บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

อาหารหมักตามพื้นบ้านเป็นอาหารที่มีมานานและมีบริโภคเฉพาะในท้องถิ่นที่ผลิตเท่านั้น โดยส่วนใหญ่แล้วในแต่ละประเทศมักจะมีอาหารหมักที่ขึ้นชื่อและมีลักษณะพิเศษจำเพาะของแต่ละประเทศ (ตาราง 1) สำหรับประเทศไทยมีอาหารหมักดองในแต่ละภาคทั้งภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง (ตาราง 2) ผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านโดยทั่วไปมักมีกระบวนการผลิตที่ง่ายๆ เช่น การดองเค็ม การดองหวาน การดองเปรี้ยว รวมถึงการหมักอื่นๆ บางครั้งก็อาจจะใช้เทคนิคผสมผสานในหลายวิธีของการแปรรูป เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามอาหารหมักพื้นบ้านมักมีความผันแปรในแต่ละพื้นที่ วิธีการผลิตมักเป็นวิธีการที่ถูกถ่ายทอดจากบรรพบุรุษสู่ลูกหลานแต่ละยุค ด้วยกระบวนการที่ง่ายๆสู่กระบวนการที่ซับซ้อนยุ่งยากมากขึ้น (ไพโรจน์และคณะ, 2537) กระบวนการหมักที่ใช้ในการทำอาหารหมักตามพื้นบ้านนี้จะช่วยเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบขึ้นมาเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบก่อนที่จะนำมาหมัก ช่วยสร้างสารเพิ่มรสชาติอาหาร อีกทั้งจะช่วยป้องกันการเน่าเสียของวัตถุดิบที่ใช้ ดังนั้นการหมักจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการถนอมอาหารได้โดยไม่จำเป็นต้องแช่เย็น

โดยส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของวัตถุดิบ ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะและเอนไซม์ดังกล่าวจะก่อให้เกิดผลต่อวัตถุดิบคือ ช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหาร ทำลายส่วนประกอบที่ไม่ต้องการและยังช่วยปรับปรุงรสชาติ คุณสมบัติในการเก็บรักษา รวมถึงความสามารถในการย่อยสลาย (digestibility) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2542)

ปัจจุบันเทคโนโลยีอาหารหมักดองยิ่งมีความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ สืบเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของราคาของแหล่งพลังงาน และประชากรส่วนใหญ่มีความสนใจกับการแปรรูปอาหารให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด ไม่มีการใช้สารเคมีในอาหาร การแปรรูปโดยการใช้กระบวนการให้ความร้อนหรือโดยกระบวนการแช่แข็งเป็นวิธีการที่ต้องสูญเสียพลังงานค่อนข้างมาก อีกทั้งกระบวนการให้ความร้อนในการแปรรูปอาหารเป็นการลดคุณค่าโภชนาการของผลิตภัณฑ์อีกด้วย ดังนั้นการนำเทคโนโลยีหมักดองมาใช้ประโยชน์ จึงเป็นวิธีการที่น่าจะมีแนวโน้มที่ดีด้วยเหตุผลที่ว่าเป็นของที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ ไม่มีการเจือปนของสารเคมีในกระบวนการ มีการจัดการที่ไม่ซับซ้อน และประหยัด (Peter, 1980) นอกจากนี้นัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 อาหารหมักดองของประเทศต่างๆ

Name	Area or country	Organisms used	Subatrate	Nature and uses
Soy sauce (chiang-yu, shoyu, toyo, kanjang, kecap, see-ieu)	the Orient	*Aspergillus oryzae, Pediococcus halophilus, Lactobacillus delbrueckii, Torulopsis versatilus, Saccharomyces rouxii*	whole soybeans or defatted soy product. wheat	dark reddish liquid, salty taste resembling meat extract: a flavoring agent
Miso (chiang, doenjang, soybean paste, touco)	the Orient	*Aspergillus oryzae, Saccharomyces rouxii, Torulopsis etchellsii, Pediococcus halophilus*	whole soybeans, rice, or barley	paste, smooth or chunky , light yellow to dark reddish brown, salty and strong flavored resembling soy sauce: a flavoring agent
Hamanatto (toushih, tao-si, tao-tjo)	the Orient	*Aspergillus, Streptococcus, Pediococcus*	whole soybeans, wheat flour	nearly black soft beans, salty flavor resembling soy sauce: a condiment
Ang-kak (red rice, anka)	China, the Philippines	*Monascus purpureus*	rice	red color throughout the rice kernels; a coloring agent
Sufu (fu-ru, tu-ju, tou-fu-ju, bean cake, Chinease cheese)	China	*Actinomucor elegans, Mucor dispersus*	soybean curd (tofu)	cream-cheese-type cubes salty: a condiment served with or without further cooking

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Area or country	Organisms used	Substrate	Nature and uses
Lao-chao (chiu-niang, tape ketan)	China, Indonesia	*Amylomyces rouxii, Rhizopus chinensis, Saccharomycopsis fibuligera, S. malanga*	glutinous rice (waxy variety of rice)	soft, juicy, sweet, and slightly alcoholic rice: served with or without cooking as a dessert
Idli	India (esp. South India)	yeast, *Leuconostoc mesenteroides*	rice, dehulled blackgram	steamed cake
Doza (Dosai)	India	yeast, *Leuconostoc mesenteroides*	rice dehulled blackgram	pancake
Tarhana	Turkey	lactic acid bacteria	parboiled wheat meal and yogurt (2 : 1)	dried, used in soup
Injera	Ethiopia	*Candida guilliermondii*	teff (eragrostistef)	pancakes
Kishk (Kushuk-Iranian name)	Egypt, Syria, Arab World	lactic acid bacteria	wheat, milk	dried balls, dissolve rapidly in water
Gari	West Africa, Nigeria	*Geotrichum candidum, Corynebacterium sp.*	cassava roots	almost pure starch with sour taste: eaten with bean-flour or fish
Ogi	Dahomey, Nigeria	molds and bacteria	maize	fermented cake boiled and eaten hot: if cooked on banana leaves

ที่มา : Hesseltine and Wang, 1980

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 อาหารหมักดอง ตามภาคต่างๆของประเทศไทยที่มีแลคติคแอสิดแบคทีเรียเกี่ยวข้อง

พื้นที่	อาหารหมักดอง	
	พืชและเห็ด	สัตว์
ภาคเหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักดอง แหนม เห็ด และผลไม้ดอง	แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาเจ่า น้ำปลา
ภาคใต้	ขนมจีน กังฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย เกี้ยมฉ่าย หัวไชโป้ว ซีอิ้ว ข้าวหมาก เต้าเจี้ยว ผักและผลไม้ดอง	หมูอวน หอยดอง กุ้งจ่อม น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา ปลาจ่อม ปลาแป้งแดง ปลาหมัก ไตปลา
ภาคตะวันออก	ขนมจีน กังฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ผัก และผลไม้ดอง	หอยดอง ปลาจ่อม น้ำปลา
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ขนมจีน แหนมเห็ด ผักและผลไม้ดอง	ส้มฟัก กุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปลาร้า แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาเจ่า และน้ำปลา
ภาคกลาง	ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน กังฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผัก และผลไม้ดอง	กุ้งเจ่า กุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปลาร้า หอยดอง น้ำปลา

