คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ Streptococcus suis ในผลิตภัณฑ์แหนม

สิริพงษ์ พงษศิริ

ห้องศึกษาคณะเกษตรศาสตร์ฯ
วันลงทะเบียน 30 มี.ค. 2554
เลขทะเบียน i5526796
เลขเรียกหนังสือ IS ศก.
ส731 ก
2554
ค.1

การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
พฤษภาคม 2554
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

อาจารย์ที่ปรึกษาและหัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ได้พิจารณาการศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง เรื่อง "การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus suis* ในผลิตภัณฑ์แหนม" เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กงบังเกิด)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กงบังเกิด)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

พฤษภาคม 2554

ประกาศคุณูปการ

การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเองฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กงบังเกิด ที่ปรึกษาและคณะกรรมการทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง จนการศึกษาค้นคว้าด้วยตนเองสำเร็จสมบูรณ์ได้ คณะผู้ศึกษาค้นคว้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ จนทำให้การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่างที่อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่ และเครื่องมือต่างในการทำการศึกษาค้นคว้า

ขอขอบพระคุณพี่ๆที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนล่าง และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจ และคำปรึกษาตลอดการทำการศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตรทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ตลอดการทำการศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาค้นคว้าฉบับนี้ คณะผู้ศึกษาค้นคว้าขออุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน

สิริพงษ์ พงษศิริ

ชื่อเรื่อง	การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus suis* ในผลิตภัณฑ์แหนม
ผู้ศึกษาค้นคว้า	สิริพงษ์ พงษศิริ
ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กงบังเกิด
ประเภทสารนิพนธ์	การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2554
คำสำคัญ	*S. suis* กรดแลคติก พีเอช แหนม

บทคัดย่อ

ศึกษาการปรากฏของเชื้อ *Streptococcus suis* จากเนื้อหมูบด ในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ในระหว่างเดือนธันวาคม 2553 – มกราคม 2554 โดยทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมูบด จำนวน 30 ตัวอย่าง และตรวจหาเชื้อ *S. suis* โดยการ spread plate ลงบน selective medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีเชื้อ *S. suis* เจริญบนอาหารทุกตัวอย่างที่สุ่มมา การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับพีเอชต่างๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Brain Heart Infusion Broth ที่มีพีเอชระหว่าง 4.2-5.8 และ spread plate ลงบนอาหาร blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *S. suis* ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำกว่า 5.2 และการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ในผลิตภัณฑ์แหนม โดยทำการถ่ายเชื้อลงไปในเนื้อหมูบด ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/g วิเคราะห์ปริมาณ *S. suis* และแบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติกในระหว่างการหมัก พบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญทำให้ค่าพีเอชลดลง ปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้น และส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* และไม่พบเชื้อ *S. suis* หลังจากหมักเป็นเวลา 9 ชั่วโมง โดยแหนมมีค่าพีเอช 5.14 ปริมาณกรดแลกติกร้อยละ 0.19 และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก 7.96 Log cfu/g และหลังจากการหมักเป็นเวลา 27 ชั่วโมงพบว่ามีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 9.08 Log cfu/g ค่าพีเอช 4.42 และปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.43

Title	Study on survival of *Streptococcus suis* in fermented pork (Nham)
Authors	Siriphong Phongsasiri
Advisor	Associate Professor Dr. Teeraporn Kongbangkerd
Academic Paper	Independent Study M.S. in Food Science and Technology Naresuan University, 2011
Keywords	*S. suis*, Lactic acid, pH, fermented pork

ABSTRACT

The study on occurrence of *Streptococcus suis* in 30 minced pork samples in Amphur Mueang, Phitsanulok province (December 2010 – January 2011) was investigated using spread plate technique onto selective medium and incubated at 37°C in 5% CO_2. The result showed that there were no *S. suis* found during the period of study. The survival of *S. suis* CCUG 7984 in Brain Heart Infusion Broths with different pHs (between 4.2 – 5.8) was determined. The culture was spreaded onto blood agar and incubated at 37°C in 5% CO_2. It was found that *S. suis* could not grow in the broth with pH lower than 5.2. The survival of *S. suis* CCUG 7984 in fermented pork during fermentation was examined. The minced pork was inoculated with an initial *S. suis* of 10^6 cfu/g. The lactic acid bacteria and *S. suis* were monitored as well as pH values and lactic acid contents. It was found that the growth of lactic acid bacteria resulted in pH reduction and the increase of lactic acid content. After 9 hours of fermentation, *S. suis* was totally inhibited which the fermented pork contained 7.96 Log cfu/g of lactic acid bacteria and the pH and lactic acid content were 5.14 and 0.19%, respectively. After 27 hours of fermentation, it was found that lactic acid bacteria content was 9.08 Log cfu/g and the pH and lactic acid content were 4.42 and 0.43%, respectively.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	2
	ขอบเขตของงานวิจัย	2
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	3
	การก่อโรค	3
	สถานการณ์การระบาดในต่างประเทศ	4
	สถานการณ์การระบาดในประเทศไทย	5
	ผลิตภัณฑ์แหนม	6
	ส่วนผสมในการผลิตแหนม	9
	กรรมวิธีการหมักไส้กรอก	12
	การผลิตแหนม	13
	แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)	14
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	19
	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	19
	วิธีการดำเนินงาน	20
	ตอนที่ 1 การศึกษาการปรากฏของเชื้อ *Streptococcus suis* ในเนื้อหมูบด	20
	ตอนที่ 2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่างๆ	21
	ตอนที่ 3 การศึกษาการรอดชีวิตของ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในแหนม	22

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2-1	จำนวนตัวอย่างตัวอย่างแหนมหมูที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย.....	7
2-2	ค่าพีเอชของตัวอย่างแหนมหมูที่พบ Salmonellae และซีโรไทป์ที่พบ.....	8
ข-1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่ม Streptococci	45
ค-1	ปริมาณเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth ที่มีพีเอชต่างๆ.....	58
ค-2	ปริมาณเชื้อ *S. suis* แบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. suis* CCUG 7984.....	59
ค-3	ปริมาณเชื้อ *S. suis* แบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมเชื้อ *S. suis* CCUG 7984.....	59

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
4-1	ปริมาณ *S. suis* ในอาหาร Brain Heart Infusion broth ที่มีพีเอชต่างๆ (ระหว่าง 4.2-5.8) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์	25
4-2	ปริมาณ *S. suis* และแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมที่เติมและไม่เติม *S. suis* ระหว่างการหมักที่ 30±5 องศาเซลเซียส.....	27
4-3	ปริมาณเชื้อ *S. suis* ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม	29
ก-1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus suis* บนอาหาร selective medium (บ่มไว้ 2 วัน) ที่แยกได้จากแหนม ในกระบวนการหมักที่ 0 ชั่วโมง.....	41
ก-2	ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร selective medium (Rosendal ,1986) ที่แยกได้จากหมูบดในขั้นตอนการศึกษาการปรากฏของเชื้อ *Streptococcus suis*	41
ก-3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus suis* บนอาหาร Blood agar	42
ก-4	ลักษณะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar	42
ก-5	ผลของการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus suis*.....	43
ก-6	ลักษณะของแหนมที่กระบวนการหมัก 27 ชั่วโมง(ด้านซ้าย) และแหนมที่กระบวนการหมัก 0 ชั่วโมง.....	43

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

โรคหูดับเป็นชื่อที่ใช้เรียกโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Streptococcus suis* ในคนที่อาจทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบและสูญเสียการได้ยิน โดยทั่วไปคนสามารถติดเชื้อ *S. suis* ได้โดยการสัมผัสใกล้ชิดกับสุกรที่ติดเชื้อ (direct contact) โดยเชื้อ *S. suis* สามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านบาดแผล และการบริโภคเนื้อ เครื่องในหรือเลือดสุกรติดเชื้อที่ไม่สุก ซึ่งในประเทศไทยได้มีรายงานการเกิดโรคนี้ในผู้เลี้ยงสุกร และผู้ชำแหละสุกร แต่การระบาดส่วนใหญ่ล้วนเป็นผลมาจากการบริโภคเนื้อ เครื่องในหรือเลือด (ภาวิน และวรางคณา,2550)

วิธีที่จะลดอุบัติการณ์ของโรคในประชากรนั้นอาจทำได้ 3 วิธี คือ การทำลายแหล่งของเชื้อโรค ขัดขวางการติดต่อ และการเพิ่มภูมิต้านทานของประชากร การทำลายแหล่งของโรคในกรณีของโรคหูดับนี้อาจทำได้โดยการเลิกเลี้ยงสุกรแบบชาวบ้านหรือลดอุบัติการณ์ติดเชื้อ *S. suis* ในสุกร แต่ชุมชนที่ห่างไกล สุกรอาจเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่จำเป็น ดังนั้นจึงไม่อาจเลิกเลี้ยงได้ และสุกรในกลุ่มนี้มีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับสุกรที่บริโภคทั่วไปซึ่งมาจากการเลี้ยงในระบบอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ การลดอุบัติการณ์ในสุกรก็อาจไม่ส่งผลต่อการลดอุบัติการณ์ในคนมากนัก เนื่องจากเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคในคนอาจไม่ใช่ชนิดที่ก่อโรคในสุกร นอกจากนี้เชื้อที่สามารถก่อโรคอย่างรุนแรงในคนยังพบเป็นสัดส่วนที่ต่ำในสุกร และการเพิ่มภูมิต้านทานในคนโดยการทำวัคซีนนั้นเป็นวิธีที่ดีและมีประสิทธิภาพ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนและอาจไม่คุ้มค่าการพัฒนาเนื่องจากเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ต่ำ การป้องกันโรคหูดับในคนที่มีประสิทธิภาพอาจต้องใช้การป้องกันการติดต่อของเชื้อจากสุกรมาสู่คน โดยเฉพาะคนบางกลุ่มที่ชื่นชอบการบริโภคอาหารดิบ เช่น ลาบเลือด หลู้ ส้า แหนม เป็นต้น (ภาวิน และวรางคณา,2550) ซึ่งมีโอกาสได้รับเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคหูดับ เนื่องจากอาหารเหล่านี้ล้วนทำมาจากเนื้อสุกรเป็นหลัก จึงมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อ *S. suis* ที่ติดมาจากสุกร และปนเปื้อนในอาหาร

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* ในผลิตภัณฑ์แหนม เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาจากเนื้อหมูดิบ และผู้บริโภคอาจเกิดความเสี่ยงในการได้รับเชื้อชนิดนี้ได้

จากการรับประทานแหนมโดยที่ยังไม่ได้ทำให้สุกก่อน รวมทั้งสำรวจการปรากฏของเชื้อ *S. suis* ในจังหวัดพิษณุโลกเนื่องจากมีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อในบริเวณจังหวัดที่ใกล้เคียง แต่ยังไม่มีข้อมูลการปรากฏของเชื้อนี้ในจังหวัดพิษณุโลก

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. สำรวจเชื้อ *Sreptococcus suis* จากเนื้อหมูใน อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
2. ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชแตกต่างกัน
3. ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* ในผลิตภัณฑ์แหนม

ขอบเขตของงานวิจัย

สำรวจเชื้อ *Streptococcus suis* จากเนื้อหมูบดในตลาด อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก และเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองการรอดชีวิตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับพีเอชต่างๆและในผลิตภัณฑ์แหนม คือเชื้อ *Streptococcus suis* CCUG 7984

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Streptococcus suis เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร ถูกจัดอยู่ใน Lancefield กลุ่ม D, R หรือ S สามารถสร้างแคปซูลที่มีส่วนประกอบสาร polysaccharides ที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดง มีการจัดแบ่งเชื้อตามลักษณะของ Capsular Antigen เป็นซีโรไทป์ (Serotype) ต่างๆ ถึง 35 ซีโรไทป์ (ซีโรไทป์ 1-34 และซีโรไทป์ 1/2) โดยซีโรไทป์ 2 และ 1 เป็นชนิดที่พบก่อโรครุนแรงและบ่อยครั้งในสุกร และซีโรไทป์ 2 สามารถติดต่อสู่คนทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบและอาจเสียชีวิตได้ ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เชื้อก่อโรคได้รุนแรงเนื่องจากคุณสมบัติของแคปซูลที่อยู่รอบเซลล์เชื้อสามารถสร้างสาร muraminidase-released protein (MRP), extra cellular factor (EF) และ hemolysin (suilysin) (Chatellier *et al.*, 1999; Gottschalk and Segura., 2000) รวมทั้งโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ adhesins, proteolytic enzymes, bacteriocins และ fimbriae (Higgins *et al.*, 1995; Higgins and Gottschalk, 1999) ซึ่งทั้งหมดดังกล่าวเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อก่อโรครุนแรงได้

การก่อโรค

เชื้อ *Streptococcus suis* ระยะฟักตัวในสุกรประมาณ 24 ชั่วโมงถึง 2 สัปดาห์หรือมากกว่านั้น type 1 ก่อโรคส่วนใหญ่ในลูกสุกรอายุ 10-14 วัน ลูกสุกรติดเชื้อจากแม่โดยการกินและหายใจ หรืออาจติดจากแม่ที่มีเชื้อในมดลูกหรือช่องคลอดตั้งแต่ก่อนหรือขณะหรือหลังคลอดไม่นาน (Robertson and Blackmore, 1989) type 2 มักพบในสุกรหย่านมและสุกรขุนช่วงอายุ 3 – 12 สัปดาห์ โดยทั่วไปสามารถพบเชื้อนี้ได้ในระบบทางเดินหายใจของสุกร เช่น ช่องจมูก บริเวณต่อมทอนซิล เพดานปาก (Clifton-Hadley and Alexander, 1980) และที่ช่องคลอดของสุกรเพศเมีย (Mwaniki et al., 1994) ซึ่งเชื้อนี้สามารถอาศัยที่บริเวณต่อมทอนซิลได้นานกว่า 1 ปี ทั้งๆ ที่มีแอนติบอดี้เกิดขึ้นแล้ว (Clifton-Hadley *et al.*, 1994)

โดยปกติสุกรที่มีเชื้อในช่องจมูกหรือต่อมทอนซิลจะไม่แสดงอาการป่วย แต่หากมีภาวะเครียดอาจเนื่องมาจากความแออัด ความสกปรก หรืออากาศไม่เหมาะสม จะทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและแพร่จากต่อมทอนซิลไปยังต่อมน้ำเหลือง และติดเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต ไปยังสมอง

และทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ โดยเฉพาะลูกสุกรแรกคลอดและสุกรหย่านมที่อยู่ในช่วงอายุ 8 - 15 สัปดาห์ เชื้อจะฉวยโอกาสจนเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหรือมีไข้สูง ซึม เบื่ออาหาร อ่อนเปลี้ย ไม่มีแรง สั่น นอนตะแคงชัก อัมพาต หายใจลำบาก ข้ออักเสบบวม กะเผลก รวมถึงปัญหาแท้งรุนแรงในแม่สุกร รอยโรคในสุกรที่ตายฉับพลันจากภาวะโลหิตติดเชื้อรุนแรง ปอดอักเสบ จุดเลือดออกตามอวัยวะภายใน และเยื่อหุ้มปอดอักเสบขุ่นขาว บางตัวพบเยื่อบุหัวใจอักเสบลิ้นหัวใจอัก เยื่อหุ้มสมองอักเสบในรายอัมพาตหรือชักเกร็ง

สุกรที่มีเชื้อจะเป็นแหล่งรังโรคและสามารถแพร่เชื้อไปยังสุกรตัวอื่นๆในฝูงได้ โดยเฉพาะสุกรที่อ่อนแอหรือลูกสุกรในช่วงหย่านมและทำวัคซีน สุกรที่ติดเชื้อมักตายจากการเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ นอกจากการก่อโรคและการแพร่เชื้อไปยังสุกรตัวอื่นๆภายในฝูงแล้ว ยังพบว่า *Streptococcus suis* เป็นเชื้อที่สามารถติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ได้ด้วยการสัมผัสกับสุกรที่ติดโรค โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผล รอยถลอก หรือเยื่อบุตา รวมทั้งการบริโภคเนื้อสุกรที่ไม่ผ่านการปรุงสุกก็ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้ โดยเชื้อจะมีระยะฟักตัวประมาณ 1-3 วัน อาการที่พบในผู้ป่วย ได้แก่ ปวดศีรษะ คลื่นเหียน มีไข้ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ข้ออักเสบ ม่านตาอักเสบ หูหนวก ตาบอด และอาจทำให้เสียชีวิตได้ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต (ศุภร และประเสริฐ 2548)

