สัญญาเลขที่ R2561B05

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

แนวทางการลดสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย

Guidelines for reducing carcinogen in Thai fermented meat product

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นางสาวอมรรัตน์ วันอังคาร	คณะเกษตรศาสตร์ฯ
2. นางสาววิลาสินี อินญาวิเลิศ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 7 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน 1049295
เลขเรียกหนังสือ จ PC
2๖๑
อ๒๘๑๑
๒๕๖๑

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2561

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) แนวทางการลดสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย

(ภาษาอังกฤษ) Guidelines for reducing carcinogen in Thai fermented meat product

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด

2.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: นางสาว อมรรัตน์ วันอังคาร

หน่วยงาน : คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ : โทรศัพท์/โทรสาร 0-5596-2704, 0-5596-2725

E-mail : amornrat.w@nu.ac.th

2.2 ผู้ร่วมวิจัย : นางสาววิลาสินี อินญาวิเลิศ

หน่วยงาน : คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ : โทรศัพท์/โทรสาร 0-5596-2704, 0-5596-2725

E-mail : wilasineei@nu.ac.th

3. ระยะเวลาทำการวิจัย วันที่ 9 ตุลาคม 2560 ถึง 30 เมษายน 2563

4. ความเป็นมา/ปัญหาในการวิจัย

องค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ (ไอเออาร์ซี) องค์การอนามัยโลก มีการรายงานว่าเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ไส้กรอก แฮม เบคอน นั้น มีสารก่อมะเร็งในระดับใกล้เคียงกับบุหรี่ แอลกอฮอล์ หรือสารหนู จากการวิจัยของสำนักงานวิจัยมะเร็งพบว่า ถ้าบริโภคไส้กรอก เบคอน หรือแฮม เป็นประจำทุกวัน แม้บริโภคเพียง 50 กรัมต่อวัน ก็สามารถเพิ่มความเสี่ยงเป็นมะเร็งลำไส้ถึง 18% เนื่องจากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปนิยมเติมโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) หรือโปแตสเซียมไนไตรท์ (KNO_2) สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีการตรวจพบการเจือปนของโซเดียมไนไตรท์ในแหนม ไก่ทอด หมูยอ ปลาเค็ม และปลาเค็มตากแห้งหวาน ซึ่งล่าสุดรายงานของมูลนิธิเพื่อผู้บริโภค เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2559 ระบุว่า จากการสุ่มตรวจสอบปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ 15 ยี่ห้อ พบว่ามีเพียงหนึ่งยี่ห้อเท่านั้นที่ตรวจไม่พบทั้งไนเตรทและไนไตรท์ นอกนั้นจำนวน 14 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 93.33 ใส่สารทั้งสองชนิด และมีจำนวน 3 ยี่ห้อที่ใส่สารไนเตรทหรือไนไตรท์เกินมาตรฐาน อย่างไรก็ตามการลดปริมาณไนไตรท์ในกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์หมักนั้นมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง อาทิเช่น การเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าการเติมกล้าเชื้อนั้นช่วยลดปริมาณไนไตรท์ที่เหลือในผลิตภัณฑ์ได้

5. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย

6. วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีขอบเขตที่จะศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย โดยตั้งเป้าหมายสำคัญที่ระดับของไนไตรท์ที่จะคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 0.07 ppm โดยการวิจัยนี้จะเริ่มจากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีในแหนมด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้านการสลายไนไตรท์ จากนั้นเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ค่าดีที่สุดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์

7. ผลการวิจัย/ข้อค้นพบ

การศึกษาวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมได้ 4 สายพันธุ์ คือ 1) *Enterococcus durans* 2) *Lactobacillus plantarum* 3) *Lactobacillus brevis* และ 4) *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ได้ถึง 70-80% ของปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น (120 ppm) ภายใน 72 ชั่วโมง ของการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นสามารถนำมาเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทยได้

แนวทางการลดสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย
Guidelines for reducing carcinogen in Thai fermented meat product

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยส่วนใหญ่ผลิตมาจากกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์หรือส่วนผสมอื่นๆ ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่คงที่และอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้น ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ลำดับเบสของ 16S ribosomal DNA ได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus durans, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis* และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งสามารถสลายไนไตรท์ได้ที่ร้อยละ 89.35, 79.11, 86.22 และ72.87 ตามลำดับ ทั้งนี้ระดับไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จะลดลงตลอดระยะเวลาของการหมักจนมีค่าต่ำที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก คือ 12.78-32.28 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้นั้นสามารถนำมาเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทยได้

คำสำคัญ: ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทย แบคทีเรียกรดแลคติก การสลายไนไตรท์

ABSTRACT

Many traditional Thai fermented meat products were naturally fermented, relying on the natural contamination by house flora resulting in products with inconsistent qualities and even unsafe products. The lactic acid bacteria species in Thai fermented sausage was identified by using molecular techniques and investigated their potential to reduce the nitrite content. The isolated strains were identified by sequencing 16S ribosomal DNA as *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, and *Pediococcus pentosaceus*. The nitrite degradation capacity in MRS broth, *E. durans*, *L. plantarum*, *L. brevis*, and *P. pentosaceus* could degrade 89.35%, 79.11%, 86.22% and 72.87% of the initial nitrite concentration, respectively. The nitrite concentration decreased throughout fermentation time and exhibited the lowest final value as 12.78-32.28 µg/ml at the third day. These results suggested that lactic acid bacteria isolates from Thai fermented sausage had showed a potential to be used as starter culture to reduce the residual nitrite in Thai fermented meat products.

Keywords: Thai fermented meat product, lactic acid bacteria, nitrite degradation

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)	ก
บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก	4
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)	5
2.3 กล้าเชื้อ (Starter culture)	7
2.4 แหล่งคาร์บอน (carbon source)	9
2.5 ไนไตรท์/ไนเตรท (Nitrite/ Nitrate)	11
2.6 สารไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amine)	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
3.1 การแยกและระบุสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	13
3.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของของแบคทีเรียกรดแลคติก	15
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย	16
4.1 ผลการดำเนินการวิจัย	16
4.2 วิจารณ์ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	21
5.1 สรุปผลการวิจัย	21
5.2 ข้อเสนอแนะ	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์คุณภาพของแหนม 5
ตารางที่ 2.2 แสดงกล้าเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการหมักไส้กรอก 10
ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลท และลักษณะเฉพาะของไอโซเลทที่แยกได้จาก แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากแหนม 17

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก ตามวิถีการสร้างกรด 7
ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเจือจางความเข้มข้น 13
ภาพที่ 3.2 เก็บตัวอย่างเชื้อไว้ในหลอดที่มีสารกลีเซอรอล 30% 13
ภาพที่ 3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการตรวจสอบขนาดและคุณภาพดีเอ็นเอ 14
ภาพที่ 4.1 (ก) ตรวจสอบขนาดและคุณภาพดีเอ็นเอจากแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel และ (ข) ผลิตภัณฑ์ 16S rDNA โดยช่อง M: MW marker; 1: *Enterococcus durans*; 2: *Lactobacillus plantarum*; 3: *Lactobacillus brevis* และ 4: *Pediococcus pentosaceus* 16
ภาพที่ 4.2 สารละลายไนไตรท์มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader 18
ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการสลายไนไตรท์ 18

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตอาหารมีการพัฒนาและก้าวหน้ามากขึ้น เพื่อตอบสนองความต้องการการบริโภคที่มีแนวโน้มสูงขึ้น เทคโนโลยีใหม่ๆ ถูกนำเข้ามาช่วยในการผลิตและการแปรรูปอาหารเพื่อบริโภคในประเทศ และการส่งออกมีมากขึ้น การแปรรูปและถนอมอาหารเป็นวิธีการอย่างหนึ่งที่จะช่วยในการเก็บรักษาอาหารให้คงสภาพอยู่ได้นาน โดยไม่เน่าเสีย สารเคมีต่าง ๆ หลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตและการแปรรูปอาหาร เพื่อให้การเก็บรักษาอาหารให้คงสภาพอยู่ได้นาน สารเหล่านี้ได้แก่ สีผสมอาหาร สารกันบูด สารบอแรกซ์ สารไนเตรทไนไตรท์ สารฟอกขาวหรือสารประกอบซัลไฟล์ เป็นต้น (แสงโฉม, 2555) ทั้งนี้สารประกอบไนไตรท์ และไนเตรทนั้นจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษอันตรายร้ายแรงและสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจนแล้ว สารไนไตรท์ (NO_2-) ยังรวมตัวกับรงควัตถุสีม่วงแดงในกล้ามเนื้อสัตว์ คือ ไมโอโกลบิน (myoglobin) ได้เป็น nitrosylmyoglobin ที่มีสีแดง และเมื่อปรุงเนื้อสัตว์ให้สุกด้วยความร้อน สารสีแดงนี้จะถูกเปลี่ยนเป็น nitrosylhemochrome ซึ่งให้สีชมพูที่คงตัว นอกจากนี้ไนไตรท์ยังช่วยลดการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เพราะไนไตรท์สามารถจับกับอิออนของเหล็กที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน หากผู้บริโภคได้รับไนไตรท์ในปริมาณที่สูงจะก่อให้เกิดภาวะอาการขาดออกซิเจน คือ มีอาการตัวเขียว เล็บเขียว หอบ เหนื่อย หัวใจเต้นแรง และอาจเสียชีวิตได้ เพราะไนไตรต์ จับตัวกับฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ในเลือดเกิดเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methaemoglobin) ทำให้ฮีโมโกลบินไม่สามารถจับตัวกับออกซิเจน (Pourazrang *et al*., 2002)

องค์การวิจัยมะเร็งนานาชาติ (ไอเออาร์ซี) องค์การอนามัยโลก มีการรายงานว่าเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ไส้กรอก แฮม เบคอน นั้น มีสารก่อมะเร็งในระดับใกล้เคียงกับบุหรี่ แอลกอฮอล์ หรือสารหนู จากการวิจัยของสำนักงานวิจัยมะเร็ง พบว่า ถ้าบริโภคไส้กรอก เบคอน แฮมเป็นประจำทุกวัน แม้บริโภคเพียง 50 กรัมต่อวัน ก็สามารถเพิ่มความเสี่ยงเป็นมะเร็งลำไส้ถึง 18% เนื่องจากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น แฮม เบคอน ไส้กรอก แหนม กุนเชียง เป็นต้น นิยมเติมโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) หรือโปแตสเซียมไนไตรต์ (KNO_2) สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2555 รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาของกระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีโซเดียมไนไตรท์ในปริมาณที่เกินกำหนดในไส้กรอกและกุนเชียง ถึงร้อยละ 16.4 และ 8.9 ของจำนวนตัวอย่างที่ถูกสุ่มตรวจ ตามลำดับ และตรวจพบการเจือปนของโซเดียมไนไตรท์ในแหนม ไก่ทอด หมูยอ ปลาเค็ม และปลาเค็มตากแห้งหวาน และล่าสุดรายงานของมูลนิธิเพื่อผู้บริโภค เมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2559 ระบุว่า จากการสุ่มตรวจสอบปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ 15 ยี่ห้อ พบว่ามีเพียงหนึ่งตัวอย่าง คือ