ที่มา : วิเชียร, 2534

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พัฒนาผลิตภัณฑ์บางท่านมีความเชื่อว่า ความรู้ความเข้าใจในกลไกของการหมักจะนำพาไปสู่การพัฒนาสูตรและวิธีการหมักเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์หมักดองชนิดใหม่ได้

เทคโนโลยีการใช้กล้าเชื้อ (starter cultures) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการหมัก วัตถุประสงค์ของการเติมเชื้อบริสุทธิ์ลงไปในกระบวนการผลิต ก็เพื่อสร้างความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความปลอดภัยสูง มีระยะเวลาการหมักที่สั้นลง และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ มีอายุการเก็บรักษาที่คงทน จากงานวิจัยที่สนับสนุนว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อแล้วทำให้ได้ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ดี มีคุณภาพสม่ำเสมอ (Acton and Keller, 1974; Acton, 1977 และ Klettner and Baumgartner, 1980) การเติมเกลือแกง น้ำตาล สารประกอบไนไตรท ไนไตรท์ การรมควัน การหมักที่อุณหภูมิเหมาะสม รวมทั้งการสร้างสภาพสิ่งแวดล้อมของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักเช่น การบรรจุในถุงพลาสติกปิด ล้วนแต่เป็นเทคนิคที่ทำให้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ ใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นกรดแลคติค ทำให้ความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์ลดลง และทำให้คุณภาพผลิตภัณฑ์คงทนต่อการเสื่อมเสียอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระหว่างการเก็บรักษา (Bacus, 1984; Bacus and Brown, 1985)

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้เทคโนโลนีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น คือปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ว่าจะต้องเพียงพอหรือมากพอที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบตามธรรมชาติ ตลอดจนต้องมีการควบคุมกระบวนการหมักให้เหมาะสม เมื่อมีการควบคุมและปฏิบัติการดังกล่าวอย่างดีที่สุดแล้วก็เป็นหลักประกันได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้น่าจะปลอดภัย และมีคุณภาพมาตรฐานที่ดี (Bacus and Brown, 1981)

ในการผลิตแหนมเห็ดมีส่วนประกอบที่สำคัญอื่นๆ ที่มีผลต่อการหมักแหนมเห็ด ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. เห็ดนางรม

ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Pleurotus ostreatus*

การจัดจำพวก Class *Basidiomycetes*

Order *Agaricales*

Family *Agaricaceae*

ชื่อสามัญ Oyster mushroom

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดนางรมมีหมวกเห็ดคล้ายหอยนางรม ดอกเห็ดมีสีขาวอมเทา ก้านดอกจะเป็นเนื้อเดียวกันกับหมวกเห็ด ลักษณะของหมวกดอกเห็ดจะเว้าตรงกลาง ผิวด้านบนโค้งเรียบ อ่อนนุ่มและกลม ขอบดอกจะห้อยย้อยลงมาด้านล่าง เมื่อโตเต็มที่ด้านหลังดอกจะมีลักษณะเป็นครีบ อาจจะเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกระจุกก็ได้ เมื่อโตเต็มที่ปกติจะกว้างประมาณ 3-6 นิ้ว เนื่องจากเห็ดนางรมมีน้ำย่อยที่ใช้ย่อยสารประกอบเชิงซ้อนจำพวกเซลลูโลสและลิกนินได้เป็นอย่างดี บางครั้งจะพบว่าเป็นปรสิตอย่างอ่อนเกาะกินต้นไม้ได้ ครั้นพอต้นไม้ตายลงแล้วก็ยังคงย่อยสลายเศษซากไม้ที่ตายแล้วต่อไปได้อีก (บรรณ, 2532)

เห็ดนางรมเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทั้งในต่างประเทศ และภายในประเทศไทยเอง เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีสีขาวสวยและสะอาด เมื่อใช้ปรุงอาหารรับประทานแล้วก็ให้รสชาติที่อร่อยไม่เหนียวมากแม้ว่าจะแก่มากน้อยเพียงใดก็ตาม เป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ประกอบไปด้วยธาตุอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ และวิตามินอยู่หลายชนิด จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารพบว่าเห็ดนางรมมีคุณค่าทางอาหารรวมทั้งสรรพคุณทางยาไม่แพ้เห็ดชนิดอื่นๆ ที่นิยมรับประทานกันในประเทศไทย อีกทั้งยังสามารถเพาะให้เกิดดอกได้ตลอดทั้งปี (อานนท์, 2523)

จากการวิเคราะห์ธาตุอาหารของเห็ดนางรมโดยกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม ผลปรากฏดังนี้ (อานนท์, 2523)

โปรตีน	5.94 %
คาร์โบไฮเดรต	50.59 %
กาก	1.50 %
ไขมัน	0.17 %
เถ้า	1.14 %

เห็ดนางรม 100 กรัม จะให้พลังงาน และแร่ธาตุวิตามิน ดังนี้

พลังงานความร้อน	45.65 แคลอรี
แคลเซียม	8.90 มิลลิกรัม
เหล็ก	1.90 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	170.00 มิลลิกรัม
วิตามินบีหนึ่ง	0.15 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิตามินบีสอง	0.15 มิลลิกรัม
วิตามินซี	12.40 มิลลิกรัม

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดนางรมเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆพบว่า เห็ดนางรมมีคุณค่าทางอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์สูงมาก มีโปรตีนสูงรองจากถั่ว มีเกลือแร่ที่ร่างกายต้องการอย่างครบครัน เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก สูงกว่าอาหารประเภทเนื้อวัว สุกร และไก่ ถึง 2 เท่าตัว มีวิตามินบีหนึ่ง และวิตามินบีสอง สูงมากกว่าเห็ดทุกชนิด มีไนอะซิน 5-10 เท่าของพืชผักชนิดอื่น มีกรดโฟลิกมากกว่าผักอื่นๆ และเนื้อสัตว์ ยกเว้นในตับ ซึ่งกรดนี้มีสรรพคุณทางยาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคโลหิตจางได้ ตามปกติเห็ดมีแป้ง ไขมัน และแคลอรีต่ำมาก จึงเหมาะสำหรับผู้ต้องการลดน้ำหนัก ผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง มีโซเดียมต่ำมากเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคไตอักเสบ โรคหัวใจ และโรคความดันโลหิตสูง นอกจากนั้นเห็ดก็ยังช่วยแก้ปัญหาโรคขาดอาหารซึ่งประชากรทั่วโลกกว่าร้อยละ 60 ประสบอยู่

เห็ดนางรมเมื่อตัดมาแล้วไม่สามารถเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานได้ ควรใช้ทำอาหารภายในวันเดียวหลังจากตัดมาแล้ว เนื่องจากเห็ดนางรมมีน้ำย่อยชนิดย่อยตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เก็บรักษาเห็ดได้ไม่นาน มักจะมีรสขมแม้จะแช่ในตู้เย็นก็ตาม การเก็บเห็ดไว้ในอุณภูมิห้องควรเก็บในถุงที่เจาะรูระบายอากาศและไอน้ำที่เกิดจากการหายใจของดอกเห็ด ถ้าเก็บในตู้เย็นก็ควรเอาถุงพลาสติกอย่างหุ่นมาขยี้จากนั้นใส่น้ำลงไปแล้วเขย่าเพื่อให้มีหยดน้ำเล็กๆติดภายใน เทน้ำทิ้งแล้วนำเห็ดนางรมใส่ในถุงปิดปากถุงด้วยยางรัด เมื่อเก็บในตู้เย็นจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาเห็ดนางรมข้ามวันจะทำให้รสชาติด้อยลงหรือขมขึ้นและสีออกเหลืองมากขึ้น (ดีพร้อม, 2525)

