เป็น 1.30 ในวันสุดท้ายของการหมัก จุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 4.30×10^{7} ซีเอฟยู/กรัม สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักคือ 9.70×10^{8} ซีเอฟยู/กรัม ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นจาก 2.70×10^{6} ซีเอฟยู/กรัม เป็น 6.00×10^{8} ซีเอฟยู/กรัม ในวันสุดท้ายของการหมัก จุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก 70.94 % ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* 31.87 %, *L. brevis* 21.76 %, *Lactobacillus spp.* 4.91 %, *L. fermentum* 3.35 %, *Pediococcus pentosaceus* 2.55 %, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 1.70 % และ *Micrococcus spp.* 4.80 % พบแบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบ 23.92 % ยีสต์ 5.14 % คัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 5 ชนิด โดยพิจารณาอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกมาใช้เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกหมักคือ *L. plantarum* 3409 และ 3404, *L. fermentum* 2112 และ 2508, *L. brevis* 3403 และ 3304, *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406, *P. pentosaceus* 3301 และ 2205 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกจากหน่วยบริการเชื้อพันธ์จุลินทรีย์ คือ *L. plantarum* TISTR 50, *L. fermentum* TISTR 55, *Lactobacillus sp.* TISTR 539, *Leu. mesenteroides* TISTR 53 และ *P. pentosaceus* TISTR 419 พบว่าไส้กรอกหมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* จากการคัดเลือกมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่า

การใช้เชื้อจากหน่วยบริการเชื้อพันธ์จุลินทรีย์ ไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์ธรรมชาติ และไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกสายพันธุ์อื่นๆ โดยเฉพาะไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดคือ 4.05 และมีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.33 ในวันสุดท้ายของการหมัก ในขณะที่ไส้กรอกหมักด้วย *L. brevis* 3403 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกสูงที่สุดคือร้อยละ 0.18 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส 10 คุณลักษณะ พบว่า *L. plantarum* 3409 มีคะแนนความแน่นแข็ง การยึดเกาะ รสหวาน รสเปรี้ยว และการยอมรับรวม ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติ และ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนกลิ่นรสเปรี้ยว กลิ่นรสไส้กรอก และการยอมรับรวม ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติเช่นกัน

การใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกัน 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1 พบว่า ไส้กรอกหมักด้วยเชื้อผสม *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 มีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.34 ในวันสุดท้ายของการหมัก และไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกสูงที่สุดคือร้อยละ 0.15 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์รวมกันมีคะแนนความแน่นแข็งสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์เดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) และไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยอมรับรวมใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุด

Thesis Title	Microbial Selection for Production of Fermented Sausage
Author	Miss Patcharin Sartsitisak
Major Program	Food Technology
Academic Year	1994

Abstract

The sausages consisting of pork, pork backfat, rice, pepper, garlic, coriander, salt, sugar and sodiium nitrite were fermented for 3 days at room temperatures. pH of the sausages reduced from 5.80 to 4.50 and acidity (lactic acid) increased from 0.46 % to 1.30 %. The total plate count increased from 4.30×10^{7} cfu/g to the maximum of 9.70×10^{8} cfu/g within day 2 of fermentation while lactic acid bacteria increased from 0.27×10^{7} cfu/g to 6.00×10^{8} in day 3. One hundred and fifteen isolates from fermented sausages were collected and identified. They were Gram-positive 70.94 %; *Lactobacillus plantarum* 31.87 %, *L. brevis* 21.76 %, *Lactobacillus spp.* 4.91 %, *L. fermentum* 3.35 %, *Pediococcus pentosaceus* 2.55 %, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 1.70 % and *Micrococcus spp.* 4.80 %, Gram-negative rod bacteria 23.92 % and yeast 5.14 %

Rate of drop in pH and rate of cell production of each isolate were determined. Two isolates of *L. plamtarum* (3409 and 3404), *L. fermentum* (2112 and 2508), *L. brevis* (3403 and 3304), *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum (2104 and 3406), *P. pentosaceus* (3301 and 2205) were selected along with reference cultures; *L. plantarum* TISTR 50, *L. fermentum* TISTR 55, *L. Spp.* TISTR 539, *Leu. mesenteroides* TISTR 53 and *P. pentosaceus* TISTR 419 to be used as single starter culture for sausage production.

Selected *L. plantarum* and *P. pentosaceus* gave sausage with lower pH than did other cultures. *L. plantarum* 3409 produced the lowest pH of 4.5 and the highest acidity of 1.33 % while *L. brevis* 3403 produced the highest volatile acid of 0.18 %. Sensory evaluation of the sausage was performed for 10 attributes. *L. plantarum* 3409 produced the sausages with firmness, cohesiveness, sweet, sour flavor and acceptability scores closed to the ideal scores. The sausages made with *P. pentosaceus* 2205 had sour and sausage flavors and acceptability closest to the ideal scores.

Mixed cultures of *L. plantarum* 3409 and *P. pentosaceus* 2205 (1:4, 1:1 and 4:1) were used for sausage production. The mixed cultures of *L. plantarum* 3409 and *P. pentosaceus* 2205 (1:4) produced sausage with the highest acidity of 1.34 % while *L. plantarum* 3409 and *P. pentosaceus* 2205 (4:1) produced the highest volatile acid of 0.15 %. Mixed cultures produced sausages with higher firmness scores ($P<0.01$) than did single culture. The sausages made with *L. plantarum* : *P. pentosaceus* (1:1) had acceptability score closest to the ideal score.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร.สุกัญญา จันทะชุม กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำตลอดงานวิจัยและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน รวมทั้งเพื่อนๆ และน้องๆทุกคน ที่ให้ความร่วมมือและเป็นกำลังใจตลอดงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่ให้โอกาสข้าพเจ้ามาโดยตลอด

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ..... (3)

Abstract..... (5)

กิตติกรรมประกาศ..... (7)

สารบาญ..... (8)

รายการตาราง..... (11)

รายการภาพ..... (15)

บทที่

1 บทนำ..... 1

บทนำต้นเรื่อง..... 1

ตรวจเอกสาร..... 3

1. ไส้กรอกและประเภทของไส้กรอก..... 3

2. ส่วนประกอบและหน้าที่ของส่วนประกอบในไส้กรอกหมัก..... 6

3. การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก..... 16

4. แบคทีเรียที่สำคัญในการผลิตไส้กรอกหมัก..... 20

5. การใช้กล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมัก..... 22

6. การใช้กล้าเชื้อกับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทย..... 28

วัตถุประสงค์..... 33

2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ..... 34

วัสดุ..... 34

อุปกรณ์..... 36

วิธีการ..... 37

1. การผลิตไส้กรอกหมัก..... 38

2. การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก..... 40

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก..... 42
4. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ธรรมชาติ และจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์..... 43
5. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และจุลินทรีย์จากธรรมชาติ..... 45
3 ผลและวิจารณ์..... 48
1. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกโดยธรรมชาติ..... 48
2. การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก..... 53
2.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบระหว่างการหมัก..... 53
2.2 การจำแนกชนิดแบคทีเรีย..... 55
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Micrococcus ระหว่างการหมักไส้กรอก..... 62
2.2.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Lactobacillus ระหว่างการหมักไส้กรอก..... 62
2.2.3 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Leuconostoc ระหว่างการหมักไส้กรอก..... 65
2.2.4 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Pediococcus ระหว่างการหมักไส้กรอก..... 66
3. การคัดเลือกแบคทีเรียสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก..... 66
3.1 การคัดเลือก *Lactobacillus plantarum*..... 67
3.2 การคัดเลือก *Lactobacillus fermentum*..... 70
3.3 การคัดเลือก *Lactobacillus brevis*..... 70

3.4 การคัดเลือก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum... 75
3.5 การคัดเลือก *Pediococcus pentosaceus*..... 75
4. การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก..... 81
4.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอก.. 82
4.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตจากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียว..... 104
5. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์..... 114
5.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์..... 114
5.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตจากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์..... 123
4 สรุป..... 128
สรุป..... 128
ข้อเสนอแนะ..... 131
เอกสารอ้างอิง..... 132
ภาคผนวก..... 144
ก. กราฟมาตรฐาน..... 144
ข. ตารางความแปรปรวน..... 149
ค. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส..... 166
ง. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ..... 168
จ. วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี..... 179
ประวัติผู้เขียน..... 186

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1. การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิดในผลิตภัณฑ์เนื้อสด และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 26
2. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลกติก ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PCA และปริมาณแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS 49
3. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอก 54
4. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacillus 58
5. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียง *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 59
6. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียง *Pediococcus pentosaceus* 60
7. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียงจุลินทรีย์ *Micrococcus* spp 61
8. ร้อยละของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกโดยธรรมชาติ 63
9. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404, 1206 และ 2506 68
10. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404, 1206 และ 2506 68
11. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus fermentum* 2508 และ 2112 71

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

12. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus fermentum* 2508 และ 2112 71
13. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus brevis* 3304, 3403, 3602 และ 3601 73
14. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus brevis* 3304, 3403, 3602 และ 3601 73
15. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2204 และ 3406 76
16. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2204 และ 3406 76
17. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Pediococcus pentosaceus* 3301, 2205 และ 3302 78
18. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Pediococcus pentosaceus* 3301, 2205 และ 3302 78
19. ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว 84
20. ปริมาณกรดแลกติก (ร้อยละ) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว 85
21. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว บนอาหาร PCA 86
22. จำนวนแบคทีเรียแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว บนอาหาร MRS 87

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

23. ปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว..... 103
24. ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ และชุดการทดลองควบคุม..... 105
25. ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ร่วมกัน..... 115
26. ปริมาณกรดแลกติก (ร้อยละ) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ร่วมกัน..... 116
27. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์ร่วมกันบนอาหาร PCA..... 117
28. จำนวนแบคทีเรียแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์ร่วมกันบนอาหาร MRS..... 118
29. ปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์..... 122
30. ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์เปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และชุดการทดลองควบคุม..... 124

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวก หน้า

ข1. ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว..... 149

ข2. ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว..... 151

ข3. ความแปรปรวนของกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกของไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว..... 153

ข4. ความแปรปรวนของคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว..... 154

ข5. ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์..... 157

ข6. ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์..... 159

ข7. ความแปรปรวนของกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกของไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์..... 161

ข8. ความแปรปรวนของคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์..... 162

รายการภาพประกอบ

ภาพ หน้า

1. แสดงปฏิกิริยาของรงควัตถุในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์..... 12
2. การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกหมัก ระหว่างการเติมเดกซ์โตรส (D) ร้อยละ 0.5, GDL (g) ร้อยละ 0.5, GDL (G) ร้อยละ 0.8 และกล้าเชื้อร้อยละ 0.5 + น้ำเชื่อมข้าวโพด (SC) ร้อยละ 1 ในการหมักไส้กรอกที่อุณหภูมิ 21-23 องศาเซลเซียส..... 15
3. การหมักกลูโคสโดยแบคทีเรียแลกติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ..... 17
4. การหมักกลูโคสโดยแบคทีเรียแลกติกพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ..... 18
5. แสดงการเกิดสารให้กลิ่นรส จากการหมักน้ำตาลกลูโคสใน Embden-Meyerhoff pathway..... 19
6. ผลของกล้าเชื้อต่อคุณภาพของลักษณะเนื้อสัมผัสของแหนม..... 29
7. การเปลี่ยนแปลงของแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดแลกติกในระหว่างการหมัก..... 31
8. แผนภูมิการผลิตไส้กรอกหมัก..... 39
9. A การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างและกรดแลกติก
   B การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอก..... 50
10. แสดงกลุ่มของจุลินทรีย์ แกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ระหว่างการหมักไส้กรอก.. 56
11. แผนภูมิการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกที่พบในไส้กรอกหมัก..... 57
12. ผลการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus pentosaceus* *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum และ *Micrococcus spp*..... 64

รายการภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพ หน้า

13.การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404, 1206 และ 2506 ในการคัดเลือกเชื้อ..... 69

14.การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus fermentum* 2508 และ 2112 ในการคัดเลือกเชื้อ..... 72

15.การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus brevis* 3304, 3403, และ 3601 ในการคัดเลือกเชื้อ..... 74

16.การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406 ในการคัดเลือกเชื้อ..... 77

17.การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Pediococcus pentosaceus* 3301, 2205 และ 3302 ในการคัดเลือกเชื้อ..... 79

18.การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 50, *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404 และชุดการทดลองควบคุม..... 88

19.การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 50, *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404 และชุดการทดลองควบคุม..... 90

20.การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus fermentum* TISTR 55*Lactobacillus fermentum* 2112, 2508 และชุดการทดลองควบคุม..... 92

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพ หน้า

21. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่าง. การหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus fermentum* TISTR 55 *Lactobacillus fermentum* 2112, 2508 และชุดการทดลองควบคุม..... 93

22. การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus spp.* TISTR 539, *Lactobacillus brevis* 2112 และ 2508 และชุดการทดลองควบคุม..... 95

23. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย Lactobacillus spp. TISTR 539, Lactobacillus brevis 2112 และ 2508 และชุดการทดลองควบคุม..... 96

24. การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 3406 และชุดการทดลองควบคุม..... 98

25. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406 และชุดการทดลองควบคุม..... 99

26. การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 *Pediococcus pentosaceus* 3301 2205 และชุดการทดลองควบคุม..... 101

27. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่าง การหมักไส้กรอกด้วย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 *Pediococcus pentosaceus* 3301 2205 และชุดการทดลองควบคุม..... 102

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพ หน้า

28.การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50, *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404 ชุดการทดลองควบคุม และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ 106

29.การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus fermentum* TISTR 55, *Lactobacillus fermentum* 2112, 2508, ชุดการทดลองควบคุม และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ..... 107

30.การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus spp.* TISTR 539, *Lactobacillus brevis* 3403, 3304, ชุดการทดลองควบคุม และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ..... 108

31.การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104, 3406, ชุดการทดลองควบคุม และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ..... 109

32.การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419, *Pediococcus pentosaceus* 3301, 2205, ชุดการทดลองควบคุม และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ 110

33.การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* 3409 *Pediococcus pentosaceus* 2205, ชุดการทดลองควบคุม และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1..... 119

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพ หน้า

34. การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* 3409 *Pediococcus pentosaceus* 2205, ชุดการทดลองควบคุม และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1 120

36. การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus plantarum* 3409 *Pediococcus pentosaceus* 2205, ชุดการทดลองควบคุม และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1 125

ภาพภาคผนวก หน้า

ก1. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique 144

ก2. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus fermentum* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique 145

ก3. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus brevis* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique 146

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไส้กรอกหมักเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกชนิดหนึ่งซึ่งนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ในต่างประเทศมีการพัฒนารูปแบบของไส้กรอกหมักให้มีความหลากหลายในผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการต่างๆตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ การพัฒนากระบวนการผลิต การพัฒนารูปแบบของไส้ที่บรรจุ ตลอดจนการใช้จุลินทรีย์ควบคุมการผลิตกรดและกลิ่นรสในไส้กรอกหมัก โดยเริ่มมีการใช้เชื้อในสกุล Lactobacillus และ Pediococcus เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมักตั้งแต่ ค.ศ. 1960 (Gillespie, 1960) และได้มีการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกมาโดยตลอด

ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์กับผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อหมักในรูปการค้า แต่ได้เริ่มมีงานวิจัยศึกษาชนิดและบทบาทของจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ ควบคุมกิจกรรมการหมัก ลดระยะเวลาการหมัก (Wiriyacharee, *et al.*, 1990) และยับยั้งการเจริญของเชื้อบางชนิด เช่น *Salmonella sp.* (อรนุช อุตรภิชาติ, 2530)

สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักของไทยที่รู้จักแพร่หลายในชื่อของไส้กรอกเปรี้ยว อาทิไส้กรอกอีสานนั้นมีลักษณะอยู่ระหว่างไส้กรอกสดและไส้กรอกหมัก กล่าวคือ บดผสมส่วนประกอบต่างๆแล้วบรรจุในไส้ธรรมชาติ ทิ้งให้หมักด้วยการผึ่งแดดเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาทำให้สุกก่อนการบริโภคโดยการย่างหรือทอด (จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์, 2523) ส่วนใหญ่จะทำการผลิตในครัวเรือน เนื่องจากมีกรรมวิธีการผลิตง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ มีผู้นิยมบริโภคในทั่วทุกภาคของประเทศ และเริ่มมีการทำเป็นระบบอุตสาหกรรมมากขึ้น ฐานเศรษฐกิจ (2532) รายงานตลาดผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปี พ.ศ.2532 มีปริมาณการบริโภครวม 5,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,800 ล้านบาทต่อปี ฝ่ายสถิติ กองควบคุมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม ได้รายงานปริมาณการผลิตไส้กรอกเปรี้ยวและแหนม ซึ่งเป็นอาหารประเภทเนื้อหมักของไทยในปี พ.ศ. 2532 มีการผลิตประมาณ 1,000 ตันต่อปี (อ้างตาม เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2532)

และไทยไฟแนนเชียล (2537) รายงานกำลังการผลิตของบริษัทในเครือ ส.ขอนแก่น ซึ่งเป็นผู้ผลิตไส้กรอกเปรี้ยวและแหนมรายใหญ่ของประเทศว่าขณะนี้บริษัทมีกำลังการผลิต 800 ตันต่อเดือน หรือ 9,600 ตันต่อปี มีส่วนแบ่งการตลาดเป็นร้อยละ 40 ของมูลค่าตลาดรวมอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ในประเทศ โดยมีกำลังการผลิตไส้กรอกเปรี้ยวและแหนมวันละ 2.5-3 ตัน (สุชาติ ภูสนะดิลก, 2537)

ปัญหาที่พบในการผลิตไส้กรอกหมักคือไม่สามารถควบคุมผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพสม่ำเสมอได้ โดยเฉพาะในโรงงานที่มีการผลิตไส้กรอกหมักเป็นอุตสาหกรรม จะพบปัญหาการเกิดกรดและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอแม้ว่าจะเก็บไว้ในบริเวณเดียวกัน อีกทั้งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นในแต่ละฤดูกาลล้วนมีผลต่อคุณภาพของไส้กรอก สาเหตุหนึ่งของปัญหาเกิดจากการที่ผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตกรด และสารให้กลิ่นรส วิธีที่ใช้ควบคุมคุณภาพของไส้กรอกซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ คือการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมกิจกรรมการหมัก ซึ่งในช่วงปี ค.ศ. 1900 การใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกและแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรทในไส้กรอกหมักได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และความสม่ำเสมอของผลผลิต ประมาณว่าการผลิตไส้กรอกหมักชนิดแห้ง และไส้กรอกหมักชนิดกึ่งแห้งในปี ค.ศ. 1986 มีมูลค่าประมาณ 400 ล้านปอนด์ และคิดเป็นร้อยละ 5.8 ของการผลิตไส้กรอกทั้งหมด (Clarke, 1991)

งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์จากไส้กรอกหมัก และศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก โดยศึกษาถึงคุณภาพทางเคมี กายภาพ และประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก ผลิตโดยใช้เชื้อที่คัดเลือกได้ ทั้งนี้เพื่อการควบคุมคุณภาพของไส้กรอกหมัก และเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกของไทย

ตรวจเอกสาร

1. ไส้กรอกและประเภทของไส้กรอก

ไส้กรอก (sausages) มีรากศัพท์มาจากภาษาละตินว่า "salsus" ซึ่งหมายถึง เนื้อสัตว์ที่มีการเก็บรักษาโดยใช้เกลือ ตามความหมายในพจนานุกรมของแพร่พิทยา (2507) ไส้กรอกหมายถึง อาหารคาวชนิดหนึ่งผลิตด้วยเครื่องปรุง เช่น เนื้อสับ เกลือ เครื่องเทศ และเครื่องปรุงรสอื่นๆ ยัดในไส้หมูหรือหนังบางๆที่ทำอย่างไส้ ยัดแน่น สุกแล้วตัดเป็นแว่นๆ หรือเป็นท่อนได้ไม่กระจายออก ในภาษาเยอรมันใช้คำว่า "เวอร์สท" (wurst) ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์เนื้อที่เตรียมได้จากการบดให้ละเอียด ผสมเกลือเครื่องเทศ และเครื่องปรุงรสอื่นๆ บรรจุในไส้หรือแบบ ความแตกต่างของไส้กรอกขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องเทศที่ใช้ สัดส่วนของเนื้อและไขมัน ชนิดของเนื้อ และวิธีทำ

Savic (1985) ได้แบ่งประเภทของไส้กรอกตามกรรมวิธีการผลิตได้ 5 ประเภทคือ

1.1 ไส้กรอกสด (fresh sausages) เป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อลูกวัวที่ผ่านการบดอย่างหยาบ ผสมกับไขมันและเครื่องเทศ มีน้ำเป็นองค์ประกอบได้ร้อยละ 3-5 มีปริมาณไขมันมากน้อยตามคุณภาพของไส้กรอก สามารถใช้สารเชื่อม เช่น แป้งสาลี และโปรตีนจากถั่วเหลืองได้ในปริมาณร้อยละ 1-3 ของน้ำหนักเนื้อ เครื่องเทศที่ใช้สำหรับไส้กรอกสดคือ พริกไทย ใบหูเสือ พริก กระเทียม ขิงป่น หัวหอม ผิวมะนาว และขมิ้น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-4 วัน และทำให้สุกเมื่อต้องการบริโภค ตัวอย่างของไส้กรอกประเภทนี้ คือ ไส้กรอกหมูสดบราทเวิรสท์ (Bratwurst) และไส้กรอกเนื้อวัวสด

1.2 ไส้กรอกรมควัน (smoked sausage) ทำจากเนื้อสัตว์ที่ผ่านการหมักเกลือและสารประกอบไนไตรท์ ส่วนผสมทั้งหมดเมื่อบรรจุลงไส้แล้วจะนำไปรมควันและทำให้สุกพร้อมที่จะรับประทาน การรมควันและการทำให้สุกนั้นมี 2 ลักษณะคือ การใช้ไอน้ำเป็นเวลา 3-5 นาที จนกระทั่งมีอุณหภูมิภายในไส้กรอกมากกว่า 50 องศาเซลเซียส อีกลักษณะหนึ่งคือ การทำให้สุกด้วยการใช้ความร้อนแห้ง จนกระทั่งไส้กรอกมีอุณหภูมิภายใน 64-65 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เย็น การรมควันและการทำให้สุกนี้มีโปรแกรมในการรมควันว่าควรใช้อุณหภูมิและเวลาในการรมควันอย่างไร การรมควันอย่างไรจึงจะได้ไส้กรอกรมควันคุณภาพดี ตัวอย่างของ

ไส้กรอกรมควัน คือ ไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ ไส้กรอกหมูรมควันพื้นเมือง ไส้กรอกโบโลนา และไส้กรอกมอร์ทาเดลลา

1.3 ไส้กรอกสุก (cooked sausages) เตรียมจากเนื้อสดหรือเนื้อที่ผ่านการหมักเกลือและสารประกอบไนไตรท์ ไส้กรอกชนิดนี้ผ่านการทำให้สุก พร้อมที่จะรับประทานได้ทันทีโดยไม่รมควัน แต่อาจมีไส้กรอกสุกบางชนิดที่มีการรมควันภายหลังจากที่ไส้กรอกสุกแล้ว ตัวอย่างของไส้กรอกแบบนี้ ได้แก่ ไส้กรอกตับซึ่งทำจากตับหมู เจลลาติน และมันหมูแข็ง ปรุงรสด้วยหัวหอมและเครื่องเทศ ทำให้สุกแล้วผ่านการรมควัน ไส้กรอกเลือด ซึ่งทำจากเลือด เจลลาติน มันหมูแข็งหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม และเนื้อบดละเอียด ปรุงด้วยเครื่องเทศบรรจุในไส้ขนาดใหญ่

1.4 ไส้กรอกอิมัลชั่น (emulsion-type sausages) เป็นไส้กรอกที่พร้อมจะบริโภคได้ทันที มีส่วนผสมระหว่างเนื้อบดละเอียด ไขมัน และน้ำหรือน้ำแข็ง ที่ผสมกันเป็นเนื้อเดียวเกิดเป็นอิมัลชั่น โปรตีนหุ้มส่วนของเม็ดไขมันไว้ ไม่ทำให้ไขมันเกิดการแยกตัว เนื้อที่ใช้ทำไส้กรอกใช้เนื้อหมู เนื้อวัว เนื้อลูกวัวที่ผ่านการหมักเกลือและสารประกอบไนไตรท์ มีการใช้สารเชื่อม เช่น นมผงที่ปราศจากไขมันและแป้งต่างๆ ส่วนผสมทั้งหมดจะบรรจุในไส้ขนาดเล็กและผ่านการรมควัน ตัวอย่างของไส้กรอกประเภทนี้คือ ไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ ไส้กรอกเวียนนา และไส้กรอกโบโลนา

1.5 ไส้กรอกหมัก (fermented sausage) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผสมของเนื้อและเครื่องปรุงรสต่างๆ บรรจุในสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ไส้กรอกหมักมีการทำมาตั้งแต่ยุคบาบิโลเนียน คือประมาณ 1,500 ปีก่อนคริสตศักราช และได้เริ่มมีการควบคุมคุณภาพในสมัยโรมันโดยการทำสถานที่เฉพาะเพื่อการหมักและการทำแห้ง ไส้กรอกที่ผ่านขั้นตอนการหมักและการทำแห้ง สามารถเก็บไว้ได้นานในสภาพที่เย็นและอากาศแห้ง ตัวอย่างของไส้กรอกชนิดนี้ เช่น ไส้กรอกซาลามี่ (salami) หรือ เซอวีเล็ท (cervelet) ไส้กรอกหมักของแต่ละประเทศจะมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น อิตาลี เรียก Salami, genoa milano, siciliano, cappicola, alessandro, alpino, mortadello, pepperoni ฝรั่งเศสเรียก arles, lyons ของสเปญได้แก่ chorizo ส่วนเยอรมันและฮังการี ได้แก่ thuringer hosteiner

การทำไส้กรอกหมักมักจะเป็นความลับของแต่ละโรงงาน เชื้อที่ใช้มักจะเป็นเชื้อที่ได้มาจากการผสมเนื้อหมักชุดเก่ากับของใหม่ เชื้อที่เกิดขึ้นอยู่นั้นเป็นเชื้อที่มีอยู่ในโรงงานหรือ

ภาชนะที่ใช้ ถึงแม้ว่าโรงงานอื่นๆจะมีกรรมวิธีการผลิตวิธีเดียวกันทุกอย่างอาจจะไม่ดีเท่าเพราะเชื้อที่ใช้ไม่เหมือนกัน

เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ได้มีการใส่เชื้อส่า ซึ่งเป็นพวกแลกติกแบคทีเรียเช่น *Pedio coccus cerevisiae* ซึ่งเป็นชนิดโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ การใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมการหมักปัจจุบันมักใช้เชื้อผง ซึ่งจะทำให้การหมักเป็นไปอย่างแน่นอนและเร็ว โดยบริษัท Merck ของสหรัฐอเมริกา ได้ผลิตขายมีชื่อทางการค้า Accel หรือ Lactacel เช่นการผลิต Thuringer ทำได้โดยนำเชื้อมาละลายน้ำ คนให้เข้ากัน ผสมลงในเนื้อที่ผสมเครื่องเทศแล้ว ยัดไส้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18-21องศาเซลเซียส จากนั้นเข้าตู้รมควันซึ่งจะมีการหมักเกิดขึ้น ระยะเวลาและอุณหภูมิของการหมักจะเป็นตัวชี้ให้ทราบถึงความเปรี้ยวของไส้กรอกที่จะเกิดขึ้น เช่นถ้าเปรี้ยวมากความเป็นกรดร้อยละ 0.8-1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5-4.8 จะได้มาจากการหมักหรือนำไปรมควันที่ 27-72 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85-90 นาน 12-16 ชั่วโมง สภาพเช่นนี้ช่วยให้ไส้กรอกแห้งและมีการหมักเกิดขึ้น จากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 38-40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้กลิ่นของการรมควัน และเชื้อจะผลิตกรดมากที่สุดในระยะนี้ จากนั้นเพิ่มเป็น 65-68 องศาเซลเซียส นาน 4-8 ชั่วโมง เพื่อทำให้อุณหภูมิภายในไส้กรอกร้อนเป็น 58 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำออกจากตู้รมควัน ปล่อยให้แห้ง และเก็บที่อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส เพื่อให้รสกลมกล่อมขึ้น

✓ การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักเป็นการเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นกรด ปริมาณกรดของไส้กรอกส่วนมากจะอยู่ประมาณร้อยละ 1.00 หรือมากกว่าเล็กน้อย ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนจาก 6.2-6.6 เป็น 4.2-5.0 ถ้าเปรี้ยวมากไปอาจเป็นการเสียของไส้กรอกก็ได้ ดังนั้นผู้ผลิตต้องควบคุมปริมาณกรดให้อยู่ในปริมาณที่กำหนด ไส้กรอกหมักหลายชนิดใช้เชื้อผสม ซึ่งมีทั้งที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. brevis* เชื้อชนิดหลังนี้จะเปลี่ยนส่วนหนึ่งของน้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก และนอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลในการผลิตแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สารที่เกิดจากการหมักบางชนิดเช่น อะเซโทอิน (acetoin) และที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี มีส่วนทำให้เกิดกลิ่นรสต่างๆ

แก๊สที่เกิดขึ้นมากจะทำให้ไส้กรอกพอง ดังนั้นผู้ผลิตบางคนจึงมีการเจาะไส้ที่บร
เพื่อให้แก๊สระบายออกไปได้

ไส้กรอกหมักมี 2 ชนิดคือ ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง (semidry sausages) ซึ่
จากเนื้อบดละเอียด บรรจุในไส้ขนาดกลางและขนาดใหญ่ มีกลิ่นรสเปรี้ยวจัด มีค่าความเ
กรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ 4.8-5.2 ตัวอย่างของไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้งคือไส้กรอกซัมเม
(summer sausages) ไส้กรอกเซอวีเล็ท (cervelet) ไส้กรอกหมักอีกชนิดหนึ่งคือ ไส้กรอกห
ชนิดแห้ง ซึ่งทำจากเนื้อบดหยาบและบดละเอียด บรรจุไส้ หมักที่อุณหภูมิต่ำ ใช้เวลาหมักน
ประมาณ 90 วัน ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.5 กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นี้จะขึ้น
การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในการหมักน้ำตาล และผลจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เ
กายภาพระหว่างการหมัก ตัวอย่างของไส้กรอกหมักแบบแห้ง คือ ไส้กรอกเปปเปอโ
(pepperoni) (Savic, 1985)

2. ส่วนประกอบและหน้าที่ของส่วนประกอบในไส้กรอกหมัก

2.1 เนื้อแดง (lean meat) ใช้เนื้อแดงคุณภาพดีในการทำเพื่อให้มีความสามารถในการ
เกาะน้ำได้ดี เมื่อนำไส้กรอกที่ได้ผ่านความร้อนแล้ว ควรจะรักษาความชื้นไว้ในผลิตภัณฑ์ไ
เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะชุ่ม น่ารับประทาน (Savic, 1985) เนื้อแดงเป็นแหล่งของโปร
โปรตีนในเนื้อแบ่งตามหน้าที่และการละลายได้ 3 ชนิด คือ

2.1.1 ซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (sarcoplasmic protein) เป็นโปรตีนที่สกัดได้ใ
น้ำเกลือเจือจาง ทำหน้าที่เป็นตัวประสานไขมันได้ดี แต่อิมัลชั่นที่ได้ไม่คงตัว

2.1.2 ไมโอฟิบริลลาร์โปรตีน (myofibrila protein) เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สกัดได้ใ
น้ำเกลือเข้มข้น นงลักษณ์ สุทธิวนิช (2527) กล่าวว่า ขณะสับนวดควรเติมเกลือก่อน เพื่อส
ไมโอซินและแอกตินออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อ เพื่อทำหน้าที่ห่อหุ้ม หรือประสานรอบๆห
ไขมัน (Fat droplet) ทำให้เกิดสภาพอิมัลชั่นที่คงตัวอยู่ได้นาน จนกว่าจะได้รับความร้อนซึ่ง
ให้เนื้อไส้กรอกคงตัว

Klement และ Cassens (1974) ได้ศึกษาความสามารถในการละลายของโปรตีน พบว่าโปรตีนต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการละลายต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเดียวกัน และในสภาวะกรดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.6 ความสามารถในการละลายของไมโอฟิบริลลาร์โปรตีนจะลดลงร้อยละ 35-60 คืออยู่ในรูปเกือบไม่ละลาย และซาร์โคพลาสมิคโปรตีน จะมีความสามารถในการละลายลดลงร้อยละ 40

2.1.3 สโตรมาโปรตีน (stroma protein) คือโปรตีนที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ประกอบด้วยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ไม่ละลายในกรด-ด่างและเกลือ จะหดตัวมากเมื่อได้รับความร้อน และเปลี่ยนสภาพเป็นเจล หรือรูภายใน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการใช้ในปริมาณที่มาก (นงลักษณ์ สุทธวนิช, 2527)

2.2 ไขมัน (fat) พิษณุ วิเชียรสวรรค์ (2535) รายงานว่าในการทำไส้กรอกจะใช้มันแข็ง (back fat) เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวสูง ในการผลิตไส้กรอกจะต้องควบคุมให้มีการหลอมเหลวของไขมันในส่วนผสมให้น้อยที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการเยิ้มหรือซึมออกของน้ำมันจากไส้กรอก ซึ่งถือว่าเป็นตำหนิของผลิตภัณฑ์ หน้าที่ของไขมันคือ

2.2.1 เป็นตัวทำให้เกิดความอ่อนนุ่ม ความฉ่ำ และรสชาติ

2.2.2 ทำให้ไส้กรอกมีลักษณะดีขึ้น ไม่เข้มคล้ำเหมือนเนื้อบดล้วนๆ เพิ่มความน่ารับประทาน

2.2.3 เป็นแหล่งของพลังงาน

2.3 ข้าวเจ้าหุงสุก การเติมข้าวในสูตรไส้กรอก ทำให้ลดต้นทุนการผลิต และยังเพิ่มสารอาหารที่เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ จากรายงานของ Acton, *et al.* (1977) ในไส้กรอกที่ผ่านการหมักพบว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกมีแนวโน้มที่จะเกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ คือ ให้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว เมื่อคาร์โบไฮเดรตที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น

ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ (2536) ใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิดในสูตรผลิตภัณฑ์แหนมที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ 10^6 โคโลนี/กรัม, *Pediococcus cerevisiae* ปริมาณ 10^3 โคโลนี/กรัม และ *Micrococcus varians* ปริมาณ 10^6

โคโลนี/กรัม แหล่งของคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิดที่ใช้ คือ ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า แป้งถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวสาลี และแป้งข้าวโพด ในปริมาณร้อยละ 6 ในสูตรการผลิต เมื่อหมักผลิตภัณฑ์ได้ 48 ชั่วโมงพบว่า ผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้ข้าวเหนียว และข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด คือ 4.54 และการใช้แป้งถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลังผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด คือ 4.69 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และผลิตภัณฑ์ที่ใช้แป้งข้าวสาลี และแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตนั้นมีกรดแลกติกสูงที่สุด คือร้อยละ 1.13 และ 1.12 ตามลำดับ และจากการประเมินความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เป็นข้าวเจ้า ข้าวเหนียว แป้งถั่วเหลือง และแป้งสาลี มีลักษณะสีที่ปรากฏดีกว่าชุดการทดลองอื่น ผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้ข้าวเหนียวในสูตรการผลิต มีความแน่นเนื้อที่ด้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ส่วนในด้านความเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดในสูตรการผลิต จะมีความเปรี้ยวที่น้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะกลิ่นของเครื่องเทศดีกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่น ผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้ข้าวเจ้า หรือแป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชอบรวมสูงที่สุด

จากลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์แหนมทั้ง 6 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าแหนมที่ใช้แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตนั้น มีลักษณะรวมต่างๆที่ค่อนข้างดีกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ แต่ถ้าพิจารณาประกอบกับค่าทางเคมี แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมควรจะเป็นข้าวเจ้า ที่สามารถใช้ร่วมกับการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์ผสม จะได้ผลิตภัณฑ์แหนมที่มีคุณภาพดี ทั้งในแง่การผลิตกรด และการสร้างสีที่ดีของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก 48 ชั่วโมง (ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ, 2536)

✓ 2.4 น้ำตาล น้ำตาลที่นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ คือ ซูโครส กลูโคส แล็กโทส น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) และน้ำเชื่อมข้าวโพดชนิดแข็ง (corn syrup solid) Acton, *et al.* (1977) พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.99 ในสูตรการผลิตไส้กรอก จะเกิดการหมักที่เร็วกว่าน้ำตาลอื่นๆ และทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเร็วขึ้นอีกด้วย

อรนุช อุตรภิชาติ (2530) รายงานถึงผลของปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Pediococcus sp.* และ *Lactobacillus sp.* ว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับการผลิตกรดแลกติก โดยพบว่าในอาหารที่มีกลูโคส ร้อยละ 1 เชื้อทั้ง 2 ชนิดจะผลิตกรดได้ใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 1 ซึ่งจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเป็น 4.4

2.5 เกลือ ปริมาณเกลือที่เติมในไส้กรอกของต่างประเทศจะอยู่ในช่วงร้อยละ 1-5 หน้าที่ของเกลือในไส้กรอก คือ (จันทร์สุดา รงค์วิศิษฏ์, 2523)

2.5.1 ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสดี

2.5.2 ช่วยในการเก็บรักษาเนื้อ โดยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในทางที่ต้องการ คือ ทำให้ปริมาณน้ำที่เป็นประโยชน์ของจุลินทรีย์ลดลง

2.5.3 เป็นเครื่องกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ตามความเข้มข้นของเกลือ เช่น ไส้กรอกหมัก เชื้อที่เจริญได้ดีคือ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก เพราะเชื้อนี้ทนเกลือ และบางตัวจะถูกเร่งการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ นอกจากนี้อัตราความเข้มข้นของเกลือจะควบคุมการหมักของไส้กรอกโดยตรง โดยพบว่าความเข้มข้นเกลือที่ดีที่สุด คือช่วงร้อยละ 2-3 ทำให้ลักษณะเนื้อ สี และความน่ารับประทานดีที่สุด (Zaika, *et al.* 1978)

2.6 เครื่องเทศ ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ (2536) รายงานว่าเครื่องเทศที่เติมนอกจากจะเป็นส่วนประกอบที่ให้รสชาติและกลิ่นตามธรรมชาติแก่ผลิตภัณฑ์แล้วยังพบว่าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตกรดที่ดี โดยเฉพาะกระเทียมสด เครื่องเทศธรรมชาติที่ใช้ในสูตรการผลิตไส้กรอกหมักอย่างเหมาะสมจะมีผลโดยตรงต่ออัตราเร็วของการหมัก โดยจะเป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่ผลิตกรด ได้มีการสร้างกรดอย่างมีประสิทธิภาพ (Ingolf and Skjelkvale, 1982) จากการสังเกตของผู้ประกอบการอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เครื่องเทศที่มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตกรด ได้แก่ พริกไทยดำ พริกไทยขาว มัสตาด กระเทียมผง เครื่องเทศชนิดที่มีกลิ่น อบเชย กานพลู ลูกจันทน์เทศ ขิง ดอกจันทน์เทศ และพริกไทยแดง เป็นต้น (Bacus, 1984) และอัตราการผลิตกรดยังขึ้นกับความเข้มข้นและชนิดของเครื่องเทศที่ใช้ตลอดจนชนิดของแบคทีเรียที่มีในผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียประเภท *Lactobacilli* จะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตกรดโดยเครื่องเทศมากกว่าเชื้อแบคทีเรียประเภท *Pediococci* (Bacus, 1984) การใช้

เครื่องเทศหลายๆชนิดผสมกัน จะทำให้อัตราเร็วของการหมักสั้น
ในสูตรการผลิต นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้มีการ
และส่วนประกอบของเครื่องเทศนั้นๆ ได้มีการจำแนกส่วนประก
แมงกานีส มาใช้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการผลิตกรดพบว่า แม
กระตุ้นให้มีการผลิตกรดในระหว่างการหมัก (Zaika and Kissinger, 1979,
เป็นปัจจัยร่วมที่เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกได้ต้องการเพื่อกิจกรรมต่าง
ทางการเจริญเติบโตและการสร้างกรด รวมถึงเอนไซม์หลักในวิถีทางไกลโค
และ Frutose 1-6 diphosphate aldolase การผลิตกรดจะมีปริมาณเพิ่ม
ความเข้มข้นของแมงกานีส อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่ปราศจ
แต่มีการเติมแมงกานีสแทนในระดับ 10^{-5} M จะมีประสิทธิภาพในการผลิ
ผลิตไส้กรอกหมักที่ใช้เฉพาะเครื่องเทศอย่างเดียว (Bacus, 1984)

นอกจากนี้เครื่องเทศธรรมชาติบางชนิดมีผลยับยั้งการเจ
แบคทีเรีย โดยเฉพาะการใช้สารสกัดที่ได้จากเครื่องเทศ เช่น พริกไทย แต่
นำว่า ถ้าหากมีการใช้ระดับของเครื่องเทศปกติในสูตรการผลิตไส้กรอกหมัก
ที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Salzer, *et al.* (1977) รายงานว่า
รูปของน้ำมันหอมระเหยประเภท Oleoresin ที่ปราศจากแมงกานีสจะไม่มี
Ingolf and Skjelkvalve (1982) รายงานว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยในเค
ผลกระตุ้นการเจริญเติบโต และการสร้างกรดของเชื้อแบคทีเรียอย่างมีประสิ
รสของผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

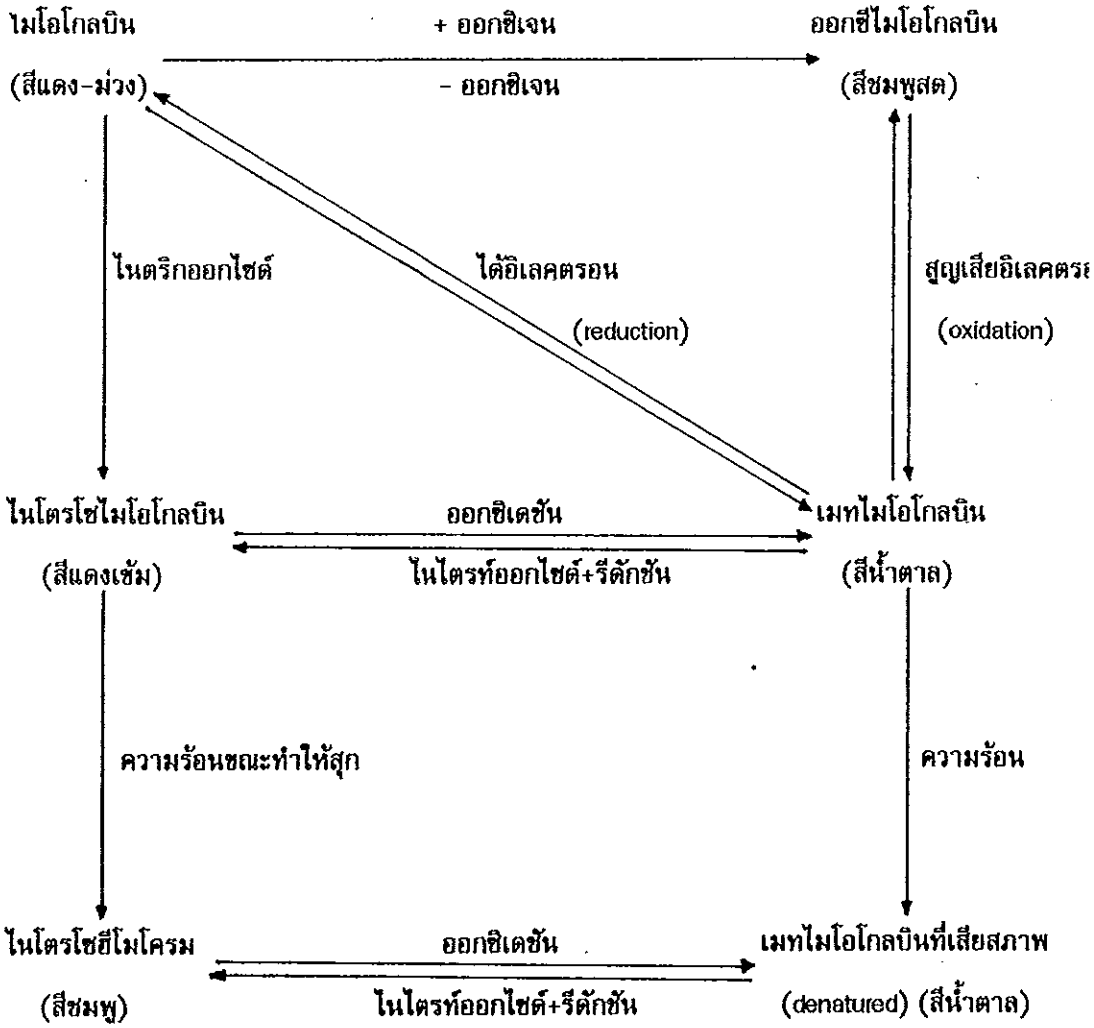
ไพโรจน์ วิริยจารี และคณะ (2536) ได้ทดลองใช้เครื่องเทศ (
พริกไทยป่น อบเชยผง ชะเอมผง เม็ดผักชีผง ในปริมาณร้อยละ 0.2 และ
ขิงสดบดละเอียด ร้อยละ 4 ในผลิตภัณฑ์แหนมร่วมกับการใช้กล้าเชื้อ
plantarum ปริมาณ 10^6 โคโลนี/กรัม *Pediococcus cerevisiae* ปริมาณ 1(
Micrococcus varians ปริมาณ 10^6 โคโลนี/กรัม พบว่าการใช้ขมิ้นชาว
หลัก คือ กระเทียมสดร้อยละ 4 และพริกขี้หนูบดละเอียด ร้อยละ 2 เป็น
ต่อการผลิตกรดแลกติกในแหนม ซึ่งมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกร

เป็นกรดแลกติกร้อยละ 1.35±0.02 หลังจากหมักได้ 48 ชั่วโมง และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.30±0.01 โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ถูกใช้ไปถึงร้อยละ 92.28 ด้านการประเมินความชอบของผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตจากการใช้เครื่องเทศต่างกันนั้นพบว่า อบเชยไม่เหมาะสมต่อการผลิตเพราะผู้บริโภคไม่ยอมรับ และไม่ชอบกลิ่นอบเชยอย่างมาก แต่การใช้เครื่องเทศอื่นๆ โดยเฉพาะ พริกไทยป่น และขมิ้นขาวบดละเอียด มีการยอมรับและความชอบในลักษณะสี ความแน่นเนื้อ ความเปรี้ยว และกลิ่นเครื่องเทศที่ดีพอสมควรต่อการใช้ผลิตเพื่อให้ผู้บริโภคมีการยอมรับได้

Zaika,*et al.* (1976) พบว่าในการผลิตไส้กรอกหมัก จุลินทรีย์ที่ปะปนมากับเครื่องเทศจะมีหรือไม่ก็ตาม จะให้ผลต่อการหมักไม่แตกต่างกัน และยังพบว่า การเติมเครื่องเทศจะช่วยเร่งอัตราการหมักในไส้กรอกให้เร็วขึ้นตามปริมาณเครื่องเทศที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Nes and Skielkvale (1982) ศึกษาปริมาณการใช้กระเทียม 0-3 กรัมต่อลิตร และพริกไทย 0-10 กรัมต่อลิตร ในไส้กรอกหมัก พบว่าอัตราการหมักเร็วขึ้นเมื่อใช้เครื่องเทศในปริมาณมากขึ้น

2.7 ไนไตรท์และไนเตรท เป็นสารประกอบอนินทรีย์เคมีที่ใช้ในรูปของเกลือไนไตรท์และเกลือไนเตรท เติมในไส้กรอกเพื่อทำหน้าที่ดังต่อไปนี้

2.7.1 เพื่อทำให้เกิดสี และความคงตัวของสีแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อ (Krol and Tinbergen, 1974) เนื้อแดงจะมีรงควัตถุคือ ไมโอโกลบิน (myoglobin) ซึ่งมีสีม่วงแดง เมื่อสัตว์ถูกฆ่าและชำแหละเนื้อที่ตัดออกมาสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ เกิดการออกซิไดซ์ได้เป็นสารออกซีไมโอโกลบิน (oxymyoglobin) มีสีแดงสด (bright red) แต่ถ้ามีการออกซิไดซ์ต่อไปอีก ไมโอโกลบินได้รับออกซิเจนมากเกินไป จะเปลี่ยนเป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) มีสีน้ำตาลหรือสีแดงคล้ำ การให้ความร้อน เช่น การต้ม ทำให้เนื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ จากกระบวนการนี้จึงมีการเติมเกลือไนเตรทและไนไตรท์ เพื่อช่วยให้เกิดสีและมีความคงทนของสี โดยสารทั้งสองสามารถสลายให้ไนตริกออกไซด์ แล้วไนตริกออกไซด์จะรวมตัวกับไมโอโกลบินได้ ไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) มีสีแดงชมพู เมื่อให้ความร้อนจะเปลี่ยนเป็นไนโตรโซฮีโมโครม มีสีแดง และคงตัวจะไม่ถูกออกซิไดซ์หรือรีดิวซ์ (Krol and Tinbergen, 1974) ดังภาพ 1



ภาพ 1 แสดงปฏิกิริยาของรงควัตถุในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

ที่มา : Price และ Schweigert (1973)

✓ 2.7.2 ให้กลิ่นและรสชาติเฉพาะกับผลิตภัณฑ์

✓ 2.7.3 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium botulinum* และจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคในตระกูล Enterobacteriaceae หลายชนิด (Leistner, *et al.* 1973)

✓2.7.4 สามารถยับยั้งการหืนของไขมันได้ (Oldfield, 1984)

ผงเพค (Praque powder) เป็นชื่อทางการค้า ของสารผสมของไนเตรทและไนไตรท์ในอัตราส่วน 100 : 1 สาเหตุที่ต้องใช้ทั้งไนไตรท์และไนเตรทผสมกัน เนื่องจากไนไตรท์เป็นตัวทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ถ้าใส่มากไปจะเกิดไนตริกออกไซด์มากเกินไป และจะระเหยออกมาภายนอก การใช้ไนเตรทด้วยจะช่วยทำให้การเกิดไนตริกออกไซด์ช้าลงจะช่วยทำให้การซึมของสารนี้เข้าเนื้อเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ

ปริมาณไนไตรท์ในอาหารตามกฎหมาย กำหนดไว้ไม่เกิน 200 ส่วนในล้านส่วน ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโปตัสเซียมไนไตรท์ เนื่องจากไนไตรท์ที่มากเกินพอ จะสามารถรวมตัวกับอามีน (amine) กลายเป็นไนโตรซามีน (nitrosamine) ที่อาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ เพราะสารประกอบของไนโตรซามีนหลายชนิดทำให้เกิดมะเร็งที่ตับของหนู และ N-N-dinitrosopiperazine ทำให้เกิดมะเร็งในโพรงจมูก

2.8 สารเร่งการเกิดกรดสำหรับไส้กรอกหมัก

สารที่ใช้ลดความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ หรือเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่ใช้ในไส้กรอกหมักมีหลายชนิด มีวัตถุประสงค์เพื่อลดระยะเวลาการหมัก ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และลดความเสี่ยงเนื่องจากการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ แต่การใช้สารเร่งเหล่านี้อาจพบปัญหาการที่ผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4.6 ซึ่งจะทำให้เนื้อสูญเสียประสิทธิภาพการรวมตัวกับน้ำ (water holding capacity) (Clarke, 1991) ตัวอย่างของสารเร่งการเกิดกรดสำหรับไส้กรอกหมัก คือ

2.8.1 กรดซิตริกและกรดแลกติกในรูปแคปซูล (encapsulated citric acid และ encapsulated lactic acid)

การใช้กรดซิตริกแคปซูล จะใช้ในปริมาณ 12-13 ออนซ์ ต่อเนื้อ 100 ปอนด์ ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงเป็น 4.8-5.0 และการใช้กรดแลกติกแคปซูล

จะใช้ในปริมาณ 1 ปอนด์ ต่อเนื้อ 100 ปอนด์ สารทั้งสองอย่างจะเติมลงในขั้นตอนสุดท้ายของการผสม และจะผสมนาน 1 นาที

2.8.2 กล้าเชื้อกรดแลกติก (Lactic acid starter culture)

การใช้เชื้อสกุล *Lactobacillus*, *Pediococcus* หรือ *Micrococcus* 2 รูปแบบคือ ในรูปของเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง (Frozen) และรูปของเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้ง (Freezed-dried) เชื้อที่อยู่ในรูปแช่แข็งนั้นจะต้องผ่านการทำละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะเติมลงในส่วนผสมไส้กรอก ส่วนเชื้อที่อยู่ในรูประเหิดแห้งนั้นสามารถจะเติมได้ทันที การใช้กล้าเชื้อจะสามารถควบคุมการลดลงของความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ได้ดี

2.8.3 กลูโคโน เดลต้า แลกโตน (Glucono delta lactone, GDL)

GDL เป็นสารตัวกลางที่เกิดในกระบวนการเปลี่ยนกลูโคส เป็นสารอื่นๆ เช่นกรดแลกติก เป็นต้น GDL มีลักษณะเป็นผงและใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย มีการใช้อย่างแพร่หลายในหลายปีที่ผ่านมา แต่การควบคุมการลดลงของความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์เป็นไปได้ยาก

2.8.4 น้ำส้มสายชูและควันเทลว (Vinegar และ Liquid smoke)

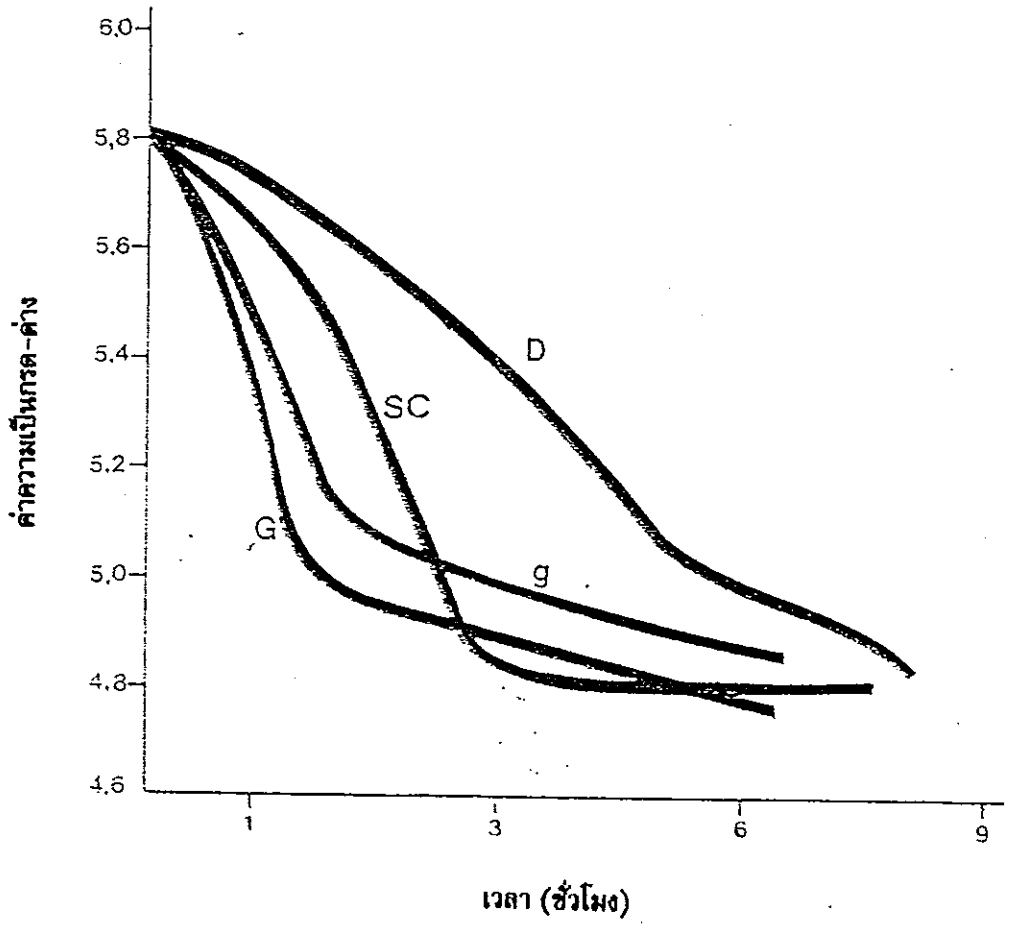
ใช้ในปริมาณ 2 แกลลอน ในน้ำ 20 แกลลอน

หรือการใช้ 2 แกลลอน ควันเทลวใน 10 % acetic acid และน้ำ 8 แกลลอน

สารเร่งการเกิดกรดพวกนี้จะเคลือบที่ผิวและลดความเป็นกรด-ด่างที่ผิวของผลิตภัณฑ์ มีผลในการลดแบคทีเรียที่ผิว ทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และทำให้การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ช้าลง

การเปรียบเทียบการใช้กล้าเชื้อกรดแลกติก และ GDL แสดงในภาพ 2

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่เติม GDL ร้อยละ 0.8 มีการลดลงของความเป็นกรด-ด่างในวันแรกของการหมักสูงที่สุด รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ที่เติม GDL ร้อยละ 0.5, กล้าเชื้อร้อยละ 0.5 + น้ำเชื่อมข้าวโพดร้อยละ 1 และเดกซ์โตรสร้อยละ 0.5 ตามลำดับ แต่ในวันที่ 3 ของการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่เติมกล้าเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดและค่อนข้างคงที่ในช่วงท้ายของการหมัก ในขณะที่การใช้ GDL ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อยๆ และควบคุมการลดลงของความเป็นกรด-ด่างได้ยาก



ภาพ 2 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกหมัก ระหว่างการเติม dextrose (D) ร้อยละ 0.5, GDL (g) ร้อยละ 0.5, GDL (G) ร้อยละ 0.8 และกล้าเชื้อร้อยละ 0.5 + corn syrup (SC) ร้อยละ 0.1 ในการหมักไส้กรอกที่อุณหภูมิ 21-23 องศาเซลเซียส

ที่มา : Savic (1985)

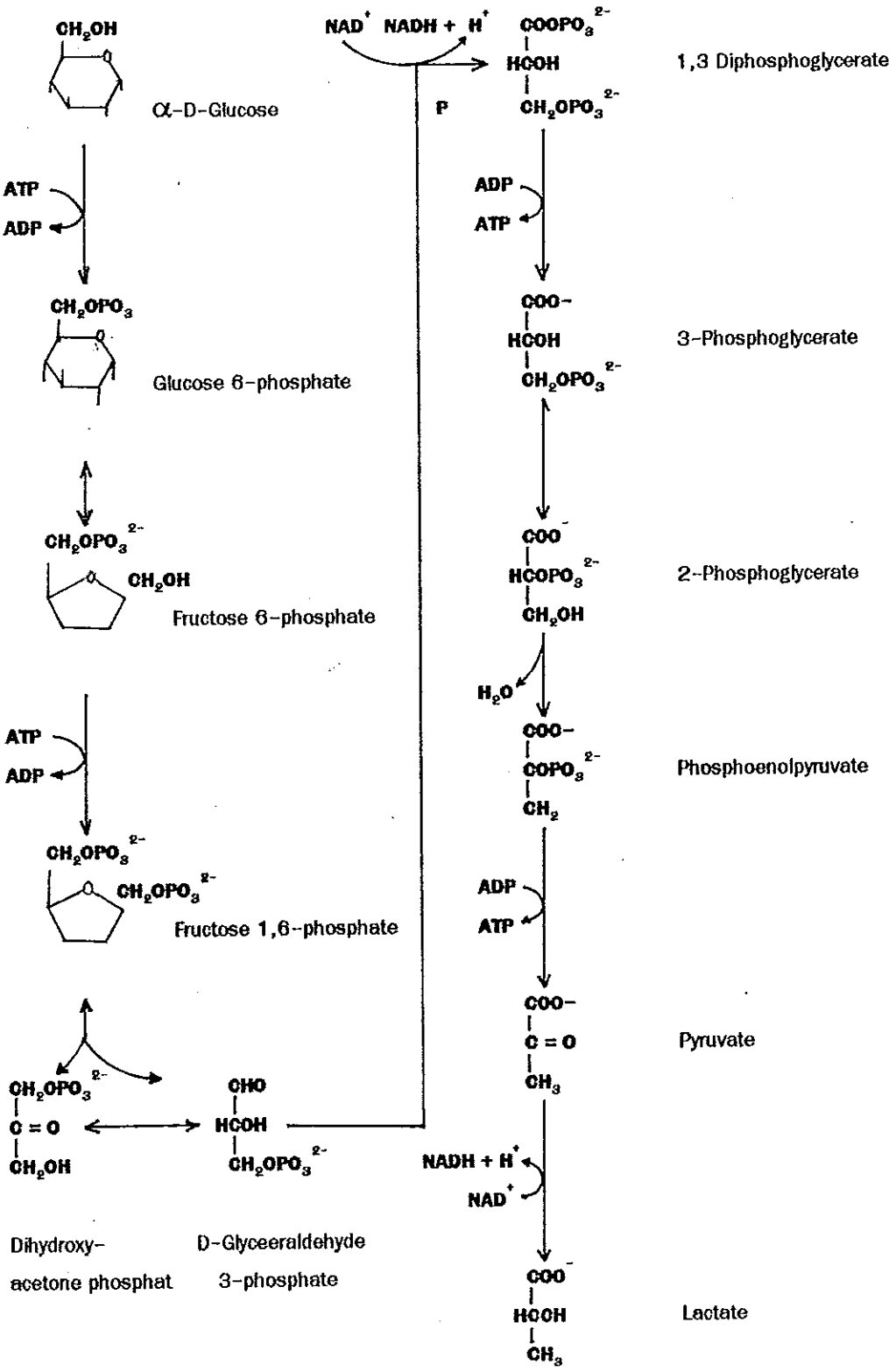
3. การเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก

การผลิตกรดแลกติกของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้สารคาร์โบไฮเดรตทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่สำคัญของไส้กรอก นอกจากการผลิตกรดแลกติกแล้วยังพบว่ามีการผลิตสารอื่นๆอีก ซึ่งแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลกติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ เมื่อเกิดการหมักเปลี่ยนกลูโคสเป็นสารประกอบกรดแลกติกได้ถึงร้อยละ 90 แบคทีเรียที่จัดอยู่ในพวกนี้ คือ *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus plantarum* ส่วนพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ เมื่อหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลกติกในปริมาณที่ต่ำกว่าแต่จะมีสารอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เอทธานอล และกรดบิวทีริก แบคทีเรียพวกนี้ ได้แก่ *Leuconostoc spp.*, *L. brevis* (Carr, *et al.* 1975; Skinner, 1979) วิถีทางในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ แสดงในภาพ 3 และภาพ 4

American Meat Institute Foundation (1960) รายงานว่าสารประกอบต่างๆที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ เช่น การเปลี่ยนแปลงของสารคาร์โบไฮเดรตเป็นกรด และการเปลี่ยนแปลงไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส (lipase) และไลปอกไซด์ (lipoxide) เป็นกรดไขมันอิสระมีความสำคัญต่อกลิ่นรสมาก

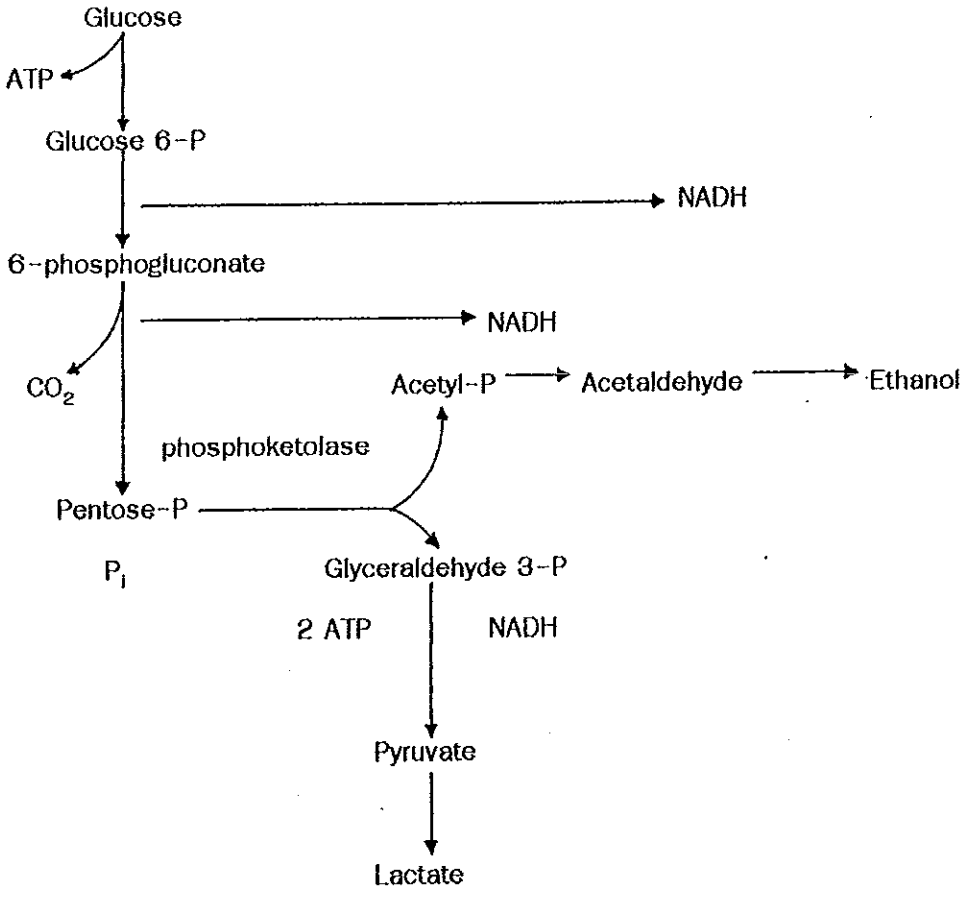
Tracey และ Britz (1989) ได้ใช้ Freon 11 เป็นตัวสกัดสารให้กลิ่นรสจากแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ Gas chromatography พบว่าสามารถสกัดสารระเหย (Volatile meta bolite) ได้ 35 ชนิด แบคทีเรียต่างชนิดกันจะให้ชนิดของสารระเหยต่างกันในปริมาณที่แตกต่างกัน สารระเหยที่สกัดได้เช่น อะซิโทอิน ไอโซบิวทานอล (isobutanol) กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ไอโซเอมิล (isoamyl alcohol) และอื่นๆ

Metzler (1977) ได้แสดงวิถีของการหมักน้ำตาลกลูโคส จากวิถี Embden-Meyerhof เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) แลกเตท (lactate) และสารระเหยอื่นๆเช่น อะซิโทอิน 2,3-บิวเทนไดออล (2,3-butanediol) เอทธานอล บิวทานอล และสารอื่นๆแสดงในภาพ 5



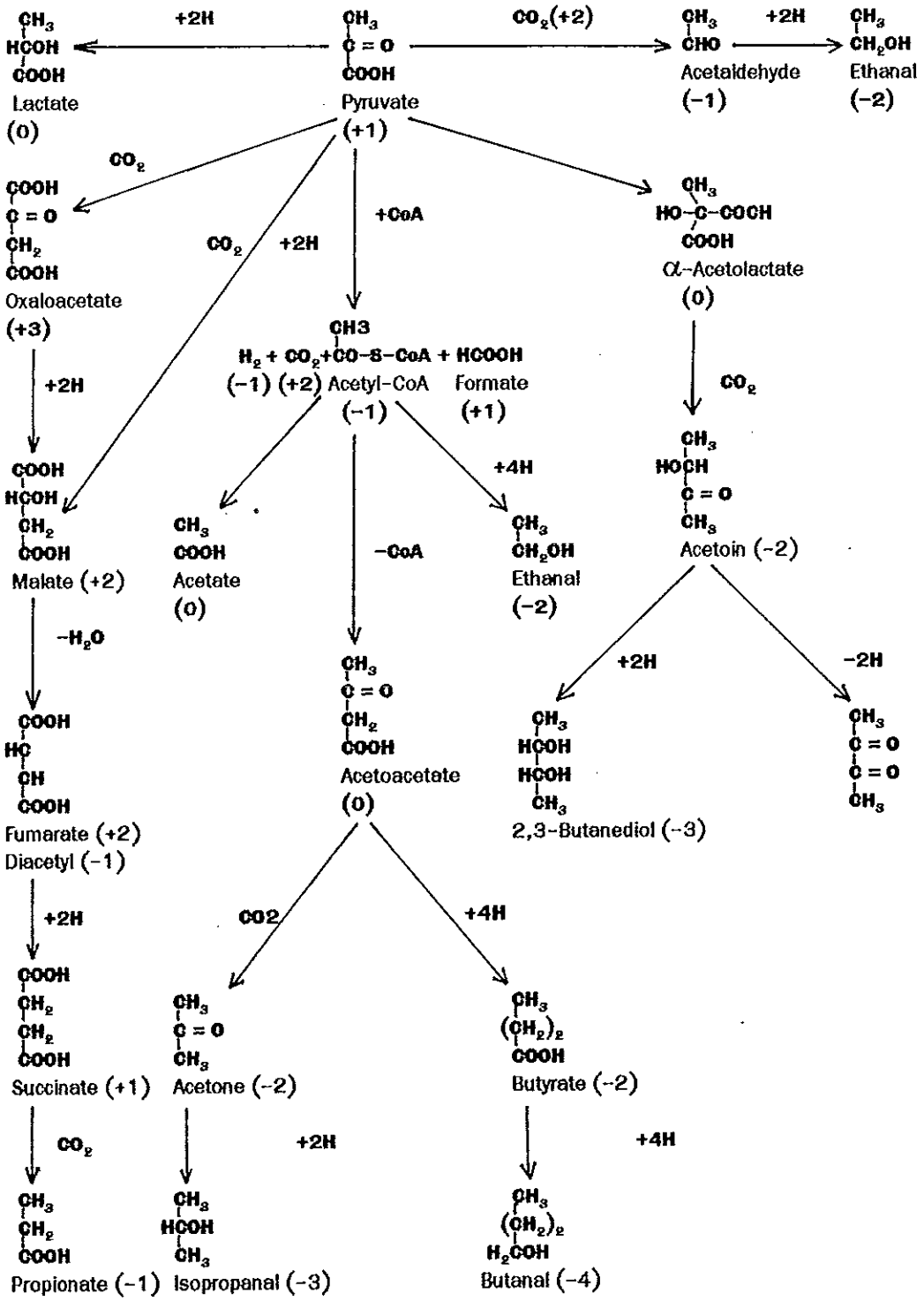
ภาพ 3 การหมักกลูโคสโดยแบคทีเรียแลกติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ

ที่มา : สิรินทร์ วิโมกสันว์และคณะ (2523)



ภาพ 4 การหมักกลูโคสโดยแบคทีเรียพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟแลกติกแอซิด

ที่มา : Metzler (1977)



ภาพ 5 แสดงการเกิดสารให้กลิ่นรส จากการหมักน้ำตาลกลูโคสใน Embden-Meyerhoff pathway

ที่มา : Metzler (1977)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

สารให้กลิ่นรสที่สำคัญที่รู้จักกันดี คือ acetoin, diacetyl, 2,3-butanediol จึงมีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มาก เช่น Drinan, *et al.* (1976) ได้ศึกษาการเติมซิเตรท(citrate) ในอาหารเลี้ยงเชื้อพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ และโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟของแบคทีเรียแลกติก ในการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า ซิเตรทจะเป็นตัวกระตุ้นการเจริญและการผลิตกรด ซึ่งเป็นผลให้ผลิต acetoin และ diacetyl ได้มากขึ้นโดยการผลิต acetoin จะเพิ่มมากขึ้นในช่วง log phase และสูงสุดที่ stationary phase คือประมาณชั่วโมงที่ 10 ของการหมัก และพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟจะไม่สามารถผลิต acetoin หรือ diacetyl ได้เลย ถ้าไม่มีซิเตรท แต่พวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟสามารถผลิตได้ และถ้ามีซิเตรทก็จะผลิตได้มากขึ้น

El-gendy, *et al.*(1983) รายงานว่าแบคทีเรียแลกติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ จะสร้าง acetoin และ diacetyl จากไพรูเวทได้มากกว่าจากซิเตรท แต่พวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ จะสร้าง acetoin และ diacetyl จากซิเตรทได้มากกว่าจากไพรูเวท และการผลิต acetoin และ diacetyl จะสูงสุดและคงที่ที่ชั่วโมง 12-24 จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. แบคทีเรียที่สำคัญในการผลิตไส้กรอกหมัก

ชนิดของจุลินทรีย์ที่สำคัญที่เกี่ยวกับการหมักคือแบคทีเรียชนิดที่สามารถผลิตกรดแลกติก โดยแบคทีเรียชนิดนี้สามารถที่จะดำรงชีวิตและทำให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยที่ไม่ต้องการออกซิเจน กระบวนการทำงานจะเกิดจากออกซิเดชั่นและรีดักชั่นภายในโมเลกุล เนื่องจากว่ากระบวนการสลายของสารไม่ได้ใช้ออกซิเจน ดังนั้นผลผลิตสุดท้ายจึงไม่ใช่เป็นพวกคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ไนเตรท และซัลเฟต แต่ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม จะเป็นกรดแลกติกซึ่งได้จากน้ำตาล ความสามารถของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นกรดแลกติก อะซิติก แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำให้สารอาหารประเภทอื่นในอาหารนั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก จุลินทรีย์เหล่านี้โดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติก จึงมีความสำคัญในการถนอมอาหาร เพราะไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เสียไป กรดแลกติกที่ผลิตขึ้นยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีก

Clarke (1991) รายงานว่า Pediococcus (*P. cerevisiae, P. acidilactici*) และ Lactobacillus (*L. plantarum*) เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก Pediococcus มักจะใช้การหมักที่อุณหภูมิสูงประมาณ 32 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Lactobacillus จะใช้ในการหมักอุณหภูมิต่ำกว่าและ Micrococcus จะทำให้เกิดการหมักเล็กน้อย แต่จะมีบทบาทด้านการพัฒนากลิ่นรส ดังนั้นจึงควรใช้ Micrococcus ร่วมกับ Pediococcus หรือ Lactobacillus เพื่อเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรท/ไนไตรท์ (nitrate/nitrite reduction) ซึ่งมีผลต่อสีของผลิตภัณฑ์

Pederson (1979) รายงานว่า ในกระบวนการหมักไส้กรอกมีแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง 2 สกุล คือ Micrococcus และ Lactobacillus จากการทดลองพบแบคทีเรียมากกว่า 50 สายพันธุ์ในไส้กรอกหมัก และเพื่อที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีควรมี *Micrococcus spp.* อยู่ใน 10 วันแรกของการหมัก เนื่องจาก *Micrococcus spp.* เป็นแบคทีเรียที่นอกจากทำให้กลิ่นรสที่ดีแล้วยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง และสีของผลิตภัณฑ์ เนื่องจาก *Micrococcus spp.* สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นสารไนไตรท์ได้ ทำให้เกิดสีแดงของสารประกอบไนโตรโซฮีโมโครม (Nitrosohemochrome) (Bacus, 1984)

Skinner (1979) พบว่า *Lactobacillus plantarum* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่พบในไส้กรอกหมัก สามารถใช้สารอาหารคาร์โบไฮเดรทได้ดี แบคทีเรียชนิดนี้เป็นพวกที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่มากกว่าสารอื่น เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วน *Pediococcus spp.* เป็นแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่พบมากในไส้กรอกหมักได้แก่ *P. cerevisiae, P. pentosaceus* (Frazier, 1967; Skinner, 1979; Bacus, 1984) และ Bacus (1984) รายงานว่ามีการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์สายพันธุ์ *P. cerevisiae* ในไส้กรอกหมักชนิดแห้งอย่างแพร่หลายในสหรัฐอเมริกาถึงร้อยละ 50 ของไส้กรอกหมักชนิดแห้งที่ผลิตขึ้นทั้งหมด ในยุโรปก็มีการใช้อย่างแพร่หลายเช่นเดียวกัน

Leuconostoc spp. เป็นแบคทีเรียที่พบในไส้กรอกหมักเช่นเดียวกันที่พบมากคือ *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 5.5-5.8 นอกจากมีการผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตสารอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ เอทธานอล และกรดบิวทีริกเกิดขึ้นด้วย (Pederson, 1971)

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2532) รายงานว่าในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนม การหมักในช่วง 1-2 วันแรกพบ *Pediococcus cerevisiae* และ Lactobacillus ชนิดเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟเจริญ และสร้างกรดขึ้นอย่างรวดเร็วและในช่วงหลังจะพบ *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis* เจริญต่อจากแบคทีเรียกลุ่มแรก ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวระยะแรกของการหมักพบ *P. cerevisiae* เจริญทำให้เกิดกรด และความเป็นกรด-ด่างลดลงเป็น 4.5-5.6 ต่อมาพบ *L. spp.* เจริญมากในช่วงหลัง และมั้มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อวัวหมัก ในช่วงแรกของการหมักพบ *P. cerevisiae* และ *L. plantarum* เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และลดจำนวนลงในวันที่ 2-4 ของการหมัก ความเป็นกรด-ด่างของมั้มช่วงแรกเป็น 4.6-5.3 และเมื่อหมักไว้ถึง 7 และ 14 วัน พบว่ามี *P. cerevisiae* อยู่มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

5. การใช้กล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมัก

ในปี ค.ศ. 1940 Jensen และ Peddock เสนอให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในสกุล Lactobacillus เป็นกล้าเชื้อ (Gillespie, 1960) ต่อมา Deibel, *et al.* (1961) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากไส้กรอกหมักได้เชื้อ Lactobacillus 32 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีคือ ยังคงมีชีวิตหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization) ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อนี้มากขึ้น พบว่าที่ถูกแล้ว เชื้อตัวนี้ควรเป็น *P. acidilactici* ในปีค.ศ. 1960 มีการผลิตเซลล์ไลโอฟิไลซ์ (Lyophilized cell) ของเชื้อตัวนี้ในรูปการค้า สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยบริษัท Merck มีชื่อทางการค้าว่า Accel จะช่วยลดระยะเวลาการผลิตจาก 150 ชั่วโมง เป็น 32-48 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ และได้ผลที่แน่นอน (Everson, *et al.* 1970) แต่เชื้อชนิดนี้ไม่รีดิวซ์ไนเตรท จึงมีการเติมไนไตรท์แทน ส่วนเซลล์ไลโอฟิไลซ์ใช้ในรูปสารแขวนลอยโดยใช้ 1.8×10^7 เซลล์/กรัมของส่วนผสมที่บดไว้ ผสม 1 นาทีเพื่อให้เข้ากัน บรรจุส่วนผสมและเชื้อในไส้ที่เตรียมไว้เก็บในห้องที่มีอุณหภูมิ 80 องศาฟาเรนต์ไฮต์ ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-90 นาน 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้จุลินทรีย์ดูดน้ำและเจริญ จากนั้นนำเข้าตู้อบรมควันที่อุณหภูมิ 100-110 องศาฟาเรนไฮต์ (38 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 90 นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีที่สุด ในช่วงสุดท้ายจะเพิ่มอุณหภูมิเป็น 137 องศาฟาเรนต์ไฮต์ (58 องศาเซลเซียส) นาน 4-5 ชั่วโมง ความเป็น

กรดที่เพิ่มมากขึ้นและอุณหภูมิขั้นสุดท้ายของตู้รมควัน จะหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ (Price and Schweigert, 1971) สำหรับเวลาที่ใช้และอุณหภูมิที่ใช้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของไส้กรอก เสร็จจากขั้นตอนนี้แล้วพบว่าไส้กรอกที่ได้มีกลิ่นฉุนรุนแรง และกลิ่นสารเคมีอันเป็นกลิ่นที่ไม่น่ารับประทาน แต่เมื่อทิ้งไว้ในที่เย็น 2-3วัน จะได้รสเปรี้ยว และลักษณะเนื้อที่ต้องการเรียกว่า "mellow" อย่างไรก็ดี Accel มีข้อเสียคือ ระยะเวลาในช่วงที่จุลินทรีย์ดูดน้ำเพื่อการเจริญนั้นจะต่างกันตามฤดูกาล ในบางฤดูกาลที่ทำการผลิตจะใช้เวลาในช่วงนี้นาน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้ออื่นๆปะปนลงไป ทำให้มีลักษณะผลิตภัณฑ์ด้อยลง

ในปี ค.ศ. 1961 บริษัท Merck และ Microlife Technic ได้แก้ไขปัญหาของ Accel ดังกล่าวโดยผลิตเชื้อนี้ในลักษณะ frozen concentrate ให้ชื่อว่า Lactacel พบว่า Lactacel จะลดเวลาในช่วงการดูดน้ำของเซลล์ ทำให้เริ่มต้นที่ช่วงของการหมักได้เลย ใช้เวลาผลิตลดลงร้อยละ 20 คือใช้เวลาผลิตลดลง 12-15 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ

กล้าเชื้อชนิดแรกสำหรับหมักอาหารประเภทเนื้อ ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาดได้แก่ *P. cerevisiae* (Gilliland, 1985) ซึ่ง Diebel, *et al.* (1961) เป็นกลุ่มแรกที่ใช้เชื้อชนิดนี้ในการหมักไส้กรอกโดยเรียกว่ากล้าเชื้อสำหรับเนื้อ (meat starter culture) Smith and Palumbo (1983) ได้ให้คำจำกัดความของคำ " meat starter culture" ว่าหมายถึง จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตซึ่งใส่ในเนื้อเพื่อปรับปรุงคุณภาพการหมักให้ดีขึ้น และทำให้อาหารหมักที่ได้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค Gilliand (1985) ได้รวบรวมคุณสมบัติของกล้าเชื้อที่ดี และรายงานไว้ว่าควรเป็นเชื้อที่เจริญในอุณหภูมิระหว่าง 26.7-43 องศาเซลเซียส มีความสามารถทนเกลือไนไตรท์เข้มข้น 80-100 ส่วนในล้านส่วน และเจริญได้ดีในที่ที่มีเกลือร้อยละ 6 ต้องไม่เป็นเชื้อโรคหรือเป็นเชื้อที่ไม่สร้างสารพิษใดๆ เป็นเชื้อที่ไม่สร้างกลิ่นเน่าเหม็นให้แก่ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน (proteolytic และ lipolytic enzyme) ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียแลกติกจะต้องเป็นเชื้อชนิดโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่งจะผลิตกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่จากการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัวแล้วผลิตสารอื่นรวมทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งแก๊สดังกล่าวจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักเกิดการแตกของไส้และมีกลิ่นรสเปลี่ยนไปจากเดิม

วัตถุประสงค์ที่สำคัญ 2 ประการในการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารประเภทเนื้อคือเพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และเพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้อสดในอุณหภูมิต่ำ (Raccach and Baker, 1978) ประโยชน์อื่นๆของการใช้กล้าเชื้อประเภทนี้คือทำให้อาหารหมักที่ได้ปลอดภัยจากสารพิษต่างๆ เช่น ฮีสตามีน ไนโตรซามีน และโบทูลิน

อาหารหมักที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกจะปลอดภัยต่อการบริโภค อันเนื่องจากสารพิษ เช่น สารพิษของ *Clostridium botulinum* และ ไนโตรซามีน เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณมาก จะผลิตกรดอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้ระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ซึ่งจะไปเร่งไนไตรท์ (residual nitrite) ที่ได้จากการใส่ดินประสิว (KNO_3) ในอาหารหมักถูกสลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) จึงทำให้การสะสมของไนไตรท์ลดลง เป็นผลให้การสะสมของ nitrosamine ลดลงเช่นกัน

Smith and Palumbo (1983) รายงานว่า เชื้อซึ่งใช้ในการหมักมากที่สุดในสหรัฐอเมริกาได้แก่ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* โดยที่ *P. pentosaceus* เป็นเชื้อที่เริ่มใช้ไม่นานมานี้ เนื่องจากเป็นเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตกรดได้มากและเร็วกว่า *P. acidilactici* จึงทำให้การหมักด้วยเชื้อ *P. pentosaceus* สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยลง เนื่องจากไม่ต้องใช้พลังงานในการเพิ่มอุณหภูมิของตู้บ่ม อีกทั้งจะได้ผลิตภัณฑ์ในเวลาเร็วขึ้น

Clarke (1991) กล่าวถึงการใช้กล้าเชื้อในประเทศสหรัฐอเมริกาในทางการค้ามี 2 รูปแบบคือแช่แข็ง (frozen form) และระเหิดแห้ง (freeze-dried form) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดหรือมากกว่าอาจจะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่หลายสายพันธ์ที่ใช้กันโดยทั่วไปคือสกุล Pediococcus, Micrococcus และ Lactobacillus ซึ่งสายพันธุ์และอัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นความลับของบริษัทเพื่อให้เกิดความสม่ำเสมอของคุณภาพไส้กรอก

Kearney, *et al.* (1990) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของการหมักระหว่างเซลล์กล้าเชื้ออิสระ (free cell culture) ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์กับเซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cell) ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนตให้อัตราการหมักดีกว่า เนื่องจากเม็ดอัลจิเนตมีส่วนในการป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างการไลโอฟิไลซ์ และควบคุมสภาพแวดล้อมระหว่างการทำแห้ง ตลอดจน

ระหว่างการใส่กล้าเชื้อในการหมัก ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Champagene and Cotes (1987) และ Spettoli, *et al.* (1982) ในการหมักไวน์ ด้วยแบคทีเรียแลกติก

ตัวอย่างของการใช้กล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแสดงดังตาราง 1

Clarke (1991) ได้สรุปประโยชน์การใช้กล้าเชื้อสำหรับการผลิตไส้กรอกหมักไว้ดังนี้

1. ทำให้เกิดความสม่ำเสมอในคุณภาพของผลิตภัณฑ์

2. ลดความเสี่ยงจากการเสื่อมเสียด้วยจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์พบว่าการใช้ *Strepto coccus lactis* ร่วมกับ *Lactobacillus casei* จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสกุล Pseudomonas ชนิดที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์

3. ควบคุมกระบวนการหมักได้

4. กำหนดระยะเวลาของการหมัก และความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

5. ลดระยะเวลาของการหมัก Raccach (1981) รายงานถึงปริมาณ Pediococci ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม พบประมาณ 3×10^7 โคโลนี/กรัม ซึ่งการใช้นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เป็นการหมักที่ได้กรดแลกติก และมีความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว

6. ทำให้อาหารหมักที่ได้ปลอดภัยจากสารพิษต่างๆ เช่น ฮีสตามีน ไนโตรซามีน และ โบทูลิน รวมทั้งปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด เช่น *Salmonella sp.* (อรนุช อุตรภิชาติ, 2530)

Smith and Palumbo (1983) ใช้ *Lactobacillus plantarum* ร่วมกับ *Pediococcus cerevisiae* ในผลิตภัณฑ์เปปเปอโรนี สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella dublin* และ *S. typhimurium*

Christiansen, *et al* . (1975) ทดลองใช้ *Lactobacillus plantarum* กับ *Pediococcus cerevisiae* ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกซัมเมอร์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* และการใช้ *P. cerevisiae* เพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cl. perfringens* ได้ (Baran and Stevenson, 1975)

ตาราง 1 การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิดในผลิตภัณฑ์เนื้อสด และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์
1. แบคทีเรีย	
1.1 *Pediococcus cerevisiae*	A. ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage, cervelat, thuringer, pork roll, summer style turkey sausage B. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง dry sausage, dry turkey sausage C. Processed meat country-style ham
1.2 *Pediococcus pantosaceus*	A. ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage B. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง pepperoni, Genoa
1.3 *Lactobacillus plantarum*	A. ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage B. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง salami, European-type dry sausage C. Processed meat bacon, country-style ham
1.4 *Lactobacillus brevis*	A. เนื้อสด, เนื้อบด
1.5 Mixture of *P. cerevisiae* and *L. plantarum*	A. ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage, lebanon bologna, cervet B. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง pepperoni, dry turkey sausage

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์
	C. Processed meat
	cooked, mechanically deboned poultry meat
	D. เนื้อสด
	mechanically deboned poultry meat,
	ground poultry breast meat
1.6 Mixture of *P. cercvisiae*	A. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
and *Micrococcus varians*	Genoa, dry sausage
2. Fungi and yeast	
2.1 Individual Penicillin species	A. ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
P. janthinellus,	mold-ripened salami sausage
P. simplicissmum	
P. cyclopium	
or *P. viridicatum*	
2.2 *Thamnidium elegans*	B. เนื้อสด
	Beef carcass aging
2.3 *Candida lipolytica*	A. เนื้อสด
	ปลา

ที่มา : Smith และ Palumbo (1983)

Daly, *et al.* (1973) รายงานการใช้ *Pediococcus cerevisiae* และ/หรือ *Lactobacillus plantarum* ในผลิตภัณฑ์ summer sausage สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งการใช้ *P. pantosaceus* ก็มีคุณสมบัตินี้เช่นกัน (Raccach, 1981)