ค๊อกเทลซอสเซส ตราไทยซอสเซส ของบริษัทไทย – เยอรมัน มีท โปรดักส์ จำกัด ที่ไม่พบทั้งไนเตรทและไนไตรท์ นอกนั้นจำนวน 14 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 93.33 ใส่สารทั้งสองชนิด และมีจำนวน 3 ยี่ห้อที่ใส่สารไนเตรทหรือไนไตรท์เกินมาตรฐาน

นอกจากสารก่อมะเร็งไนโตรซามีนที่เกิดจากปฏิกิริยาของไนไตรท์แล้ว ยังมีสารก่อมะเร็งจำพวกไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amines) ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic) และปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ในกระบวนการหมักของเนื้อสัตว์ (Ekaterini, 2011) โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ คุณภาพของวัตถุดิบ และกระบวนการเตรียม ดังนั้นสารไบโอจีนิกเอมีนจึงเป็นสารที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของวัตถุดิบและการเน่าเสียของอาหาร อันตรายร้ายแรงประการหนึ่งที่เกิดจากสารไบโอจีนิกเอมีน คือ สามารถเกิดเป็นสารก่อมะเร็งหลังจากที่เกิดปฏิกิริยากับสารประกอบไนไตรท์ (ยุพิน, 2537)

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีขอบเขตที่จะศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์กล้าเชื้อที่มีต่อระดับไนไตรท์ที่เหลือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย โดยตั้งเป้าหมายสำคัญที่ระดับของไนไตรท์ที่จะคงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่เกิน 0.07 ppm โดยการวิจัยนี้จะเริ่มจากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีในผลิตภัณฑ์ด้วย จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้านการสลายไนไตรท์ และทำการเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ค่าดีที่สุด เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นในผลิตภัณฑ์

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การลดปริมาณไนไตรท์และยับยั้งการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนในกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์หมักนั้นมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง อาทิเช่น การเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งพบว่าการเติมกล้าเชื้อนั้นช่วยลดปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนและไนไตรท์ที่เหลือในผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Kongkiattikajorn, 2015) แต่การลดลงของปริมาณไนไตรท์ในระหว่างกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์ที่เติมกล้าเชื้อส่วนใหญ่นั้นยังไม่ได้ตามค่ามาตรฐานด้านวัตถุเจือปนอาหารของโคเด็กซ์ (Joint WHO/FAO Expert of Committee on Food Additive; JECFA) ซึ่งได้กำหนดค่า acceptable daily intake (ADI) หรือ ค่าปริมาณการได้รับไนไตรท์ต่อวัน โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพตลอดช่วงชีวิต คือ ที่ 0-0.07 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงโดยการใช้กล้าเชื้อเพียงอย่างเดียวนั้นยังไม่เพียงพอ จะต้องศึกษาในปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก เช่น แหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ (carbon source) คือพวกกลุ่มของน้ำตาลเชิงซ้อนหรือเชิงเดี่ยวที่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

กรดแลคติกและการสร้างกรด ทั้งนี้พบว่าการไม่เติมน้ำตาลนั้นจะส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีน เพราะแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งอาหารหรือพลังงานจึงทำให้เกิดสารไบโอจีนิกเอมีนได้ (วีรชัย, 2556) ทั้งนี้การเติมแหล่งคาร์บอนหรือพลังงานลงไปในผลิตภัณฑ์ยังช่วยให้แบคทีเรียมีการผลิตกรดมากขึ้น และลดระยะเวลาในการหมัก นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการศึกษาการนำสารไนไตรท์ที่สกัดจากซาลารี่มาใช้ในแฮม ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับไนไตรท์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Horsch *et al*., 2014) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการตกค้างของไนไตรท์ที่สกัดจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องมีขั้นตอนการบ่มในระหว่างการผลิตเพื่อให้เกิดกิจกรรมที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์ และมีการสร้างสารที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่เฉพาะตัว (Pearson and Dutson, 1986) ลักษณะที่จำเพาะของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเกิดขึ้นจากการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เกิดจากการผสมร่วมกันของเนื้อสัตว์ ไขมัน เกลือ curing agent น้ำตาล และเครื่องเทศ (Lucke, 1998) แหนม (Nham) หรือ Thai fermented sausage เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดี และเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคทั่วไปทั่วทุกภาคของประเทศ วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแหนม คือ เนื้อสุกรบด หนังสุกรต้มสุก เกลือโซเดียมคลอไรด์ ข้าวสุก กระเทียม และเกลือไนไตร์ท 100 - 125 ppm จากนั้นนำส่วนผสมมาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก อาจมีการห่อทับด้วยใบตอง ซึ่งกระบวนการหมักแหนมจะใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) โดยไม่ต้องทำการบ่มเพิ่มเติม โดยปกติแล้วแหนมจะมีค่า pH ประมาณ 4.4-4.8 และมีค่าความเป็นกรดอยู่ที่ 0.77- 1.60% ทั้งนี้ระหว่างกระบวนการหมักแหนมจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่โดดเด่นคือ Lactobacilli (*L. plantarum, L. pentosus* และ *L. sake*) และ Pediococci (*P. acidilactici* และ *P. pentosaceus*) เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจะผลิตกรดอินทรีย์จากคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสาเหตุให้ค่า pH ลดลง ซึ่งทำให้เกิดคุณลักษณะของแหนม และยังช่วยยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

การผลิตแหนมส่วนใหญ่เป็นการหมักที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียที่พบตามสภาพธรรมชาติ ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ ส่วนผสมอื่นๆ หรือปนเปื้อนมากับเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต ทั้งนี้เชื้อที่ปนเปื้อนอาจมีการสร้างสารพิษขึ้นมาได้ นอกจากนั้นการหมักต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน คุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่ได้ยังไม่ค่อยสม่ำเสมอ เพราะคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักตามธรรมชาติมักขึ้นอยู่กับฤดูกาลผลิต วัตถุดิบ กระบวนการผลิต ตลอดจนการจัดการสุขลักษณะของกระบวนการผลิต ดังนั้นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้โดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เข้ามาช่วยในกระบวนการผลิต ปริมาณของกล้าเชื้อที่เติมลงไปมีจำนวนมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์คุณภาพของแหนม

คุณภาพ	คุณลักษณะที่กำหนด
คุณภาพทางกายภาพ	
ความเปรี้ยว	มีรสเปรี้ยว
สี	สีออกสีชมพู
ความแน่นเนื้อ	เนื้อสัมผัสค่อนข้างแน่น เกาะตัวดี ไม่ร่วน
กลิ่น	ไม่กลิ่นคาวของเนื้อดิบ มีกลิ่นเฉพาะของแหนมซึ่งเกิดจากเครื่องเทศที่เติมและการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์
คุณภาพทางเคมี	
ปริมาณน้ำอิสระ (a_w)	0.80-0.95
ความเป็นกรด-ด่าง	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.6
โปรตีน	มากกว่าหรือเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์
ไขมัน	น้อยกว่าหรือเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์
เกลือ	2-3 เปอร์เซ็นต์
ปริมาณของไนไตรท์	น้อยกว่า 125 ppm
คุณภาพทางจุลินทรีย์	
Salmonella spp.	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
Escherichia coli 0157:H7	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
Staphylococcus aureus	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
Yersinia enterocolitica	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
Clostridium perfringens	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
Fungi	ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
พยาธิ *Trichinella spiralis*	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

ที่มา: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2543)

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติก หมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และให้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก (Sneath *et al.*, 1986) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทั่วไปคือ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง ทรงกลม และกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระบบไซโตโครม ไม่มีเอนไซม์

catalase สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ เจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และทนกรดได้ อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH≤5 อัตราการเจริญลดลง เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

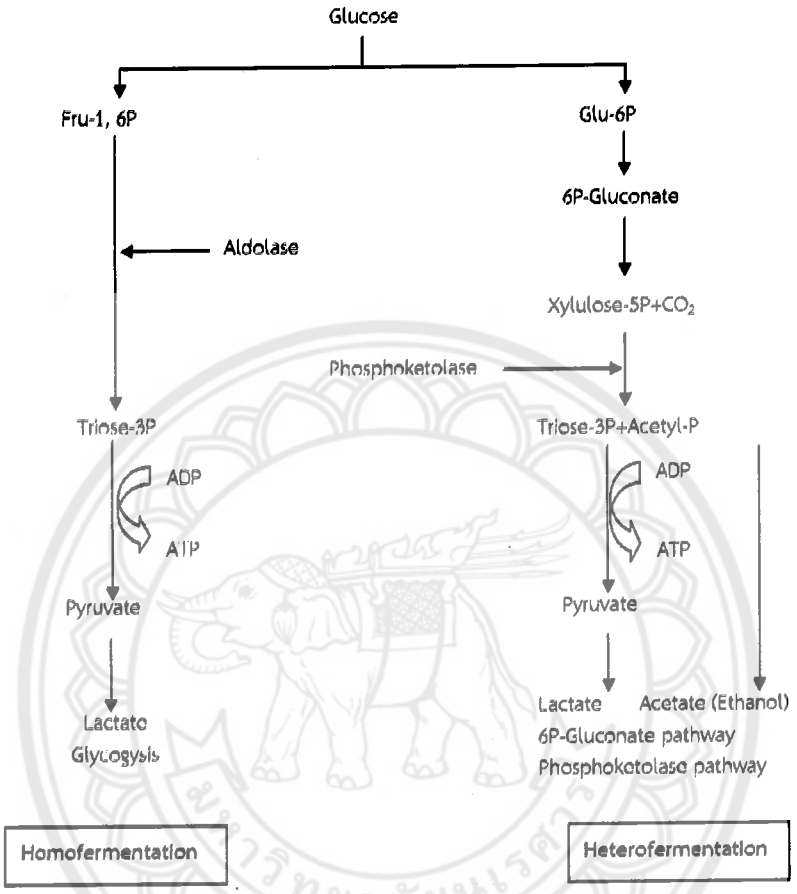
โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภท นอกจากนี้ยังสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นพวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นพบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในทางเดินอาหาร ช่องฟัน และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้นยังพบทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในอาหารพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ เครื่องในสัตว์ และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น (วิลาวัณย์, 2539)

หากจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกตามการใช้อาหารและการสร้างสาร (Axelsson, 1993) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) Homofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวสโดยอาศัยเอนไซม์ aldolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ไม่ต้องการ thiamine ในการเจริญ ได้แก่ Pediococcus Streptococcus และ Lactobacillus บางชนิด

2) Heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลคติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 กรดอะซิติก และเอธานอลร้อยละ 20-25 โดยผ่านphosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ต้องการ Thiamine ในการเจริญ สร้างเอนไซม์ phosphoketolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ aldolase ได้แก่ Leuconostoc และ Lactobacillus บางชนิด

ทั้งนี้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ การสร้างกรดแลคติกทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างของผลิตภัณฑ์ลดลง และพบว่ามีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ต้องการให้เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังทำหน้าที่ยับยั้งแบคทีเรียที่พบในลำไส้เล็กอันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารไม่ถูกสุขลักษณะ ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนม ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในสกุล Lactobacillus, Pediococcus และ Leuconostoc นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียที่ทำหน้าที่รีดิวซ์ไนเตรทไปเป็น ไนไตรท์ ได้แก่ Micrococcus เป็นต้น (ไพโรจน์, 2534)