2. เกลือ (กล้าณรงค์, 2521)

เกลือกับมนุษย์เรานั้นมีความคุ้นเคยกันมานานแล้วและการใช้เกลือในการถนอมอาหารหรือปรุงอาหารได้ใช้กันมาแต่โบราณ จนถึงปัจจุบันนี้เกลือก็ยังมีความสำคัญในการถนอมอาหาร โดยเฉพาะอาหารจำพวกของเค็มที่ชนชาวเอเชียนิยมชมชอบ สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้เกลือมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารก็เพราะว่าวิธีการใช้ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งเกลือยังมีราคาถูกและหาได้ง่าย

คำว่าเกลือในภาษาวิทยาศาสตร์การอาหารนั้น เราหมายถึงเกลือที่ใช้ปรุงอาหาร (cooking salt หรือ table salt) ซึ่งมีสูตรทางเคมีว่า sodium chloride (NaCl) เกลือที่บริสุทธิ์นั้นมีลักษณะสีขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นผลึกรูปร่างไม่คงที่ แต่จัดลักษณะของผลึกเป็นรูปลูกบาศก์ เกลือมีคุณสมบัติในการดูดซึมความชื้น และจะมีคุณสมบัตินี้มากขึ้นถ้าเกลือนั้นไม่บริสุทธิ์

2.1 คุณสมบัติในการถนอมอาหารของเกลือ

เกลือที่ใช้ในอาหารนั้น ถือว่าเป็นสารที่สร้างรสเค็มในอาหาร และจาก Public Health Regulations ของสหรัฐอเมริกา 1925-1958 ไม่ถือว่าเกลือเป็นพวกสารกันบูด (chemical preservative) (Pearson, 1970) แต่เกลือนั้นมีความสามารถในการป้องกันการบูดเสียของอาหารได้ และได้ใช้ในอุตสาหกรรมมาเป็นเวลานาน เพราะเกลือเป็นตัวลดความชื้นหรือลด water activity ของอาหารลงทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเกลือละลายน้ำ สารละลายที่เกิดขึ้นมานั้น น้ำจะถูกแรงดึงตัว เกาะกันกับเกลือเกิดเป็น ion hydration ขึ้น คุณสมบัติหรือความเป็นอิสระของน้ำจึงเปลี่ยนไป

2.2 เกลือมีผลต่อจุลินทรีย์ในอาหาร ในลักษณะดังนี้

ก. ในสารละลายเกลือมีการdehydration ของเซลล์เกิดขึ้นอันเนื่องจาก osmotic pressure และเป็นเหตุให้เซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการเสียน้ำอย่างแรง (plasmolysis) และหยุดการเจริญเติบโต

ข. เกลือมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์โดยตรง Fabian and Winslow (1929) ได้แสดงให้เห็นว่า อนุมูลพวก sodium, potassium, calcium และ magnesium มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์

ค. น้ำเกลือช่วยลดการแพร่หรือการแทรกซึมของออกซิเจน ฉะนั้นจำนวนของออกซิเจนจะซึมลงไปในสารละลายได้น้อยลง จุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนจะเจริญเติบโตได้ยากขึ้น

ง. เกลือเป็นตัวทำลายเอนไซม์บางชนิด เนื่องจากเมื่อเกลือมีความเข้มข้นได้ระดับจะสามารถทำให้โปรตีนบางตัวเกิด denature และเสียคุณสมบัติเนื่องจากขบวนการ salting-out ฉะนั้นจุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญเติบโต

2.3 คุณสมบัติในการเป็นตัวเลือก (selective agent) ชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเกิดขึ้นในอาหาร

จุลินทรีย์จำพวกแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงตัวเองให้มีความทนต่อสภาวะของสารละลายเกลือได้บ้าง แต่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ทั้งชนิด aerobes หรือ anaerobes และจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic organisms) ไม่สามารถที่จะทนต่อสารละลายเกลือได้ (Desrosier, 1970) ในสารละลายเกลือที่ใช้ในอุตสาหกรรมทำของดอง (pickle) นั้นพวกยีสต์และแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จะเจริญขึ้นได้ดีและเมื่อเจริญขึ้นแล้วก็จะผลิตกรดแลคติค และกรดอื่นๆอีกบ้าง ซึ่งจะเป็นสารที่ทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ในตัวด้วย

2.4 การใช้เกลือในการทำอาหารหมักดอง

สำหรับอาหารหมักดองกับเกลือนั้น จุดหมายใหญ่ๆ ที่ต้องการในผลิตภัณฑ์คือ รสเค็ม ซึ่งจะทำให้อาหารนั้นเก็บไว้ได้นานๆ และรสเปรี้ยวซึ่งเกิดมาจาก lactic acid fermentation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในอาหารพวกเนื้อสัตว์นั้น ส่วนใหญ่จะเป็นความต้องการในด้านรสเค็ม เช่น ปลาเค็ม หมูแฮม ฯลฯ ส่วนบางชนิดที่ต้องการหมักและการสลายตัวของโปรตีนภายในเนื้ออาหาร โดยเอนไซม์ เช่น ปลาร้า น้ำปลา ซีอิ๊ว ฯลฯ ส่วนชนิดที่ต้องการความเปรี้ยวก็มีเช่น ไส้กรอกเปรี้ยว (แบบไทย) หมูส้ม ปลาส้ม และแหนม เป็นต้น

การเกิดรสเปรี้ยวนั้น เกิดขึ้นจากความเข้มข้นของเกลือที่พอเหมาะ มีผลในการเลือกจุลินทรีย์พวก แลคติคแอสิดแบคทีเรีย ให้เจริญเกิดขึ้นในอาหาร ความเข้มข้นของเกลือประมาณ 2-2.5 % ได้ถูกแนะนำให้ใช้ในการดองเปรี้ยว ที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ 1.0-2.0 % นั้น จะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดกลิ่นไม่ดี อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ จนได้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ ขณะที่ความเข้มข้นสูงๆ 5-10 % นั้นการหมักเป็นไปได้ช้า

2.5 ผลของเกลือที่มีต่อผลิตภัณฑ์ (ไพบูลย์, 2532)

เกลือที่ใช้ในการหมักยังมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังนี้

ก. ลักษณะเนื้อสัมผัส เมื่อเกลือแพร่เข้าไปยังเนื้อเยื่อของอาหาร เช่น ปลา เนื้อสัตว์ โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารประเภทนี้เกิดการจับตัวเป็นก้อน ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักมีลักษณะเหนียวแข็ง ในการทำไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ เมื่อใช้ปริมาณเกลือลดลงร้อยละ 50 จากเดิมจะทำให้คุณภาพของลักษณะเนื้อสัมผัสไส้กรอกไม่เป็นที่น่าพอใจ Kramlich *et at.* (1973) กล่าวไว้ว่า แม้ว่าเกลือจะมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อบด แต่ปฏิกิริยาระหว่างทั้งสองยังไม่เป็นที่เข้าใจ อย่างไรก็ตาม เข้าใจว่าเกิดจากการสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลไม่สมบูรณ์