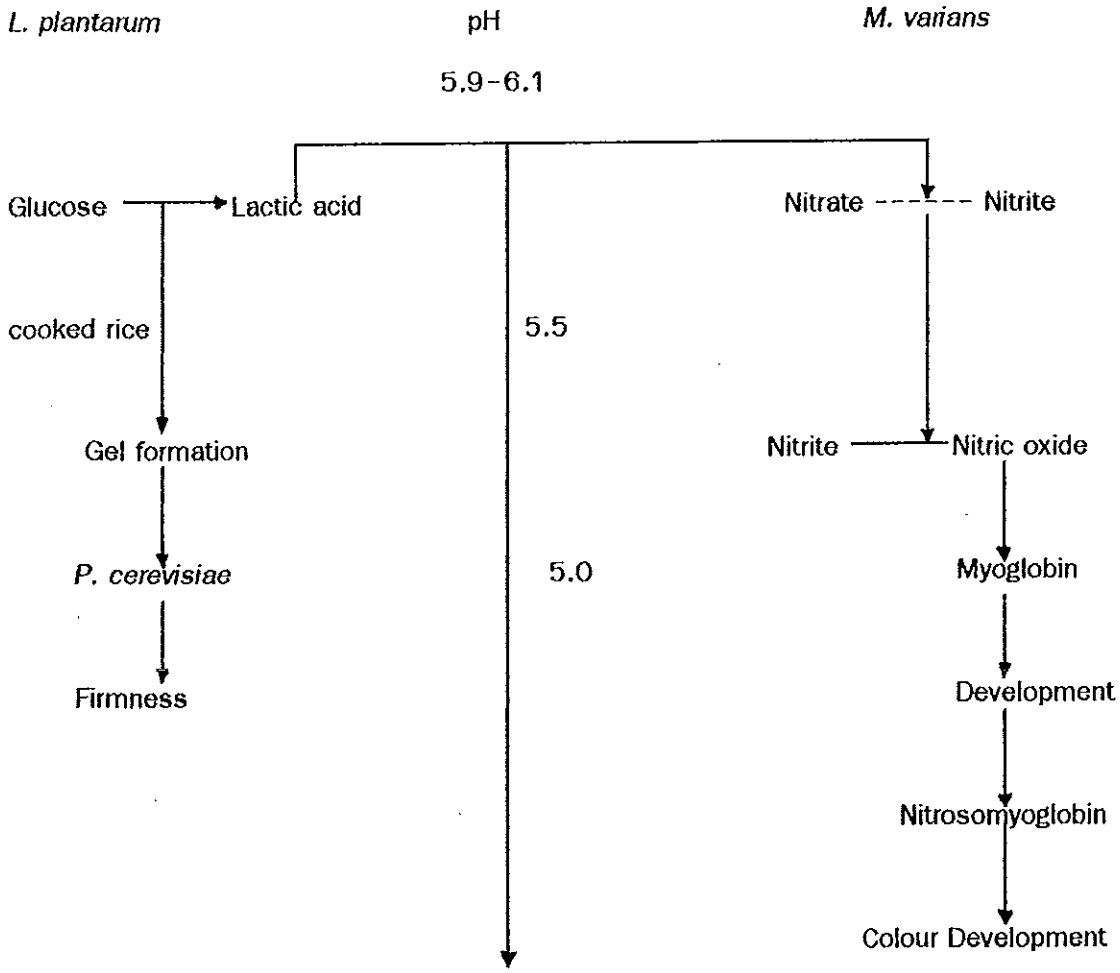
6. การใช้กล้าเชื้อกับผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทย

Wiriyacharee, *et al.* (1990) ได้ทดลองใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้นระหว่างเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (NHI 110) เชื้อ *Pediococcus cerevisiae* (NZDRI) และเชื้อ *Micrococcus varians* (ATCC 15306) ในปริมาณ 10^3, 10^6 และ 10^3 โคโลนี/กรัม ตามลำดับในสูตรของการผลิตแหนม และควบคุมสภาพการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 97 พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของแหนมทำให้การผลิตกรดเป็นไปได้อย่างดี ซึ่งมีผลทำให้คุณภาพของแหนมดีมาก ในแง่ลักษณะเนื้อของแหนม (firmness) และสีของแหนม (colour) ตลอดจนผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความปลอดภัยสูง

จากงานทดลองชี้ให้เห็นว่าความเป็นกรด-ด่างของแหนมเป็นดรรชนีที่สำคัญต่อการพัฒนาคุณภาพของลักษณะเนื้อสัมผัสของแหนมและสีของแหนมดังภาพ 6

เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้น ประเภท *L. plantarum* จะมีผลต่อการลดลงของความเป็นกรด-ด่างในช่วงแรกของการหมัก โดยการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและข้าวสุกให้กลายเป็นกรดแลกติก เมื่อความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อยๆจะทำให้โปรตีนถูกทำลายไป (denature) มีการเกิดเจลขึ้น ทำให้เนื้อเริ่มแข็งเหนียวขึ้น และพบว่าเชื้อ *P. cerevisiae* จะมีผลต่อการเกิดความแน่นในช่วงหลังของการหมัก ซึ่งการเจริญเหมาะสมที่สุดของ *P. cerevisiae* จะอยู่ที่ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.0 (Buchanan and Gibbons, 1974) ดังนั้นสภาวะในการหมักช่วงสุดท้ายจึงเหมาะสมที่เชื้อดังกล่าวจะเจริญเติบโต และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเหนียวมากขึ้น ด้วยเหตุนี้การใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้นระหว่าง *L. plantarum* และ *P. cerevisiae* จึงมีผลทำให้เกิดความเหนียวแน่น (Firmness) ของแหนม

เชื้อบริสุทธิ์ *M. varians* จะมีผลต่อการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ในช่วงแรกของการหมักอย่างยิ่ง Deible, *et al.* (1961) ได้รายงานว่ากิจกรรมของเชื้อในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์นั้นควรเกิดขึ้นระหว่าง 2-16 ชั่วโมงแรกของการหมักไส้กรอกทั่วไป ขณะที่การ



ภาพ 6 ผลของกล้าเชื้อต่อคุณภาพของลักษณะเนื้อสัมผัสของแหนม

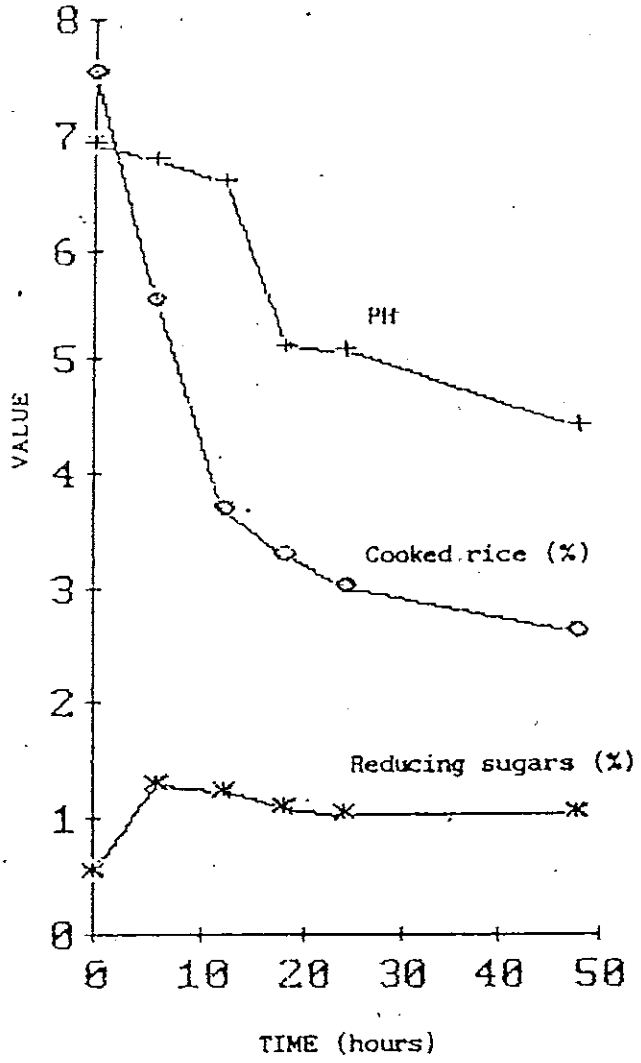
ที่มา : ไพโรจน์ วิริยจารี (2536)

สร้างกรดจะเริ่มขึ้น หลังจาก 8-16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า *M. varians* ควรจะมีกิจกรรมเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกยับยั้งเนื่องมาจากสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นกรดมากขึ้น ไนไตรท์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนตริคออกไซด์ ซึ่งจะรวมกับรงควัตถุในเนื้อ (Myoglobin) และเปลี่ยนเป็นสีชมพูของไนโตรโซไมโอโกลบิน (Nitrosomyoglobin) ซึ่งอัตราการเกิดสีชมพูดังกล่าวจะเกิดได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.5 (Nurmi, 1966) ดังนั้นการเกิดสีชมพูของแหนมเนื่องมาจาก *M. varian* ในสภาพที่มีเชื้อ *L. plantarum* ร่วมด้วยจะช่วยให้เกิดการเปลี่ยนสีในผลิตภัณฑ์แหนมได้เร็วขึ้น แหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมดังกล่าวจะเริ่มเปลี่ยนสี จากสีออกน้ำตาลอ่อนเป็นสีแดง หลังจาก 3 ชั่วโมงนับแต่เริ่มบรรจุในถุงพลาสติก (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2536)

กรดแลกติกที่เกิดขึ้นจากข้าวสุก และน้ำตาลกลูโคสที่เติม ถูกเปลี่ยนโดยเชื้อบริสุทธิ์พวกแบคทีเรียแลกติก ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็วใน 12-18 ชั่วโมง และจะลดลงไม่มากนักหลังจากนั้น ในขณะเดียวกันข้าวสุกถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอย่างรวดเร็วใน 12-18 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) และจะเริ่มคงที่หลังจาก 18 ชั่วโมง ของการหมัก (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2534) ดังภาพ 7

นอกจากนี้แหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้น 3 สายพันธุ์ดังกล่าว สามารถทำให้แหนมมีอายุการเก็บที่ยาวขึ้นกว่าเดิม และในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวพบว่าปริมาณ Enterobacteriaceae และ *Staphylococcus aureus* จะลดลงเรื่อยๆระหว่างการเก็บรักษา อีกทั้งตรวจไม่พบเชื้อราและยีสต์เลย (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2534)

นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ทำการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยว (ได้แก่ ส.ขอนแก่น พ่อครัวใหญ่ คิ้มบางไผ่ และไส้กรอกเปรี้ยวที่ชาวบ้านผลิตขึ้นเอง) พบเชื้อ *Lactobacillus plantarum*, *L. salivarius* subsp. salicinius *L. bulgaricus*, *Pediococcus pantosaceus* และ *P. acidilactici* และทดลองหมักไส้กรอกเปรี้ยว โดยเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติกในรูปของไลโอฟิไลซ์ ปริมาณร้อยละ 0.5 (น้ำหนักไลโอฟิไลซ์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) หรือจำนวนเชื้อประมาณ 10^9-10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลจากการหมักไส้กรอกเปรี้ยวทั้งแบบเติมเชื้อแห้งชนิดเดียว และไม่เติมเชื้อ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดแลกติกในช่วง 0-12 ชั่วโมงแรก มีการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็ว โดยผลิต-



ภาพ 7 การเปลี่ยนแปลงของแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดแลกติกในระหว่างการหมัก

ที่มา : ไพโรจน์ วิริยจารี (2534)

ภัณฑ์ที่เติม *Lactobacillus plantarum* มีความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด และเมื่อหมักจนครบ 72 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. salivarius* subsp. salicinius ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด รองลงมาคือ ผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* ตามลำดับ และสำหรับปริมาณกรดแลกติก ผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. plantarum*, *L. bulgaricus* และ *L. salivarius* subsp. salicinius มีปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกัน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เติม *P. acidilactici* มีปริมาณกรดแลกติกต่ำที่สุด

การใช้เชื้อผสมระหว่าง 1) *L. salivarius* subsp. salicinius และ *L. plantarum* 2) *L. bulgaricus* และ *P. pentosaceus* 3) *L. plantarum* และ *P. acidilactici* เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเชื้อ นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) พบว่าการลดลงของความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกัน เมื่อหมักผลิตภัณฑ์ได้ 48 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เติมเชื้อ *L. salivarius* subsp. salicinius และ *L. plantarum* มีความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุด และมีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด รองลงมาคือ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมเชื้อ ผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. plantarum* และ *P. acidilactici* และผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. bulgaricus* และ *P. pentosaceus* ตามลำดับ

สำหรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวผลิตด้วยเชื้อชนิดเดียว และผลิตโดยการหมักธรรมชาติ นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) พบว่าไส้กรอกหมักธรรมชาติมีคะแนนความชอบมากกว่า และไส้กรอกผลิตด้วย *L. plantarum* และ *P. acidilactici* มีคะแนนความชอบสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆที่เติมเชื้อ คุณภาพกลิ่นรสและความเปรี้ยวของไส้กรอกทุกตัวอย่างไม่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกหมัก
2. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อการผลิตไส้กรอกหมัก
3. ศึกษาคุณภาพทางเคมี และประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2. เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ธรรมชาติ และจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุในการผลิตไส้กรอกหมัก

    1.1 เนื้อหมู ใช้หมูเนื้อแดง แล่เอามันและพังผืดออกจนหมด

    1.2 มันหมู ใช้มันแข็ง (back fat)

    1.3 ข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิ

    1.4 เครื่องเทศ ประกอบด้วย พริกไทย กระเทียม และลูกผักชี

    1.5 เครื่องปรุงรส ประกอบด้วย เกลือ และน้ำตาลทราย

    1.6 สารเติมแต่งอาหาร โซเดียมไนไตรท์

    1.7 เชือกมัดไส้กรอก

    1.8 ไส้แกะ เป็นไส้แกะดองเกลือ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร

2. เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50, *Lactobacillus fermentum* TISTR 55, *Lactobacillus sp.* TISTR 539, *Pediococcus pantosaceus* TISTR 419 และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. วัสดุและอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ประกอบด้วย

    3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ง)

        3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar (Marvin, 1984) สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด

        3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Rogosa and Sharpe, 1959) สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก และเก็บรักษาแบคทีเรียแลกติก

        3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (Difco Laboratory, 1984) สำหรับเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.2 อาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อการเทียบเคียงจุลินทรีย์ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ง)

3.2.1 อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากกลูโคส

3.2.2 อาหารทดสอบการออกซิเดชัน และเฟอร์เมนเตชัน

3.2.3 อาหารทดสอบการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ

3.2.4 อาหารทดสอบการเคลื่อนที่

3.2.5 อาหารทดสอบการมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน

3.2.6 อาหาร Simmon citrate agar

3.2.7 อาหารทดสอบความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น น้ำตาลอะราไบโนส ไซโลส เมลลิไบโอส แรฟฟิโนส แรมโนส เมลลิไซโตส ซอร์บิทอล แล็กโทส เซลโลไบโอ มอลโตส และซูโครส

3.2.8 อาหารทดสอบการสร้างเดกซ์แตรน

3.3 วัสดุและเคมีภัณฑ์สำหรับการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อการเทียบเคียงจุลินทรีย์ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ง)

3.3.1 สารเคมีในการย้อมแกรม

3.3.2 สารเคมีในการย้อมสปอร์

3.3.3 Gas pack และอินดิเคเตอร์ สำหรับทดสอบการเจริญในสภาพไร้อากาศ

3.3.4 สารเคมีทดสอบการมีเอนไซม์ออกซิเดส

3.3.5 สารเคมีทดสอบการมีเอนไซม์คะตาเลส

3.3.6 สารเคมีทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดในรูปกรดแลกติก (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก จ)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการผลิตไส้กรอกประกอบด้วย

    1.1 เครื่องชั่ง รุ่น E NR 36562 บริษัท Berkel

    1.2 เครื่องผสมเนื้อ บริษัท Kenwood

    1.3 เครื่องบดเนื้อ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

    1.4 เครื่องบรรจุไส้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

    1.5 ตู้โปร่งและราวสำหรับแขวนไส้กรอก

2. อุปกรณ์สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์

3. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ประกอบด้วย

    3.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น WB-6001-g89061 บริษัท Gottengen

    3.2 โถปั่นอาหาร

    3.3 โถเพาะเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้อากาศ

    3.4 Vortex mixer รุ่น 1291 บริษัท Lab-Line Instruments

    3.5 Autoclave รุ่น SS-320 บริษัท Tomy

    3.6 กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Olympus Optical Co., LTD.

    3.7 ตู้อบไฟฟ้า รุ่น UL 30 790 406 บริษัท Memmert Co., LTD.

    3.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet) รุ่น 25 Manometer DWYER Instrument, Inc.

    3.9 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ รุ่น V.220 W 1200 PH1 TYPE 1B-H3 บริษัท KSL Engineering Co., Ltd.

    3.10 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.

    3.11 เครื่องเหวี่ยงแยก รุ่น H-103 NR Series บริษัท Kokusan Ensinri Co., Ltd.

    3.12 ตู้เย็นสำหรับเก็บรักษาเชื้อ

4. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย

    4.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น HM-7E บริษัท Tokyo TOA Electronics, Ltd.

4.2 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้

4.3 เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น P163 บริษัท Metler Instrument AG Co., LTD. และเครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 421OPR บริษัท Satorius

4.4 เครื่องอบไฟฟ้า ยี่ห้อ Memmert รุ่น ULM50 บริษัท Memmert Co., Ltd.

4.5 เตาเผา ยี่ห้อ Carbolite รุ่น ELF 10/6 บริษัท Bamfortd Co., Ltd.

4.6 ชุดวิเคราะห์หาไขมันโดยวิธีซอคเลต รุ่น ME. บริษัท Electrothermal Co., LTD.

4.7 ชุดวิเคราะห์หาโปรตีน โดยวิธีเจลดาล

5. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5.1 เครื่องทอด ควบคุมอุณหภูมิได้

5.2 Thermocouple

6. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์

7. อุปกรณ์อื่นๆ

7.1 ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น FORDA 329 จากบริษัทพัฒน์กลการ จำกัด

7.2 ห้องแช่เยือกแข็งแบบกระแสลมเป่า อุณหภูมิห้อง -20 องศาเซลเซียส รุ่น PK 64 จากบริษัทพัฒน์กลการ จำกัด

วิธีการ

วิธีการในการวิจัยประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. การผลิตไส้กรอกหมัก

2. การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

4. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดเดียวเปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ธรรมชาติ และจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

5. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์หลายชนิดที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดเดียว และจุลินทรีย์ธรรมชาติ

1. การผลิตไส้กรอกหมัก

ผลิตไส้กรอกหมักตามวิธีที่ดัดแปลงจาก จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) โดยมีส่วนผสมประกอบด้วย

ส่วนผสม	ปริมาณ	
เนื้อหมู	500	กรัม
มันหมู	200	กรัม
ข้าวเจ้าหุงสุก	250	กรัม
เกลือ	20	กรัม
น้ำตาลทราย	5	กรัม
พริกไทย	2.5	กรัม
กระเทียม	25	กรัม
ลูกผักชี	1	กรัม
โซเดียมไนไตรท์	80	ส่วนในล้านส่วน

รายละเอียดในวิธีการผลิตแสดงดังภาพ 8

ขั้นตอนในการผลิตไส้กรอกหมักเริ่มจาก

1.1 บดมันหมู เนื้อหมู และข้าวเจ้าหุงสุกผ่านรังผึ้งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางช่อง 4 มิลลิเมตร และบดกระเทียมโดยใช้เครื่องปั่น

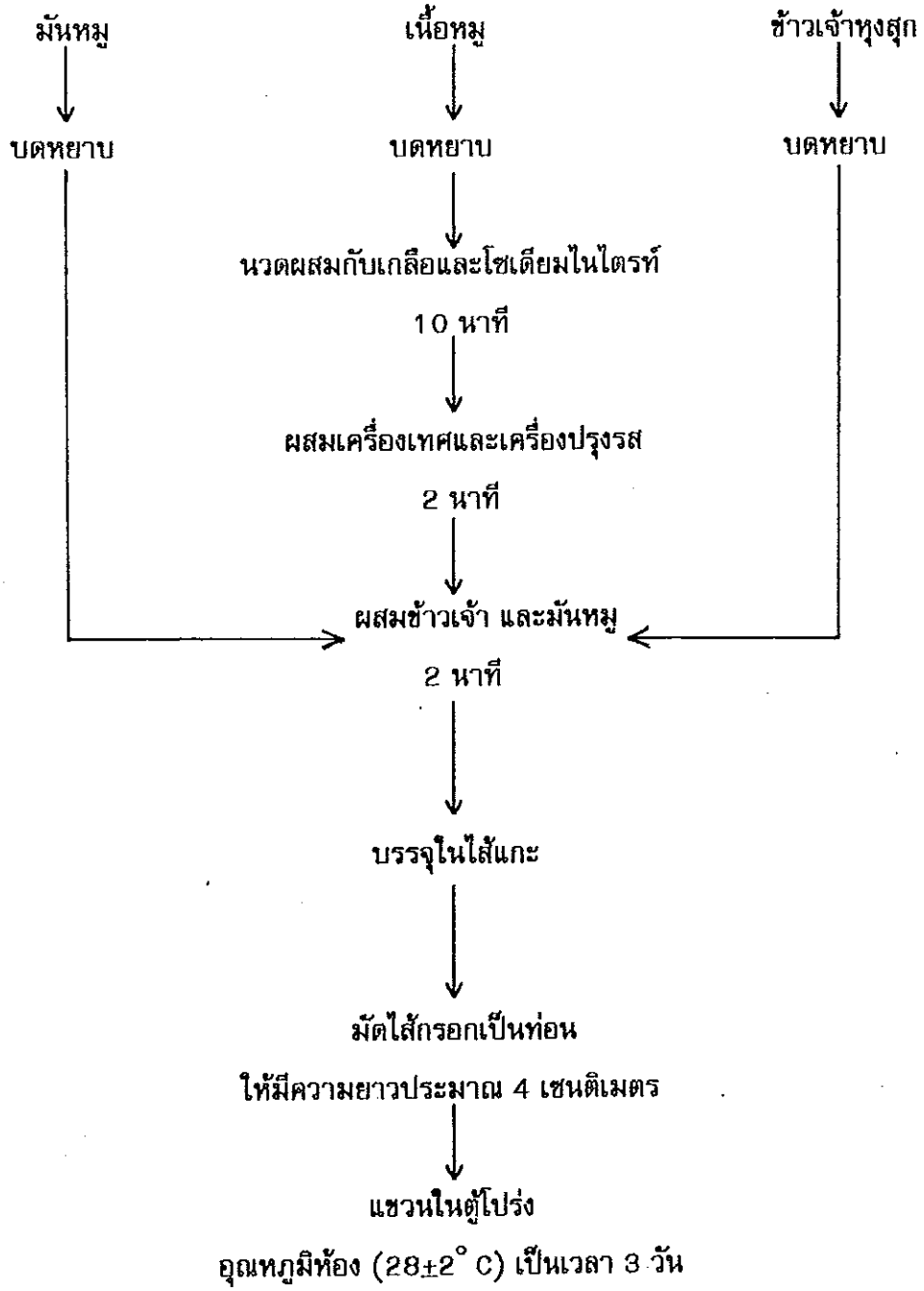
1.2 นวดเนื้อหมูกับเกลือและสารประกอบโซเดียมไนไตรท์ในเครื่องผสม โดยใช้หัวตะขอเป็นตัวนวด นวดส่วนผสมเป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว ระดับ 2

1.3 ผสมเครื่องเทศและเครื่องปรุงรส โดยเปลี่ยนใช้หัวใบไม้ในการผสม ใช้เวลา 2 นาที ที่ความเร็วระดับ 2

1.4 ผสมข้าวเจ้า และมันหมู ผสมส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากัน ใช้เวลา 2 นาที ที่ความเร็วระดับเดิม

1.5 บรรจุส่วนผสมทั้งหมดลงในเครื่องบรรจุไส้ ซึ่งผ่านการแช่น้ำเพื่อล้างเกลือออกให้หมด

1.6 มัดไส้กรอกเป็นท่อนสั้นๆ ความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร แขวนในตู้โปร่ง หมักที่อุณหภูมิห้อง ($28\pm2\ ^{\circ}C$) เป็นเวลา 3 วัน



ภาพ 8 แผนภูมิการผลิตไส้กรอกหมัก

ที่มา : ดัดแปลงจากจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523)

2 การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก

เก็บตัวอย่างไส้กรอกหมักหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 0, 24, 48, และ 72 เพื่อการวิเคราะห์ทางเคมี และจุลินทรีย์

2.1 การวิเคราะห์ทางเคมีของไส้กรอกหมัก ทำการวิเคราะห์

2.1.1 ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์ (A.O.A.C., 1990)

2.1.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก โดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล (A.O.A.C., 1990)

2.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกปริมาณ 11 กรัม ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในบรรจุสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาณ 99 มิลลิลิตร ซึ่งปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 16x150 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้ เข้ากันด้วย vortex mixer เพื่อให้ตัวอย่างเจือจางเป็น 1:100 ทำเช่นเดียวกันจนได้สารละลายตัวอย่างไส้กรอกหมักเจือจาง $1:10^{6}$, $1:10^{7}$ และ $1:10^{8}$ ตามลำดับ

2.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธี standard plate count technique, SPC (Marvin, 1984)

2.2.2.1 ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 3 ระดับ คือ $1x10^{6}$, $1x10^{7}$ และ $1x10^{8}$ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร SPC agar ที่หลอมเหลวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงไปประมาณ 15 มิลลิลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร MRS agar เพื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2.2.2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติก จากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี หาผลเฉลี่ยคิดเป็นจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่าง

2.2.2.3 เก็บเชื้อจากจานเพาะเชื้อใน SPC agar โดยสุ่มเก็บจากลักษณะของโคโลนี 30 โคโลนี แยกเชื้อบนอาหาร Nutrient agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อในอาหาร Nutrient agar และ MRS agar เพื่อการเทียบเคียงชนิดแบคทีเรีย

2.2.3 การเทียบเคียงชนิดแบคทีเรีย

ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมี ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งพบว่ามีปริมาณมากในระหว่างการหมัก ตามวิธีใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1986) และ Identification Method for Microbiologists (Sharpe and Fryer, 1966) และ Difco Manual (Difco Laboratory, 1984) โดยใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆดังนี้ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง)

2.2.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์

2.2.3.2 การเจริญในสภาพไร้อากาศ

2.3.3 การสร้างสปอร์

2.3.4 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

2.3.5 การสร้างเอนไซม์คะตาเลส

2.3.6 การทดสอบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน

2.3.7 การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน

2.3.8 ความสามารถในการเคลื่อนที่

2.3.9 การมีเอนไซม์รีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์

2.3.10 การสร้างแก๊ส

2.3.11 ความสามารถในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ หรือเฮท-เทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ

2.3.12 การเจริญที่อุณหภูมิ 35, 40, และ 50 องศาเซลเซียส

2.3.13 การเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 4, 6.5, และ 18

2.3.14 การเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง ระดับ 4.2, 7.5 และ 8.5

2.3.15 การเจริญบน Simmon citrate agar

2.3.16 การสร้างเดกซ์แตรน (dextran formation)

2.3.17 การเจริญในอาหารที่มีเอทธานอล ร้อยละ 10

2.3.18 ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรทบางชนิด เช่น อะราไบโนส ฟรุคโตส แรฟฟิโนส แรมโนส แล็กโทส เซลโลไบโอส ซอร์บิทอล เมลลิไซโตส ไซโลส เมลลิไบโอส และซูโครส

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

คัดเลือกจุลินทรีย์ตามวิธีของ Wang, *et al.* (1979) โดยวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ 2 ค่าคือ อัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างและอัตราการสร้างเซลล์

อัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง DpH = [dpH/dt]
= หน่วย/ชั่วโมง

อัตราการสร้างเซลล์ g = dN/dt
= เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง

เมื่อ N = จำนวนเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)
t = เวลา (ชั่วโมง)

ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน MRS broth และเก็บตัวอย่างน้ำหมักในชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, และ 12 (Nes and Sorheim, 1984) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิด หาได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน MRS broth เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0-1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ และวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียของน้ำหมักที่มีค่าการดูดกลืนแสงนั้นๆ โดยใช้ standard plate count technique ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณจุลินทรีย์ กราฟมาตรฐานของแบคทีเรียแสดงดังภาพภาคผนวก ก1, ก2, ก3, ก4 และ ก5

4. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ธรรมชาติ และจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

วิธีการ

4.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากตอนที่ 3 และทดลองเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 3409, 3404 และ *L. plantarum* TISTR 50 เชื้อ *L. fermentum* 2115, 2205 และ *L. fermentum* TISTR 55 เชื้อ *L. brevis* 3403, 3304 และ *L. sp.* TISTR 539 เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* 2104, 3406 และ *Leu. mesenteroides* TISTR 53 เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 3301, 2205 และ *P. pentosaceus* TISTR 419 รวม 15 เชื้อ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณการใช้ปริมาณเชื้อให้อยู่ในช่วง $5x10^6$ เซลล์/กรัมไส้กรอก (Clarke, 1991; Huang and Lin, 1993; วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจากภาพภาคผนวก ก1, ก2, ก3, ก4 และ ก5 จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกน้ำหมักที่คำนวณปริมาณการใช้แล้ว ด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Bartholomew and Blumer, 1980) ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

4.2 การผลิตไส้กรอกหมัก

ผลิตไส้กรอกหมักตามวิธีของจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 จากนั้นทำการผสมส่วนผสมกับจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องผสม นาน 2 นาที ใช้ความเร็วในการผสมระดับ 3 แล้วทำการบรรจุส่วนผสมในไส้แกะ มัดเป็นท่อน แขวนในตู้โปร่ง อุปกรณ์ที่ใช้จะทำการฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนทุกครั้ง เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ไม่ให้ปนเปื้อนในระหว่างชุดการทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 16 ชุดการทดลอง คือชุดการทดลองควบคุม 1 ชุดการทดลอง และชุดการทดลองที่มีการใช้จุลินทรีย์ 15 ชุดการทดลอง

4.3 การวิเคราะห์

4.3.1 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เก็บตัวอย่างไส้กรอกหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ไส้กรอกปริมาณ 11 กรัม (Marvin, 1984) เจือจางให้ได้สารละลายที่เหมาะสมจากตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสม 3

ระดับ คือ 10^6, 10^7 และ 10^8 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ standard plate count agar และ MRS agar ทำ 2 ซ้ำ บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

4.3.2 การวิเคราะห์ทางเคมี ทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่

4.3.2.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์ (A.O.A.C., 1990) ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 หลังการหมัก

4.3.2.2 ค่าความเป็นกรดในรูปกรดแลกติก โดยการไตเตรท (A.O.A.C., 1990) ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ของการหมัก

4.3.2.3 ค่ากรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติก โดยการกลั่นและการไตเตรท (A.O.A.C., 1990) ในไส้กรอกที่หมักจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4.5 ซึ่งจะหยุดการหมักด้วยความเย็น ในห้องแช่แข็งแบบกระแสลมเป่า อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำตัวอย่างไส้กรอกส่วนหนึ่งไปใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส

4.3.2.4 ปริมาณความชื้น โดยวิธีอบในตู้อบไฟฟ้า (A.O.A.C., 1990) ในตัวอย่างไส้กรอกก่อนการหมัก

4.3.2.5 ปริมาณโปรตีน โดยวิธีเจลดาล (A.O.A.C., 1990) ในตัวอย่างไส้กรอกก่อนการหมัก

4.3.2.6 ปริมาณไขมัน โดยวิธีซอคเลต (A.O.A.C., 1990) ในตัวอย่างไส้กรอกก่อนการหมัก

4.3.2.7 ปริมาณเถ้า โดยวิธีเผาในเตาเผา (A.O.A.C., 1990) ในตัวอย่างไส้กรอกก่อนการหมัก

4.3.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

4.3.3.1 การเตรียมไส้กรอกหมักเพื่อการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในไส้กรอกหมักที่ผ่านการหมักจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และหยุดการหมักโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการประเมินพร้อมกันทุกชุดการทดลอง การเตรียมไส้กรอกเพื่อการประเมินทางประสาทสัมผัสทำโดยการนำไส้กรอกจากห้องแช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และก่อนทอดจะไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง น้ำมันที่ใช้ทอดใช้น้ำมันถั่วเหลือง อุณหภูมิในการทอด 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งไส้กรอกมีอุณหภูมิภายใน 75 องศาเซลเซียส พักไส้กรอกให้เย็นและสะเด็ดน้ำมันเสริฟโดยการสุ่ม

4.3.3.2 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ทำการประเมินคุณลักษณะโดยวิธีพรรณาคุณลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis, QDA) (Stone, *et al.* 1974) ในด้านความแน่นแข็ง การยึดเกาะและความฉ่ำของเนื้อสัมผัส รสชาติหวาน เค็ม ขม เปรี้ยว กลิ่นออกซิไดซ์ กลิ่นไส้กรอก และความชอบรวมในอุดมคติ ดังแบบสอบถามในภาคผนวก ค1 และประเมินคุณภาพของไส้กรอกชุดการทดลองในแบบสอบถามในภาคผนวก ค2 โดยใช้ผู้ประเมินที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 16 คน วางแผนการทดลองแบบ Balanced Incomplete Block Design, BIB (สุรพล อุปติสสกุล, 2526) 16 ชุดการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ DMRT (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2535) แสดงผลในลักษณะแผนภาพใยแมงมุมเปรียบเทียบคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักในอุดมคติและในชุดการทดลอง

5. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

วิธีการ

5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากตอนที่ 4 ประกอบด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* รหัส 3409 *Pediococcus pentosaceus* รหัส 3301 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณการใช้ปริมาณเชื้อให้อยู่ในช่วง $5x10^6$ โคโลนี/กรัมไส้กรอก (Clark, 1991; Huang and Lin, 1993; วิเชียรลีลา วัชรมาศ, 2534) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจากภาพภาคผนวก ก1, ก2, ก3, ก4 และ ก5 คำนวณการใช้ปริมาณเชื้อผสมระหว่าง *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1 จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกน้ำหมักที่คำนวณปริมาณการใช้แล้ว ด้วยความเร็วรอบ

3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Bartholomew and Blumer, 1980) ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

5.2 การผลิตไส้กรอกหมัก

ผลิตไส้กรอกหมักตามวิธีของจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 จากนั้นทำการผสมส่วนผสมกับจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ด้วยเครื่องผสม นาน 2 นาที ใช้ความเร็วในการผสมระดับ 3 แล้วทำการบรรจุส่วนผสมในไส้แกะ มัดเป็นท่อน แขวนในตู้โปร่ง อุปกรณ์ที่ใช้จะทำการฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนทุกครั้ง เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองไม่ให้ปนเปื้อนในระหว่างชุดการทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 6 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองควบคุม 1 ชุดการทดลอง และชุดการทดลองที่ใช้จุลินทรีย์ 5 ชุดการทดลอง

5.3 การวิเคราะห์

3.1 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เก็บตัวอย่างไส้กรอกหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ไส้กรอกปริมาณ 11 กรัม (Marvin, 1984) ทำการเจือจางให้ได้สารละลายที่เหมาะสม จากตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ คือ 10^6, 10^7 และ 10^8 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ standard plate count agar และ MRS agar ทำ 2 ซ้ำ บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

5.3.2 การวิเคราะห์ทางเคมี ทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรดในรูปกรดแลกติก ค่ากรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติก ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า ตามข้อ 4.3.2

5.3.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5.3.3.1 การเตรียมไส้กรอกหมักเพื่อการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในไส้กรอกหมักที่ผ่านการหมักจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และหยุดการหมักโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการประเมินพร้อมกันทุกชุดการทดลอง การเตรียมไส้กรอกเพื่อการประเมินทางประสาทสัมผัสทำโดยการนำไส้กรอกจากห้องแช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และก่อนทอดจะไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง น้ำมันที่ใช้ทอดใช้

น้ำมันถั่วเหลือง อุณหภูมิในการทอด 120 องศาเซลเซียส ทอดจนกระทั่งไส้กรอกมีอุณหภูมิภายใน 75 องศาเซลเซียส พักไส้กรอกให้เย็นและสะเด็ดน้ำมันเสริฟโดยการสุ่ม

3.3.2 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ทำการประเมินคุณลักษณะโดยวิธีพรรณาคุณลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis, QDA) (Stone, *et al.* 1974) ในด้านความแน่นแข็ง การยึดเกาะและความฉ่ำของเนื้อสัมผัส รสชาติ หวาน เค็ม ขม เปรี้ยว กลิ่นออกซิไดซ์ กลิ่นไส้กรอก และความชอบรวมในอุดมคติ ดังแบบสอบถามในภาคผนวก ค1 และประเมินคุณภาพของไส้กรอกชุดการทดลองดังแบบสอบถามในภาคผนวก ค2 โดยใช้ผู้ประเมินที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 15 คน วางแผนการทดลองแบบสุ่มภายในบล็อค Randomized complete block design, RCB (ไพศาล, เหล่าสุวรรณ, 2535) 6 ชุดการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ DMRT (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2535) แสดงผลในลักษณะแผนภาพใยแมงมุมเปรียบเทียบคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักในอุดมคติและในชุดการทดลอง

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

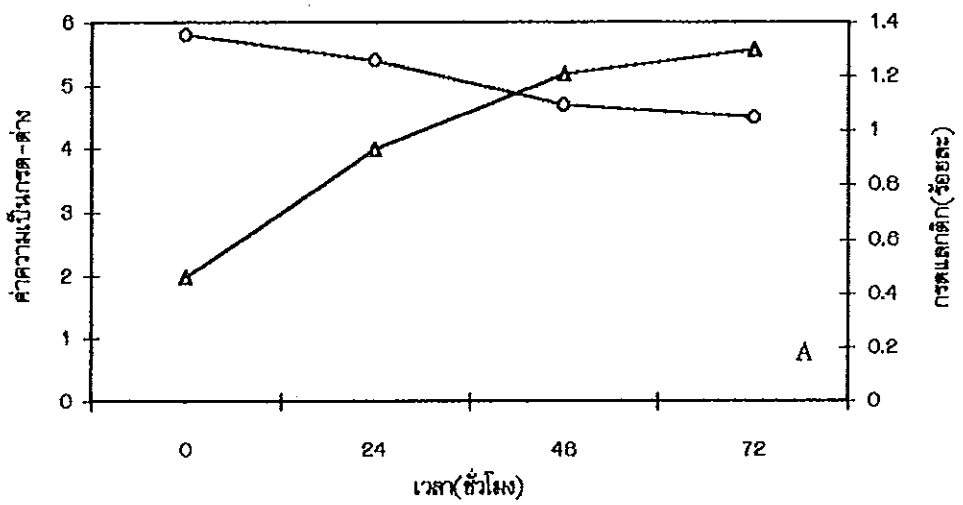
1. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกโดยธรรมชาติ

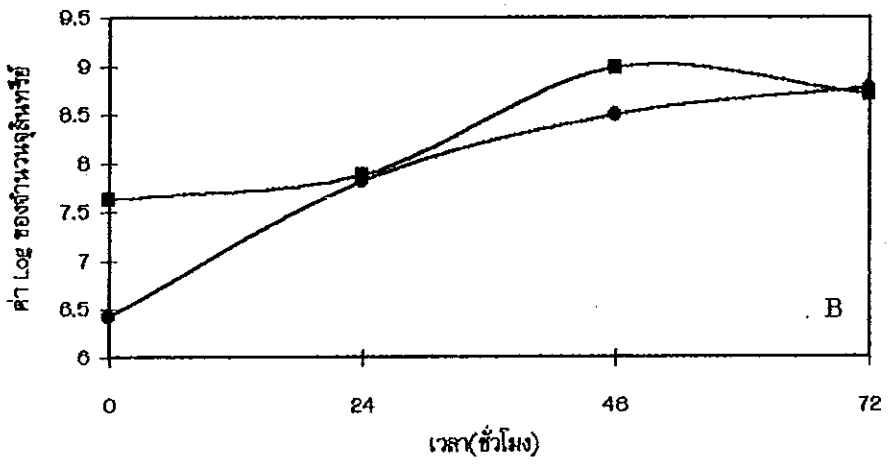
การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักแบ่งเป็น 3 ช่วงคือ ช่วงเริ่มต้นของการหมักซึ่งหมายถึงในวันที่ 0 เก็บตัวอย่างที่ยังไม่ได้เริ่มมีการหมัก ช่วงระยะการหมักหมายถึงในวันที่ 1-2 (24-48 ชั่วโมง) ของการหมัก และช่วงสุดท้ายของการหมัก หมายถึงในวันที่ 3 (72 ชั่วโมง) ของการหมักแสดงผลการเปลี่ยนแปลงในตาราง 2 และภาพ 9

ช่วงเริ่มต้นของการหมัก ไส้กรอกมีค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลกติกเริ่มต้นเท่ากับ 5.80 และร้อยละ 0.46 ตามลำดับ มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.30×10^{7} เซลล์/กรัม มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2.70×10^{6} เซลล์/กรัม ดังภาพ 10 นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ได้ผลิตไส้กรอกหมักในส่วนผสมเดียวกับการทดลองนี้ ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.70 และมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 1.21×10^{9} เซลล์/กรัม มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2.60×10^{8} เซลล์/กรัม ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในไส้กรอกเปรี้ยวค่อนข้างสูงทั้งนี้เนื่องจากการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ และในขั้นตอนการผลิตไม่มีการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ชวลิต ตั้งสกุล (2531) และจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) ผลิตไส้กรอกหมักในส่วนผสมนี้เช่นเดียวกัน ไส้กรอกที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.70 และมีปริมาณกรดแลกติก ร้อยละ 0.30 สาเหตุที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความแตกต่างของความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดนั้นมีหลายสาเหตุ เช่น ความเป็นกรด-ด่างของวัตถุดิบที่นำมาใช้โดยเฉพาะเนื้อหมู เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2534) รายงานว่า กล้ามเนื้อปกติมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.80-7.00 เมื่อสัตว์ถูกฆ่าตาย เนื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนไปจนถึงระดับหนึ่ง ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ ปริมาณไกลโคเจน (glycogen) เริ่มต้นที่มีอยู่ในเนื้อช่วงที่สัตว์ถูกฆ่า ความคงทนต่อสภาพความเครียดของสัตว์ ตำแหน่งของกล้ามเนื้อ และอัตราการทำให้ซากมีอุณหภูมิลดลง ปัจจัยต่างๆเหล่านี้ล้วนมีผลทำให้เนื้อสัตว์มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน และความแตกต่างของปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นนั้นเนื่องจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อหมู ตั้งแต่การฆ่าการชำแหละ การตัดแต่งซาก การปนเปื้อนจากมีด น้ำร้อนลวกขน การสัมผัส

ตาราง 2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลกติก ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PCA และปริมาณแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS

เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ปริมาณกรดแลกติก (ร้อยละ)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (เซลล์/กรัม)	แบคทีเรียแลกติก (เซลล์/กรัม)
0	5.80	0.46	4.30×10^{7}	2.70×10^{6}
24	5.40	0.93	7.65×10^{7}	6.60×10^{7}
48	4.70	1.21	9.70×10^{8}	3.20×10^{8}
72	4.50	1.30	5.10×10^{8}	6.00×10^{8}





ภาพ 9 A การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (—○—) และกรดแลกติก (—△—)
B การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (—■—) และ MRS (—●—) ระหว่างการหมักไส้กรอก

จากมือคน การแปรรูปของเครื่องเทศและเครื่องปรุงรสก็จะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตลอดการผลิต การบรรจุ และการขนส่ง นอกจากจุลินทรีย์จากวัตถุดิบแล้ว กระบวนการผลิตไส้กรอกก็มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากอุปกรณ์ที่ใช้ ภาชนะบรรจุ จุลินทรีย์จากผู้ผลิตและ จุลินทรีย์ในบรรยากาศ ผลของปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นและชนิดของจุลินทรีย์ล้วนมีบทบาทสำคัญระหว่างการหมัก

ช่วงระยะการหมัก หรือในวันที่ 1-2 ของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงเป็น 5.40 และ 4.70 ในขณะที่ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 0.93 และ 1.21 ในการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์พบจุลินทรีย์ทั้งหมดเปลี่ยนแปลงจำนวนเป็น 7.65×10^{7} และ 9.70×10^{8} เซลล์/กรัม มีแบคทีเรียแลกติก 6.60×10^{7} และ 3.20×10^{8} เซลล์/กรัม ดังภาพ 9B ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกเพิ่มสูงขึ้นในปริมาณมาก เนื่องจากการลดลงของความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ สภาวะที่มีอากาศน้อย และการมีสารอาหารที่เหมาะสมทำให้แบคทีเรียแลกติกเจริญได้ดี นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมัก 2.00×10^{9} และ 1.00×10^{10} เซลล์/กรัม แบคทีเรียแลกติก 1.07×10^{9} และ 2.21×10^{9} เซลล์/กรัม ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.50 และ 4.58 จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมัก 1.20×10^{7} และ 2.30×10^{8} เซลล์/กรัม ปริมาณแบคทีเรียแลกติก 8.00×10^{5} และ 5.60×10^{6} ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.60 และ 4.35 มีปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 0.85 และ 1.25 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของจุลินทรีย์เริ่มต้นนั้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์เริ่มต้นในปริมาณสูงกว่า จะมีปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสูงทั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติก ทำให้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและการเพิ่มของปริมาณกรดแลกติกมีมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นน้อยกว่า สาเหตุอื่นที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์คือ ชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิในการหมัก ชนิดและปริมาณของสารคาร์โบไฮเดรตซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของเกลือ

Houle, *et al.* (1989) ทดลองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus acidilactici* ในปริมาณร้อยละ 1 เพื่อผลิตไส้กรอกหมัก พบว่า

ผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. plantarum* มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่เติม *P. acidilactici*

Huang และ Lin (1993) หมักไส้กรอกที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าผลิตภัณฑ์หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการลดลงของความเป็นกรด-ด่างมากที่สุด และมีปริมาณจุลินทรีย์สูงที่สุด รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ที่หมักที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Acton, *et al.* (1977) ทดลองใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิดคือ น้ำตาลเดกซ์โตรส ซูโครส มอลโตส เดกซ์แตรน และแล็กโทส ในการหมักไส้กรอก ที่ใช้ *P. acidilactici* พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตภัณฑ์มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด รองลงมาคือ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ น้ำตาลเดกซ์โตรส มอลโตส เดกซ์แตรน และแล็กโทส ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำตาลเดกซ์โตรส มีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด รองลงมาคือผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำตาลซูโครส มอลโตส เดกซ์แตรน และแล็กโทส ตามลำดับ

Gilliland (1988) เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลเดกซ์โตรส 4 ระดับในการหมักไส้กรอก คือร้อยละ 0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0 โดยใช้เชื้อ Lactobacilli เป็นกล้าเชื้อ ใช้เวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่เติมน้ำตาลเดกซ์โตรสร้อยละ 1.0 มีความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด คือ 4.95 รองลงมาคือ การใช้น้ำตาลเดกซ์โตรสร้อยละ 0.5, 0.3 และ 0.1 และพบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 1 ในสูตรการผลิตไส้กรอก จะทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลง 1 หน่วย

Gilliand (1988) หมักไส้กรอกที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.5, 3.0 และ 3.5 เพื่อให้ไส้กรอกมีความเป็นกรด-ด่าง 5.10 ที่อุณหภูมิ 25.5 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือร้อยละ 2.5 ในส่วนผสมใช้เวลาในการหมักน้อยที่สุดคือ 16 ชั่วโมง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือร้อยละ 3.0 ใช้เวลาในการหมัก 18 ชั่วโมง และผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือร้อยละ 3.5 ใช้เวลาในการหมักนานที่สุดคือ 19 ชั่วโมง

ช่วงสุดท้ายของการหมัก หรือในวันที่ 3 ของการหมัก ผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรด-ด่าง 4.50 มีปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 1.30 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลกติก 5.10×10^8 และ 6.00×10^8 เซลล์/กรัม ดังภาพ 9B นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติก ในช่วงสุดท้ายของการ

หมัก 1.00×10^{11} และ 6.40×10^{8} เซลล์/กรัม ตามลำดับ ความเป็นกรด-ด่าง 4.35 จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลกติก 4.10×10^{8} และ 1.25×10^{8} เซลล์/กรัม ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลกติกในระยะนี้มีเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดของผลิตภัณฑ์มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในไส้กรอก Kandler and Weiss (1986) รายงานว่ากรดอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ในรูปที่ยังไม่แตกตัว และจะอยู่ในรูปแตกตัวเป็นโปรตอน (proton) เมื่ออยู่ภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ โปรตอนที่สะสมอยู่จะถูกขับออกจากไซโตพลาสซึมโดย H^{+} ATPase ทำให้สูญเสีย ATP (Hickey, *et al.*, 1983; Huggin, 1984; Carlson, *et al.*, 1985; Melville, *et al.*, 1988) มีผลให้เกิดการยับยั้งการขนส่งสารอาหาร (nutrient transport) (Condon, 1987) ทำให้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย การเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย และการสร้างกรดจึงลดลง

2. การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่พบในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ของการหมัก

2.1 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบระหว่างการหมัก

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหาร PCA คือการศึกษาการติดสีแกรม และการจัดเรียงเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การเก็บเซลล์จะสุ่มเก็บจากลักษณะของเซลล์และการกระจายบนจานอาหาร ทั้งหมด 115 เซลล์ จากการศึกษาแยกจุลินทรีย์ได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมบวก (Gram-positive rod) แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบ (Gram-negative rod) แบคทีเรียรูปร่างทรงกลมจัดเรียงเซลล์เดี่ยว (Gram-positive cocci) แบคทีเรียรูปร่างทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ (Gram-positive tetrad) และกลุ่มสุดท้ายคือ ยีสต์ (yeast) แสดงดังตาราง 3 ช่วงเริ่มต้นของการหมัก (ในวันที่ 0) แบคทีเรียที่พบมากจะเป็นพวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนแกรมลบ รองลงมาคือแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมแกรมบวกจัดเรียงเซลล์เดี่ยว พบยีสต์และแบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมบวกอยู่เล็กน้อย และไม่พบแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมแกรมบวกจัดเรียง 4 เซลล์ ระหว่างการหมักและระยะสุดท้ายของการหมักตั้งแต่วันที่ 1-3 มีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบอย่างเห็นได้ชัด

ตาราง 3 ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอก

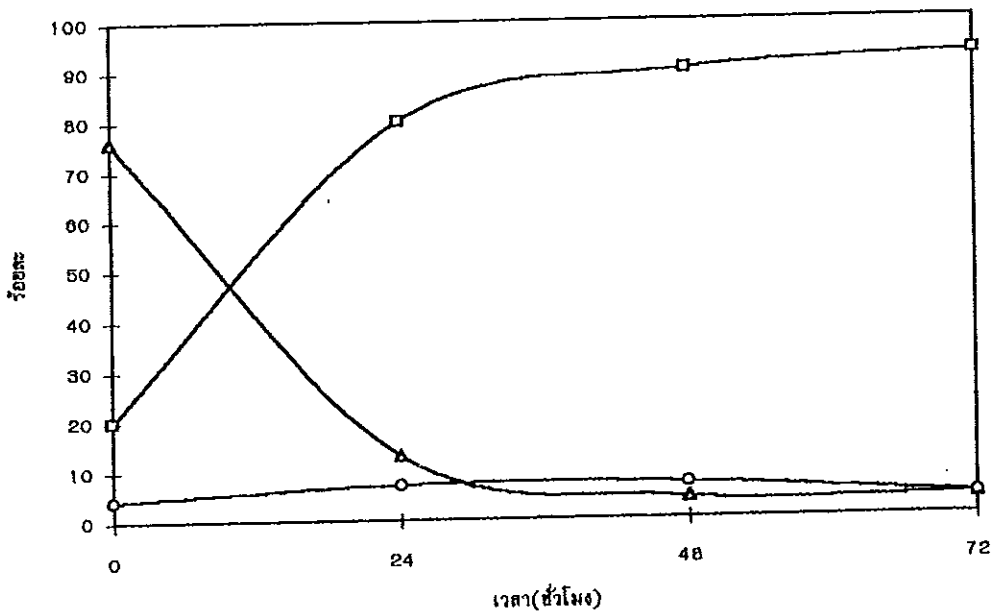
เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนีทั้งหมด					
	รูปร่างท่อน		รูปร่างทรงกลม		ยีสต์	จำนวนโคโลนีทั้งหมด
	แกรมบวก	แกรมลบ	แกรมบวก			
			จัดเรียงเซลล์เดี่ยว	จัดเรียง 4 เซลล์		
0	1	19	4	-	1	25
24	24	4	1	-	2	31
48	25	1	1	1	2	30
72	24	1	1	2	1	29

โดยลดปริมาณลงจากเติมเหลือเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกับแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมแกรมบวกจัดเรียงเซลล์เดี่ยว ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์และสภาพไร้อากาศ ทำให้แบคทีเรีย 2 กลุ่มนี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมบวก แบคทีเรียรูปร่างทรงกลมแกรมบวกจัดเรียง 4 เซลล์ มีปริมาณมากขึ้น ส่วนยีสต์พบปริมาณเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการหมัก จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เห็นได้ชัดว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่มีบทบาทในช่วงการหมัก สามารถเจริญได้ดีในระหว่างการหมักคือแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก ดังรายละเอียดในภาพ 10 งานวิจัยขั้นต่อไปคือการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม เพื่อการจัดจำแนกชนิดกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก

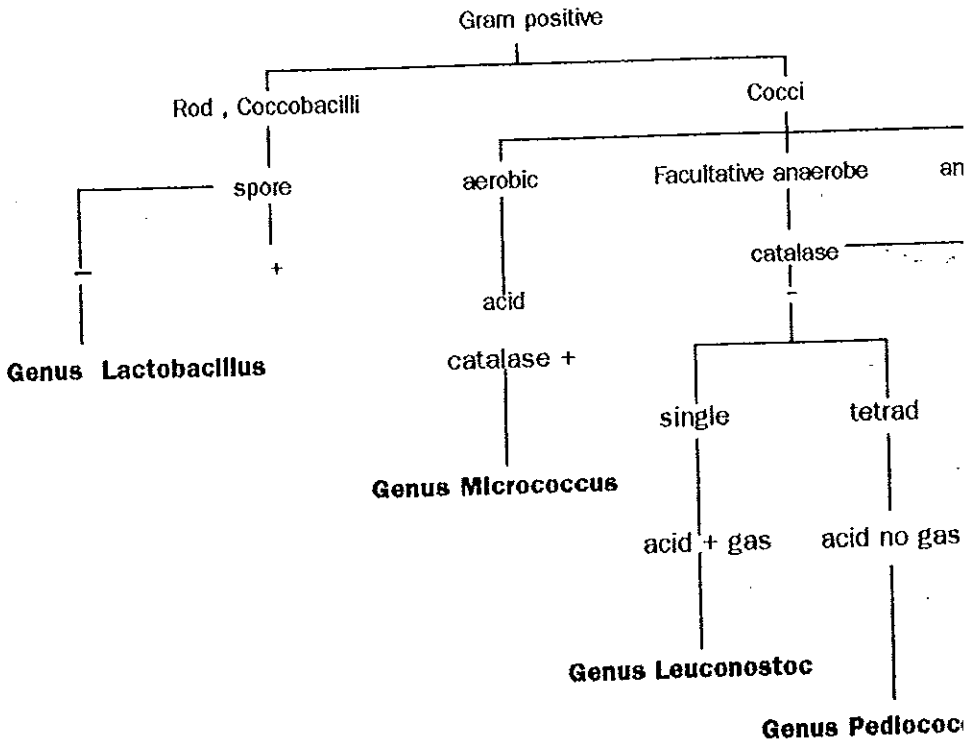
2.2 การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

แบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีรูปร่างท่อน กลุ่มภาพร่างทรงกลมจัดเรียงเซลล์เดี่ยว และกลุ่มรูปร่างทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีตามวิธีใน Bergey's manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1986) และ Identification Method for Microbiologist (Sharpe and Fryer, 1966) และ Difco Manual (Difco Laboratory, 1984) สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 4 สกุล คือ สกุล Micrococcus สกุล Lactobacillus 2 กลุ่ม คือกลุ่ม Obligate homofermentative และกลุ่ม Obligate heterofermentative สกุล Leuconostoc และสกุล Pediococcus ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแลกติก แสดงรายละเอียดการศึกษาในภาพ 11 และมีสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังตาราง 4, 5, 6, และ 7 จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ทั้งหมดตลอดระยะเวลาการหมักของไส้กรอกดังแสดงในตาราง 8

จากตาราง 8 พบแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบจำนวนมากในช่วงเริ่มต้นของการหมัก (วันที่ 0) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศปนเปื้อนมากับเนื้อหมูและวัตถุดิบอื่นๆ ดังจะเห็นได้จากการลดจำนวนลงในการหมัก เนื่องจากสภาวะอากาศที่น้อยลง และพบ Micrococcus, Lactobacillus และยีสต์ ในปริมาณเล็กน้อย สำหรับช่วงระยะการหมักในวันที่ 1-2 แบคทีเรียที่พบมากและมีบทบาทสำคัญคือ Lactobacillus ซึ่งพบทั้ง โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ วิไลลักษณ์ กมลธรรม (2535) และในช่วงสุดท้ายของการ



ภาพ 10 แสดงกลุ่มของจุลินทรีย์ แกรมบวก (—□—) แกรมลบ (—△—) และยีสต์ (—○—) ระหว่างการหมักไส้กรอก



ภาพ 11 แผนภูมิการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกที่พบในไส้กรอกหมัก

ตาราง 4 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacillus

	ชนิดของแบคทีเรีย				
	Obligate homofermentative		Obligate heterofermentative		
	L. plantarum	*L.. spp.*	*L.. brevis*	*L.. fermentum*	*L. spp.*
รูปร่างเซลล์	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+
การมีสปอร์	-	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	-	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-	-	-	-
การมีเอนไซม์โปรตีเอส	-	-	+	+	+
การเจริญในสภาพไร้อากาศ	+	+	+	+	+
ออกซิเดชัน/เฟอร์เมนเตชัน(O/F)	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	-	-	-	-
หมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ	+	+	-	-	-
การเคลื่อนที่	-	-	-	-	-
การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรท					
กลูโคส	+	+	+	+	+
ไซโลส	+	+	+	+	+
อะราไบโนส	+	-	+	+	+
เมลลิไบโอส	+	+	+	+	-
แรฟฟิโนส	+	-	-	+	-
แรมโนส	+	+	-	-	-
เมลลิไซโตส	+	+	-	-	-
ซอบิทอล	+	+	-	-	-
แล็กโทส	+	+	+	+	+
เซลโลไบโอส	+	-	-	-	+

ตาราง 5 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีสำหรับการเทียบเคียง *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum

	ชนิดของแบคทีเรีย
	Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum
รูปร่างเซลล์	ทรงกลม
การติดสีแกรม	+
การมีสปอร์	-
การมีเอนไซม์ออกซิเดส	-
การมีเอนไซม์คาตาเลส	-
การมีเอนไซม์โปรตีเอส	-
การเจริญในสภาพไร้อากาศ	+
การทดสอบออกซิเดชัน/เฟอร์เมนเตชัน(O/F)	-/+
การรีดิวซ์ไนเตรท	-
การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ	+
การเคลื่อนที่	-
การเจริญใน 10 % เอทธานอล	-
การเจริญที่พีเอช 4.8	+
การสร้างเดกซ์แตรน	+
การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรท	
กลูโคส	+
อะราไบโนส	-
ฟรุคโตส	+
ซูโครส	+
แรฟฟิโนส	-
แล็กโทส	+

ตาราง 6 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีสำหรับการเทียบเคียง *Pediococcus pentosaceus*

	ชนิดของแบคทีเรีย
	Pediococcus pentosaceus
รูปร่างเซลล์	ทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ (tetrad)
การติดสีแกรม	+
การมีสปอร์	-
การมีเอนไซม์คะตาเลส	-
การมีเอนไซม์ออกซิเดส	+
การมีเอนไซม์โปรตีเอส	-
การเจริญในสภาพไร้อากาศ	+
การทดสอบออกซิเดชัน/เฟอร์เมนเตชัน(O/F)	-/+
การรีดิวซ์ไนเตรท	-
การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ	+
การเคลื่อนที่	-
การเจริญในอาหารที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์	
ร้อยละ 4 , 6.5	+
ร้อยละ 18	-
การเจริญในอาหารที่มีพีเอช	
4.2 , 7.5 , 8.5	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 35 , 40 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	-
การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรท	
กลูโคส	+
อะราไบโนส	+
แรฟฟีโนส	-
แล็กโทส	+
ซูโครส	+
มอลโตส	+

ตาราง 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีสำหรับการเทียบเคียง *Micrococcus spp.*

	ชนิดของแบคทีเรีย
	Micrococcus spp.
สีของโคโลนี	เหลือง
รูปร่างเซลล์	ทรงกลม
การติดสีแกรม	+
การมีสปอร์	-
การมีเอนไซม์คะตาเลส	+
การมีเอนไซม์ออกซิเดส	+
การมีเอนไซม์โปรตีเอส	-
การเจริญในสภาพไร้อากาศ	-
การทดสอบออกซิเดชัน/เฟอร์เมนเตชัน(O/F)	-/+
การรีดิวซ์ไนเตรท	+
การเคลื่อนที่	-
การเจริญในอาหารที่มีสารละลาย	
โซเดียมคลอไรด์ 7.5 %	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญใน Simmon citrate agar	+
การสร้างกรดจากกลูโคส	+

หมักพบ Leuconostoc และ Pediococcus ในปริมาณเล็กน้อย และพบยีสต์ตลอดระยะเวลาการหมัก

การเปลี่ยนแปลงชนิดและจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มแกรมบวกซึ่งพบว่ามีบทบาทสำคัญระหว่างการหมัก มีรายละเอียดดังนี้

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Micrococcus ระหว่างการหมักไส้กรอก

พบ *Micrococcus spp.* ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก แสดงในตาราง 8 และภาพ 12 หรือพบเมื่อผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 5.40 สอดคล้องกับ Deibel, *et al.* (1961) ซึ่งรายงานว่า Micrococcus เป็นเชื้อที่พบในช่วงแรกของการหมักเนื้อ กิจกรรมของเชื้อในการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์นั้นเกิดขึ้นในระหว่าง 2-16 ชั่วโมงแรก ของการหมักไส้กรอกทั่วไป ขณะที่การสร้างกรดในผลิตภัณฑ์จะเริ่มขึ้นหลังจาก 8-16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า *M. varians* ควรจะมีกิจกรรมเกิดขึ้น ก่อนที่จะถูกยับยั้งเนื่องจากสภาพสิ่งแวดล้อมเป็นกรดมากขึ้น ไพโรจน์ วิริยจารี (2534) ทดลองหมักแทนมด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* และ *M. varians* พบว่า เชื้อบริสุทธิ์ *M. varians* จะมีผลต่อการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ ในช่วงแรกของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรดมากขึ้น ไนไตรท์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนตริกออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกับรงควัตถุในเนื้อ (Myoglobin) จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูของไนโตรโซไมโอโกลบิน (Nitrosomyoglobin) ซึ่งอัตราการเกิดสีชมพูจะเกิดได้ดีที่พีเอช 5.00-5.50 (Nurmi, 1966)

2.2.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Lactobacillus ระหว่างการหมักไส้กรอก

แบคทีเรียสกุล Lactobacillus ที่พบระหว่างการหมักคือ *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* และ *L. spp.* แสดงในตาราง 8 และภาพ 12 ซึ่งนงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) เทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียในไส้กรอกเปรี้ยวจากสูตรของ จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) และตัวอย่างไส้กรอกจาก ส.ขอนแก่น พ่อครัวใหญ่ คิ้มบางไผ่ และไส้กรอกเปรี้ยวที่ชาวบ้านผลิตขึ้น พบ *L. plantarum*, *L. salivarius subsp. salicinius*, *L. bulgaricus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* เชื้อที่พบมีความหลากหลายมากกว่าเพราะมีการเก็บตัวอย่างไส้กรอกในหลายสถานที่

ตาราง 8 ร้อยละของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกโดยธรรมชาติ

เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)	ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมัก								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0	4.00	76.00	4.00	-	-	-	-	-	16.00
24	6.45	12.90	45.16	19.35	3.23	9.67	-	-	3.23
48	6.67	3.33	30.00	36.67	6.67	10.00	3.33	3.33	-
72	3.45	3.45	48.30	31.00	3.45	-	6.90	3.45	-
ร้อยละทั้งหมด	5.14	23.92	31.87	21.76	3.35	4.91	2.55	1.70	4.80

A = ยีสต์

B = แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ

C = *Lactobacillus plantarum*

D = *Lactobacillus brevis*

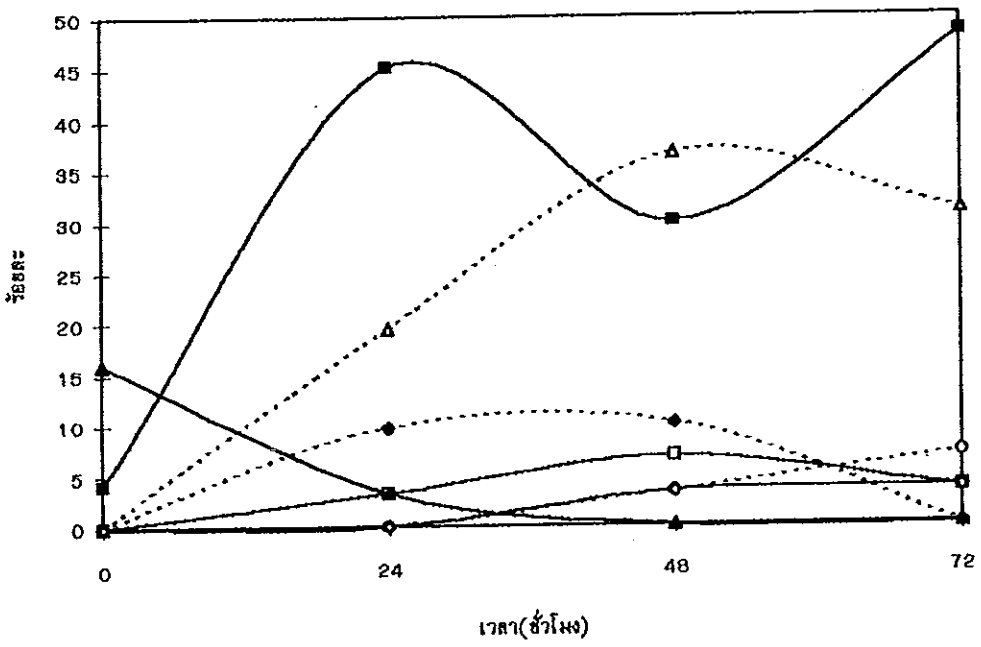
E = *Lactobacillus fermentum*

F = *Lactobacillus spp.*

G = *Pediococcus pentosaceus*

H = *Leuconostoc mesenteroides* spp. dextranicum

I = *Micrococcus spp.*



ภาพ 12 ผลการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* (—■—) *L. brevis* (---△---) *L. fermentum* (—□—) *Lactobacillus spp.* (--◆--) *Pediococcus pentosaceus* (--○---) *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* (—◇—) และ *Micrococcus spp.* (—▲—)

จากการทดลองระหว่างการหมักพบ *L. plantarum* ในปริมาณมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Clarke (1991) ที่รายงานว่า การมีปริมาณน้ำตาลในไส้กรอกหมักสูงจะพบแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ มากกว่าเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ Gilliland (1988) รายงานว่า *L. plantarum* มีเอนไซม์ aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase และ 6-phosphogluconate dehydrogenase เปลี่ยนน้ำตาลเป็น DL-Lactic acid เป็นการหมักแบบโฮโมเฟคร์เมนเตทีฟ น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้เกือบทั้งหมด ในขณะที่ *L. brevis* และ *L. fermentum* จะเปลี่ยนน้ำตาลโดยวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phospho- ketolase pathway) เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกได้เพียงร้อยละ 50 เป็นการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ และจะได้ เอทธานอล และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Thornhill and Cogan, 1984) ไพโรจน์ วิริยจารี (2534) ทดลองหมักแหนมด้วยเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum, P. acidilactici* และ *M. varians* พบว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นประเภท *L. plantarum* จะมีผลต่อการลดลงของความเป็นกรด-ด่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงแรกของการหมัก โดยการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและข้าวสุกให้กลายเป็นกรดแลกติกเมื่อความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อยๆ จะทำให้โปรตีนถูกทำลายไป (denature) มีการเกิดเจลขึ้น ทำให้เนื้อเริ่มแข็งเหนียวขึ้น และการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *L. plantarum* และ *M. varians* จะมีผลกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสีในผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น เนื่องจากอัตราการเกิดสีชมพูของไนโตรโซไมโอโกลบินจะเกิดได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.5 กรดที่สร้างจาก *L. plantarum* จึงมีผลช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดี

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Leuconostoc ระหว่างการหมักไส้กรอก

พบ *Leuconostoc mesenteroides* ในช่วงท้ายของการหมักในจำนวนเล็กน้อย Leuconostoc เป็นกลุ่มแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ ต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการเจริญเติบโต Leuconostoc ทุกชนิดต้องการกรดนิโคตินิก ไทอามีน ไบโอติน และกรดเพนโททินิก มีการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติก เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระสกุล, 2536) และการที่ Leuconostoc spp. ต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการเจริญเติบโตทำให้พบ Leuconostoc spp. ในช่วงท้ายของการหมัก แสดงในตาราง 8 และภาพ 13 Gilliland (1988) รายงานว่า *Leu. mesenteroides* เปลี่ยนน้ำตาลเป็น D (-) Lactic acid ในขณะที่ *L. brevis, L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ให้ทั้ง D

(-) และ L (+) Lactic acid

2.2.4 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียสกุล Pediococcus ระหว่างการหมักไส้กรอก

พบ *P. pentosaceus* ในช่วงท้ายของการหมัก แสดงดังภาพ 12 Pediococcus spp. เป็นแบคทีเรียพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นพวกเคโมออร์แกนโนโทรฟ (chemoorganotroph) ต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการเจริญ เติบโต Pediococcus ทุกชนิดต้องการกรดนิโคตินิก กรดเพนโททินิก และไบโอติน *P. pentosaceus* ต้องการไนอะซิน และกรดโฟลินิกในการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 28-32 องศาเซลเซียส ไพโรจน์ วิริยจารี (2534) หมักแหนมโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย บริสุทธิ์ *L. plantarum, P. acidilactici* และ *M. varians* พบว่าเชื้อ *P. acidilactici* จะมีผลต่อความแน่นในช่วงหลังของการหมัก ซึ่งการเจริญเหมาะสมที่สุดของ *P. acidilactici* จะอยู่ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 (Buchanan and Baker, 1974) ดังนั้นสภาพแวดล้อมของการหมักช่วงท้ายจึงเหมาะสมที่เชื้อดังกล่าวจะเจริญเติบโต และทำให้ผลิตภัณฑ์แหนมมีความเหนียวมากขึ้น Deibel (1974) รายงานว่า แบคทีเรียสกุล Pediococcus มีลักษณะที่เป็นกล้าเชื้อที่ดีโดยเฉพาะ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* เนื่องจากมีลักษณะทนเกลือ เจริญได้ในน้ำเกลือ 6 เปอร์เซนต์ เจริญได้ดีเมื่อมีไนไตรท์ 80-100 ส่วนในล้านส่วน อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 32.2 องศาเซลเซียส เป็นโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ เป็นพวกที่ไม่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน ไม่ผลิตกลิ่นผิดปกติ และผลิตผลพลอยได้ (by product) จากการหมัก

3. การคัดเลือกแบคทีเรียสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

การจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีบทบาทในระหว่างการหมักไส้กรอก พบแบคทีเรียที่สำคัญ 7 ชนิดคือ *L. plantarum, L. brevis, L. fermentum L. spp., Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum, *P. pentosaceus* และ *M. spp.* และเนื่องจากในงานวิจัยขั้นตอนต่อไปจะทำการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับไส้กรอกหมัก จึงต้องการแบคทีเรียที่ทราบชนิดแน่นอน มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างและอัตราการสร้างเซลล์สูง มีการเจริญได้ดีในระหว่างการหมัก ดังนั้นจึงศึกษาแบคทีเรียเพียง 5 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum,*

Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum, Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum และ *Pediococcus pentosaceus*

3.1 การคัดเลือก *Lactobacillus plantarum*

ศึกษาอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลของ *L. plantarum* โดยเลี้ยงเชื้อใน MRS broth เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาพภาคผนวก ก1 อ่านค่าเป็นจำนวนเซลล์ คำนวณค่าอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์

พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมัก ดังแสดงในตาราง 9 และภาพ 13A โดยที่การหมักด้วย *L. plantarum* 3409 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.72 ลดลงเหลือ 5.65 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง (DpH) สูงที่สุดคือ 0.09 หน่วย/ชั่วโมง *L. plantarum* 3404 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.05 หน่วย/ชั่วโมง และ *L. plantarum* 1206 และ 2506 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง 0.05 และ 0.04 หน่วย/ชั่วโมง ตามลำดับ

การศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ของ *L. plantarum* พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามเวลาหมัก แสดงในตาราง 10 และภาพ 13B โดย *L. plantarum* 3409 มีอัตราการสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง คือมีปริมาณเซลล์ จากเริ่มต้น 5.00×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 6.76×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 5.63×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง ในขณะที่ *L. plantarum* 3404 มีปริมาณเซลล์ 3.63×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 2.98×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เชื้อ *L. plantarum* 1206 มีปริมาณเซลล์ 3.02×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 2.47×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง และเชื้อ *L. plantarum* 2506 มีปริมาณเซลล์ 2.19×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 1.80×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง ซึ่ง Montville, *et al.* (1987) รายงานว่า *L. plantarum* ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าจะสร้างเซลล์ได้มากกว่าเช่นกัน

ตาราง 9 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus plantarum* 3409 , 3404 , 1206 และ 2506

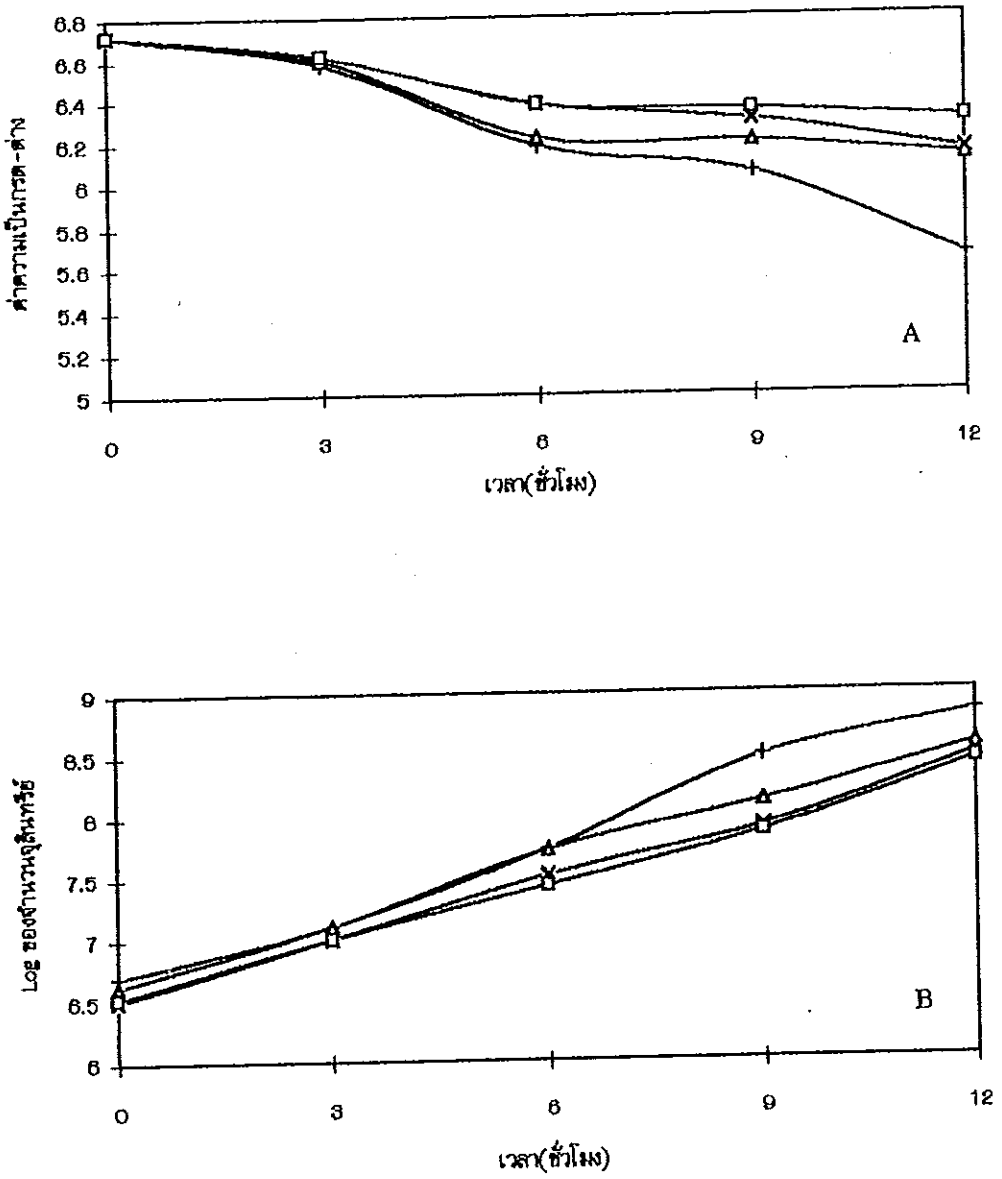
รหัสเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					DpH [1] หน่วย/ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3409	6.72	6.58	6.18	6.05	5.65	0.09
3404	6.72	6.60	6.22	6.20	6.12	0.05
1206	6.72	6.62	6.38	6.30	6.15	0.05
2506	6.72	6.62	6.38	6.35	6.30	0.04

[1] อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ 12 ชั่วโมง

ตาราง 10 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* 3409 , 3404 , 1206 และ 2506

รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์ เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)					อัตราการสร้างเซลล์ โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3409 (x 10^7)	0.50	1.29	5.37	30.20	67.61	5.63 x 10^7
(Log)	6.70	7.11	7.73	8.48	8.83	
3404 (x 10^7)	0.42	1.29	5.25	12.88	36.31	2.98 x 10^7
(Log)	6.62	7.11	7.72	8.11	8.56	
1206 (x 10^7)	0.32	1.00	3.23	7.94	30.20	2.47 x 10^7
(Log)	6.51	7.00	7.51	7.90	8.48	
2506 (x 10^7)	0.34	1.00	2.69	7.24	21.88	1.80 x 10^7
(Log)	6.53	7.00	7.43	7.86	8.34	

[1] อัตราการสร้างเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพ 13 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus plantarum* 3409 (—+—), 3404 (—Δ—), 1206 (—×—) และ 2506 (—□—) ในการคัดเลือกเชื้อ

3.2 การคัดเลือก *Lactobacillus fermentum*

พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมักด้วย *L. fermentum* ทั้ง 2 เชื้อ แสดงในตาราง 11 และภาพ 14A โดยที่การหมักด้วย *L. fermentum* 2112 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.72 ลดลงเหลือ 5.70 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง (DpH) สูงที่สุดคือ 0.09 หน่วย/ชั่วโมง *L. fermentum* 2508 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.04 หน่วย/ชั่วโมง

การศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ของ *L. fermentum* พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามเวลาหมัก ดังแสดงในตาราง 12 และภาพ 14B โดย *L. fermentum* 2112 มีอัตราการสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง คือมีปริมาณเซลล์ จากเริ่มต้น 2.60×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 4.37×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 3.64×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร.ชั่วโมง ในขณะที่ *L. fermentum* 2508 มีปริมาณเซลล์ 1.00×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 8.20×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง

3.3 ผลการคัดเลือก *Lactobacillus brevis*

พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมักด้วย *L. brevis* ทั้ง 4 เชื้อ แสดงในตาราง 13 และภาพ 15A โดยที่การหมักด้วย *L. brevis* 3304 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.72 ลดลงเหลือ 5.70 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง (DpH) สูงที่สุดคือ 0.09 หน่วย/ชั่วโมง *L. brevis* 3403 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.07 หน่วย/ชั่วโมง และ *L. brevis* 3602 และ 3601 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง 0.06 และ 0.05 หน่วย/ชั่วโมง ตามลำดับ

การศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ของ *L. brevis* พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามเวลาหมัก แสดงในตาราง 14 และภาพ 15B โดย *L. brevis* 3304 มีอัตราการสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง คือมีปริมาณเซลล์ จากเริ่มต้น 2.57×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 7.40×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 5.95×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง ในขณะที่ *L. brevis* 3303 มีปริมาณเซลล์ 5.75×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 4.61×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง *L. brevis* 3602 มีปริมาณเซลล์ 5.01×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 3.98×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง และเชื้อ

ตาราง 11 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus fermentum* 2112 และ 2508

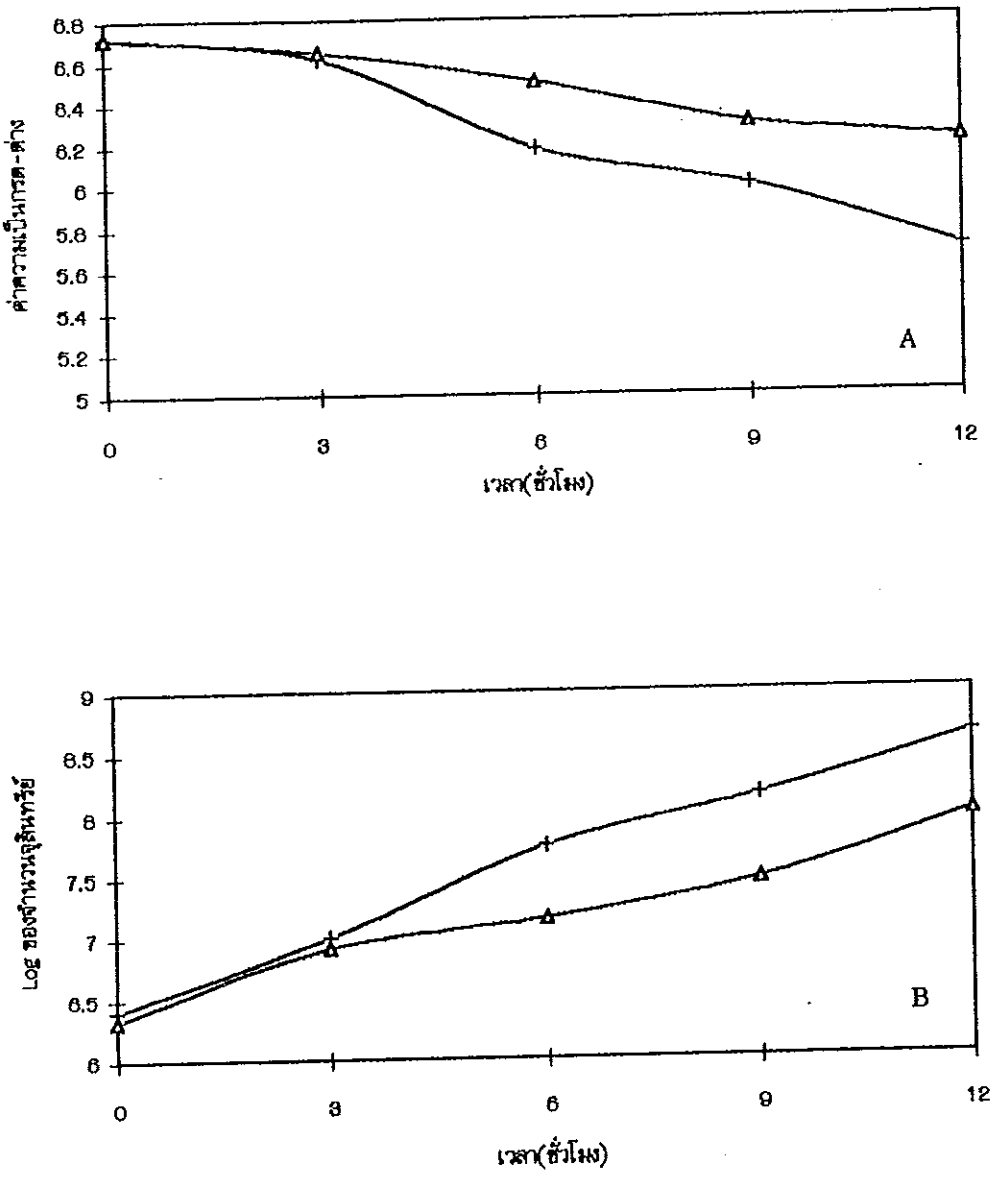
รหัสเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					DpH[1] หน่วย/ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
2112	6.72	6.62	6.18	6.00	5.70	0.09
2508	6.72	6.65	6.50	6.30	6.22	0.04

[1] อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ 12 ชั่วโมง

ตาราง 12 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus fermentum* 2112 และ 2508

รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์ เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					อัตราการสร้างเซลล์[1] โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
2112 (x 10^7)	0.26	1.00	5.62	14.13	43.65	3.64 X 10^7
(Log)	6.41	7.00	7.75	8.15	8.64	
2508 (x 10^7)	0.21	0.83	1.41	2.88	10.00	8.20 X 10^6
(Log)	6.33	6.92	7.15	7.46	8.00	

[1] อัตราการสร้างเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพ 14 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus fermentum* 2508 (—+—) และ 2112 (—Δ—) ในการคัดเลือกเชื้อ

ตาราง 13 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus brevis* 3304 , 3403 , 3602 และ 3601

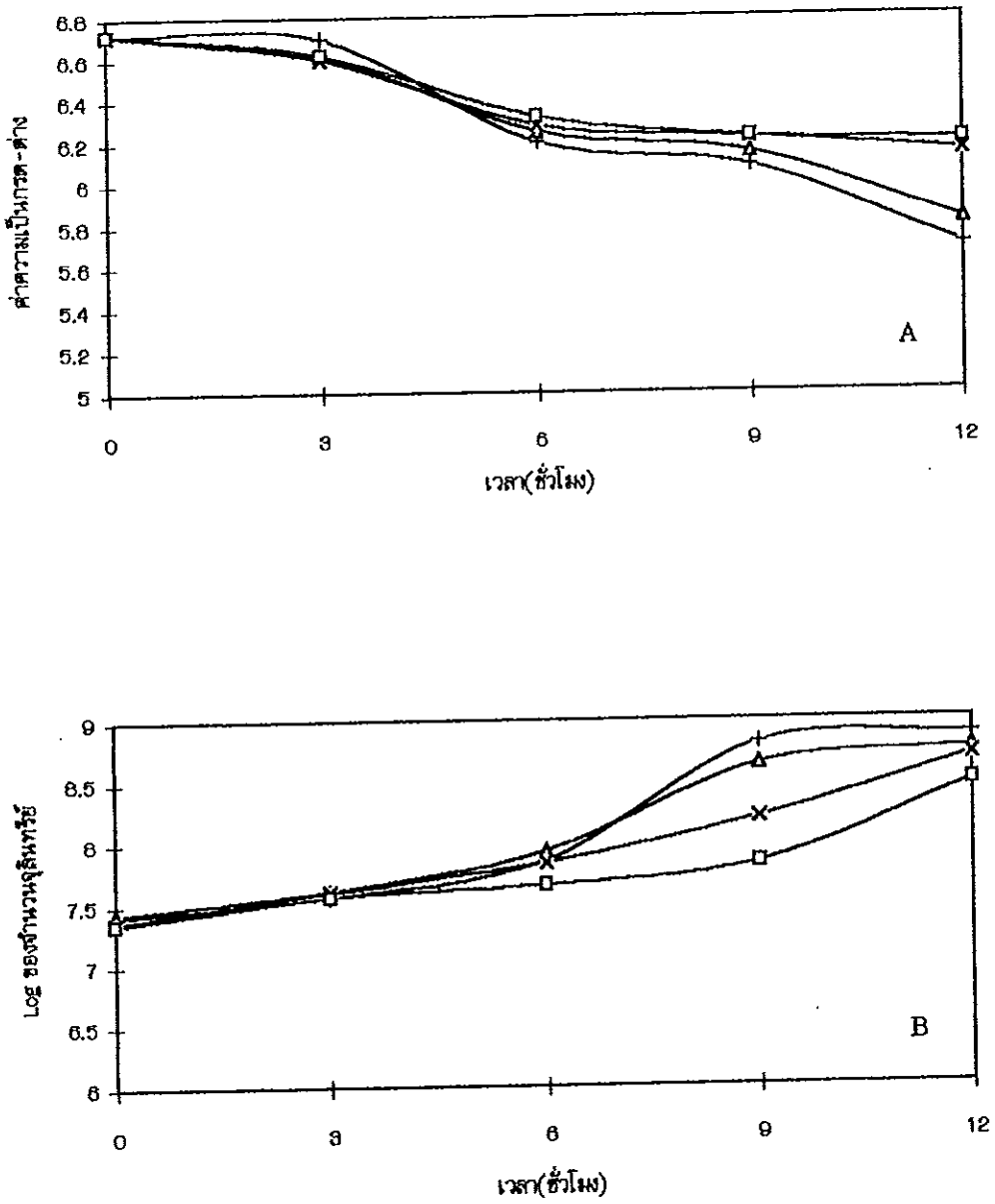
รหัสเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					DpH[1] หน่วย/ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3304	6.72	6.70	6.20	6.08	5.70	0.09
3403	6.72	6.62	6.25	6.15	5.82	0.07
3602	6.72	6.60	6.28	6.22	6.15	0.06
3601	6.72	6.62	6.32	6.22	6.20	0.05

[1] อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ 12 ชั่วโมง

ตาราง 14 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Lactobacillus brevis* 3304 , 3403 , 3602 และ 3601

รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์ เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					อัตราการสร้างเซลล์[1] โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3304 (x 10^7)	2.57	3.63	7.08	64.57	74.13	5.95 X 10^7
(Log)	7.41	7.56	7.85	8.81	8.87	
3403 (x 10^7)	2.69	4.07	8.51	43.65	57.54	4.61 X 10^7
(Log)	7.43	7.61	7.93	8.64	8.76	
3602 (x 10^7)	2.29	3.98	6.76	15.85	50.12	3.98 X 10^7
(Log)	7.36	7.60	7.83	8.20	8.70	
3601 (x 10^7)	2.19	3.63	4.47	6.61	30.20	2.32 X 10^7
(Log)	7.34	7.56	7.65	7.82	8.48	

[1] อัตราการสร้างเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Lactobacillus brevis* 3304 (—+—), 3403 (—Δ—), 3606 (—×—) และ 3601 (—□—) ในการคัดเลือกเชื้อ

3601 มีปริมาณเซลล์ 3.02 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 2.32 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง

3.4 ผลการคัดเลือก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum

พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมักด้วย *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum ทั้ง 2 เชื้อ แสดงในตาราง 15 และภาพ 16A โดยที่การหมักด้วย *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.72 ลดลงเหลือ 5.90 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง (DpH) สูงที่สุดคือ 0.07 หน่วย/ชั่วโมง *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 3406 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.05 หน่วย/ชั่วโมง

การศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ของ *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามเวลาหมัก แสดงในตาราง 16 และภาพ 16B โดย *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 มีอัตราการสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง คือมีปริมาณเซลล์ จากเริ่มต้น 8.90 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 4.17 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 3.42 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง ในขณะที่ *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 3406 มีปริมาณเซลล์ 2.82 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 1.50 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง

3.5 ผลการคัดเลือก *Pediococcus pentosaceus*

พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมักเช่นเดียวกับเชื้ออื่นๆ ผลการคัดเลือก *P. pentosaceus* ทั้ง 3 เชื้อแสดงในตาราง 17 และภาพ 17A โดยที่การหมักด้วย *P. pentosaceus* 3301 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.72 ลดลงเหลือ 4.25 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (DpH) สูงที่สุดคือ 0.21 หน่วย/ชั่วโมง *P. pentosaceus* 2205 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.20 หน่วย/ชั่วโมง และ *P. pentosaceus* 3302 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างน้อยที่สุดคือ 0.19 หน่วย/ชั่วโมง

การศึกษาอัตราการสร้างเซลล์ของ *P. pentosaceus* พบว่าจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นตามเวลาหมัก แสดงในตาราง 18 และภาพ 17A โดย *P. pentosaceus* 3301 มีอัตราการสร้างเซลล์สูงสุด เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง คือมีปริมาณเซลล์ จากเริ่มต้น 3.30

ตาราง 15 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406

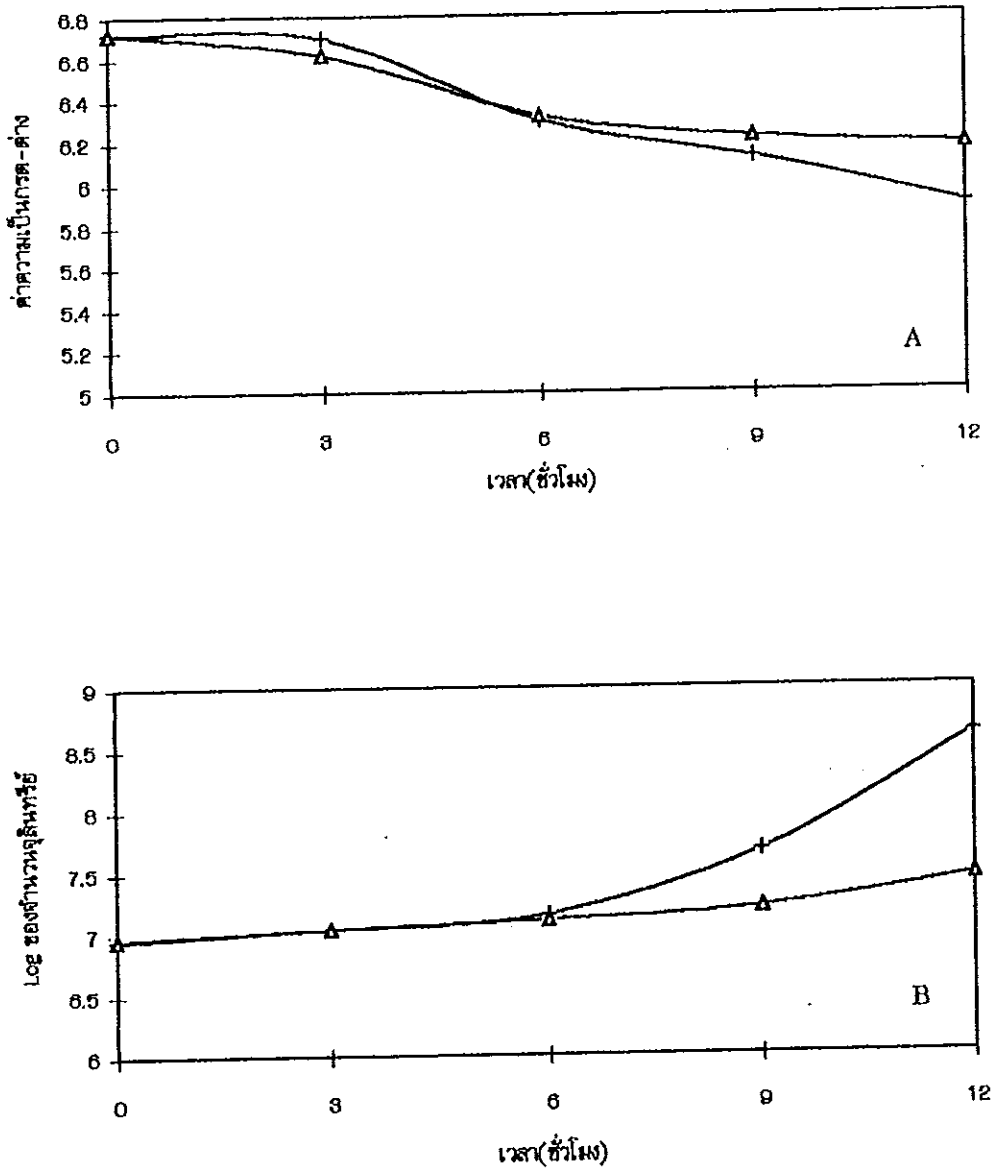
รหัสเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					DpH[1] หน่วย/ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
2104	6.72	6.70	6.30	6.12	5.90	0.07
3406	6.72	6.62	6.32	6.22	6.18	0.05

[1] อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ 12 ชั่วโมง

ตาราง 16 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406

รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์ เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					อัตราการสร้างเซลล์[1] โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
2104 (x 10^7)	0.89	1.10	1.41	4.68	41.69	3.42 X 10^7
(Log)	6.95	7.04	7.15	7.67	8.62	
3406 (x 10^7)	0.91	1.10	1.29	1.59	2.82	1.50 X 10^6
(Log)	6.96	7.04	7.11	7.20	7.45	

[1] อัตราการสร้างเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพ 16 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 (—+—) และ 3406 (—Δ—) ในการคัดเลือกเชื้อ

ตาราง 17 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Pediococcus pentosaceus* 3301 , 2205 และ 3302

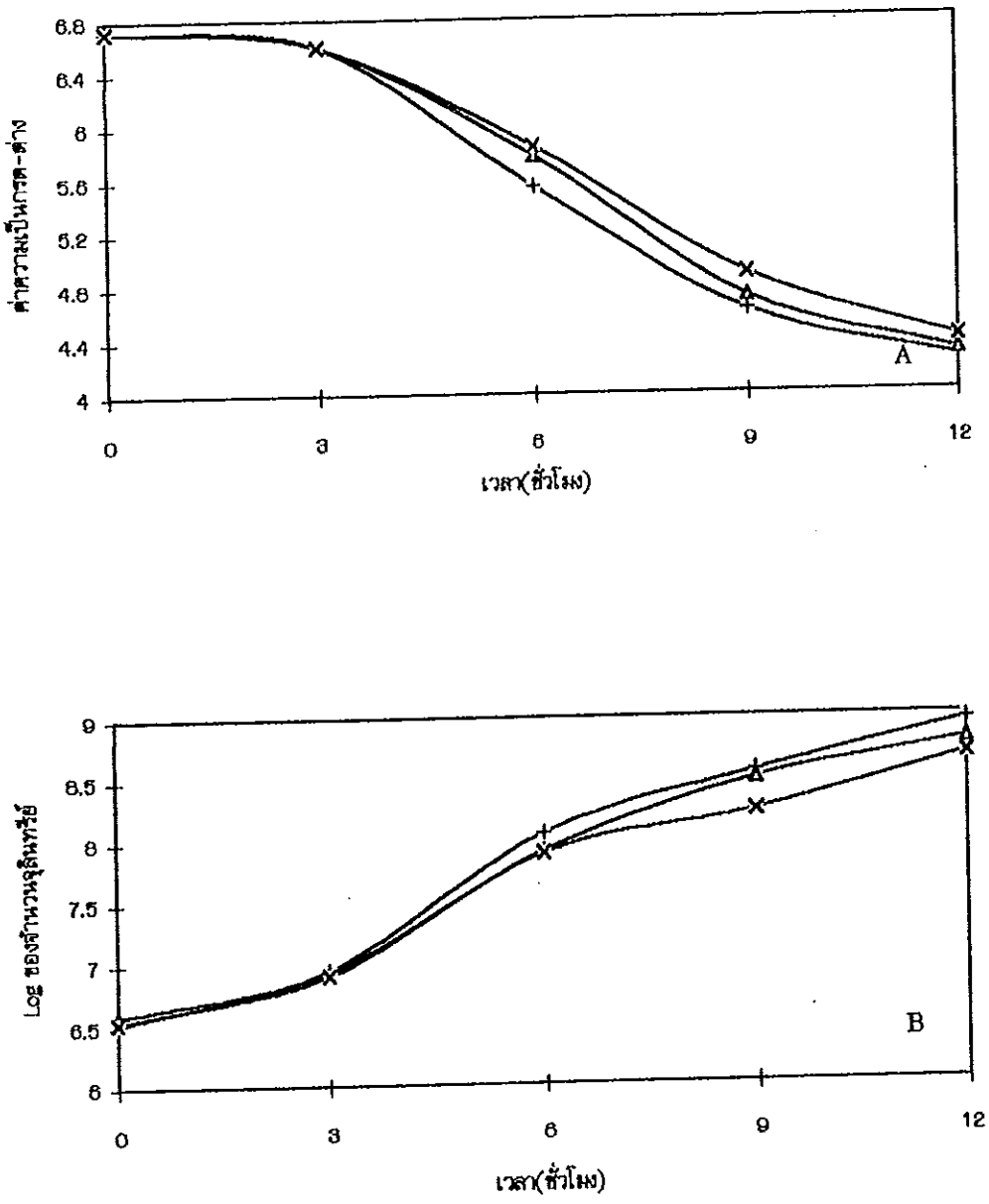
รหัสเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					DpH[1] หน่วย/ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3301	6.72	6.60	5.55	4.62	4.25	0.21
2205	6.72	6.60	5.78	4.72	4.30	0.20
3302	6.72	6.60	5.85	4.90	4.40	0.19

[1] อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างที่ 12 ชั่วโมง

ตาราง 18 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของ *Pediococcus pentosaceus* 3301 , 2205 และ 3302

รหัสเชื้อ	จำนวนเซลล์ เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)					อัตราการสร้างเซลล์[1] โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง
	0	3	6	9	12	
3301 (x 10^7)	0.33	0.89	11.48	35.48	89.13	7.47 X 10^7
(Log)	6.52	6.95	8.06	8.55	8.95	
2205 (x 10^7)	0.39	0.85	8.13	30.90	61.66	5.07 X 10^7
(Log)	6.59	6.93	7.91	8.49	8.79	
3302 (x 10^7)	0.35	0.81	7.76	16.98	46.77	3.87 X 10^7
(Log)	6.54	6.91	7.89	8.23	8.67	

[1] อัตราการสร้างเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง



ภาพ 17 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (A) และจำนวนเซลล์ (B) ของ *Pediococcus pentosaceus* 3301 (—+—), 2205 (—Δ—), 3302 (—×—) ในการคัดเลือกเชื้อ

x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เป็น 8.91 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 7.47 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง ในขณะที่ *P. pentosaceus* 2205 มีปริมาณเซลล์ 6.12 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 5.07 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง และเชื้อ 3302 มีปริมาณเซลล์ 4.68 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราการสร้างเซลล์ 3.87 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร ชั่วโมง เมื่อหมักได้ 12 ชั่วโมง

เปรียบเทียบอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์ทั้ง 5 เชื้อพบว่าเชื้อที่มีอัตราการสร้างเซลล์สูงจะมีอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าเชื้อที่มีอัตราการสร้างเซลล์ต่ำ *P. pentosaceus* เป็นเชื้อที่มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์สูงที่สุด

Houle, *et al.* (1989) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เติม *L. plantarum* มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่เติม *P. acidilactici* Smith และ Palumbo (1983) รายงานว่าเชื้อ *P. pentosaceus* สามารถผลิตกรดได้มากกว่าและเร็วกว่า *P. acidilactici* และจากการทดลองนี้พบว่า *P. pentosaceus* ผลิตกรดได้มากกว่า *L. plantarum* เช่นกัน

จากอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์ ได้คัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์สูงชนิดละ 2 เชื้อ ในการทดลองขั้นต่อไป

เชื้อที่คัดเลือกได้คือ

Lactobacillus plantarum	รหัส 3409 และ 3404
Lactobacillus fermentum	รหัส 2112 และ 2508
Lactobacillus brevis	รหัส 3403 และ 3304
Leuconostoc mesenteroides	รหัส 2104 และ 3406
Pediococcus pentosaceus	รหัส 3301 และ 2205 แบคทีเรียแลกติกทุกชนิดข้างต้นได้มีผู้ทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแล้ว (Jensen, 1940; Nes and Skjelkvale, 1982; El-gendy, *et al.*, 1983; Gilliland, 1988; Kearney, *et al.*, 1990)

4. การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก

ศึกษาแบคทีเรียแลกติก 5 ชนิด ชนิดละ 2 เชื้อที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติก ชนิดเดียวกันจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รวมทั้งหมดเป็น 15 เชื้อคือ

1. *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์
2. *Lactobacillus plantarum* 3409 จากการคัดเลือก
3. *Lactobacillus plantarum* 3404 จากการคัดเลือก
4. *Lactobacillus fermentum* TISTR 55 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์
5. *Lactobacillus fermentum* 2112 จากการคัดเลือก
6. *Lactobacillus fermentum* 2508 จากการคัดเลือก
7. *Lactobacillus sp.* TISTR 539 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์
8. *Lactobacillus brevis* 3403 จากการคัดเลือก
9. *Lactobacillus brevis* 3304 จากการคัดเลือก
10. *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์
11. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 จากการคัดเลือก
12. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 3406 จากการคัดเลือก
13. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์
14. *Pediococcus pentosaceus* 3301 จากการคัดเลือก
15. *Pediococcus pentosaceus* 2205 จากการคัดเลือก

ใช้แบคทีเรียแลกติกปริมาณ 5 x 10^6 เซลล์/กรัม (Clarke, 1991; Huang and Lin, 1993; วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) เติมลงในส่วนผสมที่ใช้ทำไส้กรอกเพื่อเป็นกล้าเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย หมักไส้กรอกที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี คือค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลกติก การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์บนอาหาร PCA เพื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร MRS เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลกติก การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

4.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอก

ปัจจัยภายในอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์คือคุณค่าทางโภชนการ และการมีอยู่ของสารที่จำกัดการเจริญเติบโต (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529) ปริมาณสารอาหารในส่วนผสมของไส้กรอก ผลิตตามวิธีของจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) มีโปรตีนร้อยละ 13.62 ความชื้นร้อยละ 53.71 ไขมันร้อยละ 15.59 และเถ้าร้อยละ 1.66 ซึ่ง Wu, *et al.* (1991) ได้ทดลองใช้ *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* และ Lactacel 75 เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกหมัก พบว่าไส้กรอกที่หมักด้วยเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีค่า water activity ปริมาณโปรตีน ไขมันและองค์ประกอบของไขมัน เถ้า และความชื้น ไม่แตกต่างกัน

จากการทดลอง จุลินทรีย์ในไส้กรอกจะใช้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส ในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟตามวิถีไกลโคไลซีส และการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟตามวิถีฟอสโฟคีโตไลซีส ในการผลิตกรดแลกติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ (Kearmen, 1990) พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก และชุดการทดลองที่หมักด้วยแบคทีเรียแลกติกกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ คือ *L. fermentum*, *L. brevis* และ *Leu. mesenteroides* ssp dextranicum ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลโดยวิถีฟอสโฟคีโตไลซีสเป็นกรดแลกติกได้เพียงร้อยละ 50 และได้กรดอะซิติก เอทธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ (Thornhill and Cogan, 1984) จึงมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกน้อยกว่าชุดการทดลองที่หมักด้วยแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ แต่โดยทั่วไปแล้วมีปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกสูงกว่า และทุกชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อจะมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อ การใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ทำให้ไส้กรอกมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกสูงที่สุด

ความสัมพันธ์ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PCA เป็นไปในทางเดียวกับจำนวนแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS โดยที่จำนวนแบคทีเรียแลกติกมีจำนวนน้อยกว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรียแลกติกต่อการลดลงของความเป็นกรด-ด่างพบว่ามี 2 ปัจจัยสำคัญคือ 1) เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์มาก จะให้ไส้กรอกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงมากกว่าและกรดแลกติกสูงกว่า 2) เชื้อที่ทำให้อัตรา

การลดลงของความเป็นกรด-ด่างในขั้นตอนของการคัดเลือกเชื้อสูง จะให้การลดลงของความเป็นกรด-ด่างในไส้กรอกสูง จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองบางชุดมีจำนวนเซลล์น้อยกว่าแต่เชื้อที่ใช้ให้อัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างในการคัดเลือกเชื้อสูงกว่าจะทำให้ไส้กรอกมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า

ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่เติมเชื้อ จึงเป็นผลให้ชุดการทดลองควบคุมมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติกต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อ สอดคล้องกับผลการทดลองของจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) และนงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่มีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นสูงกว่าจะมีปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสูงกว่าทั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติก และจากการทดลองพบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นในทุกชุดการทดลองสูงมาก จึงมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในช่วงระยะการหมัก และมีแนวโน้มที่จะลดลงในช่วงท้ายของการหมักจากผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยกรดที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Condon, 1987)

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยเชื้อแต่ละชนิดแสดงในรายละเอียดดังนี้

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum*

ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงตลอดเวลาในการหมักในทุกชุดการทดลอง และชุดการทดลองที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกผลิตภัณฑ์จะมีการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ซึ่งไม่ได้เติมเชื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) แสดงในตาราง 19 และภาพ 18A โดยที่การใช้ *L. plantarum* 3409 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดถึง 4.05 รองลงมาคือ *L. plantarum* 3404 และ *L. plantarum* TISTR 50 โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.38 และ 4.17 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลกติกทุกชุดการทดลองมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดการหมักแสดงในตาราง 20 และภาพ 18B ชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกจะมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกและแตกต่าง

ตาราง 19 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	5.55^{a}	5.31^{e}	5.03^{f}	4.80^{e}	4.67^{h}	4.63^{e}	4.53^{d}
Lactobacillus plantarum							
TISTR 50	5.55^{a}	5.11^{b-e}	4.55^{b}	4.29^{a}	4.24^{bc}	4.15^{a}	4.17^{ab}
3409	5.58^{a}	4.90^{a}	4.35^{a}	4.23^{a}	4.08^{a}	4.05^{a}	4.05^{a}
3404	5.58^{a}	5.13^{b-e}	4.70^{cd}	4.60^{cd}	4.39^{de}	4.39^{cd}	4.38^{cd}
Lactobacillus fermentum							
TISTR 55	5.56^{a}	5.30^{de}	4.90^{ef}	4.66^{cde}	4.50^{efg}	4.43^{cd}	4.45^{cd}
2112	5.55^{a}	5.16^{cde}	4.93^{ef}	4.64^{cde}	4.44^{ef}	4.50^{de}	4.50^{d}
2508	5.60^{a}	5.10^{dbc}	5.03^{f}	4.73^{de}	4.55^{fgh}	4.43^{cd}	4.43^{cd}
L. sp. TISTR 539	5.58^{a}	5.20^{cde}	4.65^{bc}	4.36^{ab}	4.25^{bcd}	4.18^{ab}	4.18^{ab}
L. brevis 3403	5.58^{a}	5.25^{de}	4.98^{ef}	4.60^{cd}	4.44^{ef}	4.38^{cd}	4.33^{c}
L. brevis 3304	5.56^{a}	5.15^{cde}	4.95^{ef}	4.70^{de}	4.58^{fgh}	4.49^{cde}	4.40^{cd}
Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum							
TISTR 53	5.58^{a}	5.25^{de}	4.93^{ef}	4.60^{cde}	4.63^{gh}	4.51^{de}	4.49^{d}
2104	5.60^{a}	5.20^{cde}	4.98^{ef}	4.68^{cde}	4.56^{fgh}	4.48^{cde}	4.39^{cd}
3406	5.60^{a}	5.18^{cde}	4.83^{de}	4.49^{bc}	4.38^{cde}	4.33^{bc}	4.30^{bc}
Pediococcus pentosaceus							
TISTR 419	5.60^{a}	5.18^{cde}	4.83^{de}	4.49^{bc}	4.38^{cde}	4.33^{bc}	4.30^{bc}
3301	5.56^{a}	4.95^{ab}	4.65^{bc}	4.34^{ab}	4.27^{bcd}	4.15^{a}	4.08^{a}
2205	5.54^{a}	5.00^{abc}	4.65^{bc}	4.30^{a}	4.20^{ab}	4.19^{ab}	4.10^{a}

$^{a-h}$ ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตาราง 20 ปริมาณกรดแลกติก (ร้อยละ)ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ปริมาณกรดแลกติก เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	0.34[a]	0.51[a]	0.67[a]	0.78[ab]	0.88[b]	0.96[ab]	1.03[a]
Lactobacillus plantarum							
TISTR 50	0.36[a]	0.50[a]	0.76[a]	0.88[ab]	1.08[ab]	1.20[a]	1.17[a]
3409	0.37[a]	0.72[a]	0.81[a]	0.90[ab]	1.15[ab]	1.28[a]	1.33[a]
3404	0.37[a]	0.55[a]	0.69[a]	0.80[ab]	1.01[ab]	1.14[a]	1.24[a]
Lactobacillus fermentum							
TISTR 55	0.35[a]	0.48[a]	0.67[a]	0.77[b]	1.02[ab]	1.08[a]	1.10[a]
2112	0.36[a]	0.60[a]	0.66[a]	0.78[ab]	0.99[ab]	1.05[a]	1.01[a]
2508	0.34[a]	0.66[a]	0.65[a]	0.77[b]	0.87[b]	1.08[a]	1.04[a]
L. spp. TISTR 539	0.36[a]	0.51[a]	0.79[a]	0.90[ab]	1.15[ab]	1.18[a]	1.21[a]
L. brevis 3403	0.36[a]	0.60[a]	0.68[a]	0.77[b]	0.93[ab]	1.06[a]	1.12[a]
L. brevis 3304	0.36[a]	0.60[a]	0.66[a]	0.79[ab]	0.96[ab]	1.03[a]	1.04[a]
Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum							
TISTR 53	0.36[a]	0.57[a]	0.65[a]	0.82[ab]	0.93[ab]	0.98[ab]	1.05[a]
2104	0.34[a]	0.60[a]	0.67[a]	0.79[ab]	0.98[ab]	1.18[a]	1.20[a]
3406	0.34[a]	0.61[a]	0.67[a]	0.76[b]	0.88[b]	1.09[a]	1.06[a]
Pediococcus pentosaceus							
TISTR 419	0.36[a]	0.59[a]	0.73[a]	0.84[ab]	1.05[ab]	1.07[a]	1.20[a]
3301	0.36[a]	0.67[a]	0.73[a]	0.88[ab]	1.00[ab]	1.08[a]	1.15[a]
2205	0.36[a]	0.67[a]	0.79[a]	0.96[a]	1.21[a]	1.23[a]	1.26[a]

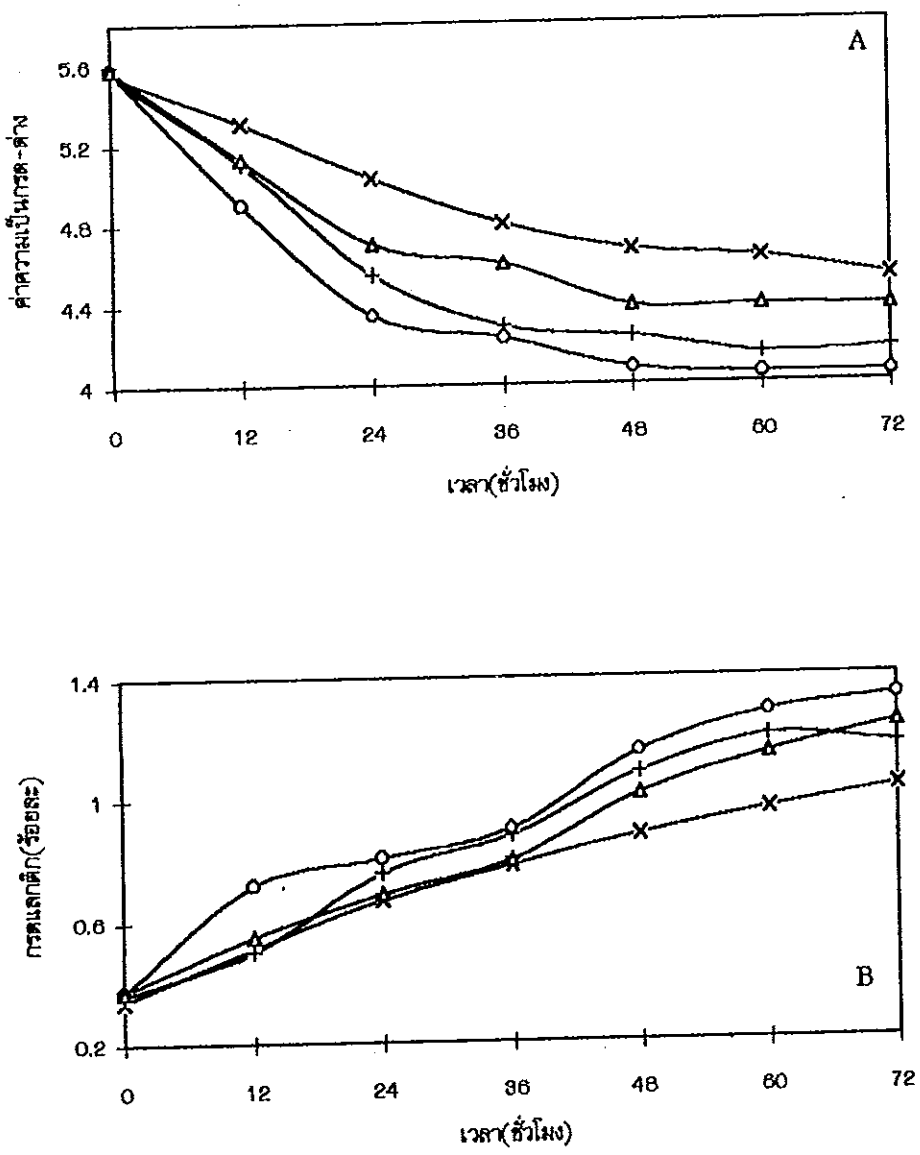
[ab] ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตาราง 21 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวบนอาหาร PCA

สายพันธุ์จุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log ของจำนวนเซลล์) เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
ชุดการทดลองควบคุม	8.22	8.35	8.08	8.04	8.11	8.33	7.69
Lactobacillus plantarum							
TISTR 50	8.60	8.78	8.42	8.54	8.40	8.24	7.96
3409	8.48	9.25	8.19	8.18	8.37	8.46	8.07
3404	8.60	8.32	8.53	8.61	8.24	8.18	8.26
Lactobacillus fermentum							
TISTR 55	8.78	8.61	8.42	7.95	8.35	8.74	8.16
2112	8.42	8.53	8.48	8.27	8.66	8.51	8.40
2508	8.30	8.67	8.22	8.20	8.32	8.49	8.29
L. sp. TISTR 539	8.65	8.51	8.46	8.58	8.56	8.51	8.37
L. brevis 3403	8.67	7.85	8.19	8.39	8.68	9.03	8.47
L. brevis 3304	8.57	8.42	8.10	8.32	8.63	8.52	8.46
Leuconostoc mesenteroides spp. dextranicum							
TISTR 53	8.76	8.58	7.95	7.72	7.70	8.02	7.98
2104	8.54	8.77	8.24	8.39	8.43	8.55	8.43
3406	8.35	9.11	8.74	8.29	8.27	8.38	8.24
Pediococcus pentosaceus							
TISTR 419	8.72	8.85	8.47	8.44	8.44	8.04	7.88
3301	8.54	8.69	8.32	8.46	8.04	8.32	7.95
2205	8.67	8.67	8.46	8.06	8.04	8.20	8.15

ตาราง 22 จำนวนแบคทีเรียแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวบนอาหาร MRS

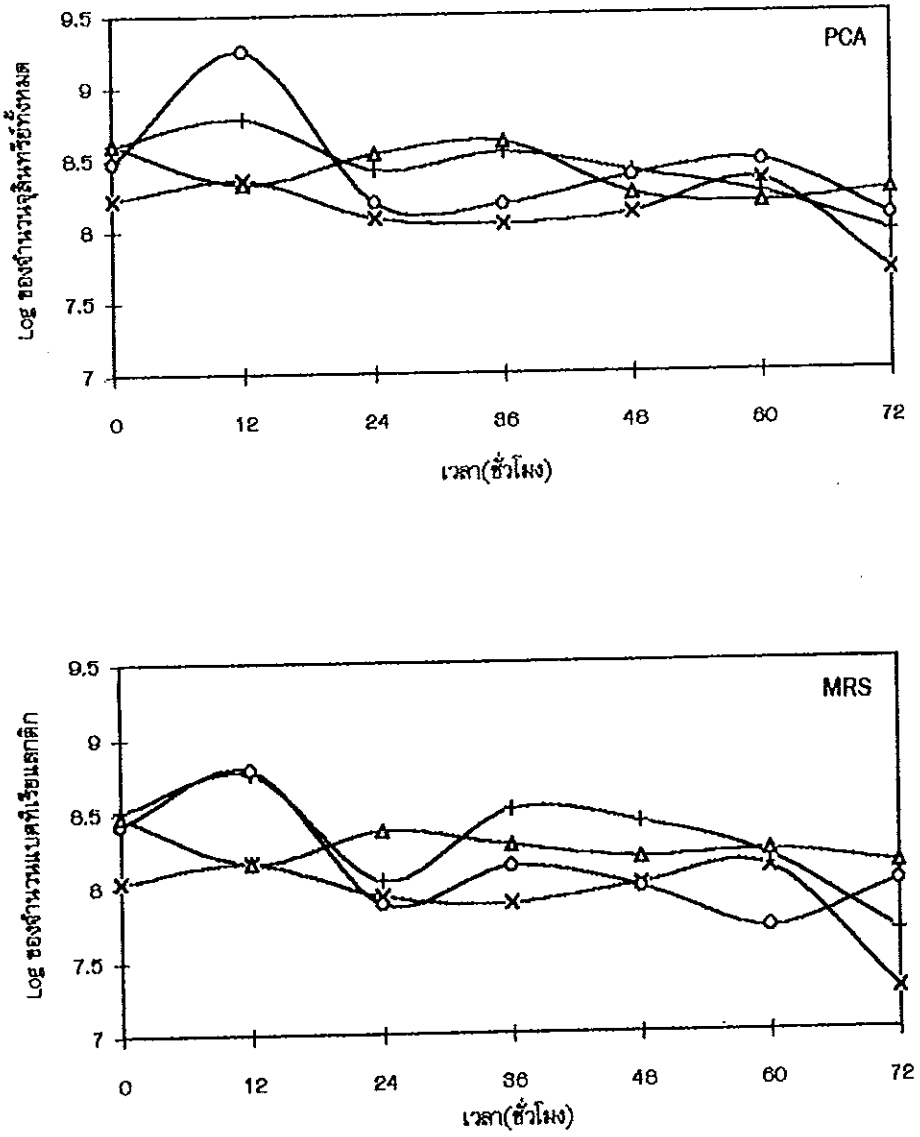
สายพันธุ์จุลินทรีย์	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (Log ของจำนวนเซลล์) เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
ชุดการทดลองควบคุม	8.04	8.16	7.93	7.88	8.00	8.11	7.28
Lactobacillus plantarum							
TISTR 50	8.51	8.76	8.04	8.51	8.42	8.18	7.67
3409	8.42	8.79	7.88	8.13	7.98	7.70	8.00
3404	8.48	8.16	8.37	8.27	8.18	8.22	8.12
Lactobacillus fermentum							
TISTR 55	8.57	8.58	8.02	7.72	8.23	8.62	8.10
2112	8.26	8.27	8.16	8.22	8.45	8.22	8.35
2508	8.26	8.55	7.90	8.06	8.20	8.34	8.22
L. sp. TISTR 539	8.45	8.27	8.10	8.50	8.33	8.62	8.27
L. brevis 3403	8.40	7.78	7.98	8.29	8.59	8.55	8.39
L. brevis 3304	8.54	8.34	8.02	8.10	8.48	8.07	8.32
Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum							
TISTR 53	8.55	8.53	7.81	7.60	7.18	7.98	7.82
2104	8.34	8.75	8.08	8.10	8.34	8.45	8.36
3406	8.32	8.76	7.90	8.27	8.16	8.24	8.05
pediococcus pentosaceus							
TISTR 419	8.59	8.78	8.33	8.34	8.33	8.02	7.78
3301	8.41	8.64	8.32	8.36	7.81	8.16	7.90
2205	8.62	8.44	8.27	7.79	7.62	7.64	8.05



ภาพ 18 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 (—+—), 3409 (—o—), 3404 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

ทางสถิติ ($P<0.01$) ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อหมักได้ 72 ชั่วโมงไส้กรอกที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* 3409 มีปริมาณกรดแลกติกมากที่สุดคือร้อยละ 1.33 *L. plantarum* 3404 และ *L. plantarum* TISTR 50 มีปริมาณกรดแลกติก ร้อยละ 1.24 และ 1.17 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั่วไปและแบคทีเรียแลกติกของตัวอย่างไส้กรอกหมักที่เติมเชื้อ *L. plantarum* TISTR 50 และ *L. plantarum* 3404 และชุดการทดลองควบคุม มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกและลดลงในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก จากนั้นเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก แสดงในตาราง 21, 22 และภาพ 19 แต่ตัวอย่างไส้กรอกที่เติม *L. plantarum* 3409 ในช่วงแรกมีการลดลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั่วไปและแบคทีเรียแลกติก แต่ในชั่วโมงที่ 12 มีการเพิ่มขึ้นและสูงกว่าชุดการทดลองอื่นคือมีจำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป 1.78×10^{9} เซลล์/กรัม (Log 9.25) และมีแบคทีเรียแลกติก 6.19×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.79) ซึ่งมีความสำคัญต่อค่าความเป็นกรด-ด่างทำให้มีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.5 ก่อนชุดการทดลองอื่น ซึ่งได้เก็บตัวอย่างไส้กรอกที่จุดนี้เพื่อการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และจากนั้นการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์มีเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งลดลงในช่วงท้ายของการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์ทั่วไปและแบคทีเรียแลกติกในระหว่างการหมักแตกต่างกันไม่มาก ชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่ได้เติมเชื้อมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกน้อยกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อตลอดเวลาในการหมัก คือมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้น 1.66×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.22) และมีแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้น 1.10×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.04) ขณะที่ *L. plantarum* 3409 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้น 3.02×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.48) และมีแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้น 2.63×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.42) และเมื่อหมักได้ 72 ชั่วโมง ชุดการทดลองควบคุมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.90×10^{7} เซลล์/กรัม (Log 7.69) และมีแบคทีเรียแลกติก 1.90×10^{7} เซลล์/กรัม (Log 7.28) ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* 3409 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1.18×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.07) และมีแบคทีเรียแลกติก 1.00×10^{8} เซลล์/กรัม (Log 8.00)



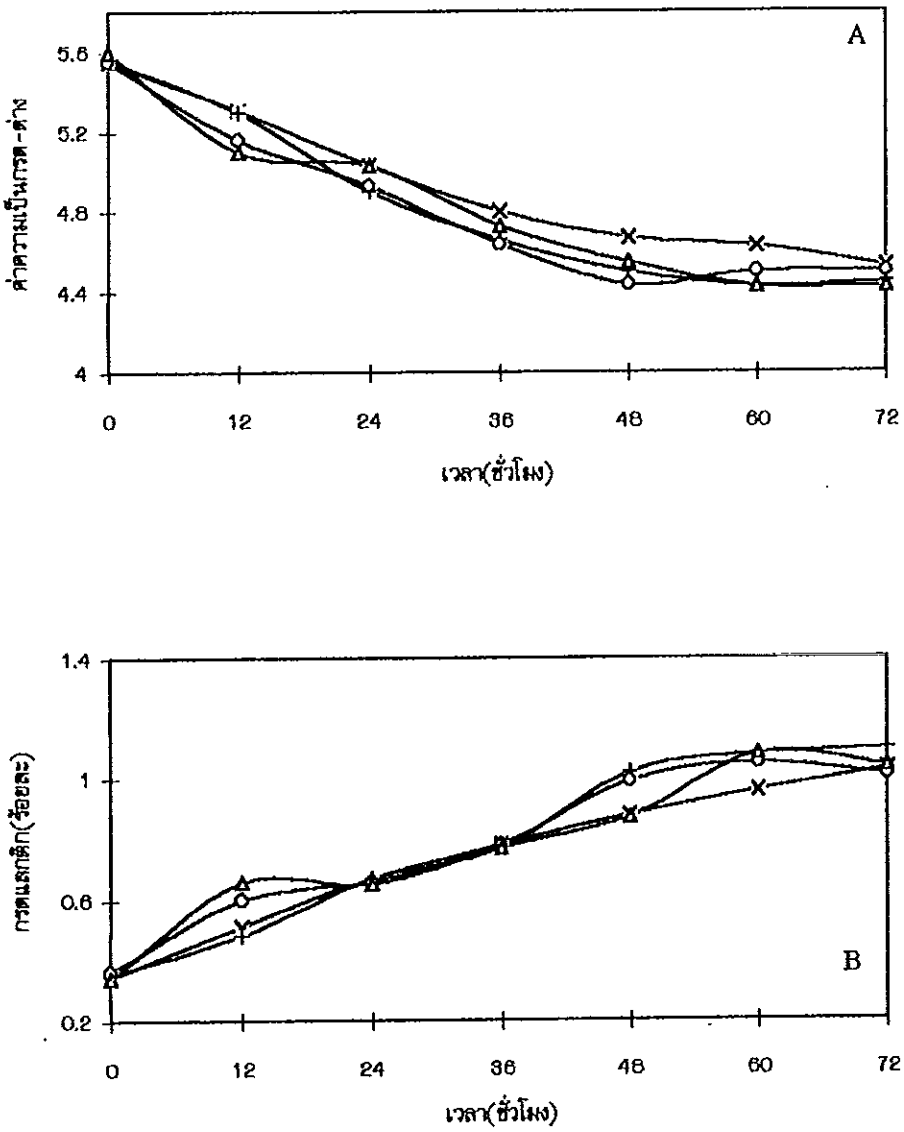
ภาพ 19 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 (—+—), 3409 (—o—), 3404 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

4.1.2 การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการห

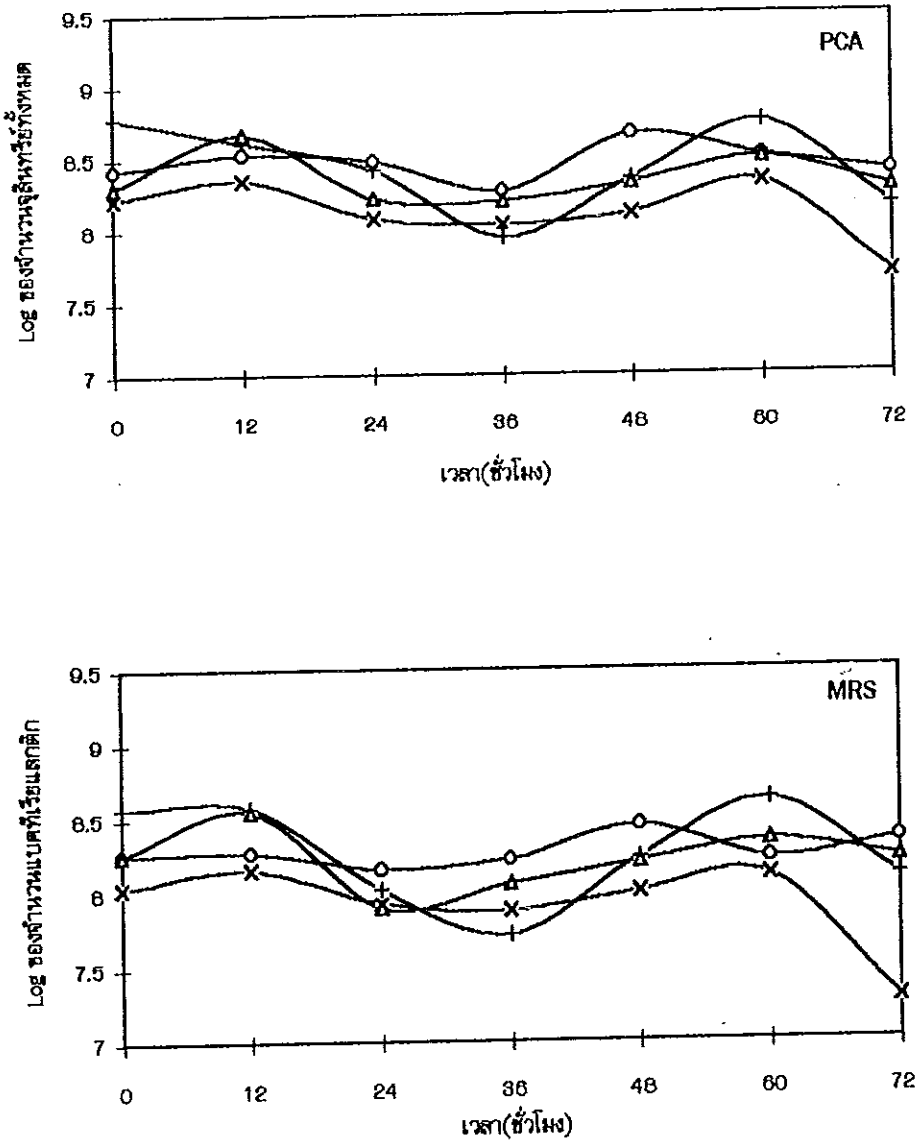
ด้วย *Lactobacillus fermentum*

การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. fermentum* ทุกสายพันธุ์ มีการเปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกันแสดงในตาราง 19 และภาพ 20 มีค่าค เป็นกรด-ด่างต่ำกว่าชุดการทดลองควบคุมเพียงเล็กน้อยแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.(คือ *L. fermentum* 2508 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.43 ขณะที่ *L. fermentum* TISTR 55 4.45 และ *L. fermentum* 2112 เป็น 4.50 ในช่วงสุดท้ายของการหมัก เช่นเดียวกับปริม กรดแลกติกในผลิตภัณฑ์ซึ่งทุกชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อมีการเพิ่มขึ้นของกรดแลกติ ปริมาณใกล้เคียงกัน และสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการใช้เชื้อแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ 0.05) คือ *L. fermentum* 2508 มีปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 1.04 ขณะที่ *L. fermen* TISTR 55 และ *L. fermentum* 2112 ร้อยละ 1.10 และ ร้อยละ 1.01 ในช่วงสุดท้ายของ หมัก ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั่วไปและแบคทีเรียแลกติกในทุกชุดการทดลองมี เพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักโดยที่ชุดการทดลองที่ใช้ *L. fermentum* TI 55 มีจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้น 6.03 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.78) และแบคทีเรียแลกติ ต้น 3.72 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.57) ซึ่งมีจำนวนสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้ *L. fermer* ที่คัดเลือก จากนั้นจำนวนจุลินทรีย์ลดลงและค่อนข้างคงที่ และจะลดลงในช่วงสุดท้ายของ หมักแสดงในตาราง 21 และภาพ 21 ปริมาณจุลินทรีย์ทั่วไปและแบคทีเรียแลกติกในระห การหมักแตกต่างกันไม่มาก โดยที่ชุดการทดทดลองที่ใช้ *L. fermentum* 2112 มีจำ จุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 24-48 ของการหมักสูงกว่าชุดการทดล ใช้ *L. fermentum* อื่น คือมีจุลินทรีย์ทั้งหมด 3.02-4.57 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8. 8.66) และแบคทีเรียแลกติก 1.45-2.82 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.16-8.45) ทำให้ ความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า และปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการใช้ *L. fermentum* 2508 คล้องกับผลการคัดเลือกเชื้อในตอนต้น และชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่ได้เติมเชื้อมีปริ จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกน้อยกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อเกือบจะตลอด ในการหมัก