ภาพที่ 2.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก ตามวิถีการสร้างกรด (Adam and Moss, 1995)

2.3 กล้าเชื้อ (Starter culture)

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักนับว่าเป็นอุตสาหกรรมการแปรรูปที่มีความสำคัญ เนื่องจากเนื้อสัตว์เป็นแหล่งอาหารโปรตีน วิตามินและเกลือแร่ต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ รูปแบบของการใช้แบคทีเรีย กรดแลคติคในผลิตภัณฑ์จึงเป็นการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ ทั้งนี้เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอมากยิ่งขึ้น เป็นการควบคุมกระบวนการหมักอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งกล้าเชื้อที่ใช้หมายถึงเชื้อบริสุทธ์ของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต และได้ผ่านการคัดเลือกตลอดจนตรวจสอบแล้วจำนวนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ใช้เติมลงไปในสูตรการผลิตอย่างน้อย 10^6 เซลล์/กรัม เพื่อใช้เป็นตัวเริ่มต้นในกระบวนการหมัก ช่วยเพิ่มคุณภาพ รสชาติและลักษณะของ ผลิตภัณฑ์ ลักษณะของกล้าเชื้อที่ใช้ ได้แก่ ลักษณะของสารแขวนลอย ในรูปของผงเชื้อที่ผ่านการ

ทำไลโอฟิไลซ์ ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยใช้หัวเชื้อ ได้แก่ ไส้กรอกหมัก โยเกร์ติ ชีส เบียร์ เป็นต้น (Frank, 1992)

Varnam and Sutberland (1995) ได้กล่าวถึงมาตรฐานที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกเปรี้ยวไว้ดังนี้คือ

1) มีประสิทธิภาพในการแข่งขันกับแบคทีเรียที่เกิดขึ้นตามสภาพธรรมชาติได้ ต้องผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่พอเพียง
2) ต้องมีความทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลืออย่างน้อย 6 เปอร์เซ็นต์
3) ต้องมีความทนต่อโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 80-100 พีพีเอ็ม
4) ต้องเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส
5) ต้องมีวิถีการสร้างกรดแลคติกแบบ homofermentative ซึ่งผลิตกรดแลคติก เป็นส่วนใหญ่จากการใช้น้ำตาลกลูโคส
6) ควรเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่สร้างแคตาเลส (catalase negative)
7) ควรมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ไนเตรท
8) มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในอาหารได้
9) ควรมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมหรือทำงานร่วมกับกล้าเชื้ออื่นได้เป็นอย่างดี

ในระดับอุตสาหกรรม กล้าเชื้อจัดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญประการหนึ่งที่สร้างความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมใช้ ได้แก่ *L. plantarum, L. curvatus, P. damnosus, P. acidilactici* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่แยกได้จากการหมักตามสภาพธรรมชาติ (Varnam and Sutberland, 1995) นอกจากนี้ยังมีเชื้อในกลุ่มของ staphylococci ชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic) และ Micrococcus ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดมีผลต่อรสชาติของไส้กรอกโดยผ่านการผลิตกรดไขมันอิสระ (Montel *et al*., 1993)

ประโยชน์สำคัญ 2 ประการ ของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใส่ในอาหารประเภทเนื้อ คือ 1) เพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก และเพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้อสดแช่เย็น (Raccach and Baker, 1978) และ 2) ทำให้อาหารหมักที่ได้ปลอดภัยจากสารพิษต่าง ๆ เช่น ฮีสตามีน (Histamine) ไนโตรซามีน (Nitrosamine) และโบทูลินัม (Botulinum) เป็นต้น ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอาหารจะมีผลต่อการสะสมของฮีสตามีน (Rice *et al*., 1975) โดยพบว่าไส้กรอกหมักชนิดดราย (Dry sausage) ที่หมักโดยวิธีธรรมชาติซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักนาน จะพบฮีสตามีนสะสมในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยป้องกันการสะสมของฮีสตามีนในอาหารหมัก (Gilliland, 2003)

นอกจากนี้อาหารที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากสารพิษ (Toxin) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Clostridium botulinum* และ สารไนโตรซามีน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีปริมาณมาก จะผลิตกรดแลคติกอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้ระดับพีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ซึ่งจะไปเร่งให้ไนไตรท์ (Residual nitrite) ที่มาจากการใส่ดินประสิว (KNO_3) ในอาหารหมัก ถูกสลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ทำให้การสะสมของไนไตรท์ลดลง ส่งผลให้การสะสมของไนโตรซามีนลดลง

2.4 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนก็คือคาร์โบไฮเดรทที่เติมลงในส่วนผสมของการผลิตเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียตลอดจนการสร้างกรดอินทรีย์ ทั้งปริมาณและชนิดของคาร์โบไฮเดรทที่เติมลงไปทำให้เกิดความสมดุลย์ของการหมักระหว่างการสร้างกรดแลคติค และการลดลงของค่าพีเอช กลูโคสจัดเป็นคาร์โบไฮเดรทโมเลกุลเดี่ยวที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็ว ส่วนโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ นั้น เชื้อแบคทีเรียนำไปใช้ได้ค่อนข้างช้า ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ปริมาณของคาร์โบไฮเดรทที่เติมลงไปอยู่ในช่วง 0.4-0.8 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไส้กรอกกึ่งแห้งในประเทศสหรัฐอเมริกามีการเพิ่มปริมาณกลูโคสสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว (Jay, 1996)

ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ต่างกัน การศึกษาถึงการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในการผลิตแหนม (น้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส แลคโตส กาแลคโตส) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรท พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนั้นยังมีการศึกษาการใช้โมลาสจากถั่วเหลือง (soy molasses) ซึ่งมีซูโครส 19 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดแลคติกพบว่าได้กรดแลคติคในปริมาณสูง ส่วนการผลิตแหนมที่มีการใช้ส่วนผสมของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราส่วน เท่ากับ 3:1 ให้ผลดีที่สุด ซึ่งการใช้คาร์บอนของเชื้อพบว่าแบคทีเรียใช้ข้าวเจ้าในช่วงแรกของการหมักเพื่อสร้างกรดแลคติก และใช้ข้าวเหนียวในช่วงกลางของการสร้างกรดแลคติค (ไพโรจน์ และคณะ, 2537) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแบคเทอริโอซินได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน Z ที่ผลิตขึ้นจาก *Lc. lactis* เมื่อทำการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลส (Matsusaki, 1996) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้แอคติวิตีของไนซิน Z สูงสุดเท่ากับ 4,000 IU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีของไนซิน Z เท่ากับ 3,000 IU/mL ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ไซโลส และกาแลคโตส (Biswas, 1991)

ตารางที่ 2.2 แสดงกล้าเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการหมักไส้กรอก

Microbial group	Species available as starter	Desired metabolic Activity	Benefit in sausage Ripening
Lactic acid bacteria	*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* *Lb. sake, Lb. curvatus* *Pd. pentosaceus*, *Pd. acidilactici*	Formation of lactic acid	Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria ; acceleration of colour formation and drying
Catalase positive cocci	*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcu xylosus* *Micrococcus varians*	Nitrate reduction Nitrite reduction, Oxygen consumption, Peroxide destruction. Formation of carbonyl and esters	Colour formation and Stabilization Removal of excess nitrite. Delay of rancidity, colour stabilization Aroma and flavor development
Yeast	*Debaryomyces hansenii* *Candida famata*	Oxygen consumption Not known in detail	Delay of rancidity; colour stabilization Aroma and flavour development
Moulds	*Pen. nalgiovense biotype 2,3,6*	Surface colonization	Suppression of undesired moulds Facilitation of drying
	Pen. chysogenum	Oxygen consumption Lactate oxidation , degradation of proteins and amino acids	Delay of rancidity; colour stabilization Flavour development

ที่มา: Luck (1998)

2.5 ไนไตรท์/ไนเตรท (Nitrite/ Nitrate)

ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์แปรรูปนั้นพบว่า ไนไตรท์มีความสำคัญอย่างมากในการทำให้ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มีสีชมพู สีที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไนไตรท์กับ myoglobin เมื่อมีการสลายตัวด้วยความร้อนจะให้สีชมพูที่คงทน นอกจากนั้นไนไตรท์ยังมีส่วนช่วยป้องกันสูญเสียของรสชาติในระหว่างการเก็บรักษาอันเนื่องมาจากการหืนของไขมัน โดยจะไปยับยั้งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของไขมัน และยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายและทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค botulism (Francis, 2000) ทั้งนี้มีรายงานว่าการใช้โซเดียมไนไตรท์ในปริมาณ 150-200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษของ *Clostridium botulinum* ได้

อย่างไรก็ตามมีข้อกำหนดให้ใช้เกลือไนไตรท์ในปริมาณไม่เกิน 125 ppm (125 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม) โดยคานวณเป็นปริมาณโซเดียมไนไตร์ท และการใช้เกลือเตรทในผลิตภัณฑ์เนื้ออยู่ที่ปริมาณไม่เกิน 500 ppm (500 มิลลิกรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม) โดยคำนวณเป็นปริมาณโซเดียมไนเตรท หากใช้เกินกำหนดจะมีโอกาสเสี่ยงต่อปัญหาของการตกค้างในผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้พบว่าโซเดียมไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับ สารประกอบชีวภาพในเนื้อสัตว์ ทำให้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตจะตรวจพบไนไตรท์ได้ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณไนไตรท์ที่เติมลงไป ส่วนปริมาณไนไตรท์ที่หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์จะลดปริมาณลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา การจำหน่าย ตลอดจนในระหว่างการเตรียมเพื่อการบริโภค (Cassen, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลก็มีส่วนในการช่วยเร่งการเปลี่ยนแปลงของโซเดียมไนเตรทเป็นไนตริกออกไซด์ ทำให้ปริมาณสารไนเตรทที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์น้อย และเกิดสีแดงเร็วขึ้น แต่สำหรับผู้บริโภคสิ่งที่ต้องระวังก็คือการทำปฏิกิริยาของโซเดียมไนไตรท์กับสารประกอบชีวภาพในเนื้อสัตว์ จำพวก secondary amines เกิดเป็น N-nitrosamines ซึ่งจัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง สารประกอบเหล่านี้สามารถตรวจพบได้ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดที่แปรรูปด้วยความร้อน (heat-treated cured) ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยตัวของผลิตภัณฑ์เองโดยขึ้นกับภาวะของความร้อนที่ให้ ความเข้มข้นของเกลือและความเข้มข้นของไนไตรท์ (Pegy and Shanidi, 1997)

2.6 สารไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amine)

สารไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amines; BAs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีคุณสมบัติเป็นเบส ซึ่งสารไบโอจีนิกเอมีนนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตดังนั้นจึงสามารถที่จะพบสารเอมีนได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Cinquina *et al.*, 2004) ในอาหารชนิดต่างๆ นั้นมีการปนปื้อนของสารไบโอจีนิกเอมีนเนื่องจากปฏิกิริยา ดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนที่เร่งโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) ทั้งนี้สารไบโอจีนิกเอมีนบางประเภทที่สามารตรวจพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เช่น ไทรามีน