ข. กลิ่นรส แม้ว่าเป็นที่ยอมรับว่าเกลือมีผลต่อกลิ่นรสของอาหาร แต่ความบริสุทธิ์ของเกลือนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อกลิ่นรส แคลเซียมซัลเฟต กับปริมาณเล็กน้อยของแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ จะทำให้เกิดรสขมกับผลิตภัณฑ์ ทั้งยังเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดกลิ่นหืนได้ เกลือจึงทำตัวเป็น pro-oxydance (Borgstrom, 1971)

3 คาร์โบไฮเดรต

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและสร้างกรดได้มี รา ยีสต์ และแบคทีเรียหลายชนิด แต่แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการหมักอาหารคือ แลคติคแอสิดแบคทีเรียโดยใช้คาร์โบไฮเดรตที่เติมลงไปในสูตรการผลิตเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และสร้างกรดแลคติคขึ้น มีผลให้ผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรด (มีผลต่อการตายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ) ไพโรจน์และคณะ (2537) ได้รายงานว่าการใช้ข้าวเจ้าร้อยละ 3 ร่วมกับข้าวเหนียวร้อยละ 1 ในสูตรการผลิตแหนมจะเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยเชื้อสามารถเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตให้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ค่อนข้างมากใน 6 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคในระยะต่อมา คิดเป็นปริมาณกรดทั้งหมด (เทียบกับกรดแลคติค) ร้อยละ 1.03 ความเป็นกรด-ด่าง 4.36

ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักสามารถใช้น้ำตาลได้หลายรูปแบบ เช่น เดกซโตรส ซูโครส น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) โดยจะช่วยในด้านกลิ่น ลักษณะเนื้อสัมผัส ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์ น้ำตาลที่ใช้จะเป็นสารเริ่มต้นของการเกิดกรดแลคติค ซึ่งจะมีผลโดยตรงกับค่า pH ที่ลดลงด้วย ได้มีผู้ศึกษาว่าความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 1 จะมีผลให้ค่า pH ลดลง 1 หน่วย (Acton *et al.*, 1977) สำหรับการใช้คาร์โบไฮเดรตที่เป็นน้ำตาลซูโครส พบว่าจะทำให้รสเปรี้ยวต่ำน้อยกว่าการใช้น้ำตาลเดกซโตรสที่ค่าระดับ pH เดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำตาลดังกล่าวมีรสหวานกว่าน้ำตาลเดกซโตรส หรือให้สภาพที่มีความเป็นด่างในผลิตภัณฑ์มากกว่า สำหรับคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลซับซ้อนจะต้องอาศัยเวลาหมักที่นานกว่า ตัวอย่างเช่น การใช้ข้าวสุกหรือข้าวเหนียวนึ่ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตแหนม โดยจะเปลี่ยนเป็นกรดแลคติค ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์ ซึ่งถ้าต้องการให้มีรสเปรี้ยวยิ่งขึ้นอาจเพิ่มปริมาณข้าวสุกได้ แต่ก็ควรมีข้อจำกัดในการใช้เช่นเดียวกัน เพราะลักษณะผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจเปลี่ยนไปในอุตสาหกรรมการหมักแบบครัวเรือนมักจะใช้ข้าวสุกเติมในส่วนผสมให้เกิดรสเปรี้ยว เนื่องจากหาได้ง่าย ราคาถูก ทำให้ลดต้นทุนการผลิตลง

ไพโรจน์และคณะ (2537) ใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิดในสูตรการผลิตแหนมที่มีการใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ปริมาณ 10^6 โคโลนี/กรัม *Pediococcus cerevisiae* ปริมาณ 10^3 โคโลนี/กรัม และ*Micrococcus varians* ปริมาณ 10^6 โคโลนี/กรัม แหล่งคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิดที่ใช้ คือ ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า แป้งถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวสาลี และแป้งข้าวโพด ในปริมาณร้อยละ 6 ในสูตรการผลิต เมื่อหมักผลิตภัณฑ์ได้ 48 ชั่วโมงพบว่า ผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้ข้าวเหนียว และข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำที่สุดคือ 4.54 และการใช้แป้งถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลังผลิตภัณฑ์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงที่สุดคือ 4.69 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และผลิตภัณฑ์ที่ใช้แป้งสาลี และแป้งข้างโพดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตนั้นมีกรดแลคติคสูงที่สุดคือร้อยละ 1.12 และ 1.23 ตามลำดับ และจากการประเมินความชอบของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนม ที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมร่วมกับแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เป็นข้าวเจ้า ข้าวเหนียว แป้งถั่วเหลือง และแป้งสาลี มีลักษณะสีที่ปรากฏดีกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ส่วนในด้านความเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์แหนมที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดในสูตรการผลิต จะมีความเปรี้ยวที่น้อยกว่าการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะกลิ่นของเครื่องเทศดีกว่าการใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้แป้งข้าวเจ้าหรือแป้งสาลีเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชอบรวมสูงที่สุด

4. เครื่องเทศ

เครื่องเทศเป็นส่วนสำคัญในอาหารหมักที่ให้รสชาติและกลิ่นที่ดีต่อผลิตภัณฑ์แล้วยังพบว่าเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตกรดที่ดี โดยเฉพาะกระเทียมสด เครื่องเทศที่ใช้ในสูตรการผลิตอาหารหมักอย่างเหมาะสมจะมีผลโดยตรงต่ออัตราเร็วของการหมักโดยจะเป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่ผลิตกรดได้ มีการสร้างกรดอย่างมีประสิทธิภาพ (Ingolf and Skjelkvale, 1982) นอกจากนั้นยังช่วยในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้อีกด้วย (Zaika *et al.*, 1978) จากการสังเกตของผู้ประกอบการอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เครื่องเทศที่มีผลต่อการกระตุ้นการผลิตกรด ได้แก่ กระเทียม พริกไทยดำ พริกไทยขาว พริกขี้หนู ขิง ดอกจันทร์ ลูกจันทร์ อบเชย กระวาน กานพลู ออลสไปซ์ (Allspice) และขมิ้น เป็นต้น อัตราการผลิตกรดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของเครื่องเทศที่ใช้ตลอดจนชนิดของแบคทีเรียที่มีในผลิตภัณฑ์ เครื่องเทศเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นโดยช่วยส่งเสริมการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ประเภท *Lactobacillus* มากกว่าพวก *Pediococcus* (Bacus and Brown, 1985) ในผลิตภัณฑ์หมักดองการใช้เครื่องเทศหลายๆชนิดผสมกัน จะทำให้อัตราเร็วของการหมักสั้นกว่าการใช้เครื่องเทศชนิดเดียว นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้มีการผลิตกรดยังขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูกและส่วนประกอบของเครื่องเทศนั้นๆ จากรายงานของ Zaika and Kissinger (1979, 1984) พบว่าแมงกานีสในเครื่องเทศเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นให้มีการผลิตกรดในระหว่างการหมัก เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีความต้องการแมงกานีสต่อการผลิตกรดโดยกลไกทางชีวเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเอนไซม์ในวิถีทางไกลโคไลซีส (Glycolysis) เช่น Fructose 1-6 diphosphate aldolase เป็นต้น การสกัดเอาสารหอมระเหยพวก oleoresin ออกจากเครื่องเทศแล้วเติมลงในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อไม่มีผลต่ออัตราเร็วของการหมัก ขณะที่การเติมเครื่องเทศจากแหล่งธรรมชาติมีผลต่อการกระตุ้นและอัตราเร็วในการสร้างกรดของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ผสมร่วมในสูตรการผลิต (Ingolf and Skjelkvale, 1982) การสะกัดเอาแมงกานีสจากเครื่องเทศชนิดต่างๆผสมลงในสูตรการผลิตในระดับ 10^{-5} M จะช่วยให้เกิดการกระตุ้นต่ออัตราเร็วในการสร้างกรดอย่างชัดเจน ผลอันนี้จะเพิ่มขึ้นถ้าหากมีการเติมปริมาณแมงกานีสมากขึ้นเช่นกัน (Zaika and Kissinger, 1984)