สถานการณ์การระบาดในต่างประเทศ

รายงานการติดเชื้อ *Streptococcus suis* ในคนครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2511 ที่ประเทศเดนมาร์ก ทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ 2 รายและติดเชื้อในกระแสเลือด 1 ราย (Perch, 1968) และพบอีกประมาณ 200 รายจากอีกหลายประเทศทั่วโลก เช่น เนเธอร์แลนด์ อิตาลี เยอรมัน เบลเยี่ยม อังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน สวีเดน ไอร์แลนด์ ออสเตรีย ฮังการี นิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา ฮ่องกง โครเอเชีย ญี่ปุ่น (Higgins and Gottschalk, 1999; Kahn, 2005)

ปี พ.ศ. 2511 มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Streptococcus suis* ในมณฑลเจียงสู ประเทศจีน มีสุกรล้มตายประมาณ 80,000 ตัว มีผู้ป่วย 25 รายและเสียชีวิต 14 ราย (Tang *et al.*, 2006) และปลายเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม 2548 เกษตรกรจีนจำนวน 215 คน อายุระหว่าง 30-70 ปี จาก 49 หมู่บ้านรอบเมืองจื้อหยางและเหน่ยเจียง มณฑลเสฉวน ป่วยมีอาการไข้สูง อ่อนเพลีย คลื่นเหียน อาเจียน ทุกรายมีประวัติสัมผัสสุกรที่ป่วย และมีประวัติการฆ่าสุกรหรือแพะ

ป่วยโดยไม่ทราบสาเหตุ รวมผู้ป่วยพบเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 102 ราย (ร้อยละ 48) ติดเชื้อเข้าในกระแสโลหิต 52 ราย (ร้อยละ 24) อาการช็อก (Toxic shock syndrome, TSS) 61 ราย (ร้อยละ 28) เสียชีวิต 39 ราย (ร้อยละ 18) (Yu et al., 2006)

ที่ประเทศเวียดนามพบชายเลี้ยงสุกรและมีนิสัยชอบดื่มสุราประจำ 1 รายในปี 2544 และหญิงขายเนื้อสุกร 1 รายในปี 2547 แม้รอดชีวิตก็หูหนวกทั้งสองข้าง และล่าสุดปี 2550 มีผู้ป่วยจากเวียดนามตอนใต้ 22 ราย ตอนเหนือ 26 ราย เสียชีวิต 2 ราย

สถานการณ์การระบาดในประเทศไทย

การระบาดในประเทศไทยมีรายงานพบผู้ป่วยเป็นโรคติดเชื้อ *Streptococcus suis* ครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2530 ที่โรงพยาบาลรามาธิบดี(Phuapradit *et al.*, 1987) และปี พ.ศ. 2536 โรงพยาบาลรามาธิบดีศึกษาผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2530 – 2535 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* 6 ราย (ร้อยละ 17) จากผู้ป่วยด้วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบเป็นหนอง มีเพียง 3 รายที่มีประวัติสัมผัสกับสุกร โดยมีอาการหูหนวกทั้งสองข้างร่วมกับอัมพาต มีตุ่มผิวหนังพอง ห้อเลือด (hemorrhagic blebs) และข้ออักเสบ แม้จะตอบสนองต่อการรักษา (ด้วยเพนนิซิลิน และ แอมพิซิลิน) แต่มีอาการหูหนวกอย่างถาวร (Pootong *et al.*, 1993)

ปี พ.ศ. 2540 พบเชื้อนี้ในผู้ป่วยอาการรุนแรง 3 รายโดยมีประวัติดื่มสุราเป็นประจำ แต่มีเพียงรายเดียวเป็นชายอายุ 23 ปีที่มีอาชีพชำแหละสุกรและติดเชื้อทางผิวหนังจากบาดแผลที่ข้อมือ ห้อเลือด มีไข้และช็อก พบความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ หัวใจเต้นผิดจังหวะ การหายใจล้มเหลวและไตวาย ผู้ป่วยได้รับการรักษาหายโดยไม่มีภาวะแทรกซ้อน อีกสองรายเป็นหญิงอายุ 49 ปีมีอาชีพเป็นกรรมกร และชายอายุ 45 ปี อาชีพช่างสี ทั้งสองมาด้วยอาการไข้ สับสน คอแข็ง หลังแข็ง รายที่เป็นหญิงไม่ตอบสนองต่อการรักษา เสียชีวิต ส่วนชายแม้จะดีขึ้นแต่ก็คงมีอาการหูหนวก (Leelarasamee *et al.*, 1997)

ปี พ.ศ. 2542 โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่นพบ *Streptococcus suis* จากเลือดและน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเพศชาย อาชีพตำรวจ ที่เข้ารับการรักษาด้วยอาการเยื่อสมองอักเสบ ซึ่งแม้จะรอดชีวิตแต่ก็หูหนวกถาวร (Chotmongkol *et al.*, 1999)

ปี พ.ศ. 2543 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบ *Streptococcus suis* จากสารน้ำในช่องท้องหลังการผ่าตัดเยื่อบุช่องท้องอักเสบในผู้ป่วยชายอายุ 45 ปี ที่มีอาชีพขับรถบรรทุกและประสบอุบัติเหตุทางรถยนต์ พบว่าไม่มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (ceftriaxone และ metronidazole) และถึงแก่กรรมในที่สุด (Vilaichone *et al.*, 2000)

โรงพยาบาลสวนดอกตรวจพบว่ามีผู้ติดเชื้อ *Streptococcus suis* เพิ่มจำนวนขึ้นประมาณ 30-40 ราย เฉลี่ยประมาณ 10 รายต่อปี จากสถิติปี พ.ศ. 2544 พบ 15 ราย ปี พ.ศ. 2545 พบ 29 ราย ปี พ.ศ. 2546 พบ 13 ราย และ ปี พ.ศ. 2547 พบ 18 ราย ส่วนใหญ่ติดเชื้อมาจากพฤติกรรมการกินเนื้อหมูดิบๆ ลาบเลือดหมูดิบๆ ผู้รอดชีวิตมักมีอาการหูหนวกถาวร (ประชาชาติธุรกิจ, 2005)

ปี พ.ศ. 2550 จังหวัดพะเยาพบระบาดที่ตำบลทุ่งกล้วย กิ่งอำเภอภูซาง มีผู้ป่วยรวม 32 ราย (ชาย:หญิง =16:16)แยกเป็นผู้ป่วยสงสัย 22 ราย ยืนยัน 10 ราย เสียชีวิต 3 ราย อายุเฉลี่ย 46 ปี ติดเชื้อจากการกินเนื้อหมูลาบดิบเลี้ยงในงานศพ ยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR ว่าเป็น *Streptococcus suis* จำนวน 6 ตัวอย่างจากซีรั่มผู้ป่วย 9 ตัวอย่าง ส่วนเลือดและ nasal swab ในสุกรจากแหล่งที่เกี่ยวข้องให้ผลลบต่อ *Streptococcus suis* โดย PCR (อนิรุธ, 2550)

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 โรงพยาบาลเชียงคำตรวจพบเชื้อ *Streptococcus suis* จากน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยชายอายุ 34 ปี ซึ่งมีอาการปวดเกร็งกล้ามเนื้อ อาเจียน เชื้อกระจายสู่กระแสโลหิต โดยผู้ป่วยดื่มสุราและกินเนื้อสุกรดิบๆ (หลู่ ลาบ) อยู่เป็นประจำ ทุก 1 - 2 วันต่อครั้ง เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่มีการเลี้ยงสุกรในหมู่บ้านและไม่มีผู้ป่วยที่มีอาการดังกล่าว ทั้งที่ทุกคนซื้อเนื้อสุกรจากตลาดเดียวกันในหมู่บ้านไปบริโภค (บุญจันทร์, 2550)

ชาวบ้านใน จ.อุตรดิตถ์ ติดเชื้อ *Streptococcus suis* เมื่อมิถุนายน 2550 จากการกินเนื้อหมูดิบ และสัมผัสซากหมูดิบ เป็นเหตุให้มีผู้เสียชีวิตแล้ว 2 ราย และอีก 3 รายเข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลอุตรดิตถ์ เชื้อเข้าสู่กระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ไข้สูง ปวดศีรษะรุนแรงและอาเจียน และอีก 1 รายเสียชีวิตในเวลาต่อมา

ผลิตภัณฑ์แหนม

แหนม (Nham) หรือ Thai fermented sausage เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดี และเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคทั่วไปในทุกภาคของประเทศ จัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีน

สูงและมีปริมาณไขมันต่ำ ผลิตจากเนื้อสุกรบดผสมกับเกลือบริโภค ข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวสุก กระเทียมบด บางสูตรมีการเติมสมุนไพรบางชนิด จากนั้นคลุกเคล้าส่วนผสมให้เข้ากัน และนำมาบรรจุโดยห่อด้วยพลาสติก หรือห่อทับด้วยใบตอง ในการบรรจุมีรูปแบบ ขนาด และน้ำหนักที่ต่างกันไป จากนั้นนำส่วนผสมที่ผ่านการบรรจุแล้วไปหมักไว้ โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 3-7 วัน จนผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว โดยความเปรี้ยวที่เกิดขึ้นในแหนมเป็นผลมาจากการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก (Adams and Moss, 1995) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ การสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก ทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงและยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกยังทำหน้าที่ยับยั้งแบคทีเรียที่พบในลำไส้เล็กอันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารไม่ถูกสุขลักษณะ ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแหนม ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในสกุล*Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Leuconostoc* นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ ได้แก่ *Micrococcos* เป็นต้น (ไพโรจน์, 2534)

ดวงดาวและคณะ (2537) ทำการการวิเคราะห์แหนมหมู 80 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ – มิถุนายน 2535 พบว่ามีแหนมหมูตัวอย่างที่ไม่ถูกสุขลักษณะ 73 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 91.3 เมื่อจำแนกตามภาคพบว่า ตัวอย่างแหนมหมูที่ผลิตใน ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไม่ถูกสุขลักษณะ ร้อยละ 78.6 89.3 และทุกตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 2-1 **จำนวนตัวอย่างแหนมหมูที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย**

ภาค	จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์	เชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ (ตัวอย่าง)			
		Fecal coliform	*S. aureus*	*C. perfringens*	Salmonellae
กลาง	26	19	7	4	8
เหนือ	28	23	2	7	1
ตะวันออกเฉียงเหนือ	26	24	12	2	1
รวม	80	66	21	13	10
ร้อยละ	100.0	82.5	26.3	16.3	12.5

ดวงดาวและคณะ (2537) ได้ทำการศึกษา Salmonellae (จากตารางที่ 2-1) ที่ตรวจพบในแหนมหมูมี 10 ตัวอย่างจาก 80 ตัวอย่าง (ร้อยละ 12.5) จำแนกเป็น 5 ซีโรไทป์ คือ *S.* Derby, *S.* Anatum, *S.* Welteverden , *S.* Stanley และ *S.* 1,4,5,12 :i : - แต่ *S* . Derby พบมากที่สุดและค่าพีเอชในตัวอย่างที่พบ Salmonellae อยู่ระหว่าง 4.40-4.94 แสดงดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ค่าพีเอชของตัวอย่างแหนมหมูที่พบ Salmonellae และซีโรไทป์ที่พบ

ตัวอย่างที่	ค่าพีเอช	Salmonellae
1	4.40	*S.* Derby
2	4.63	*S.* Anatum
3	4.56	*S.* Derby
4	4.49	*S.* 1,4,5,12 : i :-
5	4.59	*S.* Anatum
6	4.94	*S.* Derby, *S.* Weltevreden
7	4.91	*S.* Derby
8	4.58	*S.* Derby
9	4.42	*S.* Stanley
10	-	*S.* group B*

* ไม่ได้ทำ Serotyping

สุคันธา(2546) ได้ทำการนำการประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ใน อาหาร (QMRA)มาใช้เพื่อป้องกันการเจ็บป่วยจากโรคซัลโมเนลโลซิส โดยจากการทำการประเมิน ความเสี่ยงของเชื้อซาลโมเนลลาใน แหนมหมูพบว่าความน่าจะเป็นของการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูมีค่าเท่ากับ 0.186 และพบว่าความน่าจะเป็นของการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูมีค่าความน่าจะเป็นสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.035 และปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp.ที่พบในแหนมหมูมีค่าประมาณ 105 -195 CFU ต่อแหนมหมู 25 กรัม เมื่อเปรียบเทียบ กับการแพร่กระจายของเชื้อ *Salmonella* spp.ในเนื้อสุกร อยู่ที่ประมาณ 360 – 500 CFU ต่อเนื้อสุกร 25 กรัมและมีความน่าจะเป็นสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.69 พบว่า ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp.ในเนื้อสุกร เมื่อนำมาเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นแหนมหมูแล้วปริมาณเชื้อ

Salmonella spp. มีค่าลดลง อันเนื่องมาจากปริมาณกรดแลคติกภายในแหนมหมูซึ่งเกิดจากการหมักแหนมหมู อย่างไรก็ตามพบว่ามีค่าความเสี่ยงสูงสุดอยู่ที่ประมาณร้อยละ 1.9 ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. พบตั้งแต่ 120 CFU โดยพบ ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 170 CFU มีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ในแหนมหมูมีค่าสูงสุดอยู่ที่ประมาณร้อยละ 20 โดยมีระดับการปนเปื้อนอยู่ที่ระหว่างร้อยละ 10 – 40 และกำหนดให้ระยะเวลาการเก็บรักษาแหนมหมูในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่ามีปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. อยู่ในช่วง 10-10^5 CFUต่อชิ้น หรือ 1 – 500 CFU ต่อกรัม ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีโอกาสเป็นได้มากที่สุดอยู่ที่ 10^2 CFU ต่อชิ้น หรือ 0.2 CFU ต่อกรัม ดังนั้นในการผลิตแหนมหมูจึงต้องคำนึงถึงวัตถุดิบซึ่งคือ เนื้อสุกรควรเลือกเนื้อสุกรที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. น้อยที่สุด เพราะถึงแม้การหมักแหนมหมูจะทำให้เชื้อ *Salmonella* spp. ลดลงแต่การปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ในวัตถุดิบสูงย่อมเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วยต่อผู้บริโภคมากขึ้น โดยเกณฑ์มาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ของแหนมหมูจะต้องไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp.