ฮีสตามีน ทริปตามีน เบตา-ฟีนิล-เอทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มิดีน และสเปอร์มีน (Ekaterini, 2011)

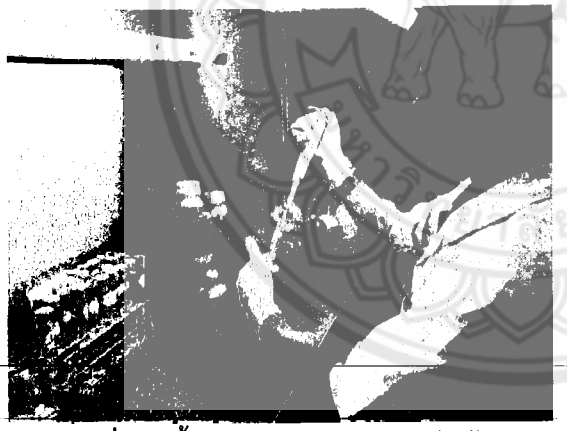
ทั้งนี้กระบวนการหมักเนื้อนั้นมีความสำคัญต่อการเกิดสารฮีสตามีนในไส้กรอก สำหรับไส้กรอกกึ่งแห้งนั้นจะหมักในระยะเวลาที่สั้นกว่าไส้กรอกแห้ง และกระบวนการหมักไส้กรอกกึ่งแห้งจะมีการเติมเชื้อหมักชนิดที่สร้างกรดแลกติก ในขณะที่ไส้กรอกแห้งจะอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าจะมีสารฮีสตามีนเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่าในระยะเวลา 1-3 วัน ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกหมักมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาในการหมัก ความแตกต่างของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส การทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ชนิดและคุณภาพของเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมูสดจะมีการปนเปื้อนสารไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณเล็กน้อย และสารไบโอจีนิกเอมีนจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาโดยมีอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญ เช่น ที่อุณหภูมิ 30^{o}C จะมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นมากกว่าที่ 4^{o}C ในขณะที่การแช่แข็งเนื้อหมูที่อุณหภูมิ -18 ^{o}C ไม่มีการเพิ่มปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนและสามารถเก็บไว้ได้นาน 9 เดือน (Shalaby, 1996)

ทั้งนี้การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฮีสตามีนและไทรามีนจะส่งผลทำให้เกิดอาการต่างๆ ได้แก่ คลื่นไส้ เกิดความผิดปกติที่ระบบทางเดินหายใจ อัตราการเต้นของหัวใจเร็วไม่สม่ำเสมอ ปวดศรีษะ ความดันเลือดสูงหรือต่ำเกินไป ไมเกรน รู้สึกปวดแสบปวดร้อนและคันโดยเฉพาะที่บริเวณฝ่ามือ หน้า หนังศรีษะ และตา ผิวแดงแผ่ไปทั่วลาคอ เกิดอาการบวมและผื่นลมพิษบนผิวหนัง ปวดท้อง มีการหลั่งกรดอย่างมากในกระเพาะอาหาร (ยุพิน, 2537) นอกจากนี้สารไบโอจีนิกบางตัว เช่น พิวเทรสซีน ยังสามารถพัฒนาไปเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย

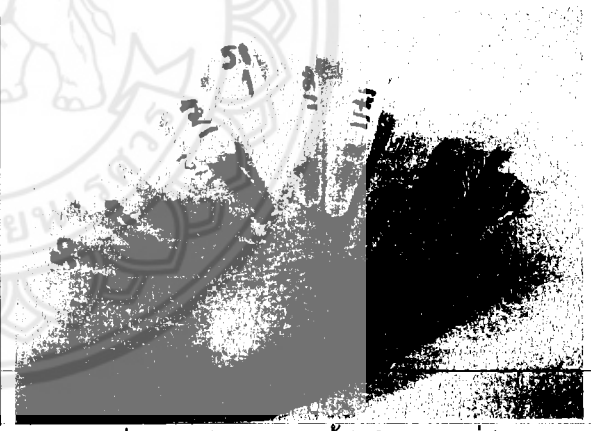
บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกและระบุสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

สุ่มเก็บตัวอย่างแหนมจากภาคเหนือ อีสาน และกลาง มาภาคละ 3 ยี่ห้อ รวมทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง จากนั้นชั่งตัวอย่างมาตัวอย่างละ 25 กรัมผสมกับสารละลาย Sterile sodium chloride (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Stomacher Lab-Blender ณ อุณหภูมิห้อง นำ Serial dilutions มาเลี้ยงบนอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง (APHA, 2001) เกิดโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียมา 30 โคโลนี/ตัวอย่าง ตามวิธีการของ Harrigan (1998) และนำเชื้อมา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วขยายเชื้อที่บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อไว้ในหลอดที่มีสารกลีเซอรอล 30% ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบประสิทธิภาพ (Papamanoli *et al.*, 2003)



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเจือจางความเข้มข้น

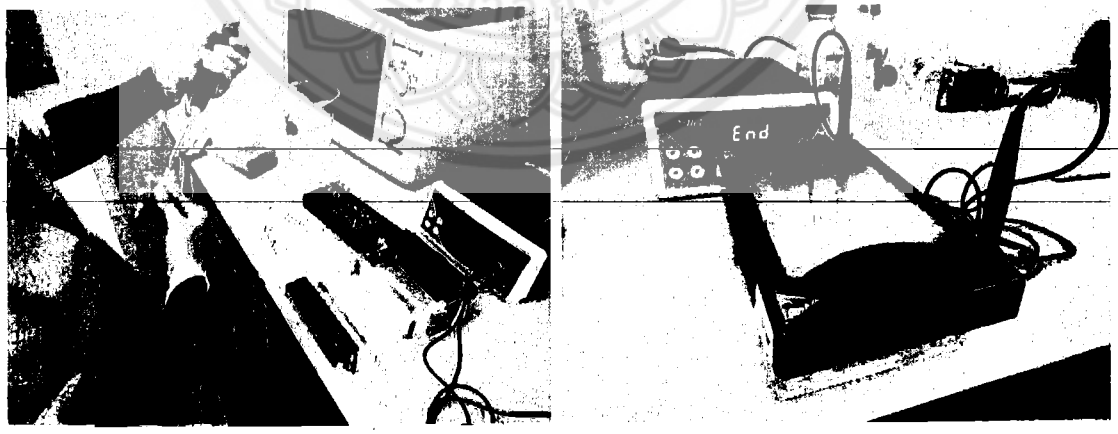


ภาพที่ 3.2 เก็บตัวอย่างเชื้อไว้ในหลอดที่มีสารกลีเซอรอล 30%

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ชุดสกัด GF-1 (Vivantis Technologies, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ จากนั้นตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวิธีการ gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได 4 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ผานกระแสไฟฟากระแสตรงความตางศักย 100 โวลตเปนเวลา 20 นาที แล้วนำ agarose gel มาตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใตแสงอัลตราไวโอเลต และถาย

ภาพดวย gel documentation จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reactions (PCR) โดยใช้ forward primer คือ BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ reverse primer คือ REVB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 mM) 2 ไมโครลิตร, dNTP (10 mM) 1 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer อยางละ1 ไมโครลิตร, Pfx50 DNA polymerase (5 unit/µl) 0.2 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นนึ่งฆาเชื้อ 10.8 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตนแบบ 2 ไมโครลิตร นำมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle) โดยมีการตั้งโปรแกรมการเปลี่ยนอุณหภูมิไว้ดังนี้ Predenaturation อุณหภูมิ 95 องศา เซลเซียส นาน 3 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ขั้นตอนการทำ Denaturation ถึง Extension ซ้ำทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปแยกแถบดีเอ็นเอดวยเทคนิค Electrophoresis โดยใช 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer โดยแบ่งผลิตภัณฑ PCR ที่ไดมา 6 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ 16S rDNA ของแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Dde I (C/TNAG), Alu I (AG/CT), Mse I (TT/AA) และ Aci I (AA/CGTT) ตามวิธีการของ Bonomo *et al.* (2008) โดยผสม 16S rDNA ให้เข้ากับเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏดวยเทคนิค eletrophoresis โดยใช 2% agarose gel ใน 1xTBE buffer 1 ผานกระแสไฟฟากระแสตรงความตางศักย 100 โวลตเปนเวลา 45 นาที



ภาพที่ 3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการตรวจสอบขนาดและคุณภาพดีเอ็นเอ

เมื่อสามารถแยกกลุ่มของแบคทีเรียออกตามความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแล้ว นำ 16S rDNA ของตัวอย่างซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่แยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick PCR Purification Kit และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (Sequencing) ด้วยเครื่อง MegaBACE 1000 sequencer (BioDesign Co., Ltd., Pathumthani, Thailand) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Antara *et al.*, 2002)

3.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของของแบคทีเรียกรดแลคติก

1) การทดสอบการเจริญและความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ Culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) หาเปอร์เซ็นต์กรดด้วยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N โดยใช้สารละลายฟีนอลทาลีน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ (Zhang *et al.*, 2007)

2) ทดสอบประสิทธิภาพการสลายตัวของไนไตรท์ (Depletion of Sodium Nitrite)

ใส่สารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีความเข้มข้น 120 µg/ml ปริมาณ 1 ml ลงในหลอดทดลองที่มี MRS broth 9 ml และเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml จำนวน 1 ml จากนั้นนำหลอดทดลองไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน และวัดอัตราการสลายตัวของไนไตรท์ด้วยวิธี colorimetric nitrite assay (Yan *et al.*, 2003)

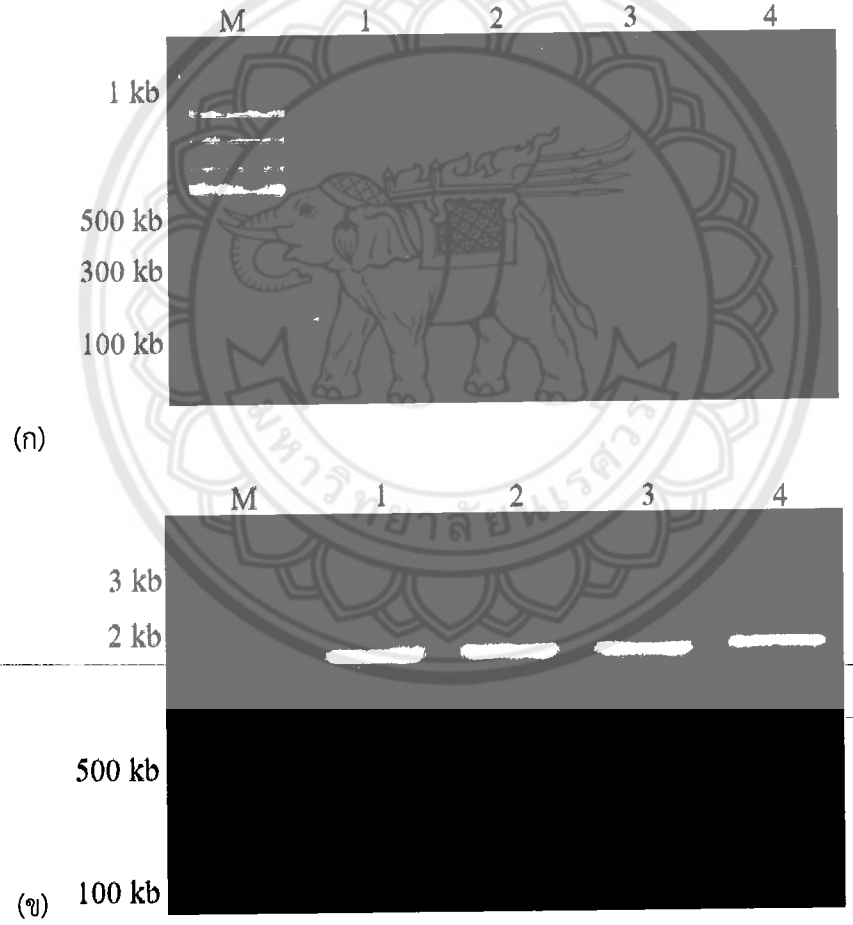
ภาพที่ 3.4 การเตรียมสารละลายไนไตรท์มาตรฐาน และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader

บทที่ 4
ผลการดำเนินการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลการดำเนินการวิจัย

4.1.1 การแยกและระบุสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากภาพที่ 4.1 (ก) ทำการตรวจสอบขนาดและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ BSF8/20 และ REVB primers เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (ข) ซึ่งผลิตภัณฑ์ 16S rDNA จะมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 1,500 bp



ภาพที่ 4.1 (ก) ตรวจสอบขนาดและคุณภาพดีเอ็นเอจากแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel และ (ข) ผลิตภัณฑ์ 16S rDNA โดยช่อง M: MW marker; 1: *Enterococcus durans*; 2: *Lactobacillus plantarum*; 3: *Lactobacillus brevis* และ 4: *Pediococcus pentosaceus*

นำผลิตภัณฑ์ 16S rDNA ส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotides sequence) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank DNA database โดยใช้โปรแกรม (BLAST) จากตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลท และลักษณะเฉพาะของไอโซเลทที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากแหนม พบว่าไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้นั้นมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลของ GenBank DNA database คือ 1) *Enterococcus durans* ที่ระดับร้อยละ 98; 2) *Lactobacillus plantarum* ที่ระดับร้อยละ 97; 3) *Lactobacillus brevis* ที่ระดับร้อยละ 95 และ 4) *Pediococcus pentosaceus* ที่ระดับร้อยละ 97

ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลท และลักษณะเฉพาะของไอโซเลทที่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากแหนม

Isolate no.	The closest relative species	Similarity (%)[a]	Accession no.[b]
1	*Enterococcus durans*	98	HQ603862.1
2	*Lactobacillus plantarum*	97	MF369875.1
3	*Lactobacillus brevis*	95	KM495930.1
4	*Pediococcus pentosaceus*	97	NC_008525.1

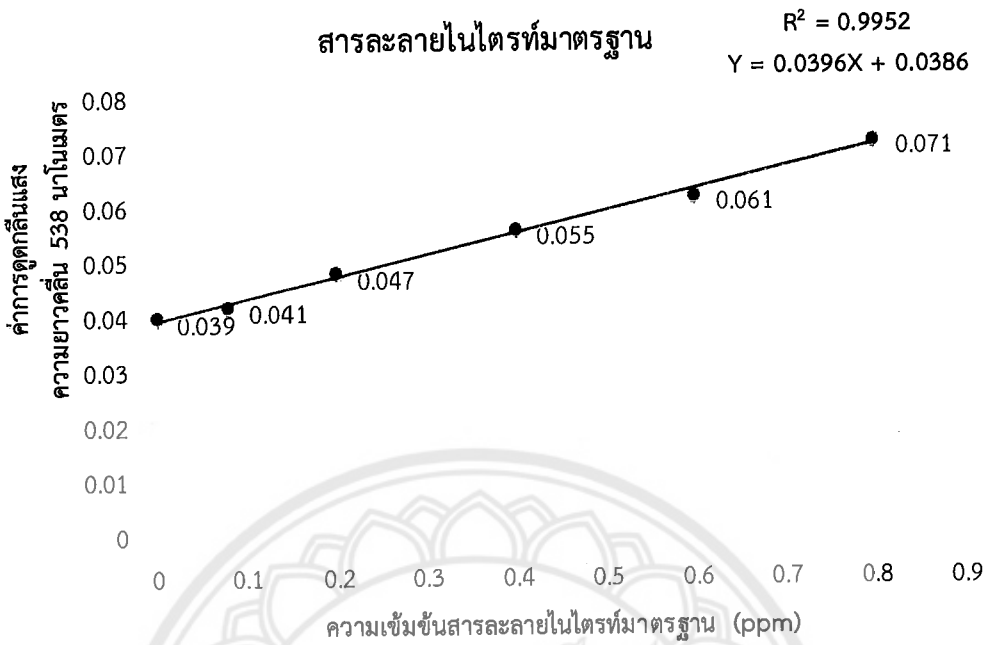
[a] ร้อยละความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ 16S rDNA ที่พบในฐานข้อมูลของ GenBank DNA database

[b] รหัสสมาชิกในฐานข้อมูล GenBank ที่ไอโซเลทมีความคล้ายคลึง

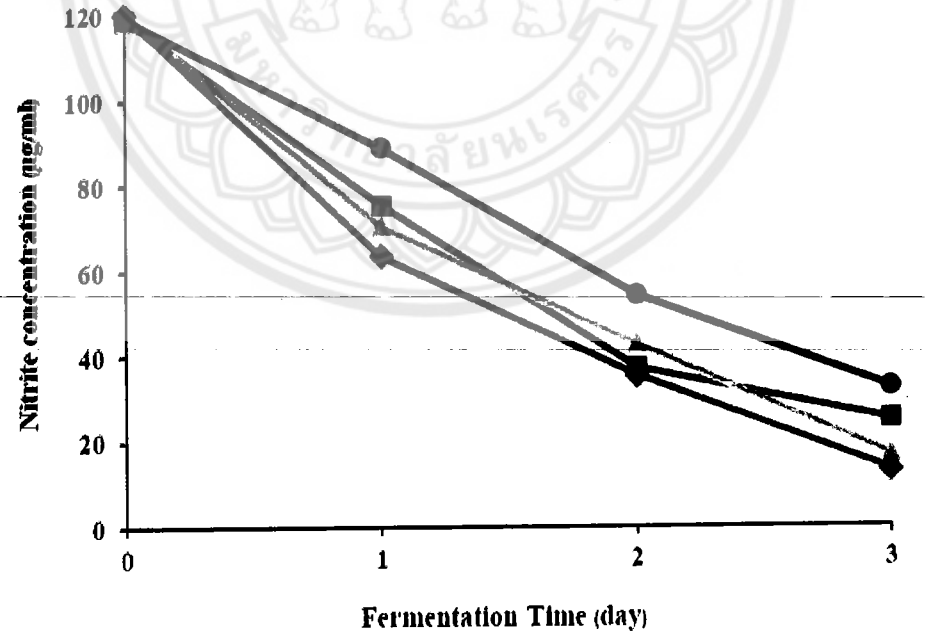
4.1.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการสลายไนไตรท์

ความเข้มข้นของสารละลายไนไตรท์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร พบว่าสารละลายไนไนตรท์ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.039, 0.041 0.047, 0.055, 0.061 และ 0.071 ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความเชื่อมั่น (R^2) มีค่าอยู่ที่ 0.9952 และได้สมการเชิงเส้นดังนี้ Y = 0.0396X + 0.0386 (ภาพที่ 4.2)

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการสลายตัวของไนไตรท์ที่เหลือเมื่อผ่านระยะการหมักที่ 3 วัน นั้นพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *E. durans*, *L. plantarum*, *L. Brevis* และ *P. pentosaceus* สามารถระดับไนไตรท์ได้ที่ร้อยละ 89.35, 79.11, 86.22 และ72.87 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.2 สารละลายไนไตรท์มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader



ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการสลายไนไตรท์

หมายเหตุ: *E. durans* (◆), *L. plantarum* (■), *L. brevis* (▲) และ *P. pentosaceus* (●)

4.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *E. durans*, *L. plantarum*, *L. Brevis* และ *P. pentosaceus* นั้นมีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้เคยแยกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกในใส้กรอกหมักแห้งแล้วพบสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่คือ *Lactobacillus*, *Pediococcus และ Enterococcus* (Ammor *et al.*, 2005) ในส่วนของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทย เช่น มั่ม ก็แยกพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* และ *L. sakei* เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบ *L. brevis, L. fermentum, P. pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides* และ *Lc. lactis* (Wanangkarn *et al.*, 2014). Thiravattanamontri *et al.* (1998) แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ Lactobacillus นั้นมักจะพบมากกว่าชนิดอื่นเนื่องจากสามารถทนต่อความเป็นกรดและเจริญเติบโตได้ดีตลอดระยะเวลาการหมักของผลิตภัณฑ์ได้ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดมากับวัตถุดิบหรือเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์นั้นจะสามารถอยู่รอดและปรับตัวให้เข้ากับสภาวะการหมักได้ดี (Hugas and Monfort, 1997) ดังนั้นการจะคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก็ควรจะคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบซึ่งติดมาจากธรรมชาติ ทั้งนี้การเติมกล้าเชื้อเข้าไปนั้นจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักมีความปลอดภัย คุณภาพคงที่ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้ (Leroy *et al.*, 2006) Klingberg *et al.* (2006) รายงานว่าการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. Plantarum* และ *L. Pentosus* ในไส้กรอก Scandinavian สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคและทำให้เกิดการเน่าเสียได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะเข้าไปแย่งอาหาร และผลิตสารจำพวก carbon dioxide, diacetyl, hydrogen peroxide, organic acids และ bacteriocins (Caplice and Fizgerald, 1999; Ghalfi *et al.*, 2010) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถย่อยแหล่งพลังงานจำพวกคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติก อะซิติก และโพรพิโอนิก ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่น และรสชาติที่ดี (Liu *et al.*, 2001)

อย่างไรก็ตามนอกจากจะมีการเติมกล้าเชื้อเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นปลอดภัยและมีคุณภาพ แล้วปัจจุบันผู้ผลิตยังมีการเติมสารผสมอื่น เช่น ไนไตรท์ เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นมีสีสันสวยงาม ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรค และลดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์ได้ (Maryuri *et al.*, 2012) แต่ข้อเสียของไนไตรท์คือหากผู้บริโภคได้รับไนไตรท์ในปริมาณที่สูงจะก่อให้เกิดภาวะอาการขาดออกซิเจน คือ มีอาการตัวเขียว เล็บเขียว หอบ เหนื่อย หัวใจเต้นแรง และอาจเสียชีวิตได้ เพราะไนไตรท์จะจับตัวกับฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ในเลือดเกิดเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methaemoglobin) ทำให้ฮีโมโกลบินไม่สามารถจับตัวกับออกซิเจนได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายชิ้นระบุว่าไนไตรท์สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบเอมีนในอาหาร แล้วทำให้เกิดสารประกอบที่เรียกว่าสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งทำให้เกิดโรคมะเร็งในอวัยวะต่างๆ