เครื่องเทศบางชนิดมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น กระเทียม โดยที่กระเทียมจะสร้างสารยับยั้งที่เรียกว่า allicin (2-propenyl-2-propernethiol sulfonat) ที่เพิ่มปริมาณมากขึ้นหลังจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการไฮโดรไลซีสของ allicin ที่มีอยู่ในกระเทียม ซึ่งกระบวนการไฮโดรไลซีสของสาร allicin นี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่กลีบกระเทียมได้ถูกทำให้แตก โดยการบดหรือสับ ซึ่งสารนี้มีผลต่อการยับยั้งและทำลายเชื้อ *Salmonella serovars* เช่น *Sal. anatum* รวมถึง *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทนกรดและพบมากระหว่างการหมักแหนม (อดิศร, 2542)

จากการทดลองของไพโรจน์และคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาเครื่องเทศที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตกรด พบว่าขมิ้นขาวสดร้อยละ 4 ร่วมกับกระเทียมสด และพริกขี้หนูสดร้อยละ 2 และ 4 ตามลำดับ มีผลต่อการผลิตกรดแลคติคโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้นถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อลักษณะของแหนมพบว่ากระเทียมร้อยละ 3-7 และพริกไทยร้อยละ 0.05 ไม่มีผลต่อลักษณะของแหนม แต่มีผลเฉพาะต่อการสูญเสียน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ (Wiriyacharee, 1990) แต่ดูเหมือนว่ากระเทียมสดมีผลต่อการผลิตกรดและการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง มีผลให้ความแน่นเนื้อของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ลักษณะสีเพิ่มขึ้น ตลอดจนมีการชะงักการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในผลิตภัณฑ์อีกด้วย

Zaika *et al.* (1976) พบว่าในการผลิตไส้กรอกหมัก จุลินทรีย์ที่ปะปนมากับเครื่องเทศจะมีหรือไม่ก็ตามไม่มีผลต่อการหมักไม่แตกต่างกัน และยังพบว่าการเติมเครื่องเทศจะช่วยเร่งอัตราการหมักไส้กรอกได้เร็วขึ้นตามปริมาณเครื่องเทศที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Nes and Skielkvale (1982) ศึกษาปริมาณการใช้กระเทียม 0-3 กรัมต่อลิตร และพริกไทย 0-10 กรัมต่อลิตร ในไส้กรอกหมัก พบว่าอัตราการหมักเร็วขึ้นเมื่อใช้เครื่องเทศปริมาณมากขึ้น

5. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง

จุลินทรีย์ที่สำคัญที่เกี่ยวกับการหมักคือพวกที่สามารถผลิตกรดแลคติค โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถที่จะดำรงชีวิต และทำให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจน กระบวนการทำงานจะเกิดจากออกซิเดชันและรีดักชันภายในโมเลกุลเนื่องจากว่ากระบวนการสลายของสารไม่ได้ใช้ออกซิเจน ดังนั้นผลผลิตสุดท้ายจึงไม่ใช่เป็นพวกคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ ไนเตรท และซัลเฟต แต่ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม จะเป็นกรดแลคติคที่ได้จากการหมักน้ำตาล ความสามารถของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นกรดแลคติค อะซิติค แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำให้สารอาหารประเภทอื่นในอาหารนั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก จุลินทรีย์เหล่านี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จึงมีความสำคัญในการถนอมอาหาร เพราะไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เสียไป กรดแลคติคที่ผลิตขึ้นยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อีก (Axelsson, 1993)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากกรดแลคติคที่ช่วยในการถนอมอาหารแล้ว แลคติคแอสิดแบคทีเรียยังสามารถสร้างสารอีกหลายชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นการที่อาหารหมักดองสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานนั้น จึงมิใช่เพียงเพราะกรดแลคติคที่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงเท่านั้น แต่มีสารอีกหลายชนิดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักที่มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซิทิล (diacetyl) แบคเทอร์ริโอซิน (bacteriocin) ไมโครแกรด (microgrd) และรูทีทิน (reuterin) (อรวินท์, 2534)

แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบมากในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีดังนี้

กลุ่ม *Lactobacillus*

เซลล์รูปท่อน ติดสีแกรมบวก อาจเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้น และมีกรดมากขึ้น โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่ ถ้ามีจะใช้แฟลกเจลลาชนิดรอบตัว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส แต่อาจมีบางสายพันธุ์สามารถสลายเปอร์ออกไซด์ได้ โดยใช้เอนไซม์ซูโดคาตาเลส ส่วนใหญ่ไม่สร้างสารสี ถ้าสร้างจะมีสีเหลือง ส้ม จนถึงสีแดงอิฐ หรือสีสนิม เป็นพวกต้องการอาหารซับซ้อนในการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญโดยทั่วไปคือ 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้คือ 5-53 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 5.5-5.8 หรือต่ำกว่า และโดยทั่วไปเจริญที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 หรือต่ำกว่า ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลางหรือเริ่มเป็นด่างทำให้การเจริญจะลดลง แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถพบในนม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำ น้ำเสีย เบียร์ ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง

แบคทีเรียพวกนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เป็นพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลคติคประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า ได้แก่ *Lb. delbrueckii, Lb. leichmannii, Lb. jensenii, Lb.lactis, Lb. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. acidophilus, Lb. salivarius, Lb. casei, Lb. xylosus, Lb. plantarum, Lb. curvatus, Lb. coryniformis* และ *Lb. homohiochill* อีกกลุ่มคือพวกเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ เป็นพวกหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลคติคประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติค และเอทานอล ได้แก่ *Lb. fermentum, Lb. cellobiosus, Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. viridescens* และ *Lb. coprophilus*

การจำแนก *Lactobacillus spp.* ออกเป็นสปีชีส์แสดงในตาราง 3-5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 การจัดจำแนก *Lactobacillus spp.* ในกลุ่ม obligately homofermentative ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