ส่วนผสมในการผลิตแหนม

เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นส่วนเริ่มต้นในการผลิตแหนม สูตรโดยทั่วไปจะใช้เนื้อสัตว์ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ เนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิตเช่น เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อหมูนิยมใช้มากในยุโรปตอนเหนือ ยุโรปตอนกลางและประเทศจีน เนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ต้องมีคุณภาพดี ไม่มีรอยตำหนิเช่น ไม่มีรอยปนเปื้อนของเลือดหรือจุดที่มีลักษณะของเลือดคั่ง มีค่าพีเอชประมาณ 5.6-6.0 สีไม่คล้ำ ไม่แห้ง และมีความแน่น เนื้อสัตว์ที่นำมาใช้ควรเป็นเนื้อไม่ติดมัน

เกลือ

โดยปกติแล้วการผลิตใช้เกลือประมาณ 2.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ บทบาทที่สำคัญของเกลือคือช่วยในการถนอมรักษา (preservation) และยังช่วยในการสกัดโปรตีนให้ละลายออกมารวมตัวกับส่วนผสมอื่น ๆ (Francis, 2000) การละลายของโปรตีนทำให้เกิดแผ่นฟิล์มที่มีความเหนียว (sticky film) ขึ้นรอบ ๆ อนุภาคของเนื้อ (Jay, 1996)

นอกจากใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์แล้ว ยังใช้ไนไตรท์เพื่อช่วยยืดอายุและช่วยในการเกิดสีของผลิตภัณฑ์ ทั้งไนเทรตและไนไทรต์ถูกนำมาใช้เป็น curing agent ในการหมักเนื้อสัตว์ทั้งนี้เพื่อช่วยในเรื่องการเกิดสีและกลิ่น โดยใช้ไนไทรต์ประมาณ 30-50 และ 20-40 ppm ในการผลิตพบว่า

ไนไทรต์มีความสำคัญอย่างมากในการทำให้ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มีสีชมพู สีที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไนไทรต์กับ myoglobin เมื่อสลายตัวด้วยความร้อนจะให้สีชมพูที่คงทน นอกจากนั้นไนไทรต์ยังมีส่วนช่วยป้องกันการสูญเสียของรสชาติในระหว่างการเก็บรักษา และยังช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายและทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งใช้ได้ถึง 80-150 ppm โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค botulism(Francis,2000) ส่วนไนเทรตไม่มีคุณสมบัติเป็นสารถนอมอาหาร

กล้าเชื้อ (starter cultures)

กล้าเชื้อ หรือหัวเชื้อ หมายถึงเชื้อบริสุทธ์ของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบแล้วจำนวนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ใช้เติมลงไปในสูตรการผลิต เพื่อใช้เป็นตัวเริ่มต้นในกระบวนการหมัก ช่วยเพิ่มคุณภาพ รสชาติและลักษณะของผลิตภัณฑ์ ลักษณะของกล้าเชื้อที่ใช้ ได้แก่ ลักษณะของสารแขวนลอย รูปของเชื้อผงที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) อาจมีการใช้โดยตรงหรือถ่ายเชื้อก่อนใช้ก็ได้ ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยใช้หัวเชื้อได้แก่ ไส้กรอกหมัก โยเกิร์ต ชีส เบียร์ เป็นต้น (Frank, 1992) โดยคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อต้องรับประกันได้ว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี ซึ่งต้องประกอบด้วยเป็นเชื้อที่มีการจัดจำแนกโดยใช้พื้นฐานทางสัณฐานวิทยา มีกิจกรรมทางสรีรวิทยาในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัว ทราบจำนวนเริ่มต้นของการใช้ มีความบริสุทธิ์ และมีความปลอดภัยในการบริโภค

ในประเทศสหรัฐอเมริกานิยมใช้ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งเกิดการหมักได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 40-43 องศาเซลเซียส ในภาวะเช่นนี้ พบว่าช่วยทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว และค่าพีเอชที่ต่ำลงมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus/Micrococcus* ส่วนกล้าเชื้อผสมประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดและยังมี staphylococci ซึ่งการใช้กล้าเชื้อในลักษณะนี้เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากให้ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ (appearance) เนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติที่ดี นอกจากนั้นองค์ประกอบของกล้าเชื้อผสมยังมีเชื้อ *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ เป็นตัวช่วยส่งเสริมการเกิดสีของผลิตได้เป็นอย่างดี (ไพโรจน์, 2534; Pearson and Dutson, 1986)

คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตใช้เป็นส่วนผสมของการผลิตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ ทั้งนี้เพื่อให้กิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักเกิดขึ้นอย่างพอเพียง เป็นการส่งเสริมการเจริญ

ของแบคทีเรียตลอดจนการสร้างกรดอินทรีย์ ทั้งชนิดและปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปทำให้เกิดความสมดุลของการหมักระหว่างการสร้างกรดแลคติก และการลดลงของค่าพีเอช กลูโคสจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้อย่างรวดเร็ว ส่วนโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้ได้ค่อนข้างช้า ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปอยู่ในช่วง 0.4-0.8 เปอร์เซ็นต์

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน การศึกษาถึงการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการผลิตแหนม (น้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส แลคโตส และกาแลคโตส) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเทรต พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก (ไพโรจน์ และคณะ, 2537) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการใช้โมลาสจากถั่วเหลือง (soy molasses) ซึ่งมีน้ำตาลซูโครส 19 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดแลคติก พบว่าได้กรดแลคติกในปริมาณสูง(Jose *et al.*, 1993) ส่วนการผลิตแหนมที่มีการใช้ส่วนผสมของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราส่วนเท่ากับ 3 : 1 ให้ผลดีที่สุด ซึ่งการใช้คาร์บอนของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกใช้ข้าวเจ้าในช่วงแรกของการหมักเพื่อสร้างกรดแลคติก และใช้ข้าวเหนียวในช่วงกลางของการสร้างกรดแลคติก (ไพโรจน์ และคณะ, 2536)

ส่วนผสมอื่น ๆ

สารประกอบหลายชนิดนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น ใช้เติมลงในสูตรการผลิตเพื่อช่วยในกระบวนการผลิตและเพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์ ส่วนผสมอื่น ๆ ในสูตรการผลิตได้แก่ น้ำ เติมลงเพื่อช่วยให้ส่วนผสมต่าง ๆ กระจายตัวได้อย่างทั่วถึง ช่วยในการสกัดโปรตีนนอกจากนั้นยังช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความฉ่ำและมีเนื้อสัมผัสดี เครื่องเทศ เครื่องปรุงรส เป็นส่วนผสมอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้ ได้แก่ กระเทียม พริกไทย ปาปริกา ไส้กรอกหมักของประเทศจีนหลายชนิดมีการเพิ่มรสชาติด้วยการเติมไวน์ ส่วนสารช่วยเพิ่มรสชาติที่ใช้ในส่วนผสมได้แก่ ผงชูรส เพราะเชื่อว่าจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ดี และมีการใช้สารยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่น การใช้สารยับยั้งเชื้อราเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราที่ปนเปื้อนในระหว่างการผลิต เพราะอาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ (Arntzen and Ritter, 1994; Jay, 1996)

กลิ่นรสที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์เกิดจากเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ และสารประกอบอื่นๆ ที่เติมลงไปในสูตรการผลิต เช่น คาร์โบไฮเดรต สารที่ช่วยในการถนอมอาหาร เครื่องเทศ

สารประกอบอื่น ๆ ที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีสการสลายโปรตีน การสลายไขมัน และลิปิดออกซิเดชั่น โดยกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดกลิ่นรสเริ่มจากเอนไซม์ในเนื้อสัตว์ และจากการหมักของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ขนาดของบรรจุภัณฑ์ ขนาดอนุภาคของเนื้อสัตว์

กรรมวิธีการหมักไส้กรอก

Jay (1996) ได้กล่าวถึงการผลิตไส้กรอกโดยทั่วไปว่า พบได้สองลักษณะ คือ การหมักตามสภาพธรรมชาติ (Natural fermentation) และการหมักโดยใช้กล้าเชื้อ (Fermentation with starter culture) ซึ่งรายละเอียดในการหมักทั้งสองลักษณะมีดังต่อไปนี้

การหมักตามสภาพธรรมชาติ

การหมักตามสภาพธรรมชาติ เป็นการหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อในสูตรการผลิตเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำหน้าที่สร้างกรด ได้มาจากการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และส่วนผสมในการผลิต การสร้างกรดแลคติกช่วงแรกของการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียในกลุ่มของ *Enterococcus* เมื่อมีการหมักเกิดขึ้นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและที่อายุการหมัก 2-5 วัน โดยพบจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10^6-10^8 โคโลนี/กรัม ค่าพีเอชที่ลดลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้เชื้อ *Pseudomonas* และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งที่ไวต่อกรดตายภายในเวลา 2-3 วัน แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบตามสภาพธรรมชาติ ได้แก่ สกุล *Lactobacillus* ส่วนใหญ่ ได้แก่ สปีชีส์ *L. bavaricus, L. curvatus, L. farciminis , L. plantarum* และ *L. sake* โดยพบว่า *L. sake* มีความสำคัญต่อการหมักไส้กรอกที่สุดในสกุล *Lactobacillus* ทั้งหมด

กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติคที่พบรองจาก *Lactobacillus* คือสกุล *Pediococcus* ได้แก่ *P. damnosus, P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* ส่วน *Leuconostoc* พบจำนวนน้อยและพบในไส้กรอกที่มีคุณภาพต่ำ (Varnam and Sutberland, 1995)

การหมักด้วยกล้าเชื้อ

การหมักไส้กรอกที่เริ่มต้นด้วยการเติมกล้าเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกลงในสูตรการผลิตมีความสำคัญเช่นเดียวกับการหมักตามสภาพธรรมชาติ โดยจะพบมากในช่วงแรกของการหมัก ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกจะต้องมีคุณสมบัติตาม

มาตรฐานที่กำหนดไว้ เช่น สามารถแข่งขันกับแบคทีเรียที่พบในเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดีและมีประสิทธิภาพ ต้องสร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณที่เพียงพอ ไม่ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่มากเกินไป เมื่อผลิตไส้กรอกเสร็จแล้วควรมีผลในการเพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์อันเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ทำให้เกิดโรค มีความทนต่อสภาวะของการหมัก เป็นต้น

การผลิตแหนม

กรรมวิธีทั่วไปในการผลิตแหนมประกอบด้วย นำเนื้อหมูมาแล่มันออกให้หมด จากนั้นนำมาสับหรือบดให้ละเอียด เติมโปแตสเซียมไนเทรตหรือผงเพรกลงในเนื้อบด คลุกเคล้าให้เข้ากันดี เติมพริกไทย กระเทียม ข้าวสุกที่บดละเอียดแล้ว จากนั้นใส่หนังหมูที่ต้มสุกและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บาง ๆ ลงผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง สำหรับการห่อแหนม ปริมาณที่ใส่แล้วแต่โรงงานผู้ผลิต เช่น อาจห่อด้วยถุงพลาสติกน้ำหนักประมาณ 30-40 กรัม พร้อมทั้งใส่พริกขี้หนูลงไป 1-2 เม็ด เพื่อให้ดูน่ารับประทาน หรือห่อให้เป็นรูปทรงกระบอก รัดให้แน่นด้วยเชือก เพื่อกำจัดอากาศในห่อและทำให้เชื้อจุลินทรีย์ทำงานได้ดีที่สุด

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่เกิดจากการหมักตามสภาพธรรมชาติ เป็นการหมักที่เกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ส่วนผสมอื่น ๆ และอาจติดอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ในช่วงแรกของการหมักเกิดจากเชื้อในสกุล *Enterococcus* และในช่วงสุดท้ายของการหมักเกิดจากเชื้อในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอย่างรวดเร็วส่งผลให้มีการสร้างกรดแลคติกมากขึ้น และทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลง ทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคลดจำนวนลงหรือตายได้ภายใน 2-3 วัน (Varnam and Sutberland, 1995)

เกณฑ์คุณภาพของแหนม

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (2547) ได้จัดทำเกณฑ์คุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์แหนม ดังนี้

ความเป็นกรด-ด่าง เมื่อถึงวัน เดือน ปี ที่ควรบริโภค ต้องไม่เกิน 4.6

Salmonella ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

Staphylococcus aureus ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม

Clostridium perfringens ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม

Trichinella spiralis ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

เชื้อรา ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติค เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) มีรูปร่างกลมหรือเป็นแท่ง (cocci or rods) ไม่มีการสร้างสปอร์ (non sporeforming) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) หรือถ้ามีการเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลา เป็น facultative anaerobic สามารถผลิตกรดแลคติกได้โดยใช้คาร์บอนเป็นสารอาหาร น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ กลูโคสและแลคโทส แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น (Singleton and Sainsbury, 1988)

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก เกิดจากการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็นสองกลุ่ม คือ homofermentative และ heterofermentative (Collier *et al.*, 1998)

1 Homofermentation

Homofermentative หรือ homolactic fermentation เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติกที่เกิดขึ้น โดยแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolytic pathway ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จากการหมักกลูโคสหรือกาแลคโทส โดยกลูโคส 1 โมเลกุลเมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวท 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติคที่เกิดขึ้นพบทั้ง D-Lactic และ L-Lactic (Adams and Moss, 1995; Singleton and Sainsbury, 1988) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีวิถีการหมักแบบ homofermentative มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง เช่น สกุล *Lactobacillius* และชนิดที่มีรูปร่างทรงกลม ได้แก่ สกุล *Streptococcus Lactococcus* และ *Enterococcus* เป็นต้น

2 Heterofermentation

Heterofermentation หรือ *heterolactic* fermentation เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโทสไปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดแอซีติก กรดฟอร์มิค เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel, 1993; Adams and Moss, 1995) ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีวิถีการหมักแบบนี้ ได้แก่ สกุล *Lactobacillus* บางสปีชีส์ และสกุล *Leuconostoc*

แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในปัจจุบัน สามารถจัดจำแนกได้เป็น 12 สกุล คือ *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* (Stiles and Holzapfel, 1997) ซึ่งแต่ละสกุลมีลักษณะดังนี้

1 *Aerococcus*

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกตระกูล streptococcaceae เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นพวก homofermentative ไม่สร้างแคตาเลส แต่มีบางสายพันธุ์มีการผลิตแคตาเลสเทียม (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในสกุลนี้มี 2 ชนิด คือ *A. urinae* และ *A. viridans* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Pediococcus urinae-equi* และ *P. homari* ตามลำดับ (Singleton and Sainsbury, 1988; Stiles and Holzapfel, 1997)

2 *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งคล้าย lactobacilli ซึ่งก่อนหน้านี้เคยจำแนกไว้ใน lactobacili ไม่มีการสร้างแคตาเลส เป็นกลุ่ม heterofermentative ส่วนใหญ่เจริญได้ที่ อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มีบางสายพันธุ์ที่สร้างแก๊สจากการใช้น้ำตากลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแอซิเตท และไม่สร้างกรดโอลิอิค พบได้ตามเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Jay, 1996; Schleifer and Ludwing, 1995)

3 *Enterococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเซลล์เป็นรูปไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ หรืออาจพบเป็นโซ่สายสั้น ๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำดี (bile) 40 เปอร์เซ็นต์เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.6 มีกระบวนการทางชีวเคมีเป็นแบบการหมัก แบคทีเรียสกุลนี้ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* (Devriese and Pot, 1995; Jay, 1996; Schleifer and Ludwing, 1995)

4 *Lactobacillus*

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา (Axelsson, 1998) เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งหรือเป็นรูปทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างแคตาเลส มีบางสายพันธุ์เป็นแคตาเลสเทียม มีคุณสมบัติในการใช้เป็นโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ ในนมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่าง ๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น ในหญ้าหมักและผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan, 1998)

Hammes and Vogel (1998) ได้กล่าวถึงการจัดแบ่งแบคทีเรียสกุลนี้โดยพิจารณาจากกระบวนการหมักแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโทสได้เป็นกรดแลคติกมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6-biphosphate-aldolase ได้ แต่ไม่ผลิต phosphoketolase ดังนั้น เชื้อกลุ่มนี้จึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้หมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติกโดยผ่านวิถี EMP มีกิจกรรมที่เกิดจากทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

ค. Obligately heterofermentative lactibacilli เชื้อกลุ่มนี้หมักน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทสได้โดยผ่านวิถี phosphogluconate ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก เอทธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

5 *Lactococcus*

เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด มีเซลล์เป็นรูปไข่ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ กระบวนการทางชีวเคมีเป็นแบบการหมัก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก (L-lactic acid) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส (Schleifer and Ludwing, 1995)

6 *Leuconostoc*

เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักและผักดองหลายชนิด ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ จัดเป็นพวก heterofermentative อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างแคตาเลส มักพบอยู่ร่วมกับ lactobacilli (Dessaet and Steenson, 1995; Jay, 1996;Schleifer and Ludwing, 1995)

7 *Oenococcus*

มีรูปร่างทรงกลม ซึ่งถูกเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenus* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อกรดได้ดีกว่า (Dick *et al.*, 1995)

8 *Pediococcus*

มีรูปร่างกลม มีการแบ่งตัวแบบ 2 ทิศบนระนาบเดียวกัน พบการจัดเรียงตัวอยู่เป็นคู่หรืออยู่เป็น 4 เซลล์ติดกัน เป็นพวก homofermentative ต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อน มักพบร่วมกับพืชที่นำมาหมัก เช่น ผักดองเค็ม นอกจากนั้นยังพบว่ามีการปนเปื้อนในเครื่องดื่มที่หมักด้วยยีสต์ (Harrigan, 1998; Jay, 1996)

9 *Streptococcus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ ต้องการสารอาหารหลายชนิด เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส เป็นได้ทั้ง homofermentative และ heterofermentative พบได้ในอาหารเป็นส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ (Hardie and Whiley, 1995)