ภาพ 20 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus fermentum* TISTR 55 (—+—), 2112 (—o—), 2508 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)



ภาพ 21 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus fermentum* TISTR 55 (—+—), 2112 (—o—), 2508 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

4.1.3 การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างก

Lactobacillus brevis

การใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติก *L. brevis* 3403 และ 3304 ที่คัดเลือกได้ เปรี
กับ *L. spp.* TISTR 539 และชุดการทดลองควบคุม พบว่าทุกชุดการทดลองมีการล
ความเป็นกรด-ด่างตลอดการหมัก โดยที่ *L. spp.* TISTR 539 มีค่าความเป็นกรด-ด่า
คือ 4.18 แตกต่างจากชุดการทดลองที่ใช้ *L. brevis* อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) ในข
brevis 3403 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำในระดับรองลงมา คือ 4.33 และการใช้ *L*
3304 มีค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม คือ 4.4
4.50 ตามลำดับ และไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) แสดงในตาราง 19 และภาพ 22

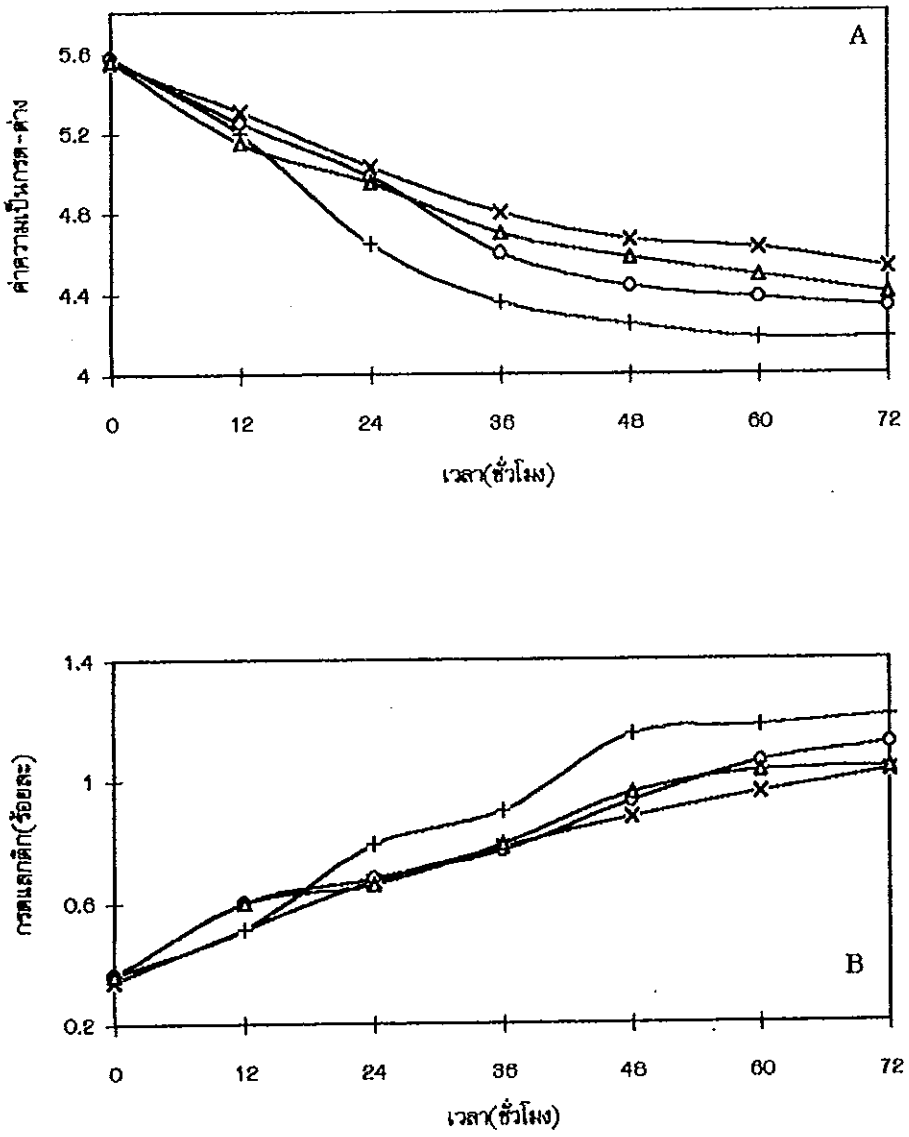
ปริมาณกรดแลกติกค่อยๆเพิ่มขึ้นระหว่างการหมัก โดยที่ *L. spp.* TISTR
ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.21 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ *L. brevis* 34
3304 และชุดการทดลองควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลกติกในระดับใกล้เคีย
ร้อยละ 1.12 1.04 และ 1.03 ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในชุดการทดลองที่มีการใช้
เล็กน้อยใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นเพิ่มสูงขึ้น โดยที่ *L. spp.* TISTR 539 มีแบคทีเรีย
ชั่วโมงที่ 24-60 สูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้ *L. brevis* คือ1.26-4.17 X 10^8 เซลล์/ก
8.10-8.62) ทำให้ผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และมีปริมาณกรดแลก
จำนวนจุลินทรีย์และแบคทีเรียแลกติกทุกชุดการทดลองลดลงในช่วงสุดท้ายของการ
L. brevis 3403 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกสูงกว่าคือ 2.95 X 1
กรัม (Log 8.47) และ 2.45 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.39) ตามลำดับในช่วงสุ
การหมัก และชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกน้
การทดลองที่มีการใช้เชื้อแสดงในตาราง 21, 22 และภาพ 23

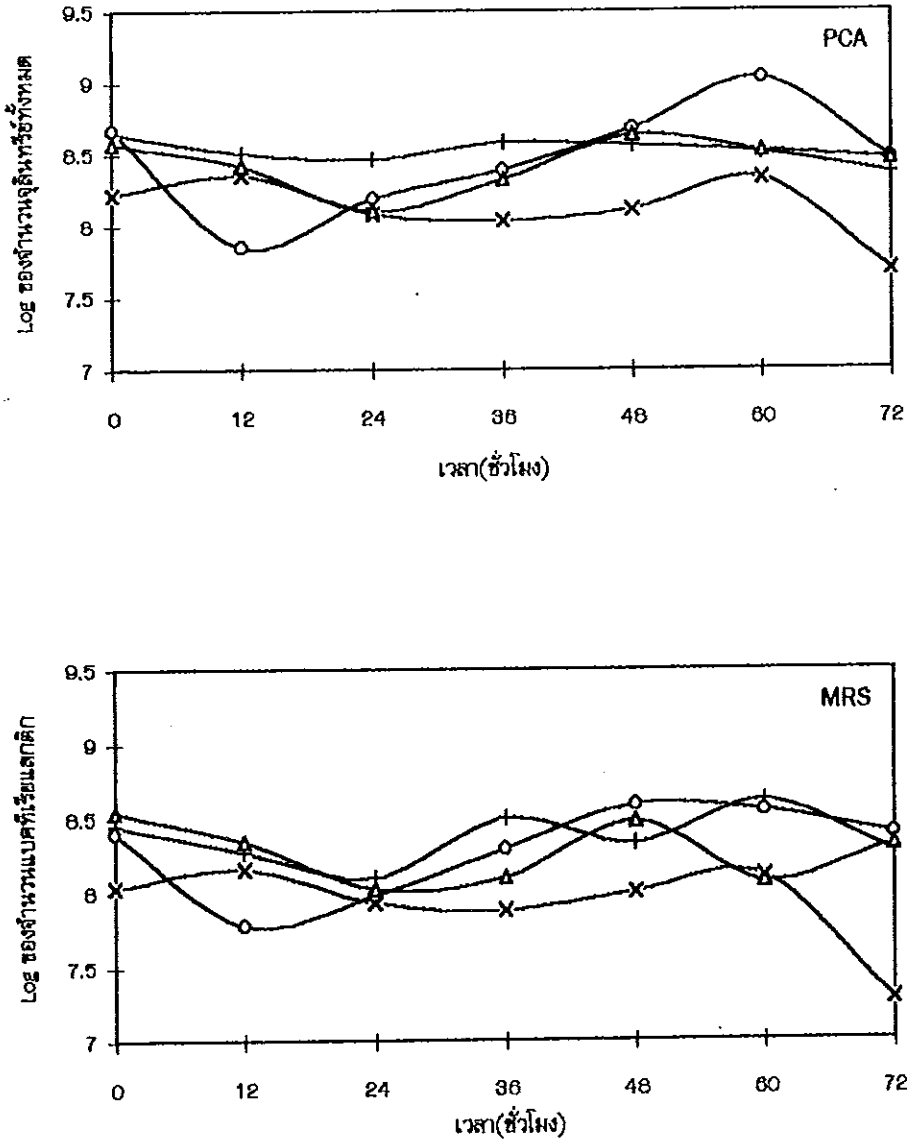
4.1.4 การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอ

***Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum**

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อ *Leu. mesenteroi*
dextranicum 3406 สูงที่สุดคือ 4.30 และแตกต่างทางสถิติ (P<0.01) กับชุดการท



ภาพ 22 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus spp.* TISTR 539 (—+—), Lactobacillus brevis 3403 (—o—), 3304 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)



ภาพ 23 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus spp.* TISTR 539 (—+—), Lactobacillus brevis 3403 (—o—), 3304 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

Leu. mesenteroides TISTR 53 คือ 4.49 และชุดการทดลองควบคุมคือ 4.5
จาก *Leu. mesenteroides* 2104 คือ 4.39 แสดงในตาราง 19 และภาพ 2

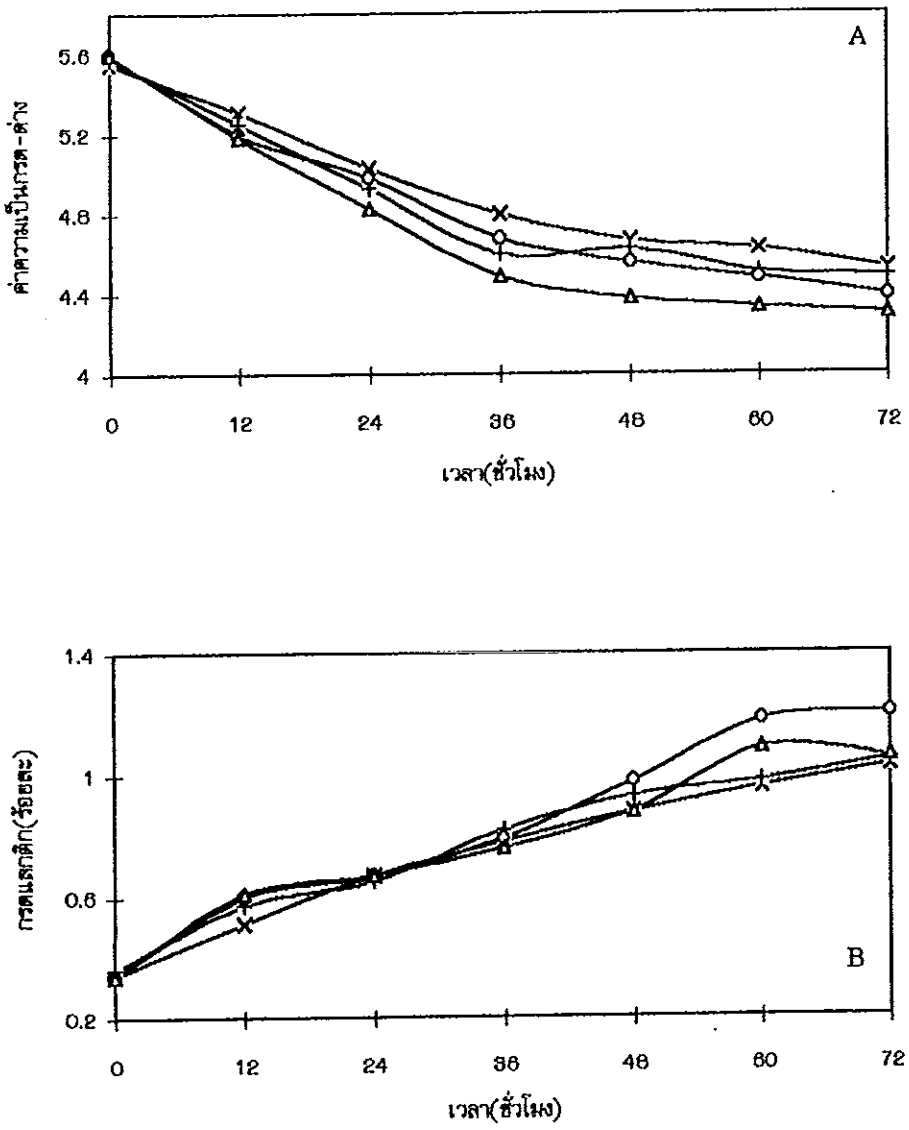
ปริมาณกรดแลกติกของทุกชุดการทดลองมีการเพิ่มขึ้นอย่างไม่แตกต่างระห
การทดลองอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) และชุดการทดลองที่มีการใช้ *Leu. mesenteroides*
dextranicum 2104 มีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.200 แสดงในตาราง 2C
ภาพ 24B

ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นช
ทดลองที่ใช้เชื้อ *Leu. mesenteroides* TISTR 53 มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน 12 ชั่วโมงแรกของ
หมัก จากนั้นลดลงและค่อนข้างคงที่ไปจนตลอดเวลาในการหมักดังแสดงในภาพ 25 โดยที่
mesenteroides ssp. dextranicum 2104 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลก
ช่วงแรกจนถึงช่วงสุดท้ายของการหมักสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วย *Leu. mesenteroides*
dextranicum 3406 คือ 3.47-2.69 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.54-8.43) และ 2.19-
X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.34-8.36) ตามลำดับ ทำให้มีปริมาณกรดแลกติกในผลิตภั
กว่า แต่จากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างขัดแย้งกับปริมาณกรดแลกติก
ไส้กรอกผลิตด้วย *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 3406 มีค่าความเป็นกรด-
กว่าตัวคค่างไส้กรอกที่ใช้เชื้อ *Leu. mesenteroides* TISTR 53 นั้นมีปริมาณจุลินท
แบคทีเรียแลกติกลดลงเกือบตลอดเวลาในช่วงหมัก ทั้งนี้เพราะ *Leu. mesenteroides* TIS
ไม่ใช่เชื้อที่ได้มาจากเนื้อหมักเหมือนกับเชื้ออื่นๆ จึงมีการเจริญที่ไม่ดีในไส้กรอกหมัก
สามารถผลิตกรดได้ดีในระดับใกล้เคียงกับเชื้อที่คัดเลือก

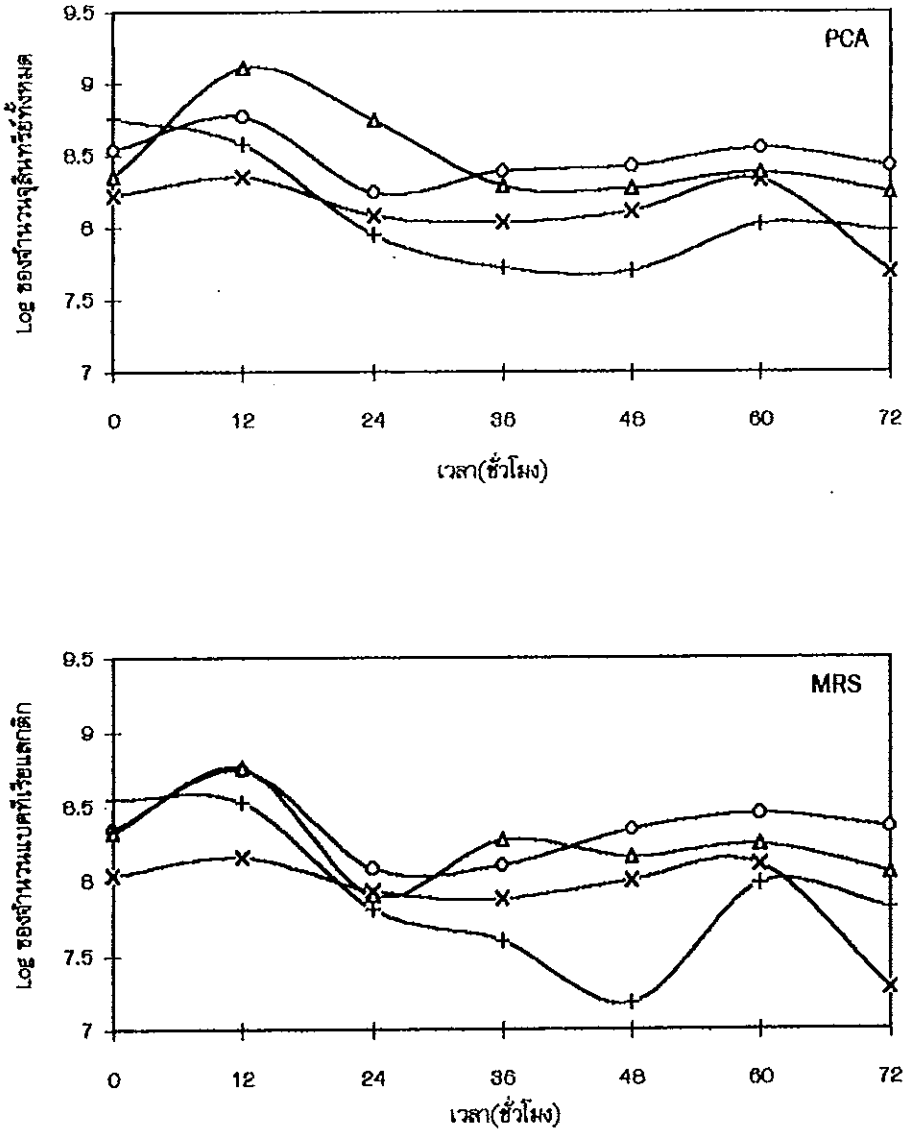
4.1.5 การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกห

Pediococcus pentosaceus

ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียแ
คัดเลือก คือ *P. pentosaceus* 3301 และ 2205 มีค่าไม่แตกต่างกัน คือ 4.08 และ 4.
แตกต่างคค่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) จากแบคทีเรียจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทร
pentosaceus TISTR 419 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.30 และชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อแบ
แลกติกจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้เชื้อแตกต่างทางสถิติ (P<
ดังแสดงในตาราง 19 และภาพ 26A



ภาพ 24 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 (—+—), 2104 (—o—), 3406 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)



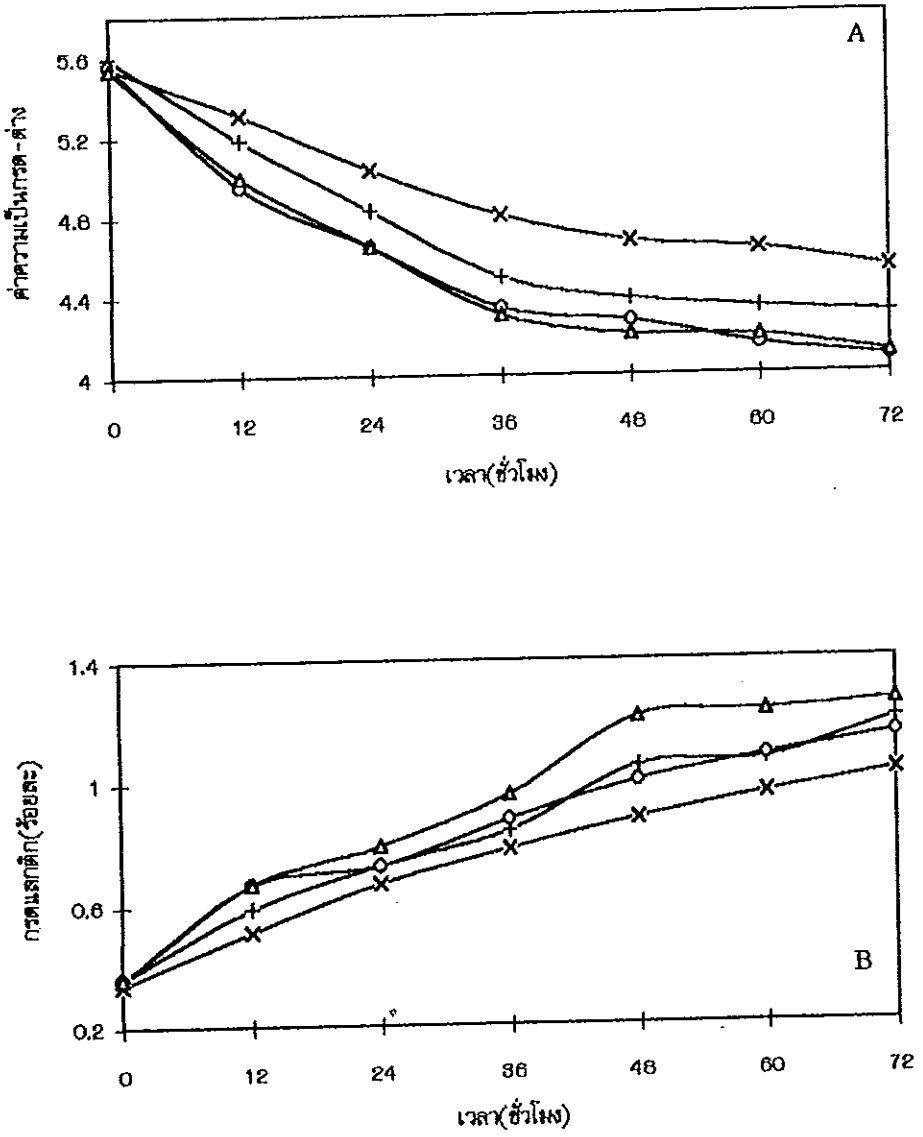
ภาพ 25 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 (—+—), 2104 (—o—), 3406 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

ชุดการทดลองที่มีการใช้ *P. pentosaceus* 2205 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุด คือร้อยละ 1.26 แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมในการหมักชั่วโมงที่ 48 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ส่วนในเวลาอื่นๆ การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกชุดการทดลอง

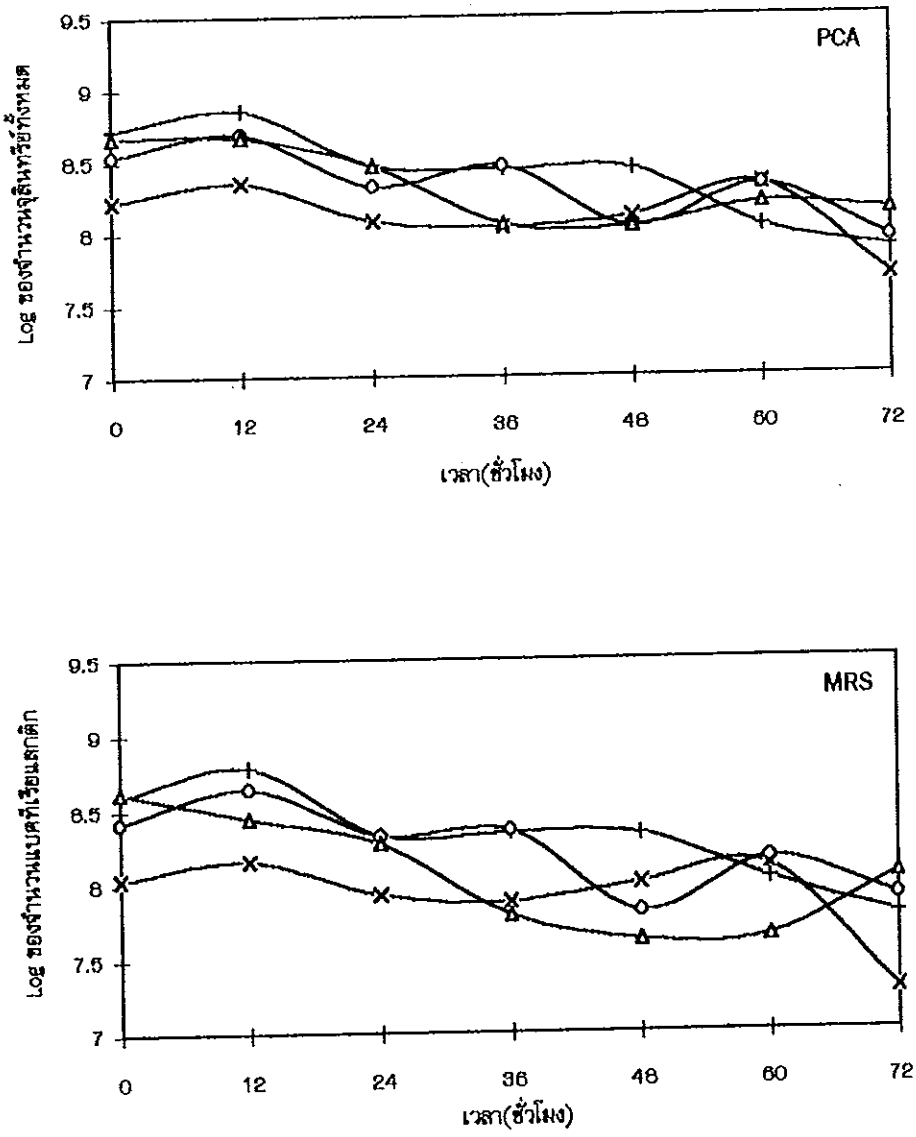
ทุกชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และลดลงในช่วงท้ายของการหมักแสดงในตาราง 21, 22 และภาพ 27 ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่ชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* 3301 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในชั่วโมงที่ 12-60 ของการหมักมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* 2205 คือ 4.90-2.09 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.69-8.32) และ 4.36-1.45 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.64-8.16) ตามลำดับ ทำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า และชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อ

4.1.6 ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกพบว่าชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียที่เป็นเฮทเทอโรเฟอร์เมฟเตทีฟที่คัดเลือกได้ (*Lactobacillus fermentum*, *L. brevis* และ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum) โดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณกรดที่ระเหยได้ในผลิตภัณฑ์มากกว่าชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (*L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus*) ดังตาราง 23 โดยชุดการทดลองที่ใช้ *L. brevis* 3403 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้มากที่สุดคือร้อยละ 0.18 และชุดการทดลองที่ใช้เชื้อจะมีปริมาณกรดที่ระเหยได้มากกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมเชื้อคือร้อยละ 0.07-0.18 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมเชื้อมีปริมาณกรดที่ระเหยได้ร้อยละ 0.07



ภาพ 26 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 (—+—), 3301 (—o—), 2205 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)



ภาพ 27 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 (—+—), 3301 (—o—), 2205 (—Δ—) และชุดการทดลองควบคุม (—×—)

ตาราง 23 ปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (ร้อยละ)
ชุดการทดลองควบคุม	0.07 [p]
Lactobacillus plantarum	
TISTR 50	0.09 [m]
3409	0.13 [h]
3404	0.15 [f]
Lactobacillus fermentum	
TISTR 55	0.08 [n]
2112	0.16 [d]
2508	0.15 [g]
L. sp. TISTR 539	0.12 [i]
L. brevis 3403	0.18 [a]
L. brevis 3304	0.17 [c]
Leuconostoc mesenteroides	
TISTR 53	0.10 [k]
2104	0.18 [b]
3406	0.16 [e]
Pediococcus pentosaceus	
TISTR 419	0.07 [o]
3301	0.12 [j]
2205	0.10 [l]

[a-p] ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

4.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตจากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์สายพันธุ์เดียว

ประเมินคุณภาพไส้กรอกหมักที่มีระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการหมักและรอทำการประเมินพร้อมกันทุกชุดการทดลอง โดยศึกษาคุณภาพด้านความแน่นแข็ง การยึดเกาะ ความฉ่ำของเนื้อสัมผัส รสชาติหวาน เค็ม ขม เปรี้ยว กลิ่นออกซิไดซ์ กลิ่นไส้กรอก และการยอมรับรวม ผลการทดลองแสดงในตาราง 24 และภาพ 28 ในการใช้เชื้อ *L. plantarum*, ภาพ 29 ในการใช้เชื้อ *L. fermentum*, ภาพ 30 *L. brevis*, ภาพ 31 ในการใช้ *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum และภาพ 32 ในการใช้เชื้อ *P. pentosaceus* จากแบบประเมินคุณภาพ QDA คะแนน 0-100 คะแนน

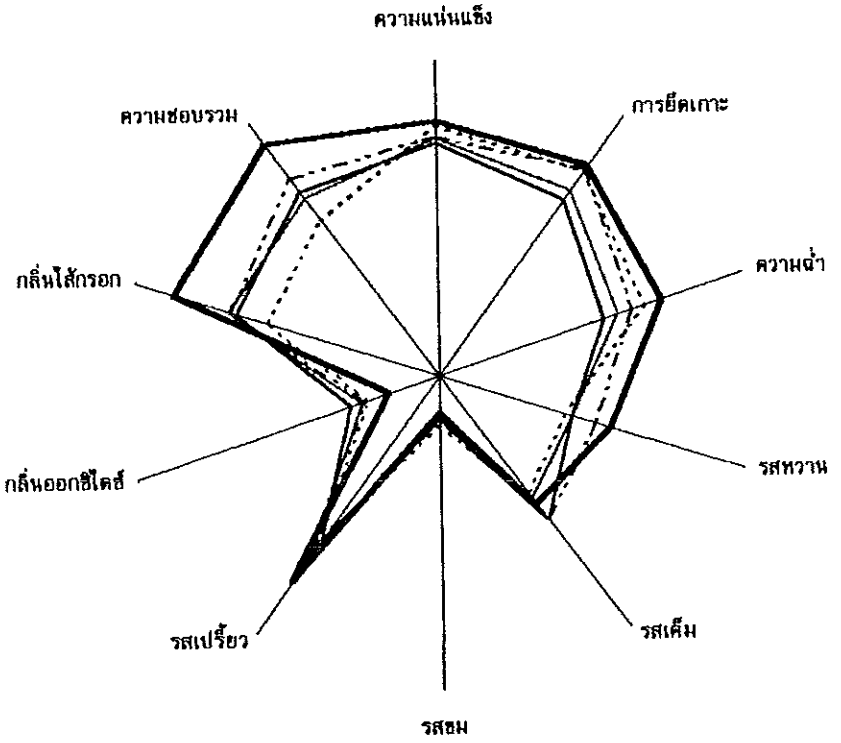
ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้าน ความแน่นแข็ง ของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) Wu, *et al.* (1991) ทดลองใช้ *L. plantarum*, *P. acidilactici* และ Lactacel 75 เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกหมัก ผลการประเมินคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส กลิ่นรส ลักษณะปรากฏ และการยอมรับรวม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* มีคะแนนประเมินคุณภาพสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยเชื้ออื่นๆ โดยเฉพาะ *L. plantarum* TISTR 50 และ 3409 มีคะแนนความแน่นแข็ง 55.20 และ 52.82 ตามลำดับซึ่งมีคะแนนใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติของผู้ประเมินมากที่สุดคือ 56.32 และมีคะแนนสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมเล็กน้อยซึ่งมีคะแนน 51.13 Vignolo, *et al.* (1988) รายงานว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงต่ำกว่า 5.5 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี (chemical decomposition) จะเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง มีอิทธิพลต่อโปรตีนกล้ามเนื้อ (muscular protein) ทำให้เกิดเนื้อสัมผัสคล้ายเจล (gel) มีผลให้อนุภาคเกิดการแน่นแข็ง

ผลการประเมินคุณภาพด้านการยึดเกาะของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตด้วย *Lactobacillus plantarum* 3409 และ 3404 *L. plantarum* TISTR 50 และ *Pediococcus pentosaceus* 2205 มีคะแนนสูงกว่าไส้กรอกหมักที่ผลิตจากเชื้ออื่น คือมีคะแนน 55.67, 50.17, 54.93 และ 51.67 ตามลำดับ และมีคะแนนใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติของผู้ประเมินมากที่สุดคือ 56.64 รวมทั้งมีคะแนนสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมเล็กน้อย (47.42) ในขณะที่ไส้กรอกผลิตจาก *L. fermentum* 2508 มีคะแนนต่ำที่สุดคือ 34.75 และแตกต่างจากชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$)

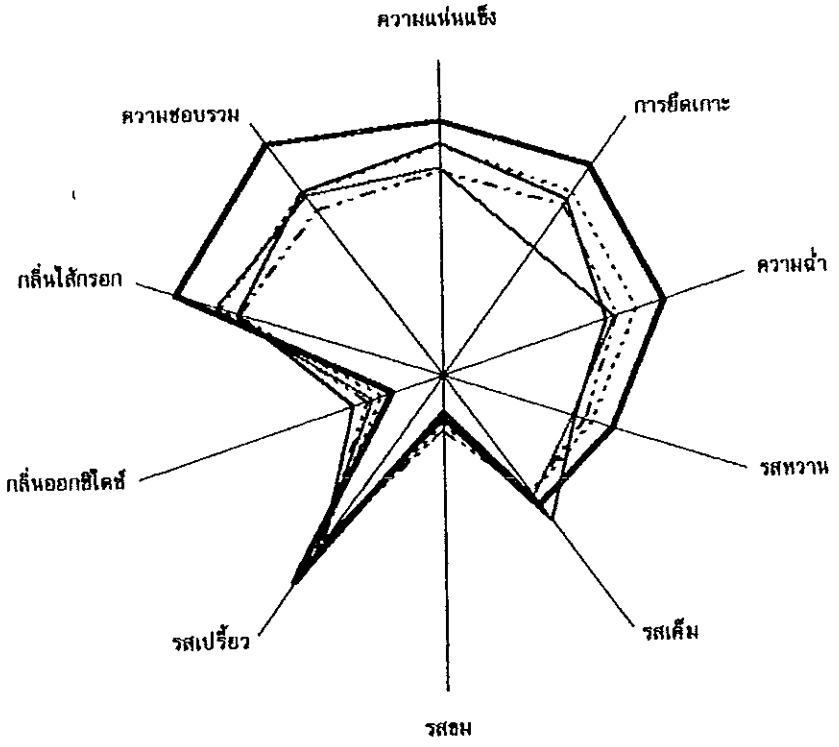
ตาราง 24 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ และชุดการทดลองควบคุม

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความแน่นแข็ง	การยึดเกาะ	ความฉ่ำ	รสหวาน	รสเค็ม	รสขม	รสเปรี้ยว	กลิ่นออกซิไดซ์	กลิ่นไส้กรอก	การยอมรับรวม
ชุดควบคุม	51.13	47.42^{abc}	38.09	30.82	40.41	9.43	44.47	20.24	46.52	50.95
L. plantarum	55.20	54.93^{a}	47.51	29.02	32.71	11.12	45.84	16.37	39.49	43.14
3409	52.82	55.67^{a}	44.75	36.19	40.25	8.98	51.11	16.90	47.83	54.57
3404	52.44	50.17^{abc}	41.40	30.76	34.26	8.659	48.24	17.76	48.56	49.14
L. fermentum	51.01	49.67^{abc}	45.20	34.88	32.84	10.56	46.72	13.88	50.69	50.65
2112	45.21	46.00^{abc}	40.81	33.02	32.39	11.93	44.69	17.37	46.25	45.68
2508	45.94	34.75^{c}	40.36	30.20	33.51	9.947	47.53	15.69	51.50	49.75
*L. sp.*TISTR 539	39.33	41.25^{abc}	39.58	30.77	39.97	7.43	39.95	19.98	45.33	41.44
L. brevis 3403	41.58	49.50^{abc}	47.86	34.40	34.40	10.81	45.52	16.30	39.95	42.19
L. brevis 3304	46.97	42.08^{abc}	45.21	29.12	33.49	9.65	47.17	13.80	49.81	50.75
Leu. mesenteroides	48.88	45.08^{abc}	45.95	34.92	33.15	10.16	44.52	18.37	44.91	43.11
2104	48.64	37.08^{bc}	37.75	29.93	35.15	12.35	48.92	19.42	44.29	48.44
3406	49.48	49.18^{abc}	39.54	26.94	39.68	9.72	46.79	15.24	51.14	52.20
P. pentosaceus	46.11	49.00^{abc}	34.45	34.86	37.68	11.12	48.07	19.50	51.65	48.08
3301	44.16	47.00^{abc}	43.69	30.49	31.39	12.69	47.11	17.60	45.01	46.43
2205	48.50	51.67^{ab}	44.60	32.77	30.48	9.37	52.17	15.01	55.56	54.87
คะแนนในอุดมคติ	56.32	56.64	51.36	39.76	35.96	8.16	55.84	11.28	61.00	64.02

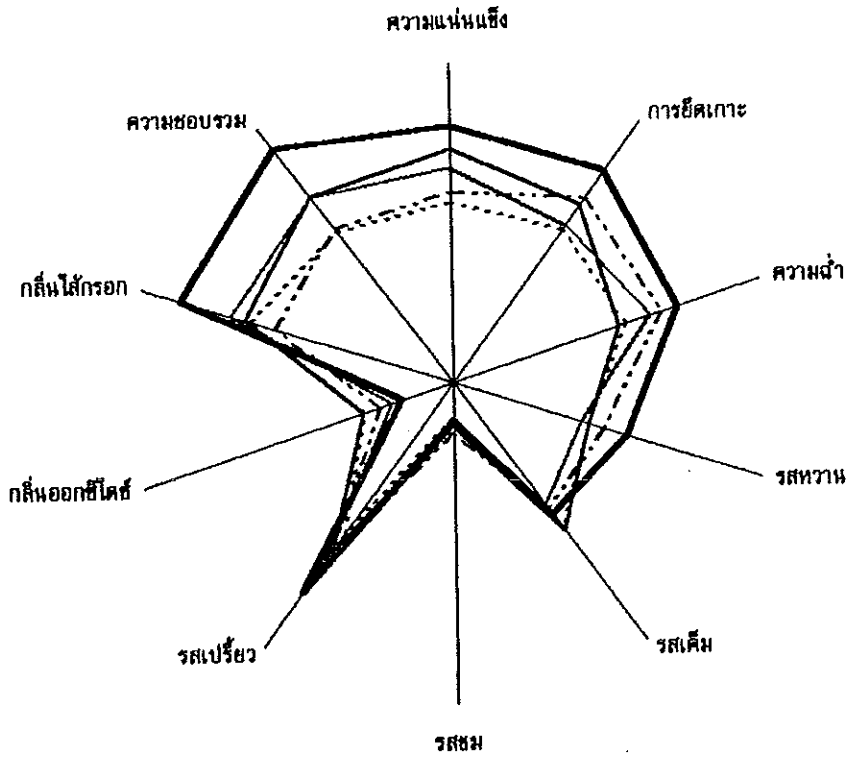
^{abc} ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)



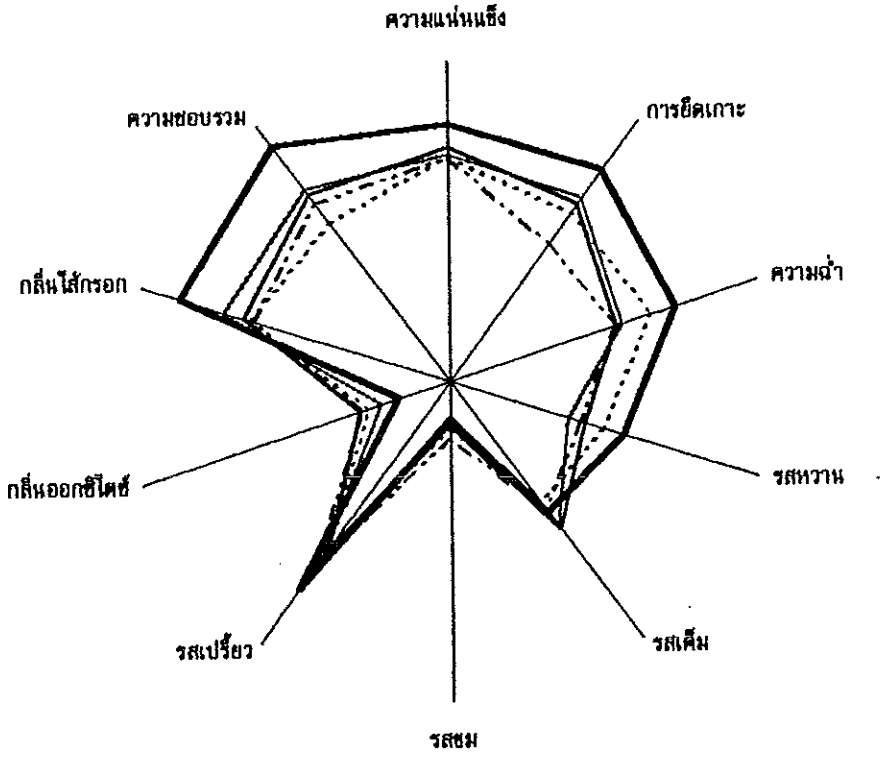
ภาพ 28 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 50 (------), 3409 (-·-·-·) 3404 (———), ชุดการทดลองควบคุม (———) และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (▬▬)



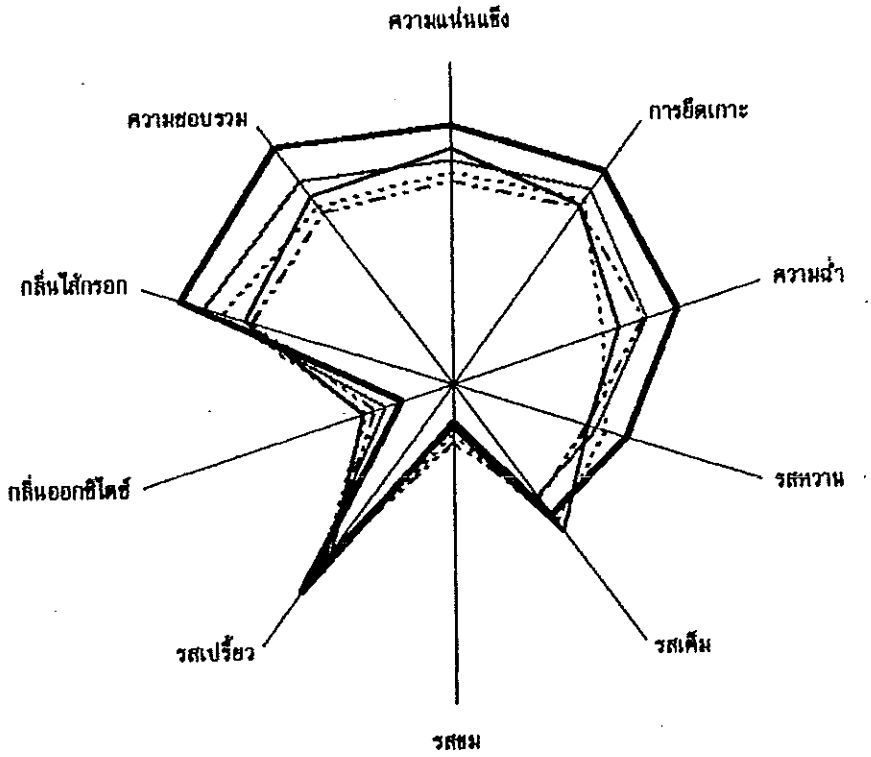
ภาพ 29 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus fermentum* TISTR 55 (------) 2112 (-·-·-·) 2508 (———), ชุดการทดลองควบคุม (———) และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (▬▬)



ภาพ 30 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus spp.* TISTR 539 (-------) *Lactobacillus brevis* 3403 (-·-·-·-) 3304 (·····), ชุดการทดลองควบคุม (———) และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (———)



ภาพ 31 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 53 (-------), 2104 (-·-·-·-), 3406 (·····), ชุดการทดลองควบคุม (———) และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (———)



ภาพ 32 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 419 (-------) 2205 (-.-.-.-) 3301 (——), ชุดการทดลองควบคุม (——) และค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (——)

ผลการประเมินคุณภาพด้านความฉ่ำ ทุกชุดการทดลองมีคะแนนความฉ่ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ *P. pentosaceus* TISTR 419 มีความฉ่ำน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น คือมีคะแนน 37.75 และ 34.45 ตามลำดับ ความฉ่ำของไส้กรอกหมักเป็นผลจากปริมาณน้ำและไขมัน ซึ่ง ชวลิต ตั้งสกุล (2531) รายงานว่าปริมาณไขมันจะลดลงเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณความชื้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเนื่องจากไขมันแข็งในไส้กรอกเปลี่ยนไปอยู่ในภาพของน้ำมันเพราะความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ทำให้สูญเสียออกมาพร้อมกับการสูญเสียของน้ำออกจากไส้กรอก และการสูญเสียน้ำเกิดเนื่องจากความเป็นกรดทำให้พีเอชของไส้กรอกลดต่ำลงเข้าใกล้กับจุดไอโซอิเลคตริก (isoelectric point) ของโปรตีนในเนื้อสัตว์มีผลให้ดึงดูดโมเลกุลของน้ำน้อยลง น้ำจึงถูกปล่อยออกมา (Forrest, *et al.*, 1975) อีกทั้งการให้ความร้อนระหว่างการทำให้สุกโดยการทอดโปรตีนของเนื้อสัตว์เมื่อถูกความร้อนจะเกิดสูญเสียสภาวะเดิม (denature) มีการหดรัดตัวของโมเลกุลโปรตีน สูญเสียความสามารถในการจับน้ำที่อุณหภูมิสูงขึ้น เช่น 70 องศาเซลเซียส ความสามารถในการจับน้ำจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 20 (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529) และจากการทดลองของ ชวลิต ตั้งตระกูล (2531) พบว่าปริมาณความชื้นของไส้กรอกหมักลดลงเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น และแม้ว่าความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกจะต่ำกว่าค่าที่จุดไอโซอิเลคตริกแล้ว ปริมาณความชื้นก็ลดลงเรื่อยๆเนื่องจากความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการหดตัวของโปรตีน จึงมีการสูญเสียน้ำ