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้นั้นมี

ประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. plantarum* (Esmaeilzadeh *et al.*, 2012) และ *P. pentosaceus* (Wu *et al.*, 2012) สามารถสลายไนไตรท์ในระหว่างกระบวนการหมักได้ดี นอกจากนี้ Dodds and Collins-Thompson (1984) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lc. lactis*, *L. acidophilus*, *L. Viridescens* และ *L. plantarum* พบว่าสามารถสลายไนไตรท์ได้ถึง 61.4-92.7% ของปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น (200 ppm) ภายใน 24 ชั่วโมง ของการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้การลดลงของปริมาณไนไตรท์ในกระบวนการหมักนั้นเกิดจาก สภาวะความเป็นกรดที่ทำให้ไนไตรท์แตกตัวออกเป็นกรดไนตรัส ไนตริกออกไซด์ และไนเตรท (Dodds and Collins-Thompson, 1984; Honikel, 2004)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมได้ 4 สายพันธุ์ คือ 1) *Enterococcus durans* 2) *Lactobacillus plantarum* 3) *Lactobacillus brevis* และ 4) *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ได้ถึง 70-80% ของปริมาณไนไตรท์เริ่มต้น (120 ppm) ภายใน 72 ชั่วโมง ของการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นสามารถนำมาเป็นกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักของไทยได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้ทำให้ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสลายไนไตรท์ แต่เนื่องจากผลวิจัยที่ได้นั้นเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) ในอนาคตจึงควรมีการทดลองนำสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้นี้ เติมลงไปในผลิตภัณฑ์จริง แล้ววิเคราะห์อัตราการสลายตัวของสารไนไตรท์ คุณภาพ และอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ วริยจารี, ลักขณา รุจนะไกรกานต์, อิสรพงษ์ พงษ์ศิรฎิล, วิวรรธน์ วรรธนัจฉริยา, และสุธยา บุญถนอม. (2537). น้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแหนมโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. วารสารเกษตร, 10(1), 90 -102.

ไพโรจน์ วริยจารี. (2534). การพัฒนาอาหารหมักพื้นบ้านโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น. อุตสาหกรรมเกษตร, 2(1), 36-40.

ยุพิน สังวรินทะ. (2537). เภสัชวิทยา. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ: อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีรชัย สิงห์ทอง. (2556). การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. (2543). ตำรับอาหารแหนม: เอกลักษณ์ไทย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

แสงโฉม ศิริพานิช. (2555). อันตรายจากการรับประทานอาหารที่มสารไนเตรทและไนไตรท์. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์, 43(23), 353-356.

Adam, M. R., & Moss, M. O. (1995). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.

Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillоull, S., & Chevallier, I. (2005). Characterisation and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbiology, 22, 529-538.

Antara, N. S., Sujaya, I. N., Yokota, A., Asano, K., Aryanta, W. R., Tomita, F. (2002). Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of "urutan", a Balinese indigenous fermented sausage. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 255–262.

APHA. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (4th ed.). Washington DC., USA: American Public Health Association.

Axelsson, L. T. (1993). Classification and physiology. In Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.), Lactic acid bacteria (pp. 1-64). New York: Marcel Dekker.

Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, V. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by Pediococcus acidilactici H. Applied and Environmental Microbiology, 57 (4), 1265-1267.

Bonomo, M. G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., & Salzano, G. (2008). Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). Meat Science, 80, 1238-1248.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. International journal of food microbiology, 50, 131-149.

Cassen, R. G. 1997. Residual nitrite cured meat. Food Technology, 51(2), 53-55.

Cinquina, A. L., Longo, F., Calì, A., De Santis, L., Baccelliere, R., & Cozzani, R. (2004). Validation and Comparison of Analytical Methods for the Determination of Histamine in Tuna Fish Samples. Journal of Chromatography A, 1032(1-2), 79–85.

Dodds, K. L., & Collins-Thompson, D. L. (1984). Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. Journal of Food Protection 47, 7-10.

Ekaterini, J. P. (2011). Biogenic Amine Levels in Dry Fermented Sausages Produced. Procedia – Food Science, 1, 1126-1131.

Esmaeilzadeh, P., Darvishi, S., Ebrahimi, K., Mirahmadi, F., & Vaziri, M. (2012). Consideration of lactic acid bacteria ability to reduce nitrite concentration in standard De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth-sodium nitrite medium during fermentation period. World Applied Sciences Journal, 18 (3), 430-435.

Francis, F. J. (2000). Encyclopedia of Food Science and Technology (2nd ed). New York: John Wiley & Sons Inc.

Frank, H. K. (1992). Bacteriocin: Dictionary of Food Microbiology. USA: Technomic Publishing. Co Inc.

Ghalfi, H., Benkerroum, N., Ongena, M., Bensaid, M., & Thonart, P. (2010). Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. Food Research International, 43, 33-39.

Gilliland, S. E. 2003. Lactic Acid Bacteria as Biopreservatives in the Food Industry. Retrieved 10 June 2006. from http://ift.confex.com/ift/2003/techprogram/paper_15725.htm.

Harrigan, W. F. (1998). Laboratory methods in food microbiology (4th ed.). California, USA: Academic Press.

Honikel, K. O. (2004). Curing agents. In Jensen, W. K., Devine, C., & Dikeman, M. (Eds.) In Encyclopedia of meat sciences (pp. 195–201). Oxford: Elsevier Ltd.

Horsch, A. M., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Niebuhr, S. E., Larson, E. M., Lavieri, N. A., Ruther, B. L., & Wilson, L. A. (2014). The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on Listeria monocytogenes. Meat Science, 96(1), 400-407.

Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry, 59, 547-554.

Jay, M. J. (1996). Modern Food Microbiology (5th ed). New York: International Thomson Publishing.

Klingberg, T., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., & Budde, B. (2006). Identification of potential starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 419-431.

Kongkiattikajorn, J. (2015). Potential of starter culture to reduce biogenic amines accumulation in som-fug, a Thai traditional fermented fish sausage. Journal of Ethnic Foods, 2(4), 186–194.

Leroy, F., Verluyten, J., & Vuyst, L. D. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology, 106, 270-285.

Liu, D. X., Zhang, L. C., Wang, Q., Da, C. S., Xin, Z. Q., Wang, R., Choi, M. C., & Chan, A. S. (2001). The application of chiral aminonaphthols in the enantioselective addition of diethylzinc to aryl aldehydes. Organic Letters, 3(17), 2733-2735

Lucke, F. K. (1998). Fermented sausage. In B. J. B. Wood (ed). Microbiology of Fermented Foods (2nd ed). London: Blackie Academic & Profestional.

Maryuri, T., De González, N., Osburn, W. N., Hardin, M. D., Longnecker, M., Garg, H. K., Bryan, N. S., & Keeton, J. T. (2012). Survey of residual nitrite and nitrate in conventional and organic/ natural/ uncured/ indirectly cured meats available at retail in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 3981-3990.

1049295
- 7 มี.ค. 2565

สำนักหอสมุด
วิทยาศาสตร์
QC
768
.6
อ965
2561

Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production byLactococcus lactis IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. Applied Microbiology and Biotechnology, 45(1), 36–40.

Montel, M. C., Talon, R., Berdague, J. L. & Cantonnet, M. (1993). Effects of starter culture on the biochemical characteristics of French dry sausage. Meat Science, 35, 229-240.

Papamanoli, E. , Tzanetakis, N. , Litopoulou-Tzanetaki, E. , & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science, 65, 859-867.

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

Pegy, R. B., & Shahidi, F. (1997). Unraveling the chemical identity of meat pigment. Critical Review in Food Science and Nutrition, 37, 561-589.

Pourazrang, H., Moazzami, A. A., & Fazly, B. S. (2002). Inhibition of mutagenic N-nitroso compound formation in sausage sample by using L-ascorbic acid and α-tocopherol. Meat Science, 62, 479-483.

Raccach, M., & Baker, R. C. (1978). Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factors in cooked, mechanically deboned poultry meat. Journal of Food Protection, 41(9), 703–705

Rice, S., Eitenmiller, R. R., & Kochler, P. E. (1975). Histamine and tyramine content of meat products. Journal of Milk Food Technology, 38, 256–258.

Salminen, S., & Wright, A. V. (1993). Lactic acid bacteria. Marcel Dekker Inc.: New York.

Shalaby, A. R. (1996). Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. Food Research International, 29(7), 675-690.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1986). Bergey's Manual of Bacteriology vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.

Thiravattanamontri, P., Tanasupawat, S., Noonpakdee, W., & Valyasevi, R. (1998). Catalases of bacteria isolated from Thai fermented foods. Food Biotechnology, 12, 221-238.

Varnam, H. A., & Sutberland, P. J. (1995). Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology. New York: Champman & Hall.

Wanangkarn, A., Liu, D. C., Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A., Phraephaisarn, C., Chumnqoen, W., & Tan, F. J. (2014). Lactic acid bacterial population dynamics during fermentation and storage of Thai fermented sausage according to restriction fragment length polymorphism analysis. International Journal of Food Microbiology, 186, 61-67.

Wu, Y. Y., Liu, F. J., Li, L. H., Yang, X. Q., Deng, J. C., & Chen, S. J. (2012). Isolation and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria from salted fish. Advanced Materials Research, 393-395, 828-834.

Zhang, J. H., Tatsumi, E., Fan, J. F., & Li, L. T. (2007). Chemical components of Aspergillus type douchi, a Chinese traditional fermented soybean product, change during the fermentation process. International Journal of Food Science & Technology, 42(3), 263-268.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

From: ijat-aatsea publication

Sent: 28 เมษายน 2563 21:28

To: Amornrat Wanangkarn

Subject: your manuscript is accepted to publish in IJAT

Dear Corresponding author,

Your manuscript has been accepted for publication in IJAT. Further correspondence with regards to the proof and publication of your article should be addressed to ijat.publication@gmail.com. Your manuscript may be a minor revision to meet the standard toIJAT format.

However, to make payment of publication feeas this would enable us to include your paper for publication. Corresponding authors are charged the publication fee of 100 USD as you has confirmed in Consent to IJAT.

Kindly make the required payment as soon as possible if you are yet to do so, to enable us include your manuscript in next issue and send a confirmation e-mail to ijat.finances@gmail.com

Please kindly make payment donation directly into any of our accounts below within **3 days for publish in coming issue**:

Bank Name: **Bangkok Bank Co.Ltd. , Thailand**
Address: 999 Tambol Bangpree Yai, Amphur Bangpree, Samutprakarn province 10540, Thailand
Swift Code:**BKKBTHBK**
Account Name: **AATSEA**
Savings Account No:**862-013355-6**

OR

Contact us if you prefer to use Western Unionthrough to Miss. Rujira Tongon, Citizen ID Card No: 1-2699 00136-97-3 and send transfer copy to email: ijat.finances@gmail.com

Please contact us if you have any question. Please kindly send us, an e-mail after making payment and attached documents (if any), and kindly be stated your title of manuscript and Corresponding authors and addresses.

Best regards,

Accountants
Association of Agricultural Technology in Southeast Asia (AATSEA)
URL: www.ijat-aatsea.com

International Journal of Agricultural Technology XXXX Vol. X(X): XXXX-XXXX
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

Identification of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented sausage for nitrite degradation ability

Wanangkarn A.[1, 2*], Tan, F. J.[3], Phumthong, N.[1] and Boonsema, P.[1]

[1]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanuloke 65000, Thailand. ; [2]The Center for Agricultural Biotechnology (AGBIOTECH-NU), Naresuan University, Phitsanuloke 65000, Thailand; [3] Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan.