10 *Tetragenococcus*

เป็นสกุลที่เปลี่ยนมาจาก *P. halophillus* เดิม ลักษณะส่วนใหญ่จึงเหมือนกัน มีรูปร่างทรงกลม ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญและสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับของ 16s rRNA ต่างจาก *Pediococcus* (Simpson and Taguchi, 1995)

11 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจาก *Streptococcus* กลุ่ม N เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ (Stiles and Holzapfel, 1997)

12 *Weissella*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคสกุลเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลมและเป็นท่อน ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*) *W. cofusus* (*Lactobacillus cofusus*) *W. halotolerans* (*L. halotolerans*) *W. kandleri* (*L. kandleri*) *W. minor* (*L. minor*) *W. viridescens* (*L. viridescens*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยวคือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

วัตถุดิบ

เนื้อหมูบดอนามัย SKF จากบริษัทเอสเคอินเตอร์ฟู้ด อ.เมือง จ.ตาก

แบคทีเรีย *Streptococcus suis* type II Strain CCUG 7984 ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อ.เมือง จ.นนทบุรี

สารเคมี

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้านเคมี

0.1 N NaOH	(Merck)
Phenolphthalene 1%	(Merck)

สารประกอบสำหรับวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา

Columbia Blood Agar base	(Oxoid)
Tryptic Soy Broth	(Difco)
Agar bacteriological	(Oxoid)
Brain Heart Infusion Broth	(Oxoid)
Sodium Chloride bacteriological grade	(Oxoid)
Cystine Tryptic Soy Agar	(Himedia)
Trehalose dehydrate	(Fluka)
Sorbitol	(Fluka)
Lactose monohydrate	(Fluka)
Raffinose pentahydrate	(Fluka)
Inulin from Chicory	(Sigma)
Salicin	(Sigma)
Mannitol	(Merck)
Hippuric acid sodium salt hydrate	(Fluka)
Esculin	(Fluka)

Crystal violet	(Fluka)
Nalidixic acid	(Fluka)
Gentamicin sulphate (sterile)	(Pharmaceutical Factory)
Oxolinic acid	(Sigma)
Colistin	(Sigma)
Lactic acid 85%	(UNIVAR)
Ninhydrin	(Fluka)
D(-)Glucose anhydrous	(Fluka)
Peptone from soymeal	(Merck)
Inactivate Horse serum	(Gibco)

เครื่องมือ อุปกรณ์

pH meter	Mettler Toledo MP 220
Spectrophotometer	Shimadzu UV-1650PC
CO_2 Incubator	Revco Ultima
Incubator	Contherm
Autoclave	Hirayama
Balance	Mettler Toledo
Micropipette	Eppendorf

วิธีการดำเนินงาน

ตอนที่ 1 การศึกษาการปรากฏของเชื้อ *Sreptococcus suis* ในเนื้อหมูบด (20 ธันวาคม 2553 – 29 มกราคม 2554)

ทำการสำรวจเชื้อ *Streptococcus suis* จากตัวอย่างเนื้อหมูบดในตลาด ที่อำเภอเมืองจังหวัดพิษณุโลก (ตลาดโคกมะตูม ตลาดบ้านคลอง ตลาดสถานีรถไฟ ตลาดใต้(night plaza) และตลาดแถวโรงเรียนเฉลิมขวัญ) จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง selective medium (Rosendal *et.al*,1986) ทำการ spread plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีสีเทา ขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแอลฟา ย้อม Gram strain แล้วติดสีม่วง รูปร่างกลม มาทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ Catalase, Oxidase, Trehalose, Sorbitol, Mannitol, Salicin, Lactose, Raffinose, Inulin, Esculin, Sodium hippurate และ 6.5%NaCl+BHI

ตอนที่ 2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่างๆ

2.1 การเก็บรักษาและการเตรียมเชื้อ *Streptococcus suis*

นำเชื้อ *S.suis* ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มาทำการ streak บน blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น swab เชื้อมาเก็บในอาหาร Mist desiccant แบ่งใส่หลอด cryo tube และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำเชื้อที่เก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มา streak บน blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้น swab เชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร นำไปเซนทริฟิวจ์ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง (ทำซ้ำตั้งแต่การเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้ง) เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยเทียบกับ McFarland เบอร์ 10 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.suis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่างๆ

นำเชื้อ *S.suis* (ที่ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland เบอร์ 10 แล้ว) 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth 100 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกและ 0.1 N NaOH ให้มีระดับพีเอชแตกต่างกัน (4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0, 90, 180, 270 และ 360 นาที โดยการ spread plate ในอาหาร blood agar

ตอนที่ 3 การศึกษาการรอดชีวิตของ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในแหนม

3.1 การผลิตแหนม

นำเนื้อหมูบดที่มีเชื้อ *S.suis* 10^6 cfu/g (control ไม่เติมเชื้อ *S.suis*) 200 กรัม ผสมกับกระเทียมสับ 20 กรัม ข้าวสุก 20 กรัม และพริกขี้หนู 10 กรัม จากนั้นนวดให้เข้ากัน และแบ่งใส่ถุงพลาสติก 25 กรัม มัดให้แน่น และหมักที่อุณหภูมิห้อง (30±5 องศาเซลเซียส)ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ)

3.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค และ *S. suis* ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม

ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค และ *S. suis* ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม โดยทำการสุ่มตัวอย่างมาทำการทดสอบทุกๆ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าพีเอชต่ำกว่า 4.6

- วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ISO 15214:1998)
- วิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S.suis* โดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Colistin-Oxolinic acid-Crystal violet blood agar (ดัดแปลงจาก Petts.,1984) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เหมือนหรือคล้าย *S.suis* คือโคโลนีมีลักษณะกลม นูน สีเทา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร และย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแอลฟา สุ่มโคโลนีมามาทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ได้แก่ Catalase, Oxidase, Trehalose, Sorbitol, Mannitol, Salicin, Lactose, Raffinose, Inulin, Esculin, Sodium hippurate และ 6.5%NaCl+BHI และคำนวณปริมาณเชื้อ (cfu/g) (ISO 7218:2007)

3.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกในระหว่างการหมักแหนม

ทำการศึกษาค่าพีเอชและปริมาณกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักแหนมโดยสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งพีเอชของผลิตภัณฑ์แหนมต่ำกว่า 4.6 โดย

- ค่า pH โดยเครื่อง pH-meter (Mettler Toledo MP 220)
- ปริมาณกรดแลคติกโดยการไตเตรทด้วย 0.1N NaOH (ภาคผนวก ข)

บทที่ 4

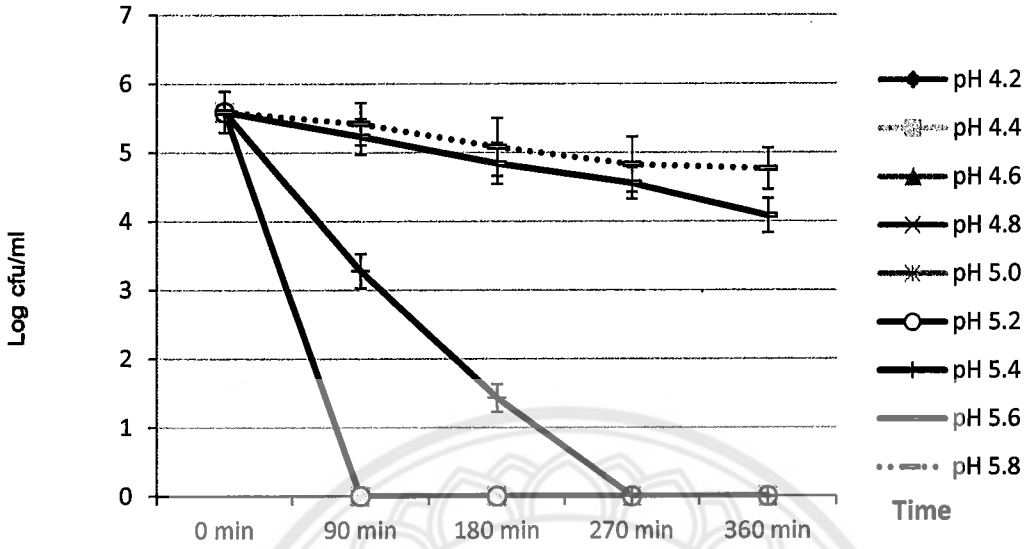
ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาการปรากฏของเชื้อ *Sreptococcus suis* ในเนื้อหมูบด

จากการวิเคราะห์เชื้อ *Streptococcus suis* จากตัวอย่างเนื้อหมูบดในตลาด ที่อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก (ตลาดโคกมะตูม ตลาดบ้านคลอง ตลาดสถานีรถไฟ ตลาดใต้(night plaza) และตลาดแถวโรงเรียนเฉลิมขวัญ) จำนวน 30 ตัวอย่าง ระหว่างวันที่ 20 ธันวาคม 2553 – 29 มกราคม 2554 ไม่พบเชื้อ *S. suis* จากตัวอย่างที่สุ่มมา ซึ่งเป็นไปได้ว่าช่วงเวลาที่ได้ทำการสำรวจยังไม่มีการแพร่กระจายของเชื้อ หรือในฟาร์มที่เลี้ยงสุกรมีสุขาภิบาลและการจัดการที่ดี (Heard, 1984) หรืออาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *S. suis* มีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากวิธีการตรวจแบบนี้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำกว่า 100 cfu/g ได้ ดังนั้นในการศึกษาปริมาณของ *S. suis* ในโอกาสต่อไป จึงควรทำ pre-enrichment เพื่อทำให้วิธีการศึกษามีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อดังกล่าวในตัวอย่างที่ศึกษา

ตอนที่ 2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชต่างๆ

จากการศึกษากราฟการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย *S.suis* โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth ที่มีพีเอชตั้งแต่ 4.2 ถึง 5.8 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆมาทำการตรวจนับจำนวนเชื้อ ผลการทดลองแสดงดังภาพ 4-1



ภาพ 4-1 **ปริมาณ** *S.suis* **ในอาหาร** Brain Heart Infusion broth **ที่มีพีเอชต่างๆ (ระหว่าง** 4.2 - 5.8) **บ่มที่อุณหภูมิ** 37 **องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์** 5 **เปอร์เซ็นต์**

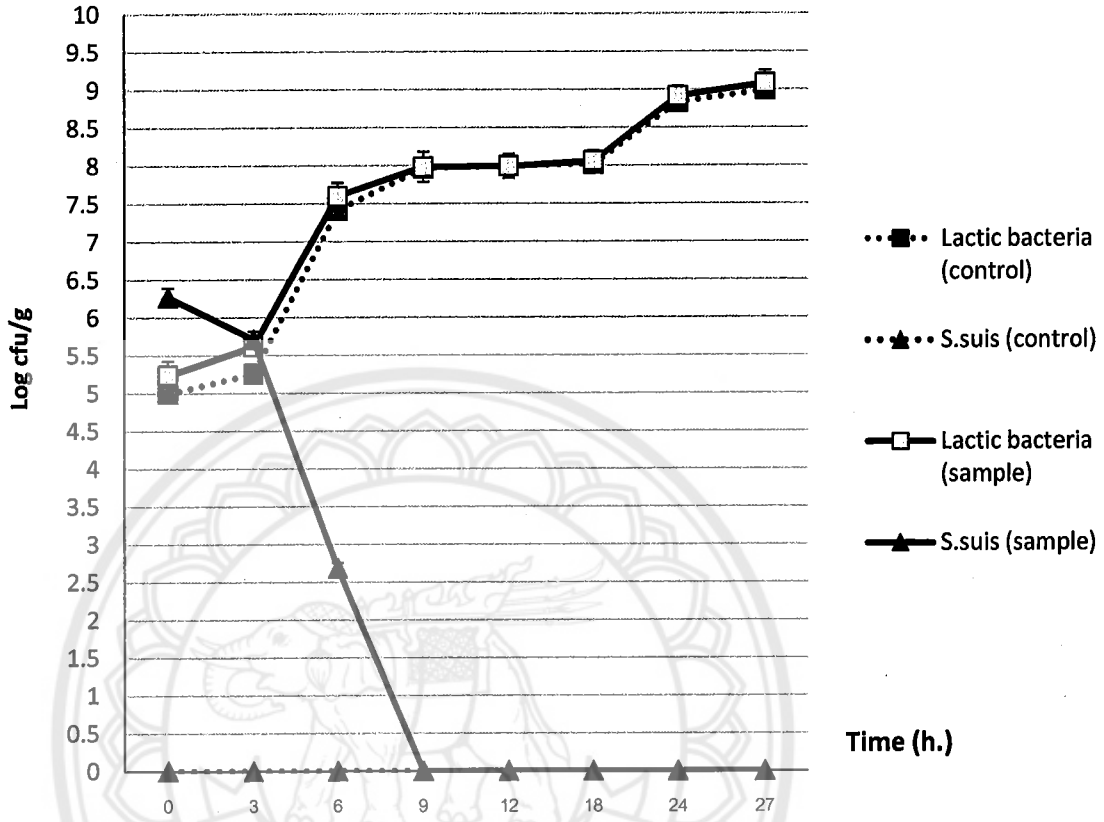
หลังจากถ่ายเชื้อลงในอาหาร Brain Heart Infusion ที่มีค่าพีเอชต่างๆ โดยที่มีเชื้อเริ่มต้น 5.59 Log cfu/ml พบว่าที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 4.2-5.2 หลังจาก 90 นาที ไม่พบเชื้อ *S. suis* ในขณะที่ค่าพีเอช 5.4 หลังจาบ่มเป็นเวลา 270 นาที ตรวจไม่พบเชื้อ โดยมีการลดลงของเชื้อหลังจากการบ่มเป็นเวลา 90 และ 180 นาที เท่ากับ 2.31 และ 1.85 Log cfu/ml ตามลำดับ ส่วนที่ค่าพีเอช 5.6 และ 5.8 ยังตรวจพบเชื้อ *S. suis* ตลอดช่วงเวลาการสุ่มตัวอย่าง โดยที่ค่าพีเอช 5.6 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 90 180 270 และ 360 นาที พบปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.23 4.84 4.56 และ 4.08 Log cfu/ml ตามลำดับ และที่ค่าพีเอช 5.8 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 90 180 270 และ 360 นาที พบปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.42 5.08 4.83 และ 4.76 ตามลำดับ

กรดแลคติก เป็นสารที่ใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง โดยการสังเคราะห์ผ่านวิถีไกลโคไลซิส การสะสมของกรดทำให้เกิดการลดลงของพีเอช ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่มีผลเนื่องมาจากการลดลงของพีเอช และการสะสมของกรดอินทรีย์ โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์จะทำหน้าที่คัดเลือกสารเข้าออกภายในเซลล์และไม่ยอมให้สารมีประจุผ่านเข้าเซลล์ได้เพื่อรักษาความเป็นกลางภายในเซลล์ ในขณะที่กรดแลคติกอยู่ในรูปไม่แตกตัว จึงสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์จุลินทรีย์และแตกตัวภายในเซลล์ทำให้ไม่สามารถกลับออกมานอกเซลล์ได้ พีเอชภายในเซลล์จึง

ลดลงและเกิดการสะสมของกรดขึ้นซึ่งจะเป็นผลในการขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการอยู่รอดจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ (ศิริกัญญา และพิมพ์ใจ, 2549)

ตอนที่ 3 การศึกษาการรอดชีวิตของ *Streptococcus suis* CCUG 7984 ในแหนม

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* ในผลิตภัณฑ์แหนม โดยตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S. suis* มีเชื้อเริ่มต้น 6.27 Log cfu/g และไม่พบ *S. suis* ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อลงไป เมื่อหมักแหนมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเชื้อ *S. suis* ในแหนมที่เติมเชื้อลดลง 0.56 Log cfu/g และลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่พบเชื้อ *S. suis* เลยใน 6 ชั่วโมงถัดมา โดยที่ 6 และ 9 ชั่วโมงของการหมักเชื้อ *S. suis* ลดลง 3.03 และ 2.68 Log cfu/g ตามลำดับ ส่วนปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างที่ไม่เติมและตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S. suis* มีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 5.00 Log cfu/g และ 5.24 Log cfu/g ตามลำดับ จากนั้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. suis* ในชั่วโมงที่ 3 6 9 12 18 24 และ 27 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 5.26 7.41 7.97 8.00 8.02 8.83 และ 8.99 Log cfu/g ตามลำดับ และตัวอย่างที่เติมเชื้อ *S. suis* ในชั่วโมงที่ 3 6 9 12 18 24 และ 27 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 5.62 7.60 7.98 7.99 8.06 8.91 และ 9.08 log cfu/g ตามลำดับ ดังภาพที่ 4-2