ผลการประเมินคุณภาพรสหวาน ทุกชุดการทดลองมีคะแนนรสหวานใกล้เคียงกันมาก และไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 มีค่าคะแนนรสหวานสูงที่สุดคือ 36.19

ผลการประเมินคุณภาพรสเค็ม พบว่าทุกชุดการทดลองมีคะแนนใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) โดยที่ชุดการทดลองที่มีความฉ่ำน้อยจะมีความเค็มมากกว่าชุดการทดลองที่มีความฉ่ำมากกว่า เช่นชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* TISTR 419 มีคะแนนความฉ่ำ 34.45 มีคะแนนความเค็ม 37.68 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* TISTR 50 มีคะแนนความฉ่ำ 47.51 มีคะแนนความเค็ม 32.71 ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความชื้นในไส้กรอกน้อยลงทำให้สัดส่วนองค์ประกอบอื่นๆ โดยเฉพาะเกลือมากกว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณความชื้นหรือความฉ่ำสูงกว่า ผู้ประเมินจึงรับรสเค็มได้มากกว่า

ผลการประเมินคุณภาพรสขม พบว่าทุกชุดการทดลองมีคะแนนใกล้เคียงกันมากและไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *Lactobacillus sp.* TISTR 539 มีคะแนนรสขมน้อยที่สุด คือ 7.43 และชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *P. pentosaceus* 3301 มีคะแนนรสขมมากที่สุดคือ 12.69

ผลการประเมินคุณภาพรสเปรี้ยว เนื่องจากทดสอบผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่มีความเป็นกรด-ด่าง 4.5 จึงทำให้คะแนนของรสเปรี้ยวมีค่าใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) และชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนความเปรี้ยวสูงที่สุดคือ 51.11 และ 52.17 ตามลำดับเนื่องจากมีปริมาณกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์มากที่สุด คือร้อยละ 0.82 และ 0.79 ตามลำดับ จึงมีคะแนนใกล้กับคะแนนในอุดมคติของผู้ประเมินมากที่สุด Smith และ Palumbo (1983) กล่าวว่ากรดแลกติกที่สร้างจากสกุล Lacobacillus และสกุล Pediococcus จะให้กลิ่นรสแบบ tangy flavor

ผลการประเมินคุณภาพกลิ่นออกซิไดซ์ ทุกชุดการทดลองมีคะแนนกลิ่นออกซิไดซ์ในปริมาณที่สูงกว่าคะแนนในอุดมคติของผู้ประเมินมาก คือมีคะแนนในช่วง 13.80-20.24 โดยที่ชุดการทดลองควบคุมซึ่งใช้เวลาในการหมักนานที่สุดเพื่อให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 มีคะแนนกลิ่นออกซิไดซ์สูงที่สุดคือ 20.24 ในขณะที่คะแนนในอุดมคติเท่ากับ 11.28 แต่ทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การมีกลิ่นออกซิไดซ์สูงในทุกชุดการทดลองเป็นเพราะไขมันในไส้กรอกเกิดออกซิเดชัน แตกตัวเป็นสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้แก่ อัลดีไฮด์ กรด และคีโตน ซึ่งส่วนผสมในไส้กรอกมีสาร ประกอบไนไตรท์ โซเดียมคลอไรด์ และธาตุโลหะบางชนิดจากเนื้อ ทำให้เร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันไขมันได้เร็วขึ้น (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529) และมีกลิ่นออกซิไดซ์มากขึ้นเมื่อใช้เวลาในการหมักนานขึ้น

ผลการประเมินคุณภาพกลิ่นไส้กรอก ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนของกลิ่นรวมของไส้กรอกหมักสูงที่สุด คือ 55.56 แต่ทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) Vignolo, *et al.* (1988) รายงานว่ากรดมีความจำเป็นต่อขบวนการสร้างกลิ่น (aroma) และกลิ่นรส (flavor) กลิ่นรสของกรดที่เกิดจากกรดแลกติกเป็นกลิ่นรสแบบอ่อน ในขณะที่กรดอื่นๆ เช่น อะซิติก ไพรูวิก ฟอร์มิก และบิวทีริก เป็นสาเหตุของกลิ่นที่แรง ซึ่งกรดทั้งหมดเกิดจากการย่อยสลายองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตไขมัน และโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบคะแนนการประเมินกลิ่น ไส้กรอกกับปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูป

กรดอะซิติกพบว่าไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้ใช้ไส้กรอกหมักที่ไม่ผ่านความร้อน แต่การประเมินกลิ่นรสจะต้องทอดไส้กรอกจนกระทั่งมีอุณหภูมิภายใน 75 องศาเซลเซียส

ผลการประเมินคุณภาพด้านการยอมรับรวม ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนการยอมรับรวมสูงที่สุดคือ 54.57 และ 54.87 ตามลำดับ สูงกว่าชุดการทดลองควบคุมเล็กน้อยซึ่งเท่ากับ 50.95 เนื่องจาก *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนของคุณลักษณะที่ต้องการคือความแน่นแข็ง การยึดเกาะ รสเปรี้ยว และกลิ่นไส้กรอกสูง และมีคะแนนคุณลักษณะที่ไม่ต้องการคือรสขม และกลิ่นออกซิไดซ์ต่ำ ในขณะที่คุณลักษณะของความฉ่ำ รสหวาน และรสเค็มใกล้เคียงกับชุดการทดลองอื่น ทำให้มีการยอมรับรวมสูงกว่าแต่คะแนนการยอมรับรวมของทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

จากผลการทดลองการใช้เชื้อชนิดเดียว เมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและผลการประเมินทางประสาทสัมผัสแล้ว พบว่าการใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักมีลักษณะเด่นที่ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และให้ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสมีคะแนนใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติ Collar, *et al.* (1992) รายงานว่าการใช้เชื้อหลายชนิดร่วมกันในการหมักทำให้มีกรดอะมิโนแต่ละชนิดในผลิตภัณฑ์มีปริมาณมากกว่าการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว และงานวิจัยของ นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) แสดงให้เห็นว่าผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักที่มีการใช้เชื้อหลายชนิดได้รับการยอมรับในปัจจัยต่างๆ สูงกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงได้ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ร่วมกันในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อผลิตไส้กรอกหมัก และ Kearney, et al. (1990) รายงานว่า *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* เป็นเชื้อที่ใช้ร่วมกันสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในทางการค้า

5. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์

ชุดการทดลองในการศึกษามี 6 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลกติกชนิดเดียว คือ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลกติกหลายชนิดรวมกัน คือ *L. plantarum* 3409 ผสมกับ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 , 1:1 , และ 4:1 รวมทั้งชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อ

ปริมาณสารอาหารในส่วนผสมของไส้กรอก ผลิตตามวิธีของจันทร์สุดา รงวิศิษฏ์ (2523) มีโปรตีนร้อยละ 13.62 ความชื้นร้อยละ 53.71 ไขมันร้อยละ 15.59 และเถ้าร้อยละ 1.66

5.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์

ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ในชุดการทดลองที่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งการใช้ชนิดเดียวและการใช้หลายชนิดรวมกัน มีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกันมากและไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงในตาราง 25 และภาพ 33A และชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าตัวอย่างไส้กรอกที่ไม่มีการเติมเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ต่ำที่สุดคือ 4.08

ปริมาณกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ระหว่างการหมักชุดการทดลองที่มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งการใช้ชนิดเดียวและการใช้หลายชนิดรวมกัน มีปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกันมากและสูงกว่าตัวอย่างไส้กรอกที่ไม่มีการเติมเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แสดงในตาราง 26 และภาพ 33B ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 มีปริมาณกรดแลกติกในช่วงสุดท้ายของการหมักเท่ากันและสูงที่สุด คือร้อยละ 1.34 ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 1.18

ไส้กรอกหมักที่เติมเชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นทั้งหมดสูงที่สุดคือ 7.08×10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.85)

ตาราง 25 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวและการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ร่วมกัน

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	5.48^{a}	5.26^{c}	4.98^{b}	4.85^{b}	4.70^{c}	4.65^{c}	4.53^{b}
3409	5.45^{a}	4.97^{b}	4.56^{a}	4.41^{a}	4.18^{a}	4.13^{a}	4.10^{a}
2205	5.45^{a}	4.80^{a}	4.52^{a}	4.45^{a}	4.32^{b}	4.22^{b}	4.12^{a}
3409:2205 , 1:4	5.50^{a}	4.87^{ab}	4.50^{a}	4.60^{ab}	4.30^{b}	4.21^{ab}	4.12^{a}
3409:2205 , 1:1	5.47^{a}	5.90^{b}	4.51^{a}	4.43^{a}	4.30^{b}	4.20^{b}	4.08^{a}
3409:2205 , 4:1	5.50^{a}	5.90^{b}	4.53^{a}	4.47^{a}	4.31^{b}	4.21^{ab}	4.12^{a}

3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205

$^{a-c}$ ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตาราง 26 ปริมาณกรดแลกติค (ร้อยละ) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวและการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ร่วมกัน

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ปริมาณกรดแลกติก เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	0.47^{a}	0.63^{c}	0.72^{d}	1.01^{b}	1.06^{b}	1.12^{b}	1.18^{d}
3409	0.55^{a}	0.74^{b}	0.84^{c}	1.15^{a}	1.24^{a}	1.28^{a}	1.33^{a}
2205	0.58^{a}	0.77^{b}	0.97^{a}	1.17^{a}	1.21^{ab}	1.25^{ab}	1.31^{b}
3409:2205 , 1:4	0.56^{a}	0.83^{a}	0.96^{a}	1.17^{a}	1.17^{ab}	1.29^{a}	1.34^{a}
3409:2205 , 1:1	0.56^{a}	0.75^{b}	0.91^{b}	1.23^{a}	1.18^{ab}	1.18^{bc}	1.27^{c}
3409:2205 , 4:1	0.53^{a}	0.83^{a}	0.97^{a}	1.18^{a}	1.18^{ab}	1.25^{ab}	1.32^{ab}

3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205

$^{a-d}$ ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ตาราง 27 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์รวมกันบนอาหาร PCA

สายพันธุ์จุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Log ของจำนวนเซลล์) เวลาในการเก็บตัวอย่าง(ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
ชุดการทดลองควบคุม	8.55	8.60	8.44	8.42	8.28	7.95	7.81
3409	8.67	8.37	8.36	8.27	8.38	8.26	8.03
2205	8.77	8.84	8.48	8.67	8.65	8.37	8.17
3409:2205 , 1:4	8.75	8.82	8.75	8.69	8.69	8.45	8.25
3409:2205 , 1:1	8.74	8.71	8.73	8.76	8.67	8.44	8.28
3409:2205 , 4:1	8.85	8.54	8.75	8.70	8.57	8.30	8.16

3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

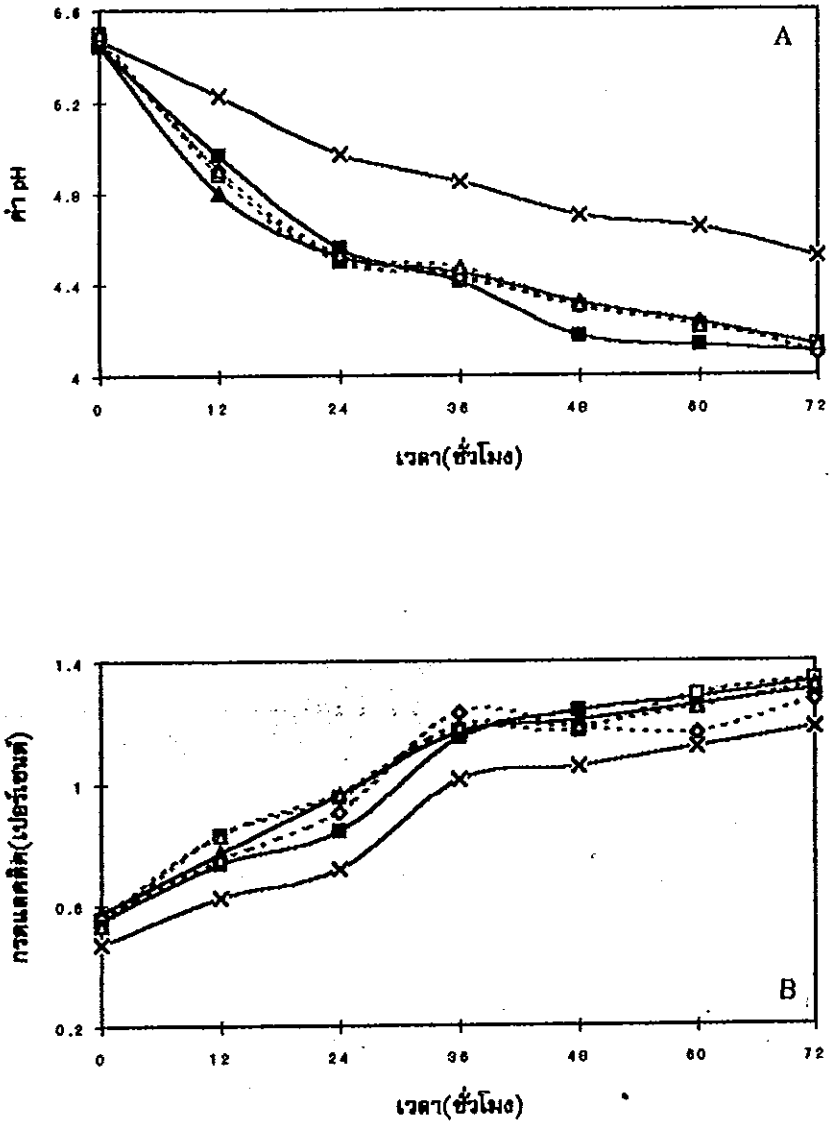
2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205

ตาราง 28 จำนวนแบคทีเรียแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์รวมกันบนอาหาร MRS

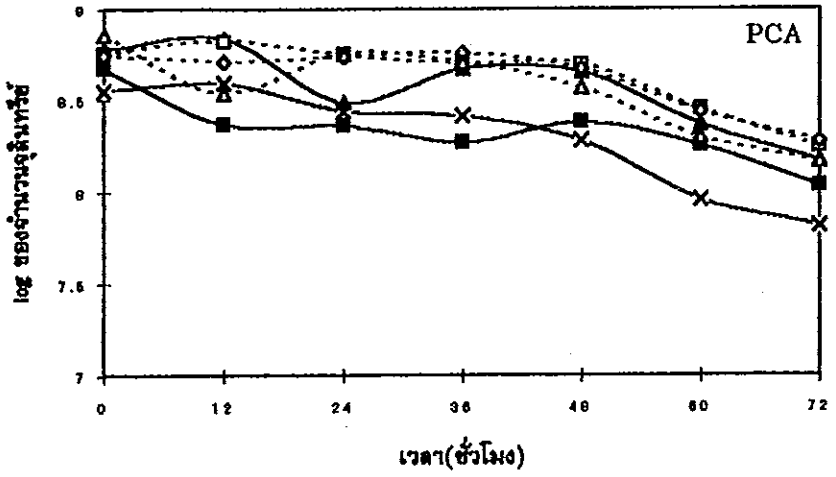
สายพันธุ์จุลินทรีย์	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (Log ของจำนวนเซลล์) เวลาในการเก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
ชุดการทดลองควบคุม	8.37	8.35	8.30	8.28	8.22	7.81	7.65
3409	8.54	8.22	7.95	8.22	8.34	8.11	7.91
2205	8.44	8.77	8.44	8.58	8.57	8.23	7.99
3409:2205 , 1:4	8.57	8.74	8.65	8.51	8.53	8.37	8.14
3409:2205 , 1:1	8.69	8.66	8.68	8.66	8.59	8.37	8.22
3409:2205 , 4:1	8.66	8.43	8.68	8.65	8.49	8.20	8.06

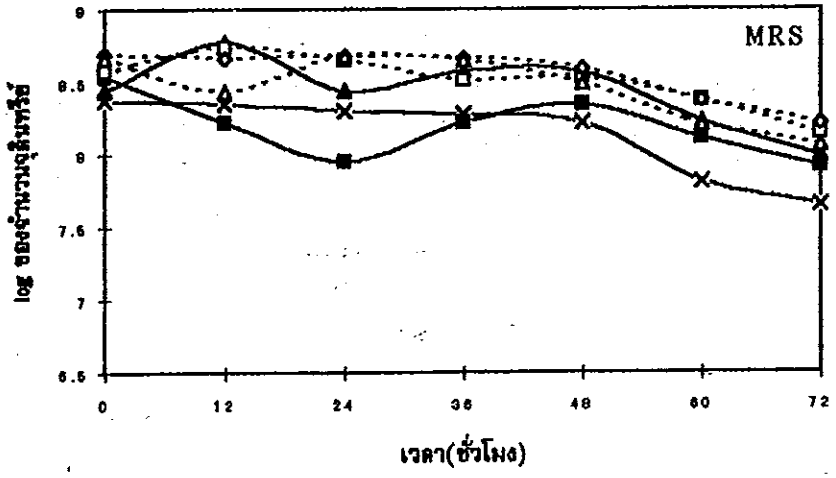
3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205



ภาพ 33 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง (A) และกรดแลกติก (B) ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* 3409 (—■—) *Pediococcus pentosaceus* 2205 (—△—), ชุดการทดลองควบคุม (—x—) และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4 (--□--), 1:1 (--◇--) และ 4:1 (--△--)





ภาพ 34 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์บนอาหาร PCA และ MRS ระหว่างการหมักไส้กรอกด้วย *Lactobacillus plantarum* 3409 (—■—), *Pediococcus pentosaceus* 2205 (—△—), ชุดการทดลองควบคุม (—x—) และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4 (--□---), 1:1 (---◊---) และ 4:1 (--△---)

แสดงในตาราง 27, 28 และภาพ 34 และไส้กรอกที่เติมเชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีแบคทีเรียแลกติกจำนวนสูงที่สุดคือ 4.90 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.74) ชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกต่ำที่สุด คือ 3.55 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.55) และ 2.34 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.37) ตามลำดับ แต่นับว่ามีจุลินทรีย์เริ่มต้นที่สูงมาก ระหว่างการหมักมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์เล็กน้อย และลดลงในช่วงท้ายของการหมักโดยที่ชุดการทดลองควบคุมมีจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกต่ำที่สุดคือ 6.46 X 10^7 เซลล์/กรัม (Log 7.81) และ 4.47 X 10^7 เซลล์/กรัม (Log 7.65) ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกสูงที่สุดคือ 1.91 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.28) และ 1.66 X 10^8 เซลล์/กรัม (Log 8.22) ตามลำดับ ซึ่งทำให้ชุดการทดลองนี้มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงสุดท้ายของการหมักต่ำที่สุด และชุดการทดลองควบคุมมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุด

ปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกแสดงดังตาราง 29 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้มากที่สุด คือ 0.15 และแตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้เชื้อชนิดเดียวและชุดการทดลองควบคุม ($P<0.01$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่ใช้เชื้อหลายชนิดในอัตราส่วนอื่นๆ และชุดการทดลองควบคุมมีปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกสูงกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว ทั้งนี้เพราะในชุดการทดลองมีจำนวนจุลินทรีย์สูงมากและอาจมีแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟอยู่มาก

5.2 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตจากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์หลายสายพันธุ์

ประเมินคุณภาพไส้กรอกหมักที่มีระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการหมักและรอทำการประเมินพร้อมกันทุกชุดการทดลอง ศึกษาคุณภาพด้านความแน่นแข็ง การยึดเกาะ ความฉ่ำของเนื้อสัมผัส รสชาติหวาน เค็ม ขม เปรี้ยว กลิ่นออกซิไดซ์ กลิ่นไส้กรอก และการยอมรับรวม ผลการทดลองแสดงในตาราง 30 และภาพ 35

ตาราง 29 ปริมาณกรดที่ระเหยได้รูปกรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตด้วยจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้หลายสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ	ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (ร้อยละ)
ชุดการทดลองควบคุม	0.13 ^{bc}
3409	0.13 ^{c}
2205	0.13 ^{bc}
3409:2205 , 1:4	0.14 ^{abc}
3409:2205 , 1:1	0.14 ^{ab}
3409:2205 , 4:1	0.15 ^{a}

3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205

^{abc} ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)

ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความแน่นแข็ง พบว่าชุดการทดลองที่มีการใช้แบคทีเรียแลกติกหลายชนิดรวมกัน มีคะแนนความแน่นแข็งไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีคะแนนสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้แบคทีเรียแลกติกชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับนงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ที่รายงานว่าคุณลักษณะด้านเนื้อสัมผัสของไส้กรอกที่หมักด้วยเชื้อผสม 2 ชนิด ได้รับการยอมรับมากกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียว ชุดการทดลองควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 มีคะแนนความแน่นแข็งสูงที่สุดคือ 57.13 และ 57.03 และใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุด

ผลการประเมินคุณภาพด้านการยึดเกาะของผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกหมักผลิตด้วยแบคทีเรียแลกติกหลายชนิดมีคะแนนการยึดเกาะใกล้เคียงกับชุดการทดลองควบคุม และมีคะแนนการยึดเกาะสูงกว่าไส้กรอกที่ผลิตด้วยแบคทีเรียแลกติกชนิดเดียว แต่ความแตกต่างของคะแนนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และไส้กรอกที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยึดเกาะสูงที่สุด คือ 51.40 ซึ่งก็ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุด

ผลการประเมินคุณภาพด้านความฉ่ำ ทุกชุดการทดลองมีคะแนนความฉ่ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ชุดการทดลองควบคุมมีคะแนนความฉ่ำน้อยที่สุด คือ 44.37 เป็นเพราะใช้เวลาในการหมักมากที่สุด ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีคะแนนความฉ่ำมากที่สุดคือ 47.17 ซึ่งใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุด

ผลการประเมินคุณภาพรสหวาน ทุกชุดการทดลองมีคะแนนรสหวานใกล้เคียงกันมากและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ชุดการทดลองควบคุมมีคะแนนรสหวานน้อยที่สุด คือ 30.23 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีคะแนนรสหวานมากที่สุด คือ 33.40

ผลการประเมินคุณภาพรสเค็ม พบว่าทุกชุดการทดลองมีคะแนนใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยที่ชุดการทดลองควบคุมซึ่งมีความฉ่ำน้อยมีความเค็มมากที่สุดคือ 34.90 มากกว่าชุดการทดลองอื่นๆซึ่งมีความฉ่ำมากกว่า แต่แตกต่างกันเล็กน้อย และชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนความเค็มต่ำที่สุด คือ 30.23

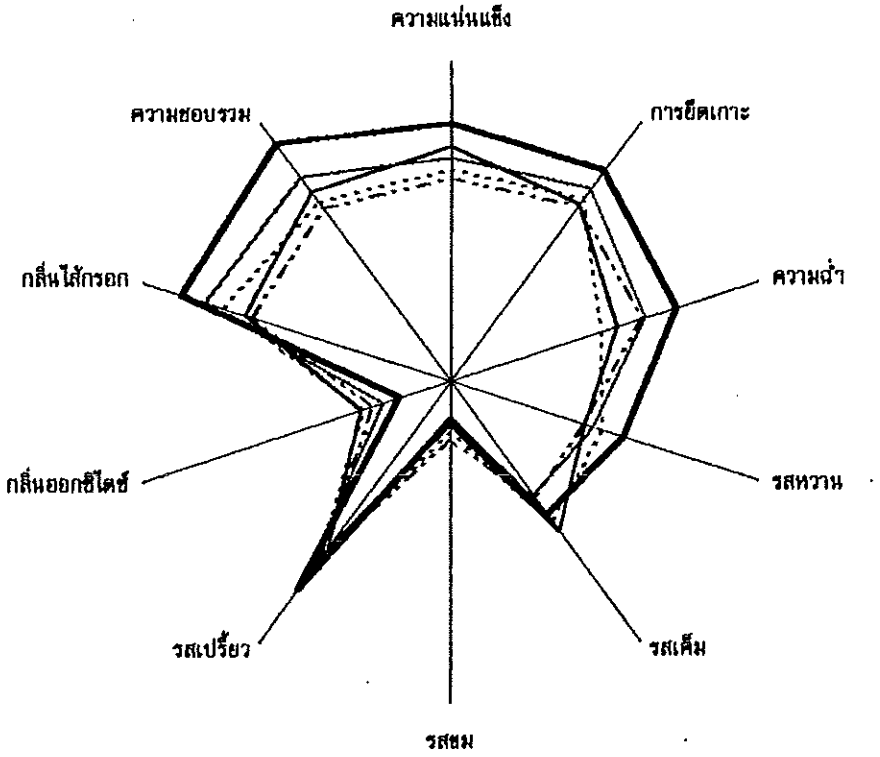
ตาราง 30 **ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และชุดการทดลองควบคุม**

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความแน่นแข็ง	การยึดเกาะ	ความฉ่ำ	รสหวาน	รสเค็ม	รสขม	รสเปรี้ยว	กลิ่นออกซิไดซ์	กลิ่นไส้กรอก	การยอมรับรวม
ชุดควบคุม	57.13[a]	50.27	44.37	30.23	34.90	6.23	57.70[ab]	16.57	51.67	59.27
3409	47.13[b]	46.70	47.53	32.97	32.43	7.37	53.57[b]	14.07	53.67	60.10
2205	49.87[b]	48.00	44.53	31.87	30.23	5.73	60.60[a]	16.67	56.10	59.70
3409:2205 1:4	57.03[a]	50.77	45.23	32.03	33.13	5.83	56.20[ab]	15.37	55.47	60.23
3409:2205 1:1	52.90[ab]	51.40	44.57	31.37	31.73	7.07	59.97[ab]	15.00	55.00	62.40
3409:2205 4:1	51.90[ab]	50.53	47.17	33.40	32.53	6.77	58.07[ab]	17.27	53.23	59.67
คะแนนในอุดมคติ	56.32	56.64	51.36	39.76	35.96	8.16	55.84	11.28	61.00	64.02

3409 = *Lactobacillus plantarum* 3409

2205 = *Pediococcus pentosaceus* 2205

[abc] ในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$)



ภาพ 35 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักผลิตด้วยการใช้ *Lactobacillus plantarum* 3409 (--------) เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 2205 (-·-·-·) ชุดการทดลองควบคุม (———) ค่าในอุดมคติของผู้ทดสอบ (▬▬) และการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ในอัตราส่วน 1:4 (———) 1:1 (·····) และ 4:1 (·····)

ผลการประเมินคุณภาพรสชม พบว่าทุกชุดการทดลองมีคะแนนใกล้เคียงกันมากและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนรสชมน้อยที่สุดคือ 5.73 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 มีคะแนนความชมสูงที่สุดคือ 7.37 ซึ่งทุกชุดการทดลองมีคะแนนความชมต่ำกว่าคะแนนในอุดมคติ คือ 8.16

ผลการประเมินคุณภาพรสเปรี้ยว ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 มีคะแนนรสเปรี้ยวน้อยที่สุดคือ 53.57 เนื่องจากมีปริมาณกรดแลกติกน้อยที่สุด และแตกต่างจากชุดการทดลองที่ใช้ *P. pentosaceus* 2205 ซึ่งมีคะแนนความเปรี้ยวสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 60.60 ซึ่งเป็นเพราะมีปริมาณกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์สูงที่สุด ดังภาพ 35 แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นทางสถิติ

ผลการประเมินคุณภาพกลิ่นออกซิไดซ์ ทุกชุดการทดลองมีคะแนนกลิ่นออกซิไดซ์ในปริมาณที่สูงกว่าคะแนนในอุดมคติของผู้ทดสอบมาก และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ใช้ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีคะแนนกลิ่นออกซิไดซ์สูงที่สุดคือ 17.27

ผลการประเมินคุณภาพกลิ่นไส้กรอก ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนของกลิ่นรวมของไส้กรอกหมักสูงที่สุดคือ 56.10 ซึ่งมีผลการทดลองเช่นเดียวกับในการทดลองใช้เชื้อชนิดเดียว (ข้อ 4.2) และไส้กรอกที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 มีคะแนนรองลงมา คือ 55.47 ชุดการทดลองควบคุมมีคะแนนกลิ่นไส้กรอกน้อยที่สุด คือ 51.67 แต่ทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) เช่นเดียวกับที่ นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) รายงานไว้

ผลการประเมินคุณภาพด้านการยอมรับรวม ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อผสมมีคะแนนการยอมรับรวมสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้เชื้อชนิดเดียวและชุดการทดลองควบคุม สอดคล้องกับการทดลองของ นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ที่รายงานว่าการใช้เชื้อผสมมีคะแนนการยอมรับรวมสูงกว่าการใช้เชื้อชนิดเดียวแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L.plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยอมรับรวมสูงที่สุดคือ 62.40 รองลงมาคือชุดการทดลองที่ใช้เชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในอัตราส่วน 1:4 คือ 60.23 เนื่องจากมีคะแนนความแน่นแข็ง การยึด

เกาะ รสเปรี้ยว และกลิ่นไส้กรอกสูง ขณะที่มีคะแนนความชม และกลิ่นออกซิไดซ์ต่ำ ชุดการทดลองควบคุมมีคะแนน 59.27 ซึ่งต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีการใช้เชื้อเนื่องจากมีคะแนนความฉ่ำ รสหวาน กลิ่นไส้กรอกต่ำ และมีคะแนน รสเค็ม และกลิ่นออกซิไดซ์สูง แต่ทุกชุดการทดลองมีคะแนนการยอมรับรวมไม่ความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

การเปรียบเทียบการใช้อัตราส่วนต่างๆในการผสมเชื้อ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 เมื่อพิจารณาผลทางเคมี จุลินทรีย์ และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสพบว่าใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างทางสถิติในเกือบทุกปัจจัย ดังนั้นสามารถเลือกใช้อัตราส่วนใดก็ได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกหมัก ซึ่งมีผลดีคือทำให้ลดระยะเวลาการหมักไส้กรอกลงจาก 72 ชั่วโมงเป็น 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

สรุป

สรุป

1. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอกโดยธรรมชาติ

ค่าความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกหมักลดลงจาก 5.80 เป็น 5.40, 4.70 และ 4.50 มีปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 0.46, 0.93, 1.21 และ 1.30 ในการหมักวันที่ 0, 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมีแนวโน้มสูงขึ้นจาก 4.30×10^{7} ซีเอฟยู/กรัม สูงสุดในวันที่ 2 ของการหมักคือ 9.70×10^{8} ซีเอฟยู/กรัม ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักจาก 2.70×10^{6} ซีเอฟยู/กรัม เป็น 6.00×10^{8} ซีเอฟยู/กรัม ในวันสุดท้ายของการหมัก

2. การแยกและเทียบเคียงชนิดจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมัก

การเทียบเคียงจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอก พบจุลินทรีย์ 5 กลุ่มใหญ่คือ แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมบวก แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบ แบคทีเรียรูปร่างทรงกลมจัดเรียงเซลล์เดี่ยว แบคทีเรียรูปร่างทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ และกลุ่มสุดท้ายคือยีสต์ ผลการเทียบเคียงจุลินทรีย์ของตัวอย่างไส้กรอกในวันเริ่มต้นของการหมักพบแบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบมากที่สุด รองลงมาคือ *Micrococcus spp.*, *Lactobacillus plantarum* และยีสต์ ในช่วงระหว่างการหมักจนถึงช่วงสุดท้ายของการหมัก แบคทีเรียที่พบมากและมีบทบาทคือแบคทีเรียแลกติกซึ่งชนิดที่พบมากที่สุดคือ *L. plantarum* รองลงมาคือ *L. brevis*, *L. spp.*, แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบ, ยีสต์, *L. fermentum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum และ *Micrococcus spp.* ตามลำดับ

3. การคัดเลือกแบคทีเรียสำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 5 ชนิดโดยพิจารณาจากอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์ เพื่อคัดเลือกเชื้อใช้เป็นกล้าเชื้อไส้กรอก แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกใช้เป็นกล้าเชื้อไส้กรอกหมักคือ *L. plantarum* 3409 และ 3404, *L. fermentum* 2112 และ 2508, *L. brevis* 3403 และ 3406 *Leu. mesenteroides* ssp. dextranicum 2104 และ 3406, *P. pentosaceus* 3301 และ 2205 โดยที่ *P. pentosaceus* 3301 มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการสร้างเซลล์สูงที่สุดคือ 0.21 หน่วย/ชั่วโมง และ 7.47×10^{7} โคโลนี/มิลลิลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

4. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์ธรรมชาติ และจุลินทรีย์จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ระหว่างการหมักไส้กรอก และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 3. เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกจากหน่วยบริการเชื้อพันธ์จุลินทรีย์คือ *L. plantarum* TISTR 50, *L. fermentum* TISTR 55, *L. sp.* TISTR 539, *Leu. mesenteroides* TISTR 53, *P. pentosaceus* TISTR 419 พบว่า ไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำและปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการหมักด้วยจุลินทรีย์จากธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ไส้กรอกหมักด้วย *L plantarum* และ *P. pentosaceus* มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำและมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการใช้เชื้ออื่น โดยที่ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ที่คัดเลือกมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า และมีปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ และจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ไส้กรอกที่หมักด้วย *L. plantarum* 3409 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดคือ 4.05 และไส้กรอกที่หมักด้วย *P. pentosaceus* 2205 มีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.26 ในวันสุดท้ายของการหมัก ในขณะที่ไส้กรอกหมักด้วย *L. brevis* 3403 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกสูงที่สุดคือร้อยละ 0.18 การใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณสูง (5×10^{6} ซีเอฟยู/กรัม) ทำให้จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่และลดลงในช่วงท้ายของการหมักเกือบทุกชุดการทดลอง โดยไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ

แบคทีเรียแลกติกสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของการใช้แบคทีเรียแลกติกชนิดเดียว ประเมินคุณภาพ 10 คุณลักษณะ พบว่าไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 มีคะแนนความแน่นแข็ง การยึดเกาะ รสหวาน รสเปรี้ยว และการยอมรับรวม ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติ รองลงมาคือ *P. pentosaceus* 2205 มีคะแนนรสเปรี้ยว กลิ่นไส้กรอก และการยอมรับรวม ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติเช่นกัน

5. การผลิตไส้กรอกหมักโดยใช้จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบกับไส้กรอกหมักผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว และจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

แบคทีเรียแลกติกที่เหมาะสมในการผลิตไส้กรอกหมักจากตอนที่ 4 คือ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 และการใช้ในรูปแบบของการผสมกันในอัตราส่วน 1:4, 1:1 และ 4:1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสพบว่าไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำและปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการหมักด้วยจุลินทรีย์จากธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) โดยที่ไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดคือ 4.10 และไส้กรอกหมักด้วยเชื้อผสม *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* เชื้อ 2205 ในอัตราส่วน 1:4 มีปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดคือร้อยละ 1.34 ในวันสุดท้ายของการหมัก และไส้กรอกหมักด้วย *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* เชื้อ 2205 ในอัตราส่วน 4:1 มีปริมาณกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกสูงที่สุดคือ 0.15 การใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณสูง ทำให้จุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่และลดลงในช่วงท้ายของการหมักเกือบทุกชุดการทดลอง โดยไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลกติกสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ และแบคทีเรียแลกติก 2 ชนิดรวมกันมีคะแนนความแน่นแข็งสูงกว่าไส้กรอกหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) และไส้กรอกหมักด้วย ด้วย *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* เชื้อ 2205 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยอมรับรวม ใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุดคือ 62.40

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณการใช้กล้าเชื้อในอัตราส่วนต่างๆ ที่แตกต่างไปจากอัตราส่วนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

2. ควรติดตามกระบวนการหมักของไส้กรอกที่มีการใช้กล้าเชื้อเพื่อศึกษาชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก รวมทั้งปฏิกิริยาการอยู่ร่วมกัน (interaction) ของเชื้อ

3. ศึกษาการใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกันมากกว่า 2 ชนิด หรือการใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกับจุลินทรีย์อื่นเช่น รีดิวซิ่ง แบคทีเรีย (reducing bacteria) เช่น *Micrococcus varians* ร่วมกับการใช้ยีสต์ และรา เพื่อปรับปรุงคุณภาพไส้กรอกหมัก และลดเวลาการหมัก

4. ควรใช้วัตถุดิบที่มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นต่ำ หรือในกรณีที่วัตถุดิบมีจุลินทรีย์ในปริมาณสูงควรใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่สูงขึ้นเพื่อให้กล้าเชื้อได้แสดงบทบาทที่ชัดเจนในกระบวนการหมัก

5. ศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อให้อยู่ในรูปที่ใช้งานได้สะดวก มีความคงตัว และเก็บได้นาน เช่นการเตรียมในรูปเชื้อผง หรือลูกแป้ง และทดลองนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

จันทร์สุดา รงวิศิษฏ์. 2523. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณข้าว เกลือ และน้ำตาลต่อการเปลี่ยนแปลง pH และปริมาณกรดในไส้กรอกเปรี้ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์. กรุงเทพ : บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชย์จำกัด.

นงเยาว์ ชัยยินภูมิ และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. แบคทีเรียแลคติคในไส้กรอกเปรี้ยว. รายงานการสัมมนาแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 28-29 ตุลาคม 2534 หน้า 68-80.

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2527. ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิษณุ วิเชียรสวรรค์. 2535. หน้าที่ของส่วนผสมต่างๆในการทำไส้กรอก ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 24 : 65, 69-71.

แพร่พิทยา. 2507. พจนานุกรม. กรุงเทพ : บริษัทแพร่พิทยา.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2535. สถิติสำหรับการวิจัยทางเกษตร. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2534. การพัฒนาอาหารหมักพื้นบ้านโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น. ว.อุตสาหกรรมเกษตร 1(2) : 36-40.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ อำพิน กันธิยะ. 2536. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 1. แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตแหนม. ว.เกษตร (วิทย.) 9 : 51-60.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ อำพิน กันธิยะ. 2536. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 2. ผลของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวต่อการผลิตกรดแลคติคในผลิตภัณฑ์. ว.เกษตร (วิทย.) 9 : 61-74.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ อำพิน กันธิยะ. 2536. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 3. สูตรเครื่องเทศที่เหมาะสมต่อการผลิตแหนม. ว.เกษตร (วิทย.) 9 : 84-96.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ อำพิน กันธิยะ . 2536. การพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม 4. ผลของเครื่องเทศหลักต่อการผลิตกรดแลคติคในผลิตภัณฑ์. ว.เกษตร (วิทย.) 9 : 97-117.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2532. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. กรุงเทพ : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. แบคทีเรียแลคติคในไส้กรอกเปรี้ยว. รายงานการสัมมนาแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน 28-29 ตุลาคม 2534.

วิไลลักษณ์ กมลธรรม. 2535. การเปรียบเทียบวิธีการผลิตไส้กรอกอีสานด้วยวิธีธรรมชาติและการเติมผงหมัก. โครงงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ส.ขอนแก่นลุยใหญ่ปีจอขยายตลาดออกเอเชีย. 2537. ไทยไฟแนนเชียล. 4 มกราคม 2537.

สิรินทร์ วิโมกสันว์, เจมส์ เอ. ฌกลสัน, ยงยุทธ ยุทฑวงค์, สุวิทย์ เพียรกิจกรรม, สกล พันธุ์ยิ้ม และมนตรี จุฬาวัฒนกล. 2523. ชีวเคมี. กรุงเทพ : ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุชาติ สุขวณิชย์ . ผู้จัดการโรงงานบริษัท ส. ขอนแก่น. 2537. ผู้ให้สัมภาษณ์, 10 ตุลาคม 2537.

สุรพล อุปติสสกุล. 2526. สถิติการวางแผนการทดลองเล่ม 2. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไส้กรอกเล่นตีแตกทั่นราคา. 2526. สถิติการวางแผนการทดลองเล่ม 2. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา และการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

A.O.A.C. 1990. Official method of analysis of official analytical chemists. 15th ed. Washington, D.C. : The Association of official analytical chemists. Inc.

Acton, J. C., Dick, R., and Norris, E. L. 1977. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. J. Food Sci. 42 : 174-178.

American Meat Institute Foundation. 1960. The Science of Meat and Meat Product. San Francisco : W.H.F. Freeman and Co.

Bacus, J. 1984. Update : Meat fermentation 1984. Food Technol. 38(6) : 59-63.

Baran, W. L., and Stevenson, K. E. 1975. Survival of selected pathogens during processing of a fermented turkey sausage. J. Food Sci. 40 : 618-620.

Batholomew, D. T., and Blumer, T. N. 1980. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria in country-style ham. J. Food Sci. 45 : 420

Buchanan, R. E., and Baker, N. G. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8 th. William & Wilkins. Baltimore.

Buchanan, R. E., and Gibbon, N. E. 1986. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology . Baltimore : Waverly Press.

Carlsson, J., Kujala, U., and Edlund M. B. K. 1985. Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 49 : 674-678.

Carr, J. G., Cutting, C. V., and Whitins, G. C. 1975. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. London : Academic Prees Inc.

Champagne, P. C., and Cotes, C. B. 1987. Cream fermentation with immobilized lactic acid bacteria. Biotechnol Lett. 9 : 329-332.

Christiansen, L. N., Tompkin, R. W., Shaparis, A. B., Johnston, R. W. and Kautter D. A. 1975. Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium*

botulihum growth and toxin production in a summer style sausage. J. Food Sci. 40 : 488-490.

Clarke, A.D. 1991. Fermented Sausage. In Fermented Sausage Workshop : American Association of Meat Processors.

Collar, C., Mascaros, A. F., and Barber, C. B. 1992. Amino acid metabolism by yeast and lactic acid bacteria during bread dough fermentation. J. Food Sci. 57 : 1423-1427.

Condon, S. 1987. Response of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev. 46 : 269-280.

Daly, C., Sandine, W. E., and Elliker, P. R. 1973. Interaction of food starter culture and food-borne pathogens: Streptococcus diacetilactis versus food-borne pathogen. J. Milk Food Technol. 35 : 349-357.

Deibel, R. H., Wilson, G. O., and Niven, C. F. 1961. Microbiology of meat curing, IV. A lyophilized *Pediococcus cerevisiae* Starter culture for fermented sausage. Appl. Microbiol. 9 : 239-245.

Deibel, R. H. 1974. Technology of fermented semi-dried and dried sausages. In Proc. Meat Ind. Res. Conf., American Meat Institute Foundation, Washington, D.C.

Difco Laboratories. 1984. Difco manual: Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th ed. Michigan.

Drinan, D. F., Tobin, S., and Cogan, T. M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homo-fermentative lactic acid bacteria. Appl. Envi. Microbiol. 31 : 481-485.

El-gendy., S. M., Abdel-galil, H., Shahin, Y., and Hegazi, F. Z. 1983. Acetoin and Diacetyl Production by Homo-and Hetero-fermentative acetic acid bacteria. J. Food Prot. 46 : 420-425.

Everson, C. E., Daemer, W. E., and Hammers, P. A. 1970. Improved Starter culture for Semidry sausage. Food Tech. 24 : 42-48.

Everson, C. E., Daemer, W. E., and Hammers, P. A. 1970. Bacterial Starter culture in sausage products. J. Agr. Food Chem. 98 : 570-577.

Faddin, J. F. M. 1976. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Baltimore : The William & Wilkins Co.

Forrest, J. C., Aberls, E. D., Hedtick, H. B., Judge, M. D., and Merkel, R. A. 1975. Principles of Meat Science. san Francisco W.H. : Freeman and Co.

Frazier, W. C. 1967. Food Microbiology. Vol. 2. New York : McGraw-Hill Publishing Co.

Gillespie, E. L. 1960. The Science of Meat and Meat products. American Meat Institute Foundation. San Francisco : W.H. Freeman and Co.

Gilliland, S. E. 1985. Bacterial Starter Culture for Foods. Florida : CRC Press Inc.

Gilliland, S. E. 1988. Bacterial Starter Culture for Foods. Florida : CRC Press Inc.

Hickey, M. W., Hillier, A. J., and Jago, G. R. 1983. Metabolism of pyruvate and pyruvate and citrate in lactobacilli. J. Biol. Sci. 36 : 487-496.

Houle, J. F., Lafrance, M., Brochu, E., and Champague, C. P. 1989. Selection of mixed cultures for meat fermentation. J. Food Sci. 54 : 839-842.

Huang, C. C., and Lin, C. W. 1993. Drying temperature and time affect quality of Chiness-style sausage inoculated with lactic acid bacteria. J. Food Sci. 58 : 249-253.

Huggins, A. R. 1984. Progress in dairy starter culture technology. Food Technol. 38 : 41-50.