Species	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer (s)	15/45 Growth (°C)	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented +											
							Amygdalin	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose
1 *Lb. acidophilus*	a	Lys-DAsp	34-37	DL	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	d	d	+	+	d
2 *Lb. amylophilus*	a	Lys-DAsp	44-46	L	+/-	ND	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
3 *Lb. amylovorus*	a	Lys-DAsp	40-41	DL	-/+	ND	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
4 *Lb. crispatus*	a	Lys-DAsp	35-38	DL	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
5a *Lb. debrueckii* subsp. *bulgaricus*	a	Lys-DAsp	49-51	D	-/+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5b *Lb. debrueckii* subsp. *debrueckii*	a	Lys-DAsp	49-51	D	-/+	d	-	d	-	-	d	-	+	-	-	-	+	d
5c *Lb. debrueckii* subsp. *lactis*	a	Lys-DAsp	49-51	D	-/+	d	+	d	d	+	+	-	+	-	-	+	+	+
6 *Lb. gallinarum*	a	Lys-DAsp	36-37	DL	+/+	ND	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	-
7 *Lb. gasseri*	a	Lys-DAsp	33-35	DL	-/+	-	+	+	+	d	d	-	+	d	d	+	+	d
8 *Lb. helveticus*	a	Lys-DAsp	38-40	DL	-/+	-	-	-	+	+	d	-	d	-	-	-	-	d
9 *Lb. jensenii*	a	Lys-DAsp	35-37	D	-/+	+	+	+	+	-	d	d	+	-	-	+	+	+
10 *Lb. johnsonii*	a	Lys-DAsp	33-35	DL	+/+	ND	+	+	+	d	+	-	+	d	d	+	+	d
11 *Lb. kefiranofaciens*	a	ND	34-35	D(L)	-/-	ND	-	-	+	+	+	-	ND	+	+	-	+	-
12a *Lb. aviarius* subsp. *araffinose*	b	Lys-DAsp	39-43	L(D)	-/ND	ND	d	d	-	-	+	-	+	-	-	d	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer (s)	15/45 Growth (°C)	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented +											
							Amygdalin	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose
12b *Lb. aviarius* subsp. *aviarius*	b	Lys-DAsp	39-43	DL	-/ND	ND	d	+	d	d	+	-	+	d	+	+	+	+
13 *Lb. farciminis*	b	Lys-DAsp	34-36	L(D)	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
14a *Lb. salivarius* subsp. *salicinus*	b	Lys-DAsp	34-36	L	-/+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14b *Lb. salivarius* subsp. *salivarius*	b	Lys-DAsp	34-36	L	-/+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
15 *Lb. mali*	b	DAP	32-34	L	+/-	-	+	d	d	-	-	-	+	-	-	+	+	+
16 *Lb. ruminis*	b	DAP	44-47	L	-/d	-	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	-
17 *Lb. sharpeae*	b	DAP	53	L	+/-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-

* Group a species belong to the *Lb. delbrueckii* group; Group b organisms to the *Lb. casei-Pediococcus* group.

+ Symbols: + , 90% or more of strains are positive; - , 90% or more of strains are negative; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available; DAP, diaminopimelic acid.

Parenthesized isomers indicate < 15% of total lactic acid.

ที่มา: Holzapfel and Wood, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 การจัดจำแนก *Lactobacillus spp.* ในกลุ่ม facultatively heterofermentative ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer (s)	15/45 Growth (°C)	Carbohydrates fermented +												
						Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
1 *Lb. acetotolerans*	a	Lys-DAsp	35-36.5	DL	-/-	-	-	d	+	-	d	-	-	-	d	-	-	-
2 *Lb. hamsteri*	a	Lys-DAsp	33-35	DL	-/ND	ND	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	d
3 *Lb. alimentarius*	b	Lys-DAsp	36-37	L(D)	+/-	ND	d	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
4 *Lb. bifermentans*	b	Lys-DAsp	45	DL	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
5 *Lb. casei*	b	Lys-DAsp	45-47	L	+/-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
6a *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*	b	Lys-DAsp	45	D(L)	+/-	-	-	-	d	+	+	-	d	d	-	d	+	-
6b *Lb. coryniformis* subsp. *torquens*	b	Lys-DAsp	45	D	+/-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
7 *Lb. curvatus*	b	Lys-DAsp	42-44	DL	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	d	-
8 *Lb. graminis*	b	Lys-DAsp	41-43	DL	+/-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9 *Lb. homohiochii*	b	Lys-DAsp	35-38	DL	+/-	-	-	d	ND	-	d	-	-	-	d	-	-	-
10 *Lb. intestinalis*	b	Lys-DAsp	33-35	DL	-/+	-	-	d	-	ND	+	-	d	d	d	-	+	-
11 *Lb. murinus*	b	Lys-DAsp	43-44	L	-/+	d	+	+	+	-	d	-	+	+	+	-	+	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 (ต่อ)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer (s)	15/45 Growth (°C)	Carbohydrates fermented +													
						Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose	
12a *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*	b	Lys-DAsp	45-47	L/DL	+/d	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	d	+	-	
13b *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*	b	Lys-DAsp	45-47	L	+/-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	
14 *Lb. rhamnosus*	b	Lys-DAsp	45-47	L	+/+	+	d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	
15 *Lb. sake*	b	Lys-DAsp	42-44	DL	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	
16 *Lb. agilis*	b	DAP	43-44	L	-/+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	d	+	-	
17 *Lb. pentosus*	b	DAP	46-47	DL	+/-	+	+	+	ND	+	+	d	+	+	+	+	+	+	
18 *Lb. plantarum*	b	DAP	44-46	DL	+/-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	

*Group a species belong to the *Lb. delbrueckii* group; Group b organisms to the *Lb. casei-Pediococcus* group.

+ Symbols: + , 90% or more of strains are positive; - , 90% or more of strains are negative; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available;

DAP, diaminopimelic acid. Parenthesized isomers indicate < 15% of total lactic acid; w, weak positive reaction

ที่มา: Holzapfel and Wood, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 การจัดจำแนก *Lactobacillus spp.* ในกลุ่ม obligately heterofermentative ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	15/45 Growth (°C)	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented +												
						Arabinose	Cellobiose	Esculin	Galactose	Maltose	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Trehalose	Xylose
1 *Lb. brevis*	b	Lys-DAsp	44-47	+/-	+	+	-	d	d	+	-	-	+	d	+	d	-	d
2 *Lb. buchneri*	b	Lys-DAsp	44-46	+/-	+	+	-	d	d	+	-	+	+	d	+	d	-	d
3 *Lb. collinoides*	b	Lys-DAsp	46	+/-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
4 *Lb. fermentum*	b	Lys-DAsp	52-54	-/+	+	d	d	-	+	+	w	-	+	+	+	+	d	d
5 *Lb. fructivorans*	b	Lys-DAsp	38-41	+/-	+	-	-	-	-	d	-	-	w	-	w	d	-	-
6 *Lb. hilgardii*	b	Lys-DAsp	39-41	+/-	+	-	-	-	d	+	-	d	+	-	+	d	-	+
7 *Lb. kefir*	b	Lys-DAsp	41-42	+/-	+	d	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
8 *Lb. malefermentans*	b	Lys-DAsp	41-42	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
9 *Lb. oris*	b	Lys-DAsp	49-45	-/d	-	+	d	d	+	+	d	-	+	+	+	+	d	+
10 *Lb. parabuchneri*	b	Lys-DAsp	44	+/ND	+	+	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	-	-
11 *Lb. reuteri*	b	Lys-DAsp	40-42	-/+	+	+	-	ND	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
12 *Lb. pontis*	b	Lys-DAsp	53-55	+/+	+	-	-	-	d	+	-	-	+	d	+	+	-	-
13 *Lb. vaginalis*	b	Lys-DAsp	38-41	-/+	ND	-	-	d	+	+	+	-	d	+	d	+	-	-
14 *Lb. suebicus*	b	DAP	40	+/D	ND	+	d	-	+	+	ND	-	+	-	+	d	-	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	15/45 Growth (°C)	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented +													
						Arabinose	Cellobiose	Esculin	Galactose	Maltose	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Trehalose	Xylose
15 *Lb. vaccinostercus*	b	DAP	36	-/-	-	+	w	-	w	+	-	-	-	-	+	-	-	+
16 *Lb. sanfrancisco*	b	Lys-Ala	36-38	+/-	-	-	-	ND	d	+	-	-	-	-	d	d	-	-
17 *Lb. confusus*	c	Lys-Ala	45-47	+/+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
18 *Lb. fructosus*	c	Lys-Ala	47	+/-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 *Lb. halotolerans*	c	Lys-Ala-Ser	45	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
20 *Lb. viridescens*	c	Lys-Ala-Ser	41-44	+/-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	d	d	-
21 *Lb. kandleri*	c	Lys-Ala-Gly-Ala_2	39	+/-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
22 *Lb. minor*	c	Lys-Ser-Ala_2	44	+/-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-

* Group b species belong to the *Lb. casei-Pediococcus* group; Group c organisms to the *Leuconostoc* group.