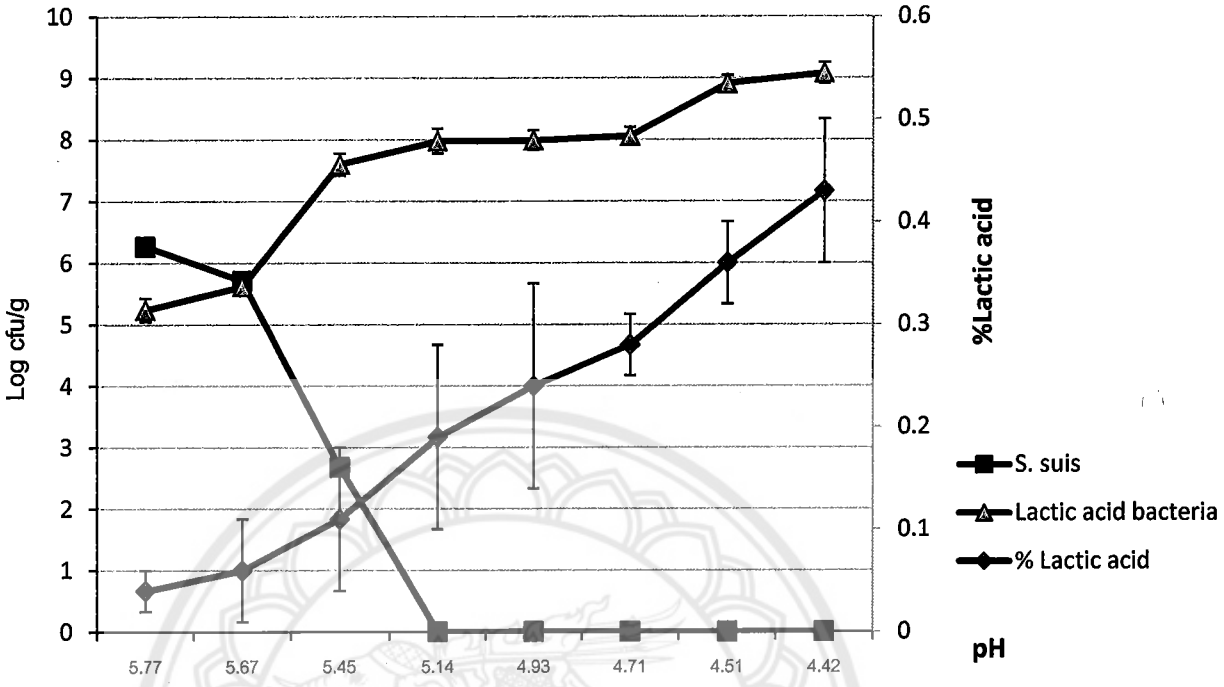
ภาพ 4-2 ปริมาณ *S.suis* และแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมที่เติมและไม่เติม *S. suis* ระหว่างการหมักที่ 30±5 องศาเซลเซียส (■=แบคทีเรียกรดแลคติก, ▲=*S. suis*, เส้นทึบ คือ เติม *S. suis*, เส้นประ คือ ไม่เติม *S. suis*)

แบคทีเรียกรดแลคติก มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ โดยการยับยั้งเป็นผลมาจากการผลิตสารหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิทิล และยังมีรายงานว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกหลายที่ชนิดสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งต่อมาเรียกว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และยังจัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น biopreservative (Kelly *et al.*, 1996)

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อว่า bacteriocin ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนขนาดใหญ่ มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ โดยกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ bacteriocin จะเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารหรือตัว receptor ที่อยู่รอบนอกเซลล์ nisin เป็น bacteriocin ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะเข้าไปมีผลต่อ cytoplasmic membrane ของเซลล์แบคทีเรีย nisin จะถูกดูดซึมเข้าทางผนังเซลล์และมีผลทำให้สูญเสีย

องค์ประกอบที่สำคัญ เช่น adenosine triphosphate (ATP) นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการทำงานของ sulphydryl group บนโปรตีนใน cytoplasmic membrane ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้ และ nisin ยังมีผลการยับยั้งสปอร์ในขั้นตอนการ pre-emergent swelling ในกระบวนการงอกของสปอร์ ส่งผลให้สปอร์ไม่มีผนังเซลล์ห่อหุ้มทำให้มันกลายสภาพไปเป็นเซลล์ปกติ เช่น สปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* และ *Bacillus cereus* (Lipinska,1977)

จากการศึกษาปริมาณการเหลือรอดของเชื้อ *S. suis* ในผลิตภัณฑ์แหนมนั้น พบว่าเมื่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มจำนวนขึ้น ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและค่าพีเอชลดลง เนื่องจากในกระบวนการหมักแหนมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างกรดแลคติกขึ้นมา โดยการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการเมแทบอลิซึม ได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ (Collier *et al.*, 1998) ทำให้ค่าพีเอชในผลิตภัณฑ์แหนมลดลง โดยผลทดลองมีแบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลคติก และ *S. suis* เริ่มต้น 5.24 Log cfu/g 5.77 0.04% และ 6.27 Log cfu/g ตามลำดับ และเมื่อค่าพีเอชลดลงเป็น 5.67 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาณกรดแลคติก และ *S. suis* เท่ากับ 5.62 Log cfu/g 0.06% และ 5.71 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชลดลงเป็น 5.45 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาณกรดแลคติก และ *S. suis* เท่ากับ 7.60 Log cfu/g 0.11% และ 2.68 ตามลำดับ และที่พีเอช 5.14 ซึ่งเป็นระยะเวลาการหมัก 9 ชั่วโมงและเป็นจุดที่ตรวจไม่พบเชื้อ *S. suis* พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกและปริมาณกรดแลคติก 7.98 Log cfu/g และ 0.19% ตามลำดับ และเวลาที่ 27 ชั่วโมง ของระยะเวลาการหมัก ผลิตภัณฑ์แหนมมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.42 และปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.43% ดังภาพ 4-3



ภาพ 4-3 **ปริมาณเชื้อ** *S. suis* **ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนม** *S. suis* (■), **ปริมาณกรดแลคติก** (♦) **และแบคทีเรียกรดแลคติก** (▲)**ระหว่างการหมัก**

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเชื้อ *S. suis* จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่าพีเอชต่ำลง และปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแหนม และยังให้ผลเป็นในทางเดียวกับการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. suis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช ต่างๆ(ตอนที่ 2) และปริมาณกรดแลคติก และค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์แหนมก็ยังใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์แหนม(ตัวอย่าง control) ของ Wonnop *et.al.*(2006) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ คุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมเชื้อ *Lactobacillus curvatus*

อย่างไรก็การตรวจปริมาณเชื้อ *S. suis* ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งใช้วิธี spread plate พบว่ามีข้อจำกัดได้แก่การที่ไม่สามารตรวจวิเคราะห์เชื้อที่มีปริมาณต่ำกว่า 100 cfu/g ได้ ทำให้ไม่สามารถบอกได้อย่างมั่นใจว่า ไม่มีเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 เหลือรอดอยู่ในผลิตภัณฑ์แหนมที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.14 แต่ก็มีการศึกษาวิจัยหลายงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณของเชื้อ *S. suis* ที่ทำให้เกิดความรุณแรงในการก่อโรค เช่น งานวิจัยของ Zhao *et.al.* (2009) ได้ศึกษาหาค่า LD_{50} ของเชื้อ

S. suis โดยนำเชื้อ *S. suis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ให้ลูกสุกรอายุ 4 สัปดาห์กิน และพบว่าค่า LD_{50} ของเชื้อ *S. suis* serotype 2 strain HA9801 คือ 1.8×10^{7} cfu และงานวิจัยของ Nakayama *et.al* (2011) ที่ศึกษาปริมาณของเชื้อ *S. suis* ในระดับ ได้แก่ 5.0×10^{8}, 3.0×10^{8}, 5.0×10^{7} และ 5.0×10^{6} cfu/ml ที่ทำให้หนูตาย และพบว่าหลังการฉีดเชื้อ *S. suis* 1 วัน ปริมาณเชื้อ *S. suis* 5.0×10^{8} cfu/ml ทำให้หนูตายหมด ที่ความเข้มข้นของเชื้อ *S. suis* 3.0×10^{8} cfu/ml พบว่าหนูสามารถรอดชีวิตได้ 40% ในวันที่ 1 หลังการฉีดเชื้อ แต่หลังจากวันที่ 7 หลังการฉีดพบว่าหนูทุกตัวไม่สามารถรอดชีวิตได้ และที่ความเข้มข้นของเชื้อ *S. suis* 5.0×10^{7} และ 5.0×10^{6} cfu/ml หลังการฉีด 12 วัน พบว่า หนูสามารถรอดชีวิตได้ 70% และ 100% ตามลำดับ จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดทำให้ทราบว่าความรุณแรงในการก่อโรคของเชื้อ *S. suis* จะต้องอาศัยปริมาณของเชื้อที่มาก (ไม่ต่ำกว่า 10^{7} cfu) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ได้พิสูจน์แล้วว่าในผลิตภัณฑ์แหนมที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.14 จะพบเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 น้อยกว่า 100 cfu/g ทำให้มั่นใจในระดับหนึ่งได้ว่าการรับประทานแหนมที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.6 (ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (2547)) น่าจะปลอดภัยจากโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. suis* CCUG 7984

นอกจากเชื้อ *S. suis* ที่สามารถมีโอกาสพบในผลิตภัณฑ์แหนมแล้ว ยังสามารถมีโอกาสพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นอีกในผลิตภัณฑ์แหนม เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์แหนมมีค่าพีเอชที่ต่ำ และมีกรดแลคติกที่โดดเด่นมากในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และ Nipa *et.al*(2009) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงของผลิตภัณฑ์แหนมที่มีเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อน และพบว่าผลิตภัณฑ์แหนมที่พีเอชต่ำกว่า 4.6 จะไม่พบสารพิษ staphylococcal enterotoxins (SEs) จากเชื้อ *S. aureus* นอกจากนี้แหนมยังมีส่วนประกอบของกระเทียม ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารที่สกัดจากกระเทียม (allicin, thiol, methyl methanethiosulfonate และอื่นๆ) และพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเช่น *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsella pnuemoniae* และ *Proteus vulgiris* (คมขำ,2521,Kyung *et al.*,1996) และยังมีการศึกษาสารสกัดจากกระเทียมมีผลในการยับยั้งเชื้อรา และพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ดี(สมศักดิ์,2547) นอกจากนี้ ชุตินันต์(2547) ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมโคเพื่อยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบในโคนม และพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดมี 2 ไอโซเลท คือ CS4-10 และ LS2-30 เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ API50 CHL พบว่า CS4-10 และ LS2-30 คือ

Pediococcus acidilacti และ *P. pentosaceus* ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่น 99.9 และ 92.8 ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองเชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ CS4-10 และ LS2-30 สามารถผลิตสารยับยั้งเมื่อมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 และ 6 ตามลำดับ โดยที่สารยับยั้งนี้นอกจากจะยับยั้ง *S. aureus* แล้วยังสามารถยับยั้ง *Salmonella* sp., *Bacillus* sp. และ *E. coli* ได้อีกด้วย

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. ในการสำรวจเชื้อระหว่างวันที่ 20 ธันวาคม 2553 – 29 มกราคม 2554 ไม่พบการแพร่ระบาดของเชื้อ *Streptococcus suis* ในเนื้อหมูบดที่สุ่มมา 30 ตัวอย่าง จากตลาดต่างๆในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
2. เชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth ที่มีพีเอชต่ำกว่า 5.2 ได้
3. การบริโภคแหนมดิบที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.14 สามารถลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนของการสำรวจเชื้อ *S. suis* ควรเพิ่มระยะเวลา และเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่ทำการสุ่ม เนื่องจากการสำรวจที่ได้ทำไปนั้นเป็นการสำรวจในช่วงเวลาที่สั้น และจำนวนตัวอย่างยังน้อยไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

คมขำ แสงมหาชัย.(2521). **ผลของสารที่สกัดจากหอมและกระเทียมต่อการเจริญเติบโตของบักเตรีบางชนิด**.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์.(2547).**การศึกษาคุณลักษณะของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*.**วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดวงดาว วงศ์สมมาตร์, นงคราญ เรืองประพันธ์, จุรีภรณ์ บุญวงศ์วิโรจน์, น้อย ทองสกุลพาณิชย์ และจุไรรัตน์ รุ่งโรจนารักษ์.(2537). พยาธิและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในแหนม. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์** 36(3): 163-171

บุญจันทร์ ทูลมณี. **รายงานการสอบสวนโรค** *Streptococcus suis* ที่ พย 0007/958 ลว 11 กค 2550

ประชาชาติธุรกิจ. **คนเหนือเสี่ยงติดหวัดหมูหมอเก็บตัวอย่างพบเชื้ออี๊อ**. Virology webboard. Aug 20 2005,จาก http://micro.sci.ku.ac.th/board/index.php?s=01daae6518af00a1a79 d8fbbb61e9e30&act=ST&f=3&t=37

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

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และปานจิตต์ คุณชะวลี. (2536). การผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม : ผลของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวต่อการผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์. **วารสารเกษตร**. 9(1): 61-74.

ไพโรจน์ วิริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์, อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, วิวรรธน์ วรรธนัจฉริยา และสุธยา บุญถนอม.(2537). น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแหนมโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. **วารสารเกษตร**. 10(1): 90 -102.

ภาวิน ผดุงทศ และ วรางคณา ไชยซาววงษ์.(2550).โรคหูดับกับการดื่มสุรา.เชียงใหม่สัตวแพทยสาร. 5(2): 109-111.

ศิริกัญญา ลิ้มประเสริฐศรี และ พิมพ์ใจ เรือนนุช. (2549).**การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลชีพที่แบคทีเรียกรดแลคติก สร้างขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp.** รายงานการวิจัย.มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

ศุภร ฟุ้งลัดดา และ ประเสริฐ ทองเจริญ.(2548).โรคติดเชื้อสเตร๊พโตค๊อกคัส ซูอีส ในมนุษย์ : ทบทวนรายงานและจุลชีววิทยา **วารสารวิชาการสาธารณสุข**, 14: 581-90.

สมศักดิ์ ไชยฤทธิ์.(2547).การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดข่ากระเทียมและกระเจี๊ยบในการยับยั้งเชื้อราที่ผลส้มเขียวหวาน **รายงานการวิจัย**.มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ฯ

สุคันธา โอศิริพันธุ์.(2546). **การประเมินความเสี่ยงเชิงปริมาณของเชื้อ** *Salmonella* spp. **ในแหนมหมู**. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

อนิรุธ เนื่องเม็ก. **รายงานการสอบสวนเบื้องต้น** (กรณีสงสัยติดเชื้อ *Streptococcus suis* ม 5 บ้านทุ่งกล้วย ต.ทุ่งกล้วย กิ่งอำเภอภูซางจังหวัดพะเยา ที่ พย 0007/ว 060 ลว 4 พค 2550)

Adams, M. R. and Moss M. O.(1995). The Royal Society of Chemistry,Cambridge. **Food Microbiology**. 232-248.

Arntzen, C. J. and Ritter E. M.(1994). Encyclopedia of Agricultural Science. **Academic Press, New York**. 17-23.

Axelsson, H. (1998). Lactic acid bacteria : **Classification and Physiology**. 1-72. In S. Saminen and A. von Wright (eds.). Lactic acid bacteria **: Microbiology and Functions Aspect**. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Carter, G.R. and Cole R.J.(1990). Diagnostic Procedurtes in Veterinary Bacteriology and Mycology. **Academic Press, California**. 217.

Chatellier S., Gottschalk M., Higgins R., Brousseau R. and Harel J.(1999). Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. 37(2): 362-366.

Chotmongkol V., Jenma J. and Kawamatawong T.(1999). *Streptococcus suis* meningitis : report of case. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 82(9): 922-924.