Ingolf, F. N., and Skjelkvale, R. 1982. Effect of natural spices and oleoresin on *Lactobacillus plantarum* in fermentation of dry sausage. J. Food Sci. 47 : 1618.

Jensen, L. B. and Paddon, L. S. 1940. Sausage treatment. U.S. Patent 2, 225, 783.

Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Genus Lactobacillus beijerinck 1901, 212al, p. 1209-1234. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Baltimore : The Williams & Wilkins Co.

Kearney, L., Upton, M., and Mcloughlin, A. 1990. Meat fermentations with immobilized acetic acid bacteria. Appl. Microbiol Biotechnol. 35 : 648-651.

Klement, J. T. and Cassens, R. G. 1974. The effect of Bacterial fermentation on protein solubility in a sausage model system. J. Food Sci. 39 : 833-941.

Krol, B. and Tinbergen, B. J. 1974. Proceedings of the International symposium on Agricultural Publishing and Documentation Netherland.

Marvin, L.S. 1984. Compendium of method for the microbiological examination of foods. 2nd ed. Washington D.C. : American Public Health Association, Inc.

Melville, S. B., Michel, T. A., and Macy, J. M. 1988. Pathway and sites for energy conservation in the metabolism of glucose by Selenomonas ruminantium. J. Bacteriol. 170 : 5298-5304.

Metzler, D. E. 1977. Biochemistry : The chemical reaction of living cells. New York : Academic press.

Montville, T. J., Meyer, M. E., and Hsu, A. H. M. 1987. Influence of carbon substrates on lactic acid, cell mass and diacetyl-acetoin production in *Lactobacillus plantarum*. J. Food Prot. 50 : 42-46.

Nes, I. F. and Skjelkvalve, R. 1982. Effect of natural spices and oleoresins on *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of dry sausage. J. Food Sci. 47 : 1618-1622.

Nes, I. F. and Sorheim, O. 1984. Effect of infection of a Bacteriophage in a starter culture during the production of Salami Dry sausage ; A Model study. J. Food Sci. 49 : 337-340.

Nurmi, E. 1966. Effect of bacterial inoculations on characteristic and microbial flora of dry sausage. Ph.D. Thesis, University of Welsinki. Finland. Acta Agradia Finnica No. 108.

Oldfield, S. 1984. Meat processing manufacting meats. Dept. of Biotechnology. Massey University.

Pederson, C. S. 1971. Microbiology of Food Fermentations. Westport, Connecticut : AVI Publishing Co.

Pederson, C. S. 1979. Microbiology of Food Fermentations. 2 nd ed. AVI Publishing Co., Westport C.T. p. 133.

Price, J. F. and Schweigert, B. S. 1971. The Science of Meat and Meat products. San Francisco : W.H. Freeman and Company.

Price, J. F. and Schweigert, B. S. 1973. The Science of Meat products. Vol 2. San Francisco : W.H. Freeman and Company.

Raccach, M. 1981. Control of *Staphylococcus aureus* in dry sausage by a newly developed meat starter culture and phenolic-type antioxidants. J. Food Prot. 44 : 665-669.

Raccach, M. and Baker, R. C. 1978. Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factors in cooked, mechanically deboned poultry meat. J. Food Prot. 41(9) : 703-705.

Rogosa, M., and Sharpe, M. E. 1959. An approach to the classification of the lactobacilli. J. Appl Bacteriol. 22 : 329-340.

Salzer, U. J., Broeker, U., Klie, H. F., and Liepe, H. U. 1977. Effect of pepper and pepper constituents on the microflora of sausage products. Fleischwirtschaft. 57 : 2011.

Savic, I. V. 1985. Small-scale sausage production. Food and Agriculture organization of the United Nations. Rome.

sharpe, M. E., and Fryer, T. F. 1966. Idemtification methods or microbiologists Part A. London : Academic Press.

Skinner, F. A. 1979. Identification Method for Microbiologists. London : Academic Press.

Smith, J. L. and Palumbo, S. A. 1983. Microorganism as food additives. J. Food Prot. 44 : 936.

Smith, J. L. and Palumbo, S. A. 1983. Microbiology of Lebanon bologna. Appl. Microbiol. 26 : 489-496.

Smith, J. L. and Palumbo, S. A. 1983. Use of Starter cultures in Meats. J. Food. Prot. 46 : 36-40.

Spettoli, P., Bettocin, A., Nutti, M. P., and Zamorani, A. 1982. Immobilization of *Leuconostoc oenos* ML 34 in calcium alginate gels and its application to wine technology Am J. Enol Vitic. 33 : 1-5.

Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A. and Singleton, R.C. 1974. Sensory evaluation by quantitation descriptive analysis. Food Technol. 28 : 26-34.

Thornhill, P. J., and Cogan, T. M. 1984. Use of gas-liquid chromatography to determine the end products of growth of lactic acid bacteria. Applied Envi Microbiol. 47 : 1250-1254.

Tracey, R. P., and Britz, T. J. 1989. Freon 11 extraction of volatile Metabolites Formed by certain Lactic Acid Bacteria. Appl. and Environ Microbiol. 55 : 1617-1623.

Vignolo, G. M., Holgado, A. P. R., and Oliver, G. 1988. Acid production and proteolytic activity of Lactobacillus strain isolated from dry sausages. J. Food Prot. 51 : 481-484.

Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Hamphrey, A. E., and Lilly, M. D. 1979. Fermentation and enzyme technology. U.S.A. : John Willey and Sons Inc.

Wiriyacharee, P., Brocks, J. D., Earle, M. D., and Page, G. 1990. The improvement of a traditional Thai fermentation Technologies : Industrial Applications. (Ed. P. Yu), London : Elsevier Applied Science.

Wu, W. H., Rule, D. C., Busboom, J. R., Field, R. A., and Ray, B. 1991. Starter culture and time/temperature of storage influences on quality of fermented mutton sausage. J. Food Sci. 56 : 916-925.

Zaika, L. L., and Kissinger, J. C. 1979. Effect of some spices on acid production by starter cultures. J. Food Prot. 42 : 572-576.

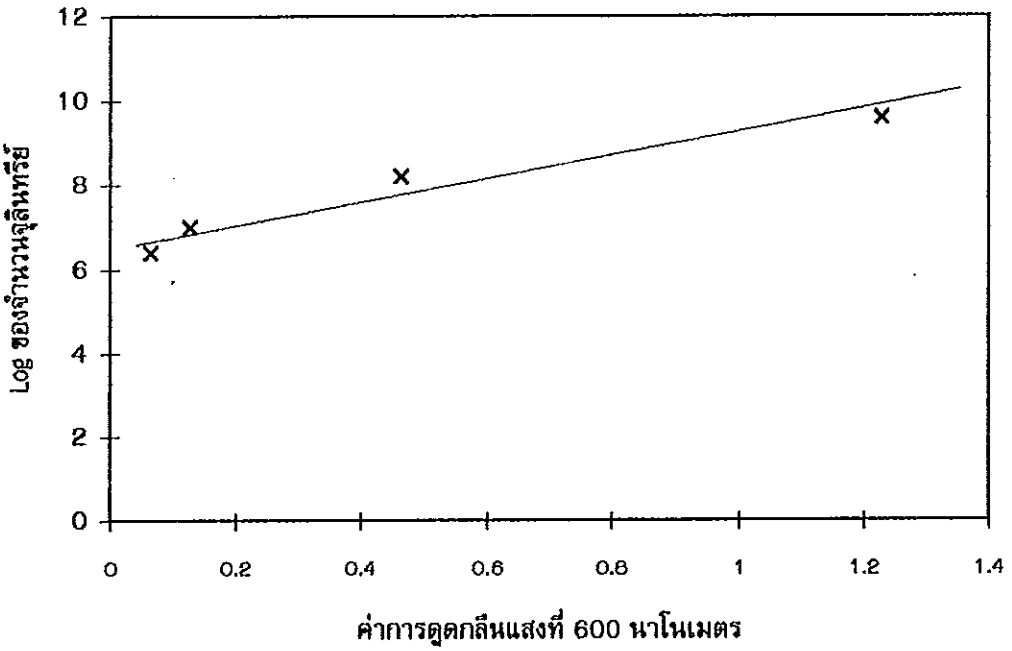
Zaika, L. L., and Kissinger, J. C. 1984. Fermentation enhancement by spices : identification of active component. J. Food Sci. 49 : 5-9.

Zaika, L. L., Zell, T. E., Smith, J. L., Palumbo, S. A. and Kissinger, J. C. 1976. The role of nitrite and nitrate in Lebanon bologna, a fermented sausage. J. Food Sci. 41 : 1457-1460.

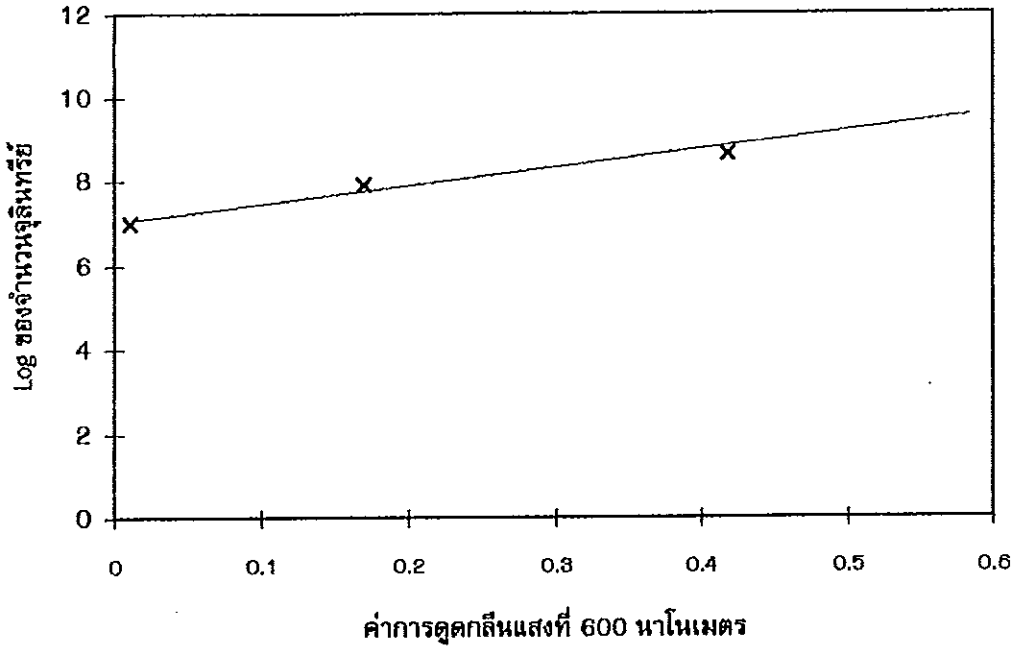
Zaika, L. L., Zell, T. E., Smith, J. L., Palumbo, S. A. and Kissinger, J. C. 1978. Effect of spices and salt on fermentation of Lebanon bologna-type sausage. J. Food Sci. 43 : 186-193.

ภาคผนวก

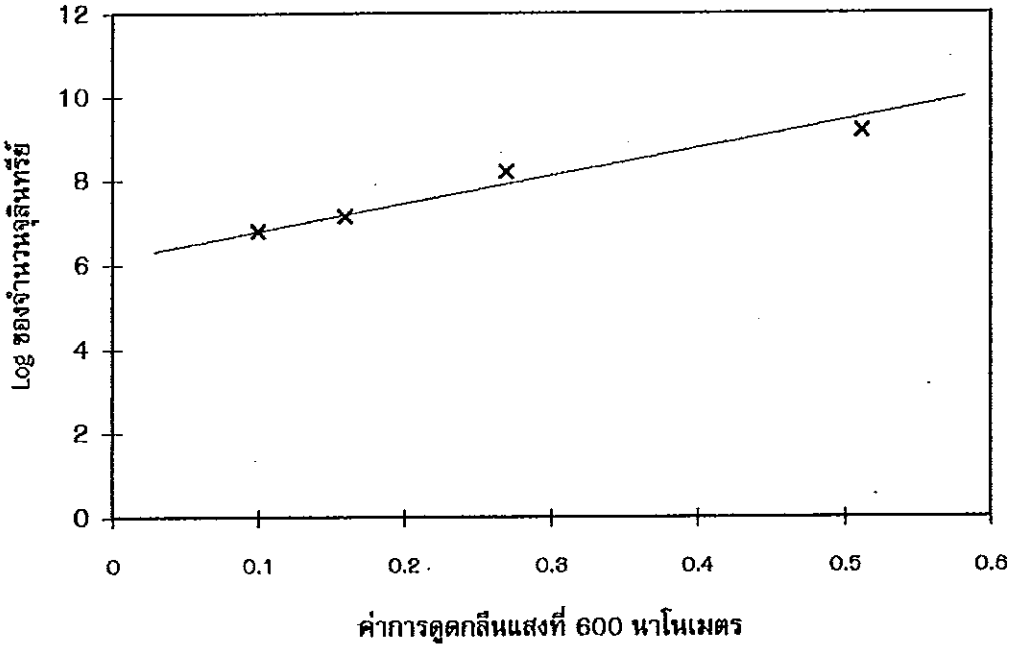
ภาคผนวก ก



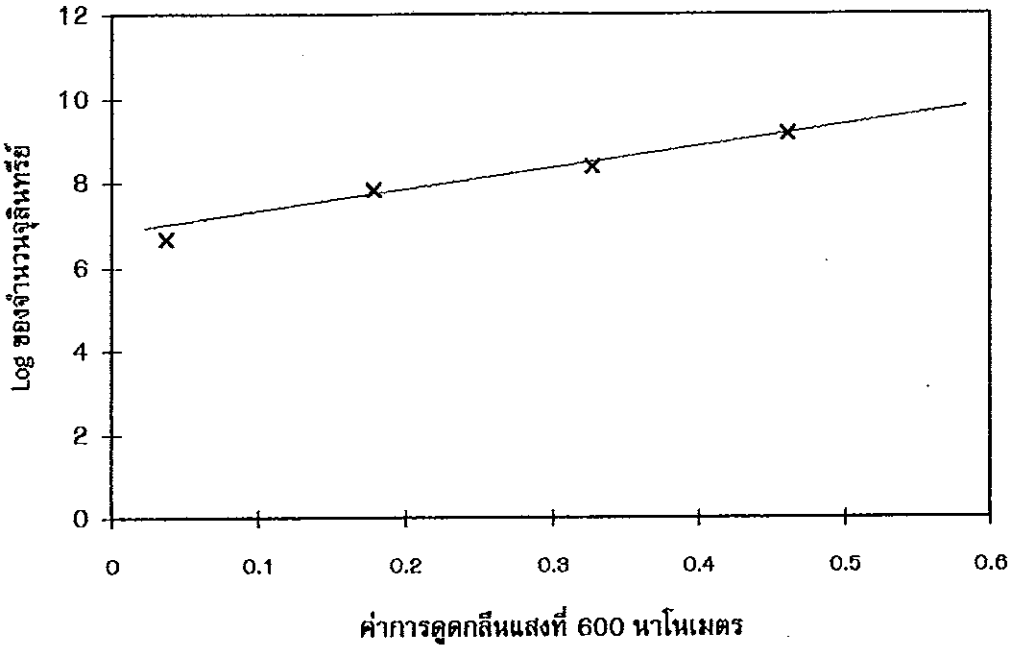
ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique



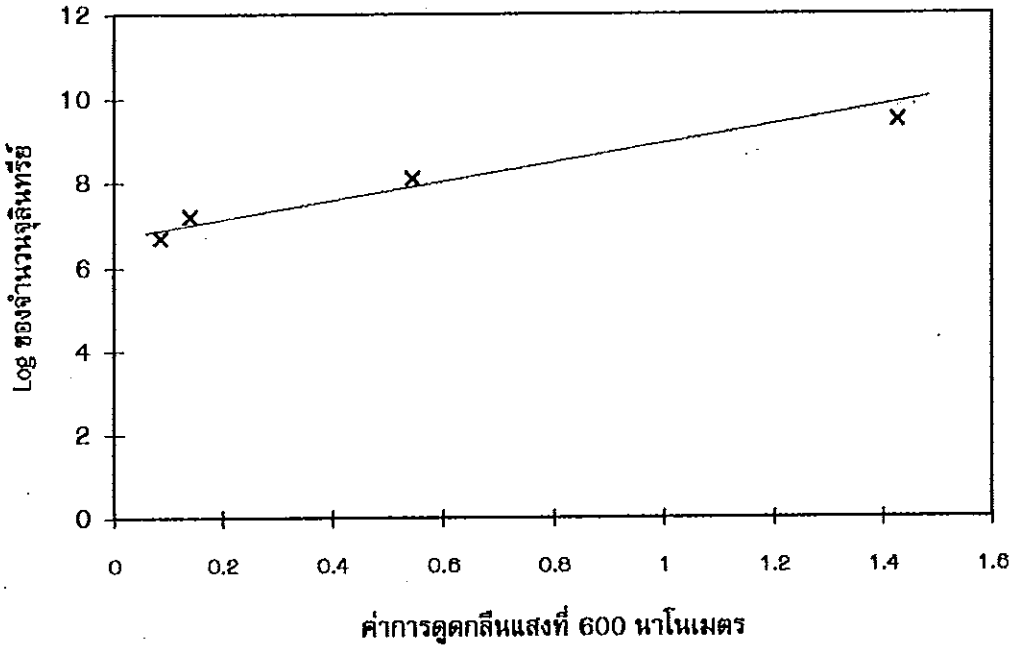
ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus fermentum* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique



ภาพภาคผนวก ก3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Lactobacillus brevis* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique



ภาพภาคผนวก ก4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. dextranicum ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique



ภาพภาคผนวก ก5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และ Log ของจำนวนเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่ได้จากวิธี Standard plate count technique

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข1 ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
0	Treatment	15	0.01	0.00	< 1
	Error	16	0.28	0.02	
	Total	31	0.29		
12	Treatment	15	0.42	0.03	3.89 **
	Error	16	0.11	0.01	
	Total	31	0.52		
24	Treatment	15	1.19	0.08	19.56 **
	Error	16	0.06	0.00	
	Total	31	1.26		
36	Treatment	15	1.00	0.07	9.83 **
	Error	16	0.11	0.01	
	Total	31	1.10		
48	Treatment	15	0.88	0.06	15.41 **
	Error	16	0.06	0.00	
	Total	31	0.94		

ตารางภาคผนวก ข1 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
60	Treatment	15	0.84	0.01	10.64 **
	Error	16	0.08	0.01	
	Total	31	0.93		
72	Treatment	15	0.78	0.05	13.10 **
	Error	16	0.06	0.00	
	Total	31	0.84		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ตารางภาคผนวก ข2 ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
0	Treatment	15	0.00	0.00	< 1
	Error	16	0.05	0.00	
	Total	31	0.05		
12	Treatment	15	0.16	0.01	< 1
	Error	16	0.39	0.02	
	Total	31	0.55		
24	Treatment	15	0.10	0.01	< 1
	Error	16	0.13	0.01	
	Total	31	0.22		
36	Treatment	15	0.11	0.01	1.39 ns
	Error	16	0.08	0.01	
	Total	31	0.19		
48	Treatment	15	0.32	0.02	1.21 ns
	Error	16	0.28	0.02	
	Total	31	0.59		

ตารางภาคผนวก ข2 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
60	Treatment	15	0.23	0.02	< 1
	Error	16	0.40	0.03	
	Total	31	0.63		
72	Treatment	15	0.28	0.02	1.02 ns
	Error	16	0.29	0.02	
	Total	31	0.58		

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางภาคผนวก ข3 ความแปรปรวนของกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกของไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

SV	df	SS	MS	F
Treatment	15	0.04	0.00	64535.30 **
Error	16	0.00	0.00	
Total	31	0.04		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ตารางภาคผนวก ข4 ความแปรปรวนของคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียว

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
ความแน่นแข็ง	Treatment	15	1832.60	122.17	1.43 ns
	Blk adj-Eb	15	10794.00	719.61	
	Intra Block-Ee	65	4308.30	66.28	
	Adj Tr. Total	15	1589.00	105.93	
	Total	95	16935		
การยึดเกาะ	Treatment	15	3021.90	201.46	2.46 *
	Blk adj-Eb	15	10633.00	708.90	
	Intra Block-Ee	65	3869.90	59.538	
	Adj Tr. Total	15	2445.1	163.01	
	Total	95	17525.00		
ความฉ่ำ	Treatment	15	1405.3	93.688	< 1
	Blk adj-Eb	15	6340.90	422.72	
	Intra Block-Ee	65	6087.00	93.65	
	Adj Tr. Total	15	1339.60	89.31	
	Total	95	13833		
รสหวาน	Treatment	15	825.16	55.01	1.23 ns
	Blk adj-Eb	15	7406.2	493.74	
	Intra Block-Ee	65	2066.40	31.79	
	Adj Tr. Total	15	652.74	43.52	
	Total	95	10297.00		

ตารางภาคผนวก ข4 (ต่อ)

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
รสเค็ม	Treatment	15	934.72	62.32	1.43 ns
	Blk adj-Eb	15	4757.30	317.15	
	Intra Block-Ee	65	3491.50	53.72	
	Adj Tr. Total	15	1017.00	67.80	
	Total	95	9183.60		
รสขม	Treatment	15	784.20	52.28	< 1
	Blk adj-Eb	15	5569.30	371.28	
	Intra Block-Ee	65	1352.90	20.81	
	Adj Tr. Total	15	175.89	11.73	
	Total	95	7706.40		
รสเปรี้ยว	Treatment	15	1130.80	75.39	< 1
	Blk adj-Eb	15	7370.1	491.34	
	Intra Block-Ee	65	4510.20	69.39	
	Adj Tr. Total	15	725.15	48.34	
	Total	95	13011.00		
กลิ่นออกซิไดซ์	Treatment	15	1298.90	86.59	< 1
	Blk adj-Eb	15	8297.10	553.14	
	Intra Block-Ee	65	3673.50	56.52	
	Adj Tr. Total	15	383.68	25.58	
	Total	95	13269.00		

ตารางภาคผนวก ข4 (ต่อ)

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
กลิ่นไส้กรอก	Treatment	15	2583.20	172.21	< 1
	Blk adj-Eb	15	10064.00	670.95	
	Intra Block-Ee	65	7680.50	118.16	
	Adj Tr. Total	15	1678.10	111.87	
	Total	95	20328.00		
การยอมรับรวม	Treatment	15	2546.60	169.77	< 1
	Blk adj-Eb	15	7348.20	489.88	
	Intra Block-Ee	65	7262.00	111.72	
	Adj Tr. Total	15	1607.30	107.15	
	Total	95	17156.00		

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางภาคผนวก ช5 ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
0	Treatment	15	0.01	0.00	2.07 ns
	Error	16	0.00	0.00	
	Total	31	0.01		
12	Treatment	15	0.22	0.04	31.26 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.23		
24	Treatment	15	0.34	0.07	62.35 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.35		
36	Treatment	15	0.28	0.06	63.83 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.29		
48	Treatment	15	0.32	0.06	47.51 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.33		

ตารางภาคผนวก ช5 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
60	Treatment	15	0.35	0.07	46.31 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.36		
72	Treatment	15	0.29	0.06	60.96 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.29		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางภาคผนวก ข6 ความแปรปรวนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกระหว่างการหมักไส้กรอกด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
0	Treatment	15	0.01	0.00	1.60 ns
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.02		
12	Treatment	15	0.06	0.01	25.59 **
	Error	16	0.00	0.00	
	Total	31	0.06		
24	Treatment	15	0.09	0.02	212.90 **
	Error	16	0.00	0.00	
	Total	31	0.10		
36	Treatment	15	0.05	0.01	5.20 *
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.07		
48	Treatment	15	0.04	0.01	1.60 ns
	Error	16	0.03	0.00	
	Total	31	0.07		

ตารางภาคผนวก ข6 (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	SV	df	SS	MS	F
60	Treatment	15	0.04	0.01	9.74 **
	Error	16	0.01	0.00	
	Total	31	0.05		
72	Treatment	15	0.04	0.01	74.33 **
	Error	16	0.00	0.00	
	Total	31	0.04		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางภาคผนวก ข7 ความแปรปรวนของกรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติกของไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์

SV	df	SS	MS	F
Treatment	5	0.00	0.00	4.35 ^{ns}
Error	6	0.00	0.00	
Total	11	0.00		

^{ns} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางภาคผนวก ข8 ความแปรปรวนของคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักด้วยจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
ความแน่นแข็ง	Block	14	5586.91	399.07	2.47 **
	Treatment	11	3766.33	342.39	2.12 *
	Replication (R)	1	1130.00	1130.00	6.98 **
	Product (P)	5	2343.56	468.71	2.90 *
	P X T	5	292.76	58.55	< 1
	Error	154	24921.09	161.83	
	Total	179	34274.33		
การยึดเกาะ	Block	14	7332.44	523.75	2.72 **
	Treatment	11	1063.44	96.68	< 1
	Replication (R)	1	32.09	32.09	< 1
	Product (P)	5	506.58	101.32	< 1
	P X T	5	524.78	104.96	< 1
	Error	154	29634.89	192.43	
	Total	179	38030.78		
ความฉ่ำ	Block	14	18207.70	1300.55	5.06 **
	Treatment	11	1221.67	111.06	< 1
	Replication (R)	1	153.09	153.09	< 1
	Product (P)	5	301.40	60.28	< 1
	P X T	5	767.18	153.45	< 1
	Error	154	39574.83	256.98	
	Total	179	59004.20		

ตารางภาคผนวก ช8 (ต่อ)

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
รสหวาน	Block	14	18913.74	1350.98	7.44 **
	Treatment	11	1505.51	136.86	< 1
	Replication (R)	1	1258.76	1258.76	6.94 **
	Product (P)	5	192.98	38.60	< 1
	P X T	5	53.78	10.76	< 1
	Error	154	27950.66	181.50	< 1
	Total	179	48369.91		
รสเค็ม	Block	14	13095.91	935.42	3.15 **
	Treatment	11	703.79	63.98	< 1
	Replication (R)	1	136.94	136.94	< 1
	Product (P)	5	356.76	71.35	< 1
	P X T	5	210.09	42.02	< 1
	Error	154	45751.29	297.09	
	Total	179	59550.99		
รสขม	Block	14	4840.50	345.75	9.70 **
	Treatment	11	330.87	30.08	< 1
	Replication (R)	1	245.00	245.00	6.88 **
	Product (P)	5	67.40	13.48	< 1
	P X T	5	18.47	3.69	< 1
	Error	154	5487.63	35.63	
	Total	179	10659.00		

ตารางภาคผนวก ข8 (ต่อ)

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
รสเปรี้ยว	Block	14	5179.53	369.97	2.58 **
	Treatment	11	1401.08	127.37	< 1
	Replication (R)	1	58.94	58.94	< 1
	Product (P)	5	990.45	198.09	1.38 ns
	P X T	5	351.69	70.34	< 1
	Error	154	22082.33	143.39	
	Total	179	28662.33		
กลิ่นออกซิไดซ์	Block	14	12866.48	919.03	6.16 **
	Treatment	11	615.38	55.94	< 1
	Replication (R)	1	226.69	226.69	1.52 ns
	Product (P)	5	219.58	43.92	< 1
	P X T	5	169.11	33.82	< 1
	Error	154	22972.46	149.17	
	Total	179	36454.31		
กลิ่นไส้กรอก	Block	14	5553.91	396.71	1.23 ns
	Treatment	11	653.18	59.38	< 1
	Replication (R)	1	17.42	17.42	< 1
	Product (P)	5	404.71	80.94	< 1
	P X T	5	231.04	46.21	< 1
	Error	154	49800.49	323.38	
	Total	179	56007.58		

ตารางภาคผนวก ข8 (ต่อ)

คุณลักษณะ	SV	df	SS	MS	F
การยอมรับรวม	Block	14	7904.911	564.64	3.01 **
	Treatment	11	1069.79	97.25	< 1
	Replication (R)	1	56.67	56.67	< 1
	Product (P)	5	187.56	37.51	< 1
	P X T	5	825.56	165.11	< 1
	Error	154	28932.96	187.88	
	Total	179	37907.66		

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

* แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ภาคผนวก ค 1

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกหมักในอุดมคติ

ชื่อ.....

วันที่.....เวลา.....

กรุณาประเมินตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก โดยบ้วนปากด้วยน้ำที่จัดให้และชิมตัวอย่างเพื่อประเมินลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture) และประเมินกลิ่นรส (Flavor) ให้คะแนนโดยขีดเส้นตั้งฉากกับเส้นแนวนอนตามคุณภาพของไส้กรอกที่ท่านต้องการ (Ideal)

ขอบคุณ

<u>เนื้อสัมผัส</u> (Texture)

ความแน่นแข็ง (Firmness)

น้อย ——— มาก

การยึดเกาะ (Cohesiveness)

น้อย ——— มาก

ความฉ่ำ (Juiciness)

น้อย ——— มาก

<u>รสชาติ</u> (Flavor)

รสหวาน (Sweet)

น้อย ——— มาก

รสเค็ม (Salty)

น้อย ——— มาก

รสขม (Bitter)

น้อย ——— มาก

รสเปรี้ยว (Sour)

น้อย ——— มาก

<u>กลิ่น</u> (Aroma)

กลิ่นยอกซิไดซ์

น้อย ——— มาก

กลิ่นไส้กรอก

(Sausage flavor) undesirable ——— desirable

การยอมรับรวม

(Overall acceptability) น้อย ——— มาก

ภาคผนวก ค 2

แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชื่อ.....

วันที่.....เวลา.....

รหัสตัวอย่าง.....

กรุณาประเมินตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก โดยบ้วนปากด้วยน้ำที่จัดให้และชิมตัวอย่างเพื่อประเมินลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture) และประเมินกลิ่นรส (Flavor) ให้คะแนนโดยขีดเส้นตั้งฉากกับเส้นแนวนอนตามที่ท่านเห็นว่าเหมาะสม

ขอบคุณ

<u>เนื้อสัมผัส</u> (Texture)

ความแน่นแข็ง (Firmness)

น้อย ——— มาก

การยึดเกาะ (Cohesiveness)

น้อย ——— มาก

ความฉ่ำ (Juiciness)

น้อย ——— มาก

<u>รสชาติ</u> (Flavor)

รสหวาน (Sweet)

น้อย ——— มาก

รสเค็ม (Salty)

น้อย ——— มาก

รสขม (Bitter)

น้อย ——— มาก

รสเปรี้ยว (Sour)

น้อย ——— มาก

<u>กลิ่น</u> (Aroma)

กลิ่นออกซิไดซ์

น้อย ——— มาก

กลิ่นไส้กรอก

(Sausage flavor) undesirable ——— desirable

การยอมรับรวม

(Overall acceptability) น้อย ——— มาก

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Plate count agar (Difco Laboratory, 1984)

ประกอบด้วย

ทริปโตน	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด	2.5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	1.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Nutrient agar (Difco Laboratory, 1984)

ประกอบด้วย

เนื้อสกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 MRS agar (Rogosa and Sharpe, 1959)

ประกอบด้วย

K_2HPO_4	2.00	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
$CH_3COONa.3H_2O$	5.00	กรัม
$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	2.00	กรัม
เปปโตน	10.00	กรัม
ยีสต์สกัด	4.00	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โตรส	20.00	กรัม
ผงวุ้น	17.00	กรัม

วิธีการ

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น เติม Bromcresol purple ร้อยละ 1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. วิธีการทดสอบและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 การย้อมแกรม

สารเคมี

1. คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)

ชั่งผงคริสตัลไวโอเลต 2 กรัม ละลายในเอทธานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ละลายสารผสมให้เข้ากัน แล้วเติม สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตร้อยละ 1 ลงไป 80 มิลลิลิตร

2. สารละลายไอโอดีน (iodine)

ชั่งผงไอโอดีน 1 กรัม โปตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายซาฟรานีน (safranin)

สารละลายซาฟรานีน 10 มิลลิลิตร (ซึ่งเตรียมโดยชั่งซาฟรานีน 2.5 กรัม ในเอทธานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. เอทธานอลร้อยละ 95

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ปล่อยให้แห้งและยึดเชื้อด้วยเปลวไฟ

2. หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ 2-3 วินาที แล้วเทน้ำออกให้หมด

3. หยดสารละลายไอโอดีน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ

4. หยดเอทธานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อล้างสีน้ำเงินออกจนสีจางเกือบหมด แล้วล้างออกด้วยน้ำ

5. หยดสารละลายซาฟรานีน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 การย้อมสปอร์

สารเคมี

1. มาลาไครท์กรีนร้อยละ 5 (malachite green)

ชั่งมาลาไครท์กรีน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายเก็บในขวดสีชา

2. สารละลายซาฟรานีน (safranin)

สารละลายซาฟรานีน 10 มิลลิลิตร (ซึ่งเตรียมโดยชั่งซาฟรานีน 2.5 กรัม ในเอทธานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. เอทธานอลร้อยละ 95

วิธีการ

1. เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ไม่ต้องยึดด้วยความร้อน

2. หยดสารละลายมาลาไครท์กรีนร้อยละ 5 ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ

3. นำสไลด์วางเหนือน้ำเดือด 10 นาที คอยเติมสารละลายมาลาไครท์กรีน เพื่อไม่ให้สารละลายบนสไลด์แห้ง

4. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด แล้วล้างด้วยเอทธานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 15 วินาที

5. ล้างออกด้วยน้ำสะอาด หยดสารละลายซาฟรานีน 30 วินาที

6. ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด ทำให้สไลด์แห้ง นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตัว เซลล์จะติดสีแดงของซาฟรานีน สปอร์จะติดสีเขียวของมาลาไครท์กรีน

2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) (Faddin, 1976)

สารเคมี

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น

วิธีการ

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นสดงว่าเป็นผลบวก มีเอนไซม์คะตาเลส

2.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) (Faddin, 1976)

สารเคมี

Tetramethyl-p-phenyl diamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาทีก่อนใช้ เก็บรักษาไว้ในขวดหุ้มฟอยล์เพื่อให้ไม่ถูกแสง และเก็บในตู้เย็น

วิธีการ

หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenyl diamine dihydrochloride เข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงบนกระดาษ Whatman เบอร์ 1 ใช้ loop เขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar ที่ต้องการทดสอบ ขีดไปบนกระดาษกรองเป็นเส้นยาว 1 เซนติเมตร สังเกตุการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาที ถ้าเกิดสีม่วงตามแนวขีดแสดงว่ามีผลเป็นบวก แบคทีเรียที่ทดสอบมีเอนไซม์ออกซิเดส

2.5 การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Faddin, 1976)

สารเคมี

อาหาร nitrate broth medium ประกอบด้วย

ทริปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรท	1.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 บรรจุในหลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>solution A</u>

sulfanilic acid	0.8	กรัม
SN acetic acid	100.0	มิลลิลิตร

<u>solution B</u>

Alpha naphthylamine	0.5	กรัม
SN acetic acid	100.0	มิลลิลิตร

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไนเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง นำมาทดสอบการรีดิวส์ไนเตรทโดยการนำ culture มาหยดด้วย sulphanilic acid และ alpha napthylamine อย่างละ 2-3 หยด ในปริมาณที่เท่ากัน ถ้า culture เปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดสีแดงนำมาทดสอบต่อโดยเติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้สักครู่ ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าสังกะสีเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ซึ่งไนไตรท์ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ sulphanilic acid ได้สีแดง แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ จึงเติมสังกะสีเพื่อทำปฏิกิริยานี้ ได้ผลเป็นลบ แต่ถ้าเติมสังกะสีแล้วไม่มีสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์ และไนไตรท์ถูกรีดิวส์เป็นแก๊สไนโตรเจนหมดแล้ว นั่นคือ แบคทีเรียสามารถรีดิวส์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ ให้ผลเป็นบวก

2.6 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Difco Laboratory, 1984)

สารเคมี

อาหาร motile test medium ประกอบด้วย

ทริปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
ผงวุ้น	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปต้มให้เดือด บรรจุในหลอด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร motile test medium โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-40 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้ จะมีรอยการเจริญจากรอยที่แทงไว้

2.7 การทดสอบออกซิเดชั่นและเฟอร์เมนเตชั่น (Faddin, 1976)

สารเคมี

อาหาร oxidative-fermentative medium (O-F medium) ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	10.0	กรัม
ทริปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
ผงวุ้น	3.0	กรัม
bromthymol blue 1.6 %	4.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นกลูโคสในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 เติม bromthymol blue เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วเติมกลูโคสลงไป จากนั้นบรรจุใส่หลอดทดสอบ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อแบบแทง ตลอดความลึกของหลอดอาหาร O-F จำนวน 2 หลอด หลอดแรกปิดทับด้วยพาราฟินเหลวปราศจากเชื้อหนา 2-3 เซนติเมตร เพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพไม่มีอากาศ ส่วนอีกหลอดไม่ปิดพาราฟินเหลว เพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพมีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลจนครบ 7 วัน จุลินทรีย์ที่เป็นเฟอร์เมนเตทีฟสามารถสร้างกรดซึ่งเกิดจากการหมักกลูโคสทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นออกซิเดทีฟ การสร้างกรดจะเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น

2.8 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Gibson and Abd-el-Malek, 1945)

สารเคมี

อาหาร Gibson' s semi-solid tomato juice medium ประกอบด้วย

Nutrient agar	200.0	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	2.5	กรัม

น้ำตาลกลูโคส	50.0	กรัม
น้ำมะเขือเทศ	100.0	มิลลิลิตร
นมผงคืนรูป	800.0	มิลลิลิตร

นำน้ำมะเขือเทศผสมกับนม เติมยีสต์สกัดและน้ำตาลกลูโคส นำไปต้มให้เดือดและเติม nutrient agar ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ด้วยกรดเกลือร้อยละ 10 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อ

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบ Gibson' s semi-solid tomato juice medium โดยวิธีแทง เทวุ้นเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไปปิดผิวหน้าให้หนาประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันเป็นเวลา 7 วัน แบคทีเรียที่หมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟจะสร้างแก๊สและดันวุ้นที่ปิดทับผิวหน้าขึ้นมา ส่วนพวกที่หมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ วุ้นจะมีลักษณะปกติ

2.9 ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด

สารเคมี

อาหารเหลว MRS แต่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส ใช้น้ำตาลที่ต้องการทดสอบคือ น้ำตาลอะราไบโนส ไซโลส เมลลิไบโอส แรฟฟิโนส แรมโนส เมลลิไซโตส ซอบิทอล แล็กโทส เซลโลไบโอส มอลโตส และซูโครส ในปริมาณร้อยละ 1 ในอาหาร MRS

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดที่ต้องการทดสอบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

2.10 การสร้างเดกซ์แตรน (Garvie, 1960)

สารเคมี

อาหาร sucrose agar ประกอบด้วย		
K_2HPO_4	5.0	กรัม
Triammonium citrate	5.0	กรัม
ทริปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
น้ำตาลซูโครส	50.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหาร sucrose agar โดยวิธีแทง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-14 วัน ผลบวกแสดงโดยเชื้อที่เจริญขึ้นมาจะสร้างเมือกบนอาหารทดสอบ

2.11 การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สารเคมี

อาหาร standard plate count agar	1000	มิลลิลิตร
นมผง (casein)	10	กรัม

ละลายนมผงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และฆ่าเชื้ออาหาร standard plate count agar ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

ผสมสารละลายนมผงที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร standard plate count agar ที่หลอมเหลว เขย่าให้เข้ากันเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ชีดเชื้อให้เป็นรอยเจริญบนจานอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะย่อย casein เห็นเป็นบริเวณใส

2.12 การเจริญใน 10% เอทธานอล

สารเคมี

อาหาร nutrient broth	100	มิลลิลิตร
เอทธานอล	10	มิลลิลิตร

ผสมเอทธานอลลงในอาหารเหลว nutrient เติม bromcresol purple ร้อยละ 1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว nutrient ที่มีเอทธานอลร้อยละ 10 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

2.13 การเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2, 7.5 และ 8.5

สารเคมี

อาหารเหลว MRS	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.2, 7.5 และ 8.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สังเกตุการเจริญของเชื้อจากความขุ่นข้างหลอด

2.14 การเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส

สารเคมี

อาหารเหลว MRS	100	มิลลิลิตร

เติม bromcresol purple ร้อยละ 1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ใน water bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

2.15 การเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl ร้อยละ 4, 6.5, 7.5 และ 18

สารเคมี

อาหารเหลว MRS	100	มิลลิลิตร
เกลือ NaCl	4, 6.5, 7.5 หรือ 18	กรัม

เติม bromcresol purple ร้อยละ 1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือ NaCl ในปริมาณร้อยละ 4, 6.5, 7.5 หรือ 18 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

ภาคผนวก จ

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น pH 7 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2. วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นอินดิเคเตอร์

2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด

3. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.)} \times N \times 90.09 \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000}$$

3. การวิเคราะห์กรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติก โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์

2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในขวดกลั่น จากนั้นทำการกลั่นด้วยไอน้ำ

2. เก็บส่วนที่กลั่นได้ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ประมาณ 250 มล.

3. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด

4. ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน 0.01 นอร์มอลจนได้จุดยุติเป็นสีชมพู

การคำนวณ

1 มิลลิลิตรของ 0.01 นอร์มอลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ = 0.006 กรัมอะซิติก

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1. ชั่งโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลต ($KHC_8H_4O_4$) (อบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.8 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอเนตปริมาณ 25 มิลลิลิตร

3. ไตเตรตด้วยสารละลายด่าง โดยมีฟีนอฟทาลีนเป็นสารแสดงจุดยุติ

การคำนวณ

ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

$$= \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลต (กรัม)}}{\text{ปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร) X 0.2042}}$$

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

1. ชั่งโซเดียมเตตราบอเรต ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.4-0.5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร เติมเมธิลเรด

3. ไตเตรตด้วยสารละลายกรด สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

$$= \frac{\text{น้ำหนักโซเดียมเทตราบอเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร) X 0.2042}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เวลา 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในเดซิกเคเตอร์ จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักนำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เวลา 4-5 ชั่วโมง

4. นำออกจากตู้อบใส่ในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างจากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบและทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เตาเผารอประมาณ 30 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงแล้วนำออกจากเตาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำในข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งตัวอย่างกลายเป็นเถ้าสีขาวหรือสีเทาอ่อน

4. นำออกจากเตาเผาใส่ในเดซิกเคเตอร์ ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักแล้วนำกลับไปเผาอีกประมาณ 30 นาที ทำซ้ำเช่นเดิมจนได้น้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนเผาและหลังเผา X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}}$$

6. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธีของ A.O.A.C. (1990)

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มล. ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักให้ทราบแน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างเป็นชนิดที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดใส่ตัวอย่าง ใส่ลงในซอคเลต

4. เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 150 มล. ลงในขวดทาไขมันแล้ววางบนเตา

5. ประกอบชุดสกัดไขมัน (ซอคเลตและเครื่องควบแน่น) พร้อมเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน

6. สกัดไขมันประมาณ 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อควบแน่น 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย

8. อบขวดหาไขมันในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที

9. นำออกจากตู้อบใส่ในเดซิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักและอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักขวดรวมไขมัน-น้ำหนักขวด X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล A.O.A.C. (1990)

สารเคมี

1. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4)

2. เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$)

- ละลายผงเมอร์คิวรีออกไซด์จำนวน 10 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 12 มล. แล้วเติมน้ำ 92 มล.

3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และโซเดียมไธโอซัลเฟต 5 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

5. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ละลายกรดบอริก 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล

7. อินดิเคเตอร์ ใช้ fashiro indicator เตรียมเป็น stock solution (ชั่งเมทธิลีนบลู 0.2 มิลลิกรัม ละลายในเอทธานอล 200 มิลลิลิตร และชั่งเมทธิลเรด 0.05 กรัม ละลายในเอทธานอล 50 มิลลิลิตร) เวลาใช้ผสมในอัตราส่วน stock solution 1 ส่วน : เอทธานอล 1 ส่วน : น้ำกลั่น 2 ส่วน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นนอนประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. เติมโซเดียมซัลเฟต 2 กรัม และเมอร์คิวรีซัลเฟต 5 มล.

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล.

4. ใส่ลูกแก้ว

5. ย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อน จนกระทั่งได้สารละลายใส

6. ปล่อยทิ้งให้เย็น

7. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว

8. ให้ความร้อนต่อจนกระทั่งหมดควัน

9. ทิ้งให้เย็น แล้วถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

10. จัดอุปกรณ์กลั่นรวมทั้งเปิดสวิทช์ไฟ และเปิดน้ำกลั่นเย็นเครื่องควบแน่น

11. นำขวดขนาด 100 มล. ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 5 มล. ผสมน้ำกลั่น 5 มล. และเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

12. เติมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 10 มล. ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

13. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 60/โซเดียมไธโอซัลเฟต ปริมาณ 10 มล. ลงในช่องใส่ตัวอย่าง

14. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

15. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 6.25}{W}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรริกที่ใช้ในการไตเตรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรริกที่ใช้ในการไตเตรตกับ blank

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์

วัน เดือน ปีเกิด 7 พฤศจิกายน 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า	
สาขาสัตวศาสตร์	เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	2535

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์