+ Symbols: + , 90% or more of strains are positive; - , 90% or more of strains are negative; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available;

DAP, diaminopimelic acid. Parenthesized isomers indicate < 15% of total lactic acid; w, weak positive reaction

ที่มา: Holzapfel and Wood, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติที่ทำให้กลุ่ม *Lactobacillus* มีความสำคัญด้านอาหาร คือ

ก. ความสามารถในการหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติค นำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นม เช่นยาคูลท์ ใช้ *Lb. bulgaricus* (และ *Streptococcus thermophilus*) นมแอซีโดฟิลัสใช้ *Lb. acidophilus* นมบัลกาเรียนใช้ *Lb. delbrueckii* นอกจากนั้นยังใช้ในการหมักผักดอง ใช้ผลิตกรดแลคติคในระดับอุตสาหกรรม เช่น ใช้ *Lb. delbrueckii* ผลิตกรดแลคติคจากหางนม *Lb. plantarum* ผลิตกรดแลคติคจากน้ำทิ้งโรงงานทำกระดาษ แต่ขณะเดียวกันก็ทำให้อาหารต่างๆ เกิดการเน่าเสีย เช่น *Lb. pastorianus, Lb. brevis, Lb. arabinosus* และ *Lb. leichmanii* ทำให้ผลไม้เกิดรสเปรี้ยวเนื่องจากกรดแลคติคที่สร้างขึ้น นอกจากนี้ทำให้ไวน์ไซเดอร์ เบียร์ เกิดรสเปรี้ยวขึ้น เป็นต้น

ข. การผลิตก๊าซและผลิตภัณฑ์ระเหยอื่นๆ ของพวกเฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ บางครั้งทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพอาหาร เช่น การเจริญของ *Lb. fermentum* ในเนยแข็งสวิส *Lb. hilgardii* หรือ *Lb. trichodes* ในไวน์

ค. ความสามารถในการสร้างเมือก เช่น *Lb. plantarum* ทำให้น้ำแอปเปิล น้ำองุ่น ผักดอง เกิดเมือก *Lb. brevis* ทำให้น้ำแอปเปิลเกิดเมือก *Lb. cucumeria* ทำให้น้ำผักดองเกิดเมือก

ง. ความสามารถในการทนความร้อน (thermoduric) ทำให้อยู่รอดภายหลังการพาสเจอร์ไรส์หรือการใช้ความร้อนอื่นๆ เช่น *Lb. bulgaricus, Lb. brevis* จะเหลือรอดจากการพาสเจอร์ไรส์นม หมักน้ำตาลในนมให้เป็นกรดแลคติค ทำให้นมพาสเจอร์ไรส์เกิดรสเปรี้ยว นอกจากนี้อาจพบในอาหารกระป๋องที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ เช่น ในผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ถั่ว และผลไม้อื่นๆ

จ. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่ำ เป็นสาเหตุทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แฮม ไส้กรอก เกิดเน่าเสียโดยมีกลิ่นรสเปรี้ยว

ฉ. การผลิตสารพวกเปอร์ออกไซด์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำปฏิกิริยากับเนื้อทำให้เนื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียว การเกิดสีเขียวนี้มักเกิดในสภาพที่เป็นกรดเล็กน้อย และมีปริมาณออกซิเจนเล็กน้อย

ช. แบคทีเรียพวกนี้ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินส่วนใหญ่ที่ตัวเองต้องการ ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีวิตามินน้อยๆ แต่มีประโยชน์ในการใช้ตรวจสอบวิตามินในอาหารเช่น *Lb. leichmannii* ในการตรวจสอบวิตามินบี 12

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่ม *Pediococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ (tetrads) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างก๊าซ ไม่สร้าง endospore สร้างกรดแลคติคเพียงอย่างเดียวในการหมัก โดยเปลี่ยนมาจาก เดกซ์โตรส กาแลคโตส และซาลิซิน ไม่สามารถเปลี่ยนสารไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง

3.5-6.2 และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่มีอากาศ ลักษณะโคโลนีกลม สีขาวออกเหลืองถึงน้ำตาล เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

บางชนิดสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ช่วยทำลายและป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคในไส้กรอกได้ เชื้อก่อโรคที่สามารป้องกันได้ เช่น *Listeria monocytogenes* (Berry *et al*., 1991; Yousef *et al*., 1991; Foegeding *et al*., 1992; Luchansky *et al*., 1992) เราสามารถพบจุลินทรีย์เหล่านี้ในอาหารหมักหลายชนิดเช่น buroung dalag ซึ่งเป็นอาหารหมักของประเทศฟิลิปปินส์ทำจากปลา dalag หมักกับข้าวและเครื่องเทศปลาในซอสมะเขือเทศ (marinated herrings) (Blood, 1975) ในอาหารหมักของไทย เช่นปลาส้ม ส้มฟัก แหนม กุ้งส้ม และอาหารหมักดองของไทยอีกหลายชนิด (Tanasupawat and Daengsubha, 1983)

การจำแนก *Pediococcus spp.* ออกเป็นสปีชีส์แสดงในตาราง 6

กลุ่ม *Leuconostoc*

รูปร่างเซลล์โดยมากเป็นรูปรี แต่อาจมีกลมบ้าง การเรียงตัวของเซลล์มักเป็นคู่หรือเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ติดสีกรัมบวก โคโลนีมีขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ต้องการอาหารอุดมสมบูรณ์ มักต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเติบโต เช่น กรดนิโคตินิก ไทอะมีน กรดแพนโททินิก และไบโอติน

หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติค เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นพวกแฟคัลเททีฟแอนแอโรบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส ไม่เป็นโรคกับคนและสัตว์ *Leuconostoc* บางชนิด เช่น *Leu. mesenteroides subsp. dextranicum* สร้างสารเมือกพวกเดกซ์แทรน จากน้ำตาลซูโครส แบคทีเรียพวกนี้พบในนม ผลิตภัณฑ์นม ผักผลไม้ ผักดองไวน์ (Holzapfel and Schillinger, 1992)

การจำแนก *Leuconostoc spp.* ออกเป็นสปีชีส์แสดงในตาราง 7

สมบัติที่สำคัญบางอย่างที่ทำให้ *Leuconostoc* มีความสำคัญด้านอาหารได้แก่

ก. การผลิต ไดอะซิทิล และผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นอื่นๆ เช่น *Leu. cremoris* สามารถเปลี่ยนไพรูเวทเป็นอะซิโตอิน และไดอะซิทิล ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นในเนย

ข. ความสามารถในการทนเกลือ เช่น *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียที่หมักผักดอง เช่น กะหล่ำปลีดอง ทำให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเป็น 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. ความสามารถในการทนน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงๆ ได้ เช่น *Leu. mesenteroides* ทน น้ำตาลได้สูงถึง 55-60 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียพวกนี้จึงสามารถเจริญในอาหารที่มีตาลสูงได้