Wanangkarn A., Tan, F. J., Phumthong, N. and Boonsema, P. (xxxx). Identification of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented sausage for nitrite degradation ability. International Journal of Agricultural Technology x(x): xxx-xxx.

Absract

Many traditional Thai fermented meat products were naturally fermented, relying on the natural contamination by house flora resulting in products with inconsistent qualities and even unsafe products. The lactic acid bacteria species in Thai fermented sausage (E-sarn sausage) was identified by using molecular techniques and investigated their potential to reduce the nitrite content. The isolated strains were identified by sequencing 16S ribosomal DNA as *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, and *Pediococcus pentosaceus*. The nitrite degradation capacity in MRS broth, *E. durans*, *L. plantarum*, *L. brevis*, and *P. pentosaceus* could degrade 89.35%, 79.11%, 86.22% and 72.87% of the initial nitrite concentration, respectively. The nitrite concentration decreased throughout fermentation time and exhibited the lowest final value as 12.78-32.28 µg/ml at the third day. These results suggested that lactic acid bacteria isolates from E-sarn sausage had showed a potential to be used as starter culture to reduce the residual nitrite in Thai fermented meat products.

Keywords: Fermented sausage, identification, lactic acid bacteria, nitrite degradation

Coressponding Author: Wanangkarn, A.; **E-mail address**: Amornrat.w@nu.ac.th

Introduction

Many traditional fermented meat products in Thailand, including E-sarn sausage (pork fermented sausage) were naturally fermented by house flora, which occurs during animal slaughtering and sausage manufacturing (Ammor *et al.*, 2005). Furthermore, this natural fermentation may result in products with inconsistent qualities and even unsafe products (Wanangkarn *et al.*, 2012). For this reason, fermented sausages are generally manufactured with food preservatives (Paik and Lee, 2014). Nitrate and nitrite are widely used as curing agents by combining with potassium or sodium salts in meat products to extend the shelf life (Goswami *et al.*, 2014) due to their preserving action on colour, flavor, and the reduction of lipid oxidation (Alahakoon *et al.*, 2015). Moreover, nitrite is recognized as an antimicrobial agent to inhibit the growth of pathogenic bacteria, which cause food poisoning, such as *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. (Hospital *et al.*, 2014; Tompkin, 2005). However, the addition of a high level of nitrite has toxicological risks due to the transformation of nitrite to N-nitrosamine (Mirvish, 1995; Cammack *et al.*, 1999).

N-nitrosamines are formed by the reaction between the nitrosating agents, which originate from nitrite and amines derived from protein (De Mey *et al.*, 2017). These substances are considered carcinogens and mutagens that can cause gastric and colorectal cancer in humans (Oostindjer *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Due to the health concerns, the maximum level of sodium nitrite permitted by the Ministry of Public Health of Thailand is 125 ppm of sodium nitrite for meat products. The current approved levels of sodium nitrite in meat products may be revised in the near future due to the increasing demand of additive-free and healthy food products by consumers. However, the addition of nitrate and nitrite should be limited to the necessary minimum levels, which provide enough protection against food poisoning (Hospital *et al.*, 2012). The residual nitrite level in meat products is dependent on many factors, including heat treatment, storage condition, food additives, pH value, and packaging type (Boci *et al.*, 2014). Furthermore, previous studies demonstrated that some lactic acid bacteria (LAB) in meat products are highly efficient in both nitrate and nitrite reductase activities (Ammor and Mayo, 2007).

Therefore, the purpose of this study was to identify LAB species in Thai fermented sausage (E-sarn sausage) and investigate their potential as starter culture for fermented sausages with nitrite reducing capacity.

Materials and methods

Sausage sampling and isolation of lactic acid bacteria

Freshly-manufactured E-sarn sausages were obtained from a local meat factory (Phitsanuloke, Thailand) and transported to the lab. After collection, the sausages were stored at 4°C until analyzes. A 25-g sample was homogenized with 225 ml of 0.85% NaCl solution (w/v). Serial dilutions of the samples were made and plated onto the Man Rogosa Sharpe (MRS) agar supplemented with 1% $CaCO_3$ to distinguish the acid-producing bacteria and incubated at 37°C for 48 h (APHA, 2001). LAB isolates were selected and streaked on MRS agar (Harrigan, 1998). The purified colonies were stored as liquid cultures in MRS broth with 30% (v/v) glycerol at -80°C before being subjected to molecular identification (Papamanoli *et al.*, 2003).

Depletion of sodium nitrite by LAB culture in MRS broth

The nitrite reducing capacity of LAB was determined as described by Esmaeilzadeh *et al.* (2012). The LAB strains were activated in MRS agar and incubated at 37°C for 24 h. Freshly cultured LAB strains were inoculated at 10^8 CFU/ml into 10 mL MRS broth containing 120 µg/ml sterilized sodium nitrite solution. The control samples were made without any inoculums. The mixture tubes were incubated at 37°C for 3 days. The supernatant was collected by centrifugation at 3000 g for 15 min and used to measure nitrite. The degree of microbial depletion of nitrite in broth cultures was analyzed using colorimetric nitrite assay. The optical density (OD) value of colored mixtures was performed at 538 nm. A standard curve in the range 0-3,000 µg/ml of $NaNO_2$ solutions was subjected to similar colour development and OD measurement steps. The above test was analyzes in triplicate.

DNA extraction and 16S ribosomal DNA amplification of LAB isolates

LAB isolates were activated in MRS broth at 30°C for 12 h before analysis, and then genomic DNA of the isolates was extracted using a DNA extraction kit. The genomic DNA was quantified using a nanodrop 2000 spectrophotometer and checked for integrity

by horizontal gel electrophoresis (Bio-RAD, California, USA) with 1.5% (w/v) agarose pre-stained with SYBR® safe DNA gel (Invitrogen, UK) in 1X TBE using 100 V for 20 min. The 16S rDNA was amplified by polymerase chain reactions (PCR) and using the primer set of BSF8/ 20 (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') and REVB (5' - GGTTACCTTGTTACGAC
TT-3'). The amplification program was performed with an initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 35 cycles include a denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, elongation at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The amplified product was checked using electrophoresis in a 1.5% (w/v) agarose gel and photographed via an UV illumination.

16S rDNA gene sequencing analysis

Prior to sequence analysis of 16S rDNA, the 16S rDNA was purified by PureLink™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA.). Sequencing reactions were evaluated by the Biodesign company (Pathumthani, Thailand). The identities of these isolates were determined through the GenBank DNA database using the basic local alignment search tool (BLAST).

Results

Genotypic techniques have a high discriminatory power to classify LAB isolates from foods and other materials. In this study, all genomic DNA samples were extracted and amplified 16S rDNA by using the universal primer set. As shown in Fig.1, LAB isolated and purified from Thai fermented sausage were successfully amplified in the above PCR amplification procedures, and samples showed a single band without any non-specific amplification. The lengths of PCR amplification product were approximately 1,600 bp.

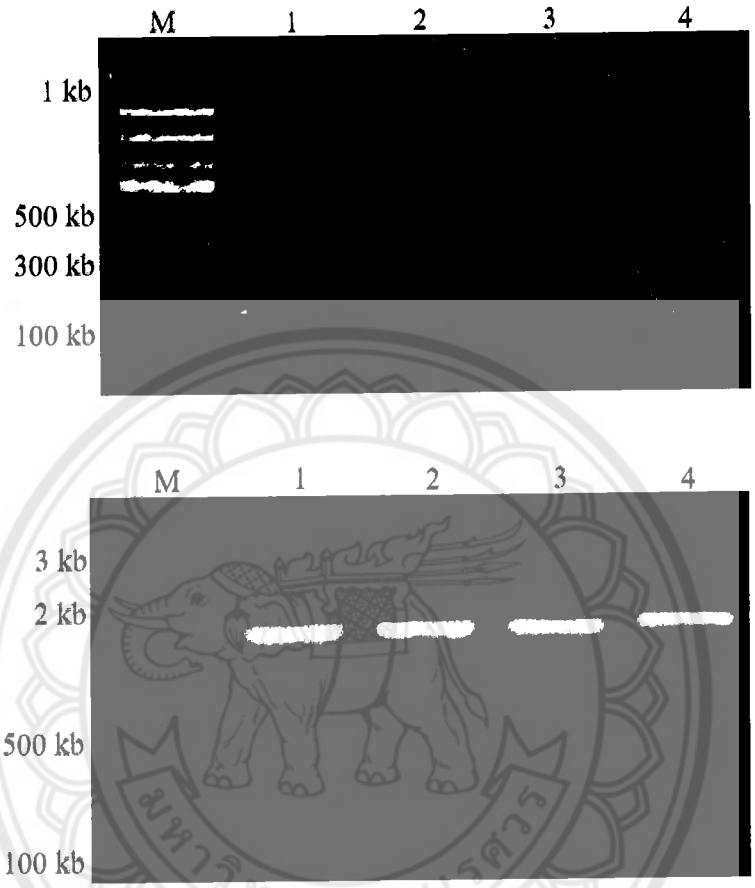


Figure 1. The gel electrophoresis analysis of (a) DNA extracts and (b) 16S rDNA gene on 1.5% agarose gel from LAB. Lane M: MW marker; lane 1: *E. durans*; lane 2: *L. plantarum*; lane 3: *L. brevis*; lane 4: *P. pentosaceus*.

The 16S rDNA sequence of four LAB were compared with the nucleotide sequence deposited in GenBank DNA database by the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Table 1 shows the results from 16S rDNA sequencing, which are indicated that lanes 1, 2, 3, and 4 were matched with the species of *E. durans* (98% identity) with accession number HQ603862.1, *L. plantarum* (97% identity) with accession number MF369875.1, *L. brevis* (95% identity) with accession number KM495930.1, and *P. pentosaceus* (97% identity) with accession number NC_008525.1, respectively.

The change of nitrite concentration during fermentation period is shown in Fig. 2. The initial nitrite concentration was 120 µg/ml, and the addition of pure LAB in MRS-sodium nitrite solution was capable of reducing the nitrite concentration. At the end of fermentation, *E. durans, L. plantarum, L. brevis, and P. pentosaceus* depleted 89.35%, 79.11%, 86.22% and 72.87% of the initial nitrite, respectively. The nitrite concentration decreased throughout fermentation time and exhibited the lowest final value as 12.78-32.28 µg/ml at day 3. Additionally, MRS broth inoculated with *P. pentosaceus* exhibited the highest nitrite concentration throughout fermentation time. However, there was no significant difference ($P>0.05$) among all treatments.

Table 1 Identification of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented sausage.

Isolate no.	*The closest relative species*	*Similarity (%)**	*Accession no.**
1	*Enterococcus durans*	98	HQ603862.1
2	*Lactobacillus plantarum*	97	MF369875.1
3	*Lactobacillus brevis*	95	KM495930.1
4	*Pediococcus pentosaceus*	97	NC_008525.1

*The similarity percentage and accession numbers of the 16S rDNA sequences obtained from NCBI.