Clifton-Hadley FA and Alexander TJL.(1980).**The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type 2 in pigs**. Veterinary Record. 107:40-41.

Clifton-Hadley FA, Alexander TJL, Upton I and Duffus WPH.(1994). **Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs**. Veterinary Record. 114:513-518

Collier, L., Balows, A. and Sussman, M. (1998). **Microbiology and Microbial Infections :Systematics Bacteriology**. Vol. 2 10th ed. Oxford University Press, Inc.,London, 99-105.

Dessaet, S. R. and Steenson, L. R. (1995). Biotechnology of dairy *Leuconostoc*. (pp.665-698).In Y. H. Hui and G. G. Khaehatouriam (eds.). **Biotechnology**. VCH.Publishers, Inc.,U.S.A.

Devriese, L. A. and Pot, B. (1995). The genus of *Enterococcus,* (pp. 327-367). In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed.Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Dick, L. M., Dellaglio, T. E. and Collins, M. D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenostoc* as *Oenococcus oeni.* (corring). **International Journal of Systematic Bacteriology**. 45: 395-397.

Francis. F. J. (2000). **Encyclopedia of Food Science and Technology**. 2nd ed. Vol. 3 John Wiley & Sons, Inc., New York., 1556-1617.

Frank, H. K. 1992. Bacteriocin. **Dictionary of Food Microbiology**. Technomic Publishing. Co Inc., USA,43.

Gottschalk, M. and Segura, M. (2000).The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis* : unresolved questions. **Veterinary Microbiology**. 76(3) : 405-406

Hammes, W. P. and Vogel R. F.(1998). The genus of *Lactobacillus,*(pp. 15-45). In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Hardie, J. M. and Whiley R. A.(1995). The genus of *Streptococcus*, (pp. 55-124). In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Harrigan, W. F. (1998). **Laboratory Method in Food Microbiology**. 3 rd ed. AcademicPress, New York. , 346-348.

Heard T. (1984) ***Streptococcus suis* type 2 in British pig herds**; 6(3):69-71.

Higgins, R., Gottschalk, M., Boudreau, M., Lebrun, A. and Henrichsen, J.(1995). Description of six new capsular types(29-34) of *Streptococcus suis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 7(3): 405-406.

Nipa, C., Sarinya, P., Young-Gun, Z., Sanit, K., Plearnpis, L., Srianant, W. and Ruud, V.(2009). Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. **Food Microbiology**, 26:547-551

Pearson, M. A. and Dutson R. T. (1986). **Advanced in meat research : Meat and Poultry Microbiology**. Vol. 2. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 123-143.

Perch B, Krisjanse, P. and Skadhauge, K.(1968).Group R Streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, 74(1):69-76

Petts, N. D.(1984).Colistin-Oxolinic Acid-Blood agar : a New selective medium for Streptococci. **Journal of Clinical Mcrobiology**, 19:4-7

Phuapradit P., Boongrid P. and Boonyakarnkul S.(1987). Meningitis caused by *Streptococcus suis*. **International Medical Journal**. 3: 120-122.

Pootong, P., Boongrid, P. and Phuaprsdit, P.(1993). *Streptococcus suis* meningitis at Ramathibodi Hospital. **Ramathibodi Medical Journal**. 16: 203-207.

Robertson, I.D. and Blackmore, D.K.(1989).Prevalence of *Streptococcus suis* types 1 and 2 in domestic pigs in Australia and New Zealand. **Veterinary Record**, 124(15):391-4.

Rosendal, S., Breton, J., Henrichsen, J., Hilt, L. and Mitchell, W.R.(1986).Isolate of *Streptococcus suis* using a selective medium.**Canadian Journal of Veterinary Research** :537-539.

Schlegel, H. G. (1993). **General Microbiology**. 7th ed. Cambridge University Press, New York, 300-305.

Schleifer, K. H. and Ludwing, W. (1995). Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria , pp. 7-19. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Simpson, W. J and Taguchi, H.(1995). The genus *Pediococus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus,* (pp. 125- 164). In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Singleton, and Sainsbury, D.(1988). **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology**.2nd ed. John Wiley & Sons, Singapore,485-486, 682.Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel.(1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. 36: 1-29.

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. 36: 1-29.

Tang, J., Wang, C., Feng, Y., Yang, W., Song, H., Chen, Z.(2006).Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* Serotype 2. **PLoS Med**,3(5): e151.

Varnam, H. A. and Sutberland, P. J.(1995). **Meat and Meat Products : Technology, Chemistry and Microbiology**. Chapman & Hall, New York, 315-332.

Vilaichone, R., Mahachai, V. and Nunthapisud, P.(2000). *Streptococcus suis* peritonitis: case report. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 83(10): 1274-1277.

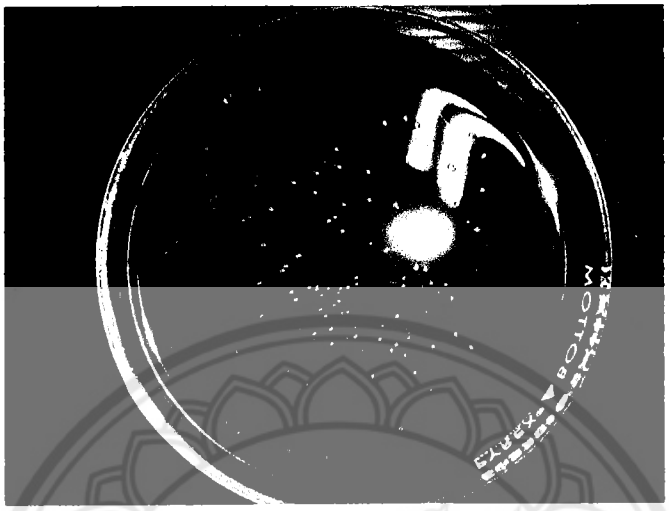
Wonnop, V., Soottawat, B., Thitapha, S., Chonticha, K., Preenapha, T. and Atikorn, P.(2006). Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. LWT, 39: 814-826.

Yu, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H.(2006) Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. **Emerging Infectius Diseases**, 12(6): 914-20.

Zhao, Z., Wang, J., Liu, P., Zhang, S., Gong, J., Huang, X., Li, B. and Xue, F.(2009). Cultivation, LD_{50} determination and experimental model of *Streptococcus suis* serotype 2 strain HA9801. **Research in Veterinary Science**. 86: 200-205.

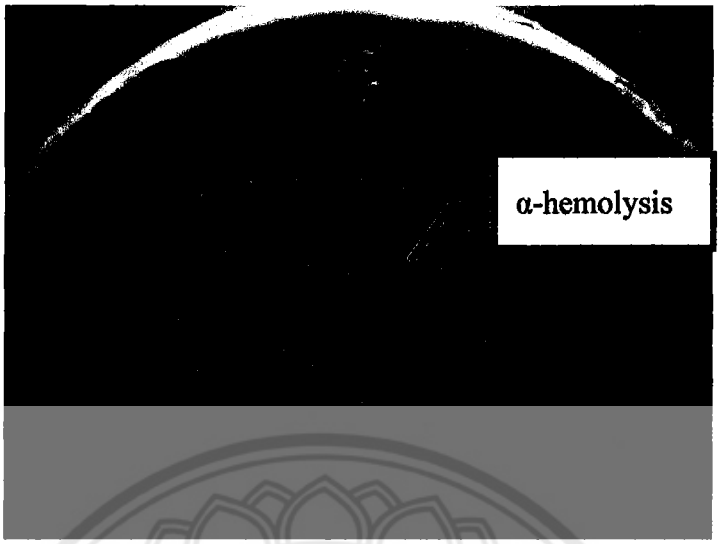
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ภาพเชื้อจากผลการทดลองและผลิตภัณฑ์แหนม

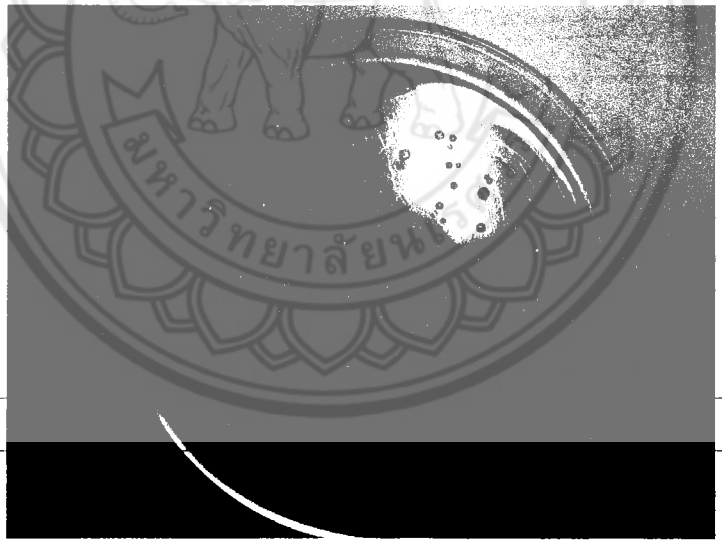


ภาพ ก-1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus suis* บนอาหาร selective medium(บ่มไว้ 2 วัน) ที่แยกได้จากแหนม ในกระบวนการหมักที่ 0 ชั่วโมง

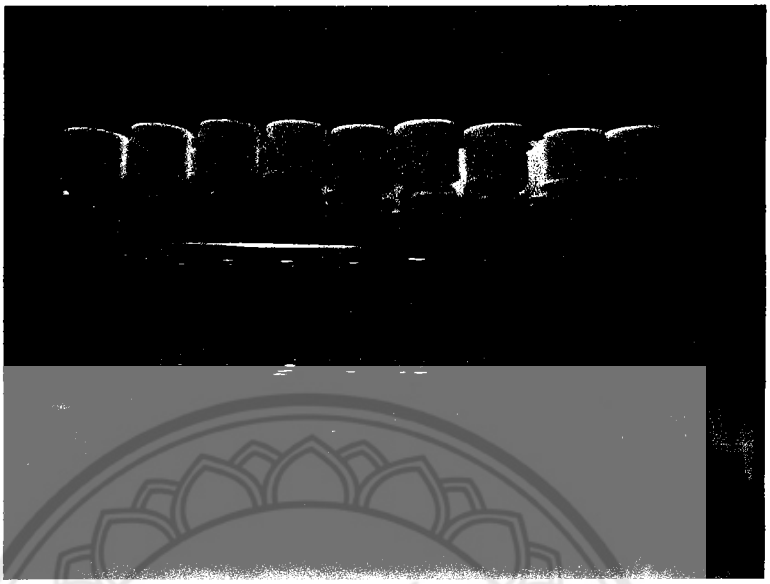
ภาพ ก-2 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหาร selective medium (Rosendal S., 1986) ที่แยกได้จากหมูบดในขั้นตอนการสำรวจหาเชื้อ *Streptococcus suis*



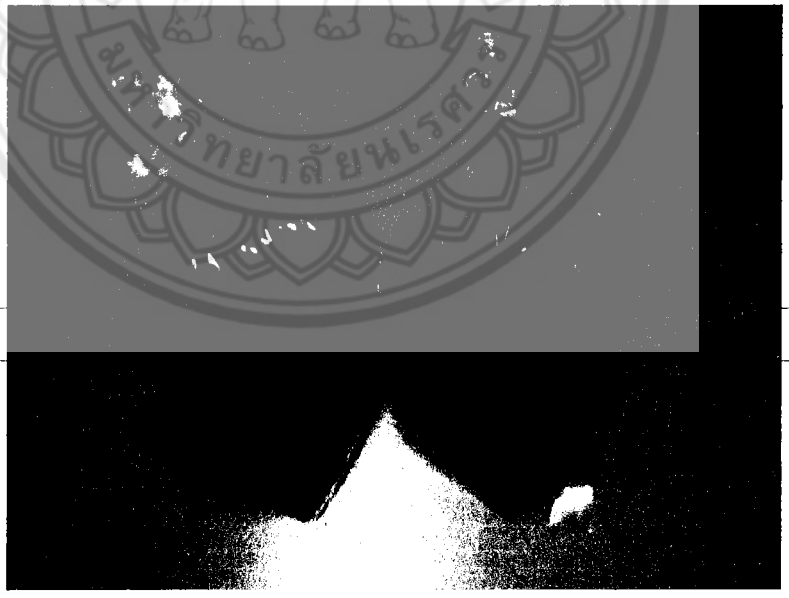
ภาพ ก-3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Streptococcus suis* บนอาหาร Blood agar



ภาพ ก-4 ลักษณะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar



ภาพ ก-5 แสดงผลของการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptococcus suis*



ภาพ ก-6 ลักษณะของแหนมที่กระบวนการหมัก 27 ชั่วโมง(ด้านซ้าย) และแหนมที่กระบวนการหมัก 0 ชั่วโมง(ด้านขวา)

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา

การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติค

นำตัวอย่าง 25 กรัม มาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:9 และนำมา spread plate บนอาหาร MRS agar และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การนับจำนวนเชื้อ *S. suis*

นำตัวอย่าง 25 กรัม มาเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:9 และนำมา spread plate บนอาหาร Selective agar (Colistin – Oxolinic acid – Crystal violet blood agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นับจำนวนโคโลนีที่เหมือนหรือคล้าย *S. suis* คือ ลักษณะโคโลนีกลม สีเทา ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบแอลฟา จากนั้นเลือกสุ่มโคโลนีมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 10% ของโคโลนีที่เหมือน แต่ถ้าสุ่มมาได้ไม่ถึง 10 โคโลนี ต้องทำการเลือกโคโลนีที่เหมือนทั้งหมดมาทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การคำนวณปริมาณเชื้อ ยกตัวอย่างเช่น ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-5} มีโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *S. suis* อยู่ 120 โคโลนี สุ่มโคโลนีมาทดสอบ 12 โคโลนี มีโคโลนีที่ให้ผลทางชีวเคมีตรงกับ *S. suis* อยู่ 6 โคโลนี

วิธีคำนวณ โคโลนีทั้งหมด 12 โคโลนี เป็นเชื้อ *S. suis* 6 โคโลนี

ถ้าโคโลนีมี 120 โคโลนี จะเป็นเชื้อ *S. suis* (6/12)*120 = 60 โคโลนี

ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-5} มีเชื้อ *S. suis* อยู่ 60 โคโลนี

ดังนั้นในตัวอย่างจะมีเชื้อ *S. suis* อยู่ $6 * 10^{7}$ cfu/g

ตารางที่ ข-1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่ม Streptococci

Bacteria	Hemolysis	ชีวเคมี											
		fermentation											
		Trehalose	Sorbitol	Mannitol	Salicin	Lactose	Raffinose	Inulin	Esculin	Sodium hippurate	6.5%NaCl+BHI	Catalase	Oxidase
Streptococcus pyogenes	β, α	+	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S. agalactiae	β, α, γ	+	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-	-
S.dysgalactiae	β, α, γ	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S. Dysgalactiae subsp. equisimilis	β	+	-	-	(+)	V	-	-	-	-	-	-	-
S. equi subsp. Equi	β	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S.equi subsp. Zooeqidemicus	β	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
S. bovis	α	V	-	V	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S. equinus	α	V	-	-	(+)	-	+	+	+	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	β, α, γ	+	+	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-
S. uberis	α, γ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	(+)	-	-
S. suis	α	+	-	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	-
S. pneumoniae	α	+	-	-	V	+	+	+	(+)	-	-	-	-
S. porcinus	β	+	+	+	+	(+)	-	-	+	-	+	-	-
Enterococcus avium	α, γ	+	+	+	+	+	-	-	+	V	(+)	-	-

(+), Majority of strains positive; V, variable reaction

ที่มา Carter and Cole,1990

การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

การวิเคราะห์หาค่า pH

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จนละเอียด นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายที่มี pH เท่ากับ 4.01 และ 7.00 ตามลำดับแล้ว

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายมาหยดฟีนอล์ฟทาลีน 2 – 3 หยด ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N จนถึงจุดยุติ (สีชมพู่อ่อน)

การคำนวณ

สูตร Acidity (as lactic acid) = $\frac{\text{ความเข้มข้น NaOH X มล. ของ NaOH X 0.0098 X 100}}{\text{ตัวอย่าง}}$

หมายเหตุ 1 มล. ของ 0.1 N NaOH

Citric acid	=	0.0070
Acetic acid	=	0.0060
Malic acid	=	0.0067
Tartaric acid	=	0.0075
Lactic acid	=	0.0098

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

1 การทดสอบ Catalase test

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3 %H_2O_2) (Catalase Reagent)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- สไลด์สะอาด

วิธีการ

1. ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีของเชื้อแตะลงบนสไลด์ที่สะอาด
2. หยด 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% H_2O_2) ลงบนสไลด์บริเวณที่แตะเชื้อลงไป
3. สังเกตดูฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายใน 10 วินาที

การอ่านผลการทดสอบ

ผลบวก : มีฟองอากาศเกิดขึ้น บันทึกผลเป็น +

ผลลบ : ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น บันทึกผลเป็น -

2 การทดสอบ Oxidase test

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Oxidase reagent

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- สไลด์สะอาด
- กระดาษกรองขนาดประมาณ 1 x 1 ซม.

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองขนาดประมาณ 1 x 1 ซม. บนสไลด์ที่สะอาด
2. หยด Oxidase reagent ลงบนกระดาษกรอง
3. ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อแตะลงบนกระดาษกรองบริเวณที่หยดสารทดสอบ
4. สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีบนกระดาษกรองภายในเวลา 10 วินาที

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดสีม่วงบริเวณที่แตะเชื้อบนกระดาษกรอง บันทึกผลเป็น +

ผลลบ : ไม่มีสีม่วงเกิดขึ้นบริเวณที่แตะเชื้อ บันทึกผลเป็น _

3 การทดสอบ Esculin Test

เลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Esculin Agar Slant

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- ตู้บ่ม 37± 1 องศาเซลเซียส
- Rack
- ตะเกียงบุนเสน

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อลงในหลอดอาหาร Esculin Agar โดย streak บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนที่เป็น Slant
2. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดตะกอนสีดำในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลเป็น +

ผลลบ : ไม่เกิดตะกอนสีดำในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลเป็น -

4 การทดสอบ Hippurate Hydrolysis test

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 1 % Sodium Hippurate
- Ninhydrin Reagent

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- ตู้บ่ม 37± 1 องศาเซลเซียส
- Rack

- ตะเกียงบุนเสน

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ในสารละลาย 1% Sodium Hippurate
2. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง
3. หยดสาร Ninhydrin Reagent ลงในหลอดที่เพาะเชื้อ ประมาณ 5 หยด โดยไม่ต้องเขย่า
4. นำเข้าไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที

การอ่านผล

ผลบวก : เกิดสีน้ำเงินเข้มบนผิวของสารละลาย บันทึกผลเป็น +

ผลลบ : ไม่มีสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นบนผิวของสารละลายหรือมีสีเหลืองอ่อนๆบันทึกผลเป็น -

5 การทดสอบการเจริญของเชื้อใน 6.5 %NaCl ใน Brain Heart Infusion broth(BHI+6.5 %NaCl)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- BHI+6.5 %NaCl

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- ตู้บ่ม 37± 1 องศาเซลเซียส
- Rack
- ตะเกียงบุนเสน

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI+6.5 %NaCl
2. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก : มีการเจริญของเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น บันทึกผลป็น +

ผลลบ : ไม่มีการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น บันทึกผลป็น -

6 การทดสอบ Carbohydrate Fermentation test

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Cystein tryptic agar + 1% น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น glucose,lactose

เครื่องมือและอุปกรณ์

- ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- ตู้บ่ม 37± 1 องศาเซลเซียส
- ตะเกียงบุนเสน

วิธีการ

1. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อตามชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบ เช่น กลูโคส แลคโตส
2. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก (+) : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

ผลลบ (-) : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือมีสีส้ม- แดง

การเตรียมสารเคมี

1.Catalase Reagent (3% H_2O_2)

สารเคมีที่ใช้

- Hydrogen peroxide 30%

วิธีเตรียม

1. ตวง Hydrogen peroxide 30% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ลงใน Hydrogen peroxide 30% ผสมให้เข้ากัน เทสารที่ได้เก็บในขวดสีชาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2.MacFarland

สารเคมีที่ใช้

- 0.048 M Barium chloride ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- 0.36 N Sulfuric acid (H_2SO_4)

<u>วิธีเตรียม</u>

1. เตรียม 0.048 M Barium chloride โดยใช้ Barium chloride 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. เตรียม 0.36 N Sulfuric acid ตวง Sulfuric acid ปริมาตร 1.96 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 98.04 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เตรียมส่วนผสมของ 0.048 M Barium chloride และ 0.36 N Sulfuric acid ตาม MacFarland Number ที่ต้องการ ดังตาราง

MacFarland No. / สารเคมี	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.048 M Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
0.36 N Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density ($\times 10^8$/ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

นำสารที่เตรียมได้บรรจุในหลอดทดลองพร้อมทั้งติดป้ายชี้บ่งสารละลาย แล้วเก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง

3.Ninhydrin Reagent

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

- Ninhydrin 3.5 กรัม
- Acetone 50 มิลลิลิตร
- Butanol 50 มิลลิลิตร

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ใช้ Ninhydrin หนัก 3.5 กรัม

2. ตวง Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ Butanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำ Ninhydrin ใส่ในสารละลายที่เตรียมได้ ผสมให้เข้ากัน
4. เก็บสารละลายในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

4.Oxidase Reagent

สารเคมีที่ใช้

- N,N,N,N',N' – tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride 0.5 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ใช้N,N,N,N',N'– tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride หนัก 0.5 กรัม
2. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับ N,N,N,N',N' – tetramethyl-1,4-phenylenediamine dihydrochloride
3. .เก็บสารละลายในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BA)

อาหารและสารเคมีที่ใช้

- Columbia Blood agar base (Merck)
- Defibrinated blood

วิธีการเตรียม

1.ละลาย Columbia Blood agar base 39 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
2.ต้มให้เดือดจนละลาย และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.8 ± 0.2
3.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4.นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส
5.เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส เติม Defibrinated blood ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (5%) ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากัน เทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 6.8 ± 0.2

2.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI)

<u>อาหารและสารเคมีที่ใช้</u>

- Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)

<u>วิธีการเตรียม</u>

1.ละลาย Brain Heart Infusion Broth ในอัตราส่วน 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.นำไปอุ่นจนผงอาหารละลาย และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ด้วยกรดแลคติก และ 0.1N NaOH

3.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร

4.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน

3.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth with 6.5% NaCl (BHI+6.5%NaCl)

<u>อาหารและสารเคมีที่ใช้</u>

-Brain Heart Infusion Broth (Oxoid)

-Sodium Chloride Bacteriological (Oxoid)

<u>วิธีการเตรียม</u>

1.ละลาย Brain Heart Infusion Broth 37 กรัม และ Sodium Chloride Bacteriological 65 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.นำไปอุ่นจนละลายและปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 7.4±0.2

3.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร

4.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 7.4±0.2

4.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Colistin–Oxolinic acid–Crystal violet blood agar (modifile จาก Petts N.D.)

อาหารและสารเคมีที่ใช้

-Columbia Blood agar base (Oxoid)

- Defibrinated blood

- 10 mg/ml colistin

- 5 mg/ml Oxolinic acid

- 20 mg/ml Crystal violet

วิธีการเตรียม

1.ละลายผงอาหาร Columbia Blood agar base อัตราส่วน 39 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.ต้มให้เดือดจนละลาย และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 6.8 ± 0.2

3.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส

5.เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส เติม 10 mg/ml, 5 mg/ml Oxolinic acid และ 20 mg/ml Crystal violet ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.เติม Defibrinated blood ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (5%) ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากัน เทอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.วัดค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 6.8 ± 0.2

5.การเตรียม 1% Hippurate

อาหารและสารเคมีที่ใช้

- Hippuric acid sodium salt hydrate (Fluka)

วิธีการเตรียม

1.ละลาย Hippuric acid sodium salt hydrate ในอัตราส่วน 1 กรัมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร

2.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.เก็บสารละลาย 1% Hippurate ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ ≤-18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

6.การเตรียม Mist desiccant

อาหารและสารเคมีที่ใช้

- D(-)Glucose anhydrous (Fluka)
-Peptone form soymeal (Merck)
- Inactivate Horse serum

วิธีการเตรียม

1.ละลาย D(-)Glucose anhydrous 30.0 กรัม และ Peptone form soymeal 1.3 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.นำไปอุ่นจนละลาย ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 7.0±0.2

3.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 1 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.เมื่อจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อให้ใส่ Inactivate Horse serum ลงในหลอด Mist desiccant ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

5.วัดค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 7.0 ± 0.2

7.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbohydrate fermentation test (น้ำตาลชนิดต่างๆ)

อาหารและสารเคมีที่ใช้

-Cystine tryptic Agar
- น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่
D(-)Mannitol,
D(+)Raffinose Pentahydrate,

D(+)Trehalose Dihydrate,

D(+)Sorbitol,

Inulin From Chicory (Sigma),

D(-)Salicin

วิธีเตรียม

1.ละลาย Cystine tryptic Agar 28.5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตรและน้ำตาลที่ต้องการเตรียม 10 กรัม(น้ำตาล 1%)

2.นำไปอุ่นจนละลายและปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 7.3±0.2

3.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร

4.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.วัดค่าความเป็นกรด–ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 7.3±0.2

8.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective medium (Rosendal S.,1986)

อาหารและสารเคมีที่ใช้

- Tryptic Soy Broth
- Agar bacteriological
- Defibrinated blood
- 20 mg/ml gentamicin
- 50 mg/ml nalidixic acid
- 20 mg/ml Crystal violet

วิธีการเตรียม

1.ละลายผงอาหาร Tryptic Soy Broth และ Agar bacteriological อัตราส่วน 30 กรัม และ 10 กรัม ตามลำดับ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.ต้มให้เดือดจนละลาย

3.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส

5.เมื่ออาหารมีอุณหภูมิ 44-47 องศาเซลเซียส เติม 20 mg/ml gentamicin, 50 mg/ml nalidixic acid, 20 mg/ml Crystal violet ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ผสมให้เข้ากัน

6.เติม Defibrinated blood ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (5%) ลงในอาหาร ผสมให้เข้ากัน เทอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.วัดค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้งาน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปใช้เท่ากับ 6.8 ± 0.2

9.การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Esculin Agar (modifier BAM media M53)

อาหารและสารเคมีที่ใช้

-Brain Heart Infusion broth

- Agar bacteriological

- Esulin

- Ferric citrate

วิธีการเตรียม

1.ละลายผงอาหาร Brain Heart Infusion broth , Agar bacteriological, Esculin และ Ferric citrate ในอัตราส่วน 37 กรัม 10 กรัม 1 กรัม และ 0.5 กรัม ตามลำดับ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.ต้มให้เดือดจนละลาย

3.เมื่ออาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 7.0±0.2

4.แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดแก้วหลอดละ 3 มิลลิลิตร

5.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. หลังการนึ่งฆ่าเชื้อนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมาวางให้ผิวหน้าอาหารลาดเอียง (slant) ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค ผลการทดลอง

ตาราง ค-1 ปริมาณเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth ที่มีพีเอชต่างๆ

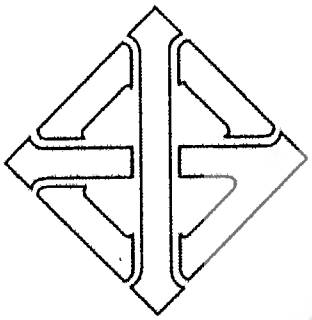
pH	ปริมาณเชื้อ *S. suis* CCUG 7984 (Log cfu/g)				
	0 นาที	90 นาที	180 นาที	270 นาที	360 นาที
4.2	5.59±0.30	0	0	0	0
4.4	5.59±0.30	0	0	0	0
4.6	5.59±0.30	0	0	0	0
4.8	5.59±0.30	0	0	0	0
5.0	5.59±0.30	0	0	0	0
5.2	5.59±0.30	0	0	0	0
5.4	5.59±0.30	3.28±0.25	1.43±0.20	0	0
5.6	5.59±0.30	5.23±0.26	4.84±0.30	4.56±0.23	4.08±0.25
5.8	5.59±0.30	5.42±0.31	5.08±0.42	4.83±0.40	4.76±0.31

ตาราง ค-2 ปริมาณเชื้อ *S. suis* แบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมที่ไม่ได้เติมเชื้อ *S. suis* CCUG 7984

ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	*S. suis* (Log cfu/g)	แบคทีเรียกรดแลคติก (Log cfu/g)	ค่าพีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ)
0	0	5.00±0.17	5.84±0.06	0.03±0.04
3	0	5.26±0.21	5.67±0.04	0.04±0.02
6	0	7.41±0.16	5.48±0.02	0.11±0.01
9	0	7.97±0.11	5.20±0.03	0.15±0.04
12	0	8.00±0.14	5.01±0.09	0.20±0.04
18	0	8.02±0.18	4.85±0.03	0.26±0.07
24	0	8.83±0.15	4.71±0.03	0.28±0.06
27	0	8.99±0.16	4.59±0.06	0.33±0.06

ตาราง ค-3 ปริมาณเชื้อ *S. suis* แบคทีเรียกรดแลคติก ค่าพีเอช และปริมาณกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมที่เติมเชื้อ *S. suis* CCUG 7984

ระยะเวลาการหมัก(ชั่วโมง)	*S. suis* (Log cfu/g)	แบคทีเรียกรดแลคติก (Log cfu/g)	ค่าพีเอช	ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ)
0	6.27±0.12	5.24±0.19	5.69±0.05	0.04±0.02
3	5.71±0.11	5.62±0.12	5.63±0.03	0.06±0.05
6	2.68±0.07	7.60±0.18	5.42±0.03	0.11±0.07
9	0	7.98±0.20	5.14±0.04	0.19±0.09
12	0	7.99±0.16	4.97±0.03	0.24±0.10
18	0	8.06±0.14	4.73±0.03	0.28±0.03
24	0	8.91±0.13	4.48±0.03	0.36±0.04
27	0	9.08±0.17	4.44±0.03	0.43±0.07



มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

THAI INDUSTRIAL STANDARD

มอก. 1219 – 2547

แหนม

NAEM (FERMENTED GROUND PORK)

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

กระทรวงอุตสาหกรรม

ICS 67.120.10 ISBN 974- 9683-43-9

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

แหนม

มอก. 1219 – 2547

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
กระทรวงอุตสาหกรรม ถนนพระรามที่ 6 กรุงเทพฯ 10400
โทรศัพท์ 0 2202 3300

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 121 ตอนที่ 112ง
วันที่ 23 ธันวาคม พุทธศักราช 2547

คณะกรรมการวิชาการคณะที่ 285
มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เนื้อ

ประธานกรรมการ	
นางมาลัยวรรณ อารยะสกุล	ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางสุจินต์ ศรีคงศรี	กรมวิทยาศาสตร์บริการ
นายประกาย บริบูรณ์	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
นางสาวทิพยา ปาณะโตษะ	สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
นายชัยณรงค์ คันธพนิต	ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
นางสาวเพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์	กรมปศุสัตว์
นางกาญจนารัตน์ ทวีสุข	สมาคมมาตรฐานไทย
นางสมใจ วิชัยดิษฐ์	สภาสตรีแห่งชาติ ในพระบรมราชินูปถัมภ์
นางสาวเรวดี จรรยาพูน	บริษัท อุตสาหกรรมอาหาร ส.ขอนแก่น จำกัด (มหาชน)
นายพรศักดิ์ ศรีสยาม	บริษัท ไทยเยอรมันมีทโปรดักท์ จำกัด
นางสาวชลิตา กลัดนิ่ม	บริษัท ซี.พี. อินเตอร์ฟูดส์ จำกัด
กรรมการและเลขานุการ	
นางเสาวลักษณ์ ทองสถิตย์	สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแหนม นี้ ได้ประกาศใช้ครั้งแรกเป็นมาตรฐานเลขที่ มอก.1219-2532 ในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 111 ตอนที่ 63ง วันที่ 9 สิงหาคม พุทธศักราช 2537

ต่อมาได้พิจารณาเห็นสมควรแก้ไขปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแหนม เพื่อส่งเสริมอุตสาหกรรมประเภทนี้ และเป็นแนวทางในการผลิตให้อยู่ในระดับมาตรฐานเดียวกัน จึงได้แก้ไขปรับปรุงโดยยกเลิกมาตรฐานเดิมและกำหนดมาตรฐานขึ้นใหม่