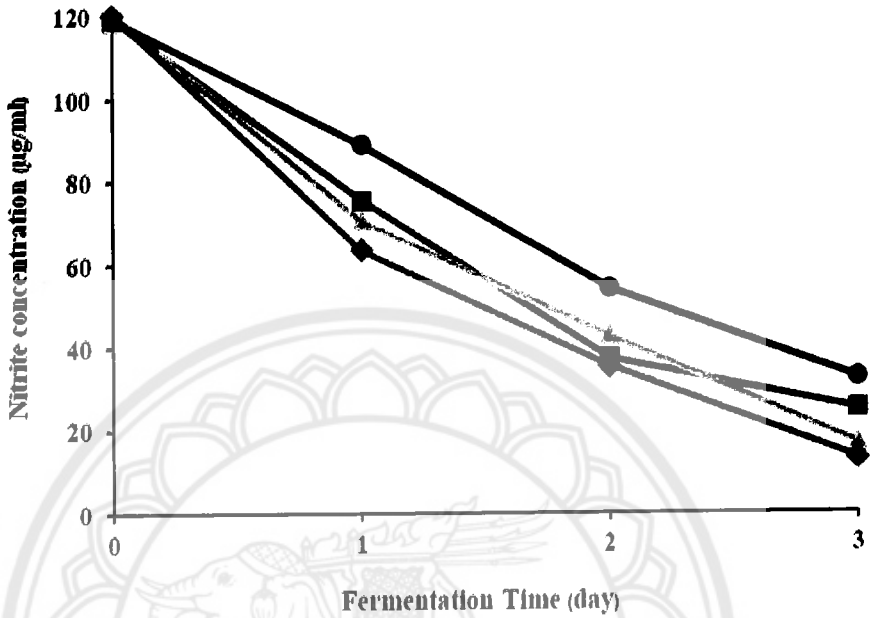


Figure 2. Nitrite depletion by pure LAB in MRS- sodium nitrite solution during fermentation period. Symbol: *E. durans* (◆), *L. plantarum* (■), *L. brevis* (▲) and *P. pentosaceus* (●).

Discussion

In this study, the LAB isolates were identified as *E. durans, L. plantarum, L. brevis, and P. pentosaceus*. Ammor *et al.* (2005) reported that the most common LAB isolated from dry fermented sausages are *Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Enterococcus*. According to the study of Thai fermented sausage, *L. plantarum* and *L. sakei* were identified as the major LAB species isolated from Mum sausages, whereas the minority species, such as *L. brevis, L. fermentum, P. pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides,* and *Lactococcus lactis* were also found (Wanangkarn *et al.*, 2014). Tanasupawat *et al.* (2015) also reported that the dominant LAB species in Thai fermented sausages, including Mum (fermented beef), Nham (fermented pork), and Sai-krog-prieo (fermented sausage) were identified as *Lactobacillus* sp., *L. pentosus*, and *P. pentosaceus*. A strain of lactobacillus is

usually present as a dominant species (Thiravattanamontri *et al.*, 1998). It may be due to the lactobacillus showing more acid tolerance than other LAB species and continuous growth throughout the fermentation process (Lee *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). Hugas and Monfort (1997) mentioned that the LAB originating from fermented meats should be well adapted to the ecological condition during meat fermentation and used as starter cultures. The addition of starter cultures in sausage production can improve the safety, stability, and shelf life of products (Leroy *et al.*, 2006). Klingberg *et al.* (2006) showed that inoculation of *L. plantarum* and *L. pentosus* to ferment Scandinavian-type sausage could inhibit pathogens and spoilage bacteria. During the fermentation process, LAB can inhibit the growth of undesirable bacteria by competing for nutrients and produce various specific inhibitory substances, including carbon dioxide, diacetyl, hydrogen peroxide, organic acids, and bacteriocins (Caplice and Fizgerald, 1999; Ghalfi *et al.*, 2010). Moreover, LAB degrade carbohydrates into a variety of organic acids (lactic acid, acetic acid, and propionic acid), which contribute to a pleasant taste in fermented products. Organic acid can also enhance the flavor of fermented sausage by interacting with alcohols and aldehydes (Liu *et al.*, 2001).

Furthermore, to guarantee the fermented sausage products are safe and good quality, manufacturers use not only a starter culture, but also add curing agents, such as nitrite to develop colour, inhibit pathogenic bacteria, and retard the rancidity of products (Maryuri *et al.*, 2012). In the current study, we investigated the ability of pure LAB to deplete nitrite concentration in MRS broth during the fermentation period. It was observed that LAB were able to reduce nitrite, which was in agreement with previous studies. *L. plantarum* (Esmaeilzadeh *et al.*, 2012) and *P. pentosaceus* (Wu *et al.*, 2012) are the active species for nitrite degradation. Dodds and Collins-Thompson (1984) compared different strains of LAB, including *Lc. lactis*, *L. acidophilus*, *L. viridescens*, and *L. plantarum* and found that these LAB can rapidly deplete 61.4-92.7% of the original nitrite levels (200 ppm) in broth medium after 24 hours at 30°C under anaerobic conditions. However, in order to inoculate the meat product with LAB, residual nitrite was decreased by the action of LAB for 30% in the bologna. Several researchers have mentioned that the reduction of nitrite during the fermentation period was due to the destruction of nitrite to nitrous acid, nitric oxide (NO) and nitrates (Dodds and Collins-Thompson, 1984; Honikel, 2004).

Conclusion

The LAB isolated from E-sarn sausages were identified as *E. durans, L. plantarum, L. brevis, and P. pentosaceus.* The addition of these pure LAB in MRS-sodium nitrite solution was capable of reducing 70-80% of the original nitrite levels (120 ppm) after 72 hours at 37°C. These results provide data that support the use of these LAB strains as a starter culture for Thai fermented sausages with potential to reduce nitrite in the final products. However, the amount of the rate of nitrite reduction depends on the conditions of sausage production, including raw materials, incubation temperature, and time.

Acknowledgement

This work was supported by the Naresuan University Research Fund under the grant number R2561B059. The authors would like to thank the Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment and the Center for Agricultural Biotechnology (AGBIOTECH-NU) for instruments and laboratory space.

References

Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S. and Jo, C. (2015). Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. Trends in Food Science and Technology 45:37-49.

Ammor, M.S. and Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. Meat Science 76:138-146.

Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chailloull, S. and Chevallier, I. (2005). Characterisation and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbiology 22:529-538.

APHA. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods (4th ed.). American Public Health Association, Washington, DC., USA.

Boci, I., Ziu, E. and Bardhi, G. (2014). Role of nitrite in processed meat products and its degradation during their storage. Albanian Journal of Agricultural Sciences 1:1-5.

Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X. Y., Martinez, C. T., Maraj, S. R. and Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Biochimica et Biophysica Acta 1411:475-488.

Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. International journal of food microbiology 50:131-149.

De Mey, E., De Maere, H., Paelinck, H. and Frayer, I. (2017). Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing and mitigation strategies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57:2909-2923.

Dodds, K. L. and Collins-Thompson, D. L. (1984). Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter cultures. Journal of Food Protection 47:7-10.

Esmaeilzadeh, P., Darvishi, S., Ebrahimi, K., Mirahmadi, F. and Vaziri, M. (2012). Consideration of lactic acid bacteria ability to reduce nitrite concentration in standard De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth-sodium nitrite medium during fermentation period. World Applied Sciences Journal 18 (3): 430-435.

Ghalfi, H., Benkerroum, N., Ongena, M., Bensaid, M. and Thonart, P. (2010). Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. Food Research International 43:33-39.

Goswami, M., Prabhakaran, P. P. and Tanwar, V. K. (2014). Antioxidant and antimicrobial effects of condiments paste used as nitrite replacer in chicken mince. Veterinary World 7(6):432-438.

Harrigan, W. F. (1998). Laboratory methods in food microbiology (3rd ed.), Academic Press, California, 532 p.

Honikel, K. O. (2004). Curing agents. In: Jensen, W. K., Devine, C. and Dikeman, M. eds. Encyclopedia of meat sciences, Oxford, Elsevier Ltd, pp. 195-201.

Hospital, X. F., Hierro, E. and Fernández, M. (2012). Survival of Listeria innocua in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. International Journal of Food Microbiology 153:395-401.

Hospital, X. F., Hierro, E. and Fernandez, M. (2014). Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of Salmonella Typhimurium. Food Research International 62:410-415.

Hugas, M. and Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chemistry 59:547-554.

Klingberg, T., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. and Budde, B. (2006). Identification of potential starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology 105:419-431.

Lee, J. Y., Kim, C. J. and Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. Meat Science 72:437-445.

Leroy, F., Verluyten, J. and Vuyst, L. D. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology 106:270-285.

Liu, D. X., Zhang, L. C., Wang, Q., Da, C. S., Xin, Z. Q., Wang, R., Choi, M. C. and Chan, A. S. (2001). The application of chiral aminonaphthols in the enantioselective addition of diethylzinc to aryl aldehydes. Organic Letters 3(17):2733-2735

Maryuri, T., De González, N., Osburn, W. N., Hardin, M. D., Longnecker, M., Garg, H. K., Bryan, N. S. and Keeton, J. T. (2012). Survey of residual nitrite and nitrate in conventional and organic/ natural/ uncured/ indirectly cured meats available at retail in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60:3981-3990.

Mirvish, S. S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. Cancer Letter 93:17-48.

Oostindjer, M., Alexander, J., Amdam, G. V., Andersen, G., Bryan, N. S., Chen, D. and Egelandsdal, B. (2014). The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. Meat Science 97(4): 583-596.

Paik, H. D. and Lee, J. Y. (2014). Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. Meat Science 97:609-614.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science 65:859-867.

Tanasupawat, S., Phoottosavako, M. and Keeratipibul, S. (2015). Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. Journal of Applied Pharmaceutical Science 5:6-12.

Thiravattanamontri, P., Tanasupawat, S., Noonpakdee, W. and Valyasevi, R. (1998). Catalases of bacteria isolated from Thai fermented foods. Food Biotechnology 12:221-238.

Tompkin, R. B. (2005). Nitrite. In: Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen, A. L. eds. Antimicrobials in food, Boca Raton, Taylor and Francis Group, pp. 169-236.

Wanangkarn, A., Liu, D. C., Swetwiwathana, A. and Tan, F. J. (2012). An innovative method for the preparation of mum (Thai fermented sausages) with acceptable technological quality and extended shelf-life. Food Chemistry 135:515-521.

Wanangkarn, A., Liu, D. C., Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A., Phraephaisarn, C., Chumnqoen, W. and Tan, F. J. (2014). Lactic acid bacterial population dynamics during fermentation and storage of Thai fermented sausage according to restriction fragment length polymorphism analysis. International Journal of Food Microbiology 186:61-67.

Wu, R., Wang, L., Wang, J., Li, H., Menghe, B., Wu, J., Guo, M. and Zhang, H. (2009). Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. Journal of Basic Microbiology 49:318-326.

Wu, Y. Y., Liu, F. J., Li, L. H., Yang, X. Q., Deng, J. C. and Chen, S. J. (2012). Isolation and identification of nitrite-degrading lactic acid bacteria from salted fish. Advanced Materials Research 393-395:828-834.

Zhu, Q., Wang, J., Liu, S. and Zhang, Y. (2015). Determination of four volatile n-nitrosamines in the process of Chinese preserved meat. International conference on materials, environmental and biological engineering. Guilin, China, pp. 618-621.