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยผลการวิเคราะห์จากกรมปศุสัตว์ข้อมูลจากผู้ทำและเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

มอก.34 ข้อปฏิบัติแนะนำระหว่างประเทศ : หลักการทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหาร

Official Methods of Analysis of AOAC International 17th Edition, 2000

Compendium of Methods for the Examination of Food 4th Edition, 2001

Modern Food Analysis. F.L Hart and H.J.Fisher, Springer-Verlag, New York, 1991

คณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมได้พิจารณามาตรฐานนี้แล้ว เห็นสมควรเสนอรัฐมนตรีประกาศตามมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม

ฉบับที่ 3299 (พ.ศ. 2547)

ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

พ.ศ. 2511

เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

แหนม

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม แหนม มาตรฐานเลขที่ มอก. 1219-2537

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 15 แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรมออกประกาศยกเลิกประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 1979 (พ.ศ.2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ.2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม แหนม ลงวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2537 และออกประกาศกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม แหนม มาตรฐานเลขที่ มอก. 1219-2547 ขึ้นใหม่ ดังมีรายการละเอียดต่อท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ให้มีผลนับแต่วันที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 4 พฤศจิกายน พ.ศ. 2547

พงศักดิ์ รักตพงศ์ไพศาล

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงอุตสาหกรรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

แหนม

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ครอบคลุมเฉพาะแหนมที่ผลิตจากเนื้อหมูเป็นส่วนใหญ่ และหนังหมู อาจผสมหูหมู หรือจมูกหมูด้วยก็ได้

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 แหนม (naem หรือ fermented ground pork) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อหมู และหนังหมู อาจมีหูหมู จมูกหมูอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่างผสมอยู่ แล้วเติมเครื่องปรุง ห่อเป็นมัดหรือบรรจุในภาชนะบรรจุ หมักจนได้รสเปรี้ยว อาจนำไปฉายรังสีด้วยก็ได้

2.2 แหนมฉายรังสี หมายถึง แหนมที่ผ่านการฉายรังสี แกมมาไม่เกิน 7 กิโลเกรย์

3. ส่วนประกอบ

3.1 ส่วนประกอบหลัก

3.1.1 เนื้อหมูไม่น้อยกว่าร้อยละ 52 และต้องเป็นเนื้อหมูที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ที่ถูกต้องตามกฎหมาย

3.1.2 หนังหมู ไม่เกินร้อยละ 40

3.1.3 เครื่องปรุง เช่น เกลือบริโภค กระเทียม ข้าวสุก

3.2 ส่วนประกอบอื่นที่อาจมี

3.2.1 หูหมู จมูกหมู รวมกับหนังหมูแล้วไม่เกินร้อยละ 40

3.2.2 พริกสด

3.2.3 น้ำตาล

4. คุณลักษณะที่ต้องการ

4.1 ลักษณะทั่วไป

แหนมต้องมีเนื้อแน่นและคงรูป ส่วนประกอบต่าง ๆ ต้องผสมกันอย่างทั่วถึง มีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนมที่พร้อมบริโภค มีกลิ่นและรสดี ปราศจากกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 10.1 แล้ว ต้องได้คะแนนจากผู้ตรวจสอบแต่ละคนในแต่ละลักษณะไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และต้องได้คะแนนรวมของทุกลักษณะไม่น้อยกว่า 12 คะแนน

4.2 สิ่งแปลกปลอม

ต้องปราศจากสิ่งแปลกปลอม เช่น ผม ขน (ยกเว้นขนที่ฝังอยู่ในหนังหมู) กระดูก (ยกเว้นกระดูกอ่อนของใบหู)

การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.3 โปรตีน

ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 20

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 39.1.19

4.4 ไขมัน

ต้องไม่เกินร้อยละ 8

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 39.1.05

4.5 ความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อถึงกำหนดวัน เดือน ปี ที่ควรบริโภคต้องไม่เกิน 4.6

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 28.1.28

5. วัตถุเจือปนอาหาร

ห้ามใช้วัตถุเจือปนอาหารอื่นใด นอกจากชนิดและปริมาณที่กำหนดต่อไปนี้

5.1 ฟอสเฟตในรูปของโมโน-ได- และพอลิของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันในผลิตภัณฑ์สำเร็จ (คำนวณจากฟอสฟอรัสทั้งหมดในรูป P_2O_5) ให้ใช้ได้ไม่เกิน 3 000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 39.1.12

5.2 โซเดียมหรือโพแทสเซียมไนเทรตให้ใช้ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือโซเดียมหรือโพแทสเซียมไนไทรต์ ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ถ้าใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมไนเทรตและโซเดียมหรือโพแทสเซียมไนไทรต์รวมกันต้องให้ใช้ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 39.1.20

5.3 สี

ต้องไม่เจือสีใด ๆ

การทดสอบให้ปฏิบัติตาม Modern Food Analysis โดย F.L. Hart and H.J. Fisher, Springer-Verlag, New York, 1991 หน้า 444 และหน้า 445

6. สุขลักษณะ

6.1 สุขลักษณะให้เป็นไปตาม มอก.34

6.2 จุลินทรีย์ที่อาจมีในแหนมต้องไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนดดังต่อนี้

6.2.1 ซาลโมเนลลา (Salmonella) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.9.01 ถึงข้อ 17.9.03

6.2.2 สตาฟิโลค็อกคัล ออเรียส (Staphylococcus aureus) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.5.02

6.2.3 คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 17.7.02

6.3 พยาธิทริคิเนลลา สไปราลิส (Trichinella spiralis) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตามข้อ 10.2

6.4 เชื้อรา ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
การทดสอบให้ปฏิบัติตาม COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS 4TH EDITION 2001

7. การบรรจุ

7.1 วัสดุที่ใช้ห่อหุ้มแหนม ต้องเป็นวัสดุจากธรรมชาติหรือวัสดุอื่นใดที่สะอาด ห่อหุ้มได้เรียบร้อย และป้องกันสิ่งปนเปื้อนได้ ในกรณีที่เป็นวัสดุอื่นส่วนที่สัมผัสกับแหนม ต้องไม่มีสี หรือสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ

7.2 หากมิได้กำหนดไว้เป็นอย่างอื่น น้ำหนักสุทธิของแหนมในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องเป็น 80 กรัม 100 กรัม 150 กรัม 200 กรัม 240 กรัม 250 กรัม 270 กรัม และต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

8. เครื่องหมายและฉลาก

8.1 ที่ภาชนะบรรจุแหนมทุกหน่วยอย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(1) ชื่อผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานนี้

(2) วัน เดือน ปีที่ควรบริโภค และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ

(3) วัตถุเจือปนอาหาร (ถ้ามี)

(4) ข้อความว่า "ผ่านการฉายรังสี" และแสดงเครื่องหมายและรายละเอียดการฉายรังสีตามภาคผนวก ก. (ในกรณีที่ฉายรังสี)

(5) น้ำหนักสุทธิ เป็นกรัม

(6) ข้อแนะนำการเก็บรักษาและบริโภค

(7) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ หรือชื่อผู้จัดจำหน่าย พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

(8) ประเทศที่ทำ
ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

9. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

9.1 การชักตัวอย่างและเกณฑ์ที่ตัดสินให้เป็นไปตามภาคผนวก ก. ให้ไว้เป็นเพียงข้อแนะนำ

10. การทดสอบ

10.1 ลักษณะทั่วไป

10.1.1 ให้ตรวจสอบในวัน เดือน ปีที่ควรบริโภค ตามที่ระบุไว้ที่ฉลาก

10.1.2 วิธีตรวจสอบ

10.1.2.1 คณะผู้ตรวจสอบประกอบด้วยผู้มีความชำนาญในการตรวจสอบแหนมอย่างน้อย 5 คน ทุกคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

10.1.2.2 หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 หลักเกณฑ์การให้คะแนน
(ข้อ 10.1.2.2)

สมบัติที่ตรวจสอบ	ระดับการตัดสิน	คะแนนที่ได้
ลักษณะเนื้อ	เนื้อแน่น คงรูป เนื้อและหนังผสมกันอย่างทั่วถึง	5
	เนื้อแน่น คงรูป เนื้อและหนังผสมกันไม่ค่อยทั่วถึง	4
	เนื้อไม่แน่น คงรูป เนื้อและหนังผสมกันไม่ทั่วถึง มีรอยแยกหรือแตกภายในเนื้อ	3
	เนื้อไม่แน่น ไม่คงรูป เนื้อและหนังผสมกันไม่ทั่วถึง	2
	เนื้อยุ่ย และไม่คงรูป	1
กลิ่นและรส	กลิ่นหอมชวนรับประทาน รสเปรี้ยวพอดี	5
	กลิ่นหอมปานกลาง รสเปรี้ยวพอดี	4
	กลิ่นหอมเล็กน้อย รสเปรี้ยวพอดี	3
	กลิ่นบูดหรือคาวเล็กน้อย รสเปรี้ยวมาก	2
	กลิ่นและรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับ	1
สี	สีชมพูของไนโตรโซฮีโมโครม	5
	สีซีดหรือจางหรือเข้มไปเล็กน้อย	4
	สีซีดหรือจางหรือเข้ม	3
	สีคล้ำค่อนข้างเขียว	2
	สีเขียวคล้ำมาก	1

10.2 พยาธิทริคิเนลลา สไปราลิส

10.2.1 เครื่องมือ

10.2.1.1 เครื่องบดไฟฟ้า

10.2.1.2 กล้องทริคิโนสโกป (Trichinoscope) หรือกล้องสเตอริโอไมโครสโกป (Stereomicroscope)

10.2.2 สารเคมี

10.2.2.1 เพปซิน (1:12 500)

10.2.2.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 + 3

10.2.3 วิธีตรวจสอบ

บดตัวอย่าง 100 กรัมกับน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องบดไฟฟ้าจนละเอียด ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 3 ลูกบาศก์เดซิเมตร เติมเพปซิน 10 กรัม น้ำกลั่นอุ่นอุณหภูมิ 46 ถึง 48 องศาเซลเซียส 2 ลูกบาศก์เดซิเมตร แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 16 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำบีกเกอร์ตั้งบนแท่นให้ความร้อน ซึ่งมีแท่งแม่เหล็กสำหรับคน ควบคุมอุณภูมิที่ 44 ถึง 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรู 0.18 มิลลิเมตร ลงในกรวยแยก ตั้งไว้ 30 นาที ให้ตกตะกอน ไขส่วนล่างมา 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งไว้อีก 10 นาที ให้ตกตะกอนอีกครั้งหนึ่ง ใช้ไซริงค่อย ๆ ดูดส่วนบนออกทิ้ง 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทตะกอนที่เหลือทั้งหมดลงจานแก้ว นำไปส่องกล้องทริคิโนสโกปหรือกล้องสเตอริโอไมโครสโกป ตรวจหาพยาธิทริคิเนลลาสไปราลิส

ภาคผนวก ก.

การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

(ข้อ 9.1)

ก.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง แหนมที่มีส่วนประกอบอย่างเดียวกัน ทำโดยกรรมวิธีเดียวกัน มีลักษณะการบรรจุห่อหุ้มหรือผูกมัดและขนาดเดียวกัน และทำในคราวเดียวกัน

ก.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้ หรืออาจใช้แผนการชักตัวอย่างอื่นที่เทียบเท่ากันทางวิชาการกับแผนที่กำหนดไว้

ก.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบการบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

ก.2.1.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันตามจำนวนที่กำหนดในตารางที่ 1 นำไปทดสอบเครื่องหมายและฉลากก่อน แล้วจึงทดสอบการบรรจุ

ก.2.1.2 จำนวนตัวอย่างที่ไม่เป็นไปตามข้อ 7. ต้องไม่เกินเลขจำนวนที่ยอมรับที่กำหนดในตารางที่ 1 และตัวอย่างทุกตัวอย่างต้องไปเป็นตามข้อ 8. จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 1 แผนการชักตัวอย่างสำหรับการทดสอบการบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก

(ข้อ ก.2.1)

ขนาดรุ่น หน่วยภาชนะบรรจุ	ขนาดตัวอย่าง หน่วยภาชนะบรรจุ	เลขจำนวนที่ยอมรับ
ไม่เกิน 280	2	0
281 ถึง 1 200	8	1
ตั้งแต่ 1 201 ขึ้นไป	13	2

หมายเหตุ ในกรณีที่มีการผูกมัดหรือบรรจุรวม หน่วยภาชนะบรรจุ หมายถึง พวง ถุงใหญ่ หรือกล่อง

ก.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป และสิ่งแปลกปลอม

ก.2.2.1 ให้ชักตัวอย่างที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดข้อ ก.2.1 ทุกภาชนะบรรจุ ในปริมาณเท่า ๆ กัน ให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 500 กรัม ในกรณีที่ตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันเพิ่มเติมจนได้น้ำหนักตามต้องการ

ก.2.2.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.1 และข้อ 4.2 จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบโปรตีน ไขมัน และวัตถุเจือปนอาหาร

ก.2.3.1 ให้ชักตัวอย่างที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดข้อ ก.2.1 แล้วทุกภาชนะบรรจุ ในปริมาณเท่า ๆ กัน ให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 1 000 กรัม ในกรณีที่ตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันเพิ่มเติมจนได้น้ำหนักตามต้องการ

ก.2.3.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 4.3 ข้อ 4.4 และข้อ 5. จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับสำหรับการทดสอบจุลินทรีย์และพยาธิ

ก.2.4.1 ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 5 หน่วยภาชนะบรรจุ แล้วทำเป็นตัวอย่างรวม

ก.2.4.2 ตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 6.2 และ 6.3 จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ก.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างแหนมต้องเป็นไปตามข้อ ก.2.1.2 ข้อ ก.2.2.2 ข้อ ก.2.3.2 และข้อ ก.2.4.2 ทุกข้อ จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้

มหาวิทยาลัยนเรศวร

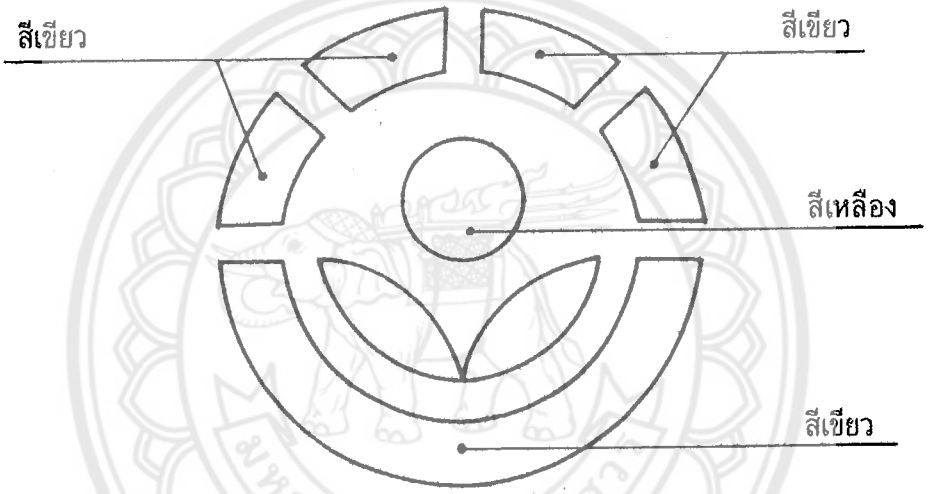
ภาคผนวก ข.

เครื่องหมายและรายละเอียดการฉายรังสี

(ข้อ 8.1(4))

ข.1 รายละเอียดและรูปแบบของเครื่องหมายซึ่งแสดงว่าแหนมนี้ได้ผ่านการฉายรังสีแล้ว มีดังนี้

(1) เครื่องหมายแสดงว่าได้ผ่านการฉายรังสีแล้ว ดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 เครื่องหมายแสดงว่าได้ผ่านการฉายรังสีแล้ว

(ข้อ ข.1(1))

(2) ชื่อและที่ตั้งของสำนักงานใหญ่ของผู้ฉายรังสี

(3) ข้อความว่า "ได้ผ่านการฉายรังสีเพื่อทำลายพยาธิและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแล้ว"

(4) วัน เดือน ปีที่ทำการฉายรังสี