ง. การผลิตสารเมือก เช่น *Leu. mesenteroides* จะผลิตสารเมือกพวก เดกซ์แทรน จากน้ำตาลซูโครส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างเมือกของแบคทีเรียชนิดนี้คือ 20-25 องศาเซลเซียส แต่ในขณะเดียวกันสารเมือกเหล่านี้ทำให้เป็นผลเสียต่ออาหาร เช่น ทำให้น้ำอ้อยเกิดเมือกขึ้น ทำให้ตกผลึกไม่ได้ ความหวานลดลง และทำให้ท่อต่างๆ อุดตัน ทำให้ไวน์เกิดเมือก รวมทั้งในไส้กรอกและแฮม เป็นต้น

จ. ความสามารถในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาล ทำให้อาหารต่างๆ เกิดเน่าเสีย เช่น ทำให้เกิดก๊าซในแตงกวาดอง ทำให้ไส้กรอกบวม

ฉ. ความสามารถในการเริ่มต้นหมักได้เร็วกว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียอื่นๆ และสามารถผลิตกรดแลคติคมากพอที่จะยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่พวกแลคติค เช่น การหมักกะหล่ำปลีดอง *Leu. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียพวกแรกๆ ที่เติบโตให้กรดแลคติค 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้จุลินทรีย์พวกอื่นๆเจริญไม่ได้

Clarke (1991) รายงานว่า *P. cerevisiae, P. acidolactici* และ *Lb. plantarum* เป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก *Pediococcus* มักจะใช้การหมักที่อุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Lactobacillus* จะใช้ในการหมักที่อุณหภูมิต่ำกว่าและ *Micrococcus* จะทำให้เกิดการหมักเล็กน้อย แต่จะมีบทบาทด้านการพัฒนากลิ่นรส ดังนั้นจึงควรใช้ *Micrococcus* ร่วมกับ *Pediococcus* หรือ *Lactobacillus* เพื่อเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรทหรือไนไตรท์ (nitrate/nitrite reduction) ซึ่งมีผลต่อสีของผลิตภัณฑ์

Jay (1978) รายงานว่าการเปรี้ยวของเนื้อที่พบทั่วๆไปมักเกิดจาก *Lactobacillus, Streptococcus* และจุลินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่ในไส้กรอกที่เปรี้ยวจะพบ *Micrococcus* และ *Leuconostoc* ส่วนในเบคอนจะพบ *Lactobacillus, Streptococcus* และ *Micrococcus*

จรูญ (2509) ได้ศึกษาแหนมจากตลาดพบว่าในระยะแรกของการหมักจะมีจุลินทรีย์พวก *Pediococcus* เจริญขึ้นมากทำให้เปอร์เซ็นต์กรดสูงขึ้น ความเป็นกรด-ด่างลดลง และตรวจพบ *Lactobacillus* เจริญต่อมาหลังจากการเจริญของจุลินทรีย์พวกแรกได้ลดน้อยลง ทำให้แหนมมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงยิ่งขึ้น และเปอร์เซ็นต์กรดสูงขึ้นไปอีก

เยาวลักษณ์ (2536) รายงานว่าในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่นแหนมการหมักในช่วง 1-2 วันแรก พบ *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus* ชนิดเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเจริญและสร้างกรดขึ้นอย่างรวดเร็ว และในช่วงหลังจะพบ *Lb. plantarum* และ *Lb. brevis* เจริญต่อจากแบคทีเรียกลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แรก ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวระยะแรกของการหมักพบ *P. cerevisiae* เจริญ ทำให้เกิดกรด และความเป็นกรด-ด่างลดลงเป็น 4.5-5.6 ต่อมาพบ *Lactobacillus spp.* เจริญมากในช่วงหลัง และมั่มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อวัวหมัก ในช่วงแรกของการหมักพบ *P. cerevisiae* และ *Lb. plantarum* เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และลดจำนวนลงในวันที่ 2-4 ของการหมัก ความเป็นกรด-ด่าง ช่างแรกเป็น 4.6-5.3 และเมื่อหมักได้ถึง 7 และ 14 วันพบว่ามี *P. cerevisiae* อยู่มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

อรุณวรรณ (2516) ศึกษาผลิตภัณฑ์กุ้งหมักที่เรียกว่ากุ้งส้มหรือกุ้งจ่อมของไทยพบจุลินทรีย์ *Pediococcus sp., Lb. casei var. oasoi* และ *Lb. casei var. alactosus*

7. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างการหมัก

จากการศึกษาถึงรูปแบบการหมักน้ำตาล (Sugar fermentation pattern) ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย โดย Axelsson (1993) สามารถแบ่งกลุ่มพวกแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

ประเภทที่หนึ่ง คือ พวก lactobacilli group I ซึ่งเป็น obligate homofermentative ที่สามารถหมักน้ำตาลด้วยกระบวนการไกลโคไลซีส (Embden- Meyerhof pathway) เท่านั้น

ประเภทที่สอง คือ พวก *Leuconostoc* และ lactobacilli group III ซึ่งเป็น obligate heterofermentative ที่หมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านทาง 6 - phosphogluconate/phosphoketolase (6-PG/PK) pathway เท่านั้น

ความแตกต่างของ 2 ประเภทนี้สามารถสังเกตได้จากการเปรียบเทียบระดับเอนไซม์สำคัญในแต่ละประเภทว่ามีเอนไซม์สำคัญของกระบวนการไกลโคไลซีส และ 6-PG/PK pathway หรือไม่ คือ fructose-1, 6-diphosphate aldolase (FDP aldolase)และ phosphoketolase ตามลำดับ species ต่างๆ ที่เป็นพวก obligately homofermentative จะสร้าง FDP aldolase อยู่ตลอดเวลา (constitutive) และจะขาด phosphoketolase ซึ่งจะตรงข้ามกับพวก obligate heterofermentative (Kandler, 1983; Kandler and Weiss 1986) ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักน้ำตาลกลูโคสที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พวก group I Lactobacilli ก็ไม่สามารถใช้ pentose ต่างๆ และ gluconate ได้ (Axelsson, 1993)

โครงร่างกรดแลคติคของแลคติคแอสิดแบคทีเรียพวก homofermentative และ heterofermentative แสดงในตาราง 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 การจัดจำแนก *Pediococcus spp.* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

Character	*P. acidilactici*	*P. damnosus*	*P. dextrinicus*	*P. halophilus*	*P. inopinatus*	*P. parvulus*	*P. pentosaceus*	*P. pentosaceus* subsp.	*P. urinaeequi*
Growth at 35° C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
40° C	+	-	+	+/-(weak)	+/-(weak)	-	+/-(weak)	+/-(weak)	+
45° C	+	-	+/-(weak)	-	-	-	+/-(weak)	+/-(weak)	+/-(weak)
50° C	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Maximum NaCl concentrate for growth	10%	5%	6%	> 18%	8%	8%	10%	10%	10%
Growth at pH 4.5	+	+	+/-	-	+	+	+	+	-
pH 5.0	+	+	+	-	+	+	+	+	-
pH 7.5	+	-	+	+	+/-	+/-	+	+	+
pH 8.0	+	-	-	+	-	-	+	+	+
pH 8.5	+/-	-	-	+	-	-	+/-	+/-	+
Catalase activity	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
Gas from gluconate	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Hippurate hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Production o acetoin	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	-
Lactate configuration	DL	DL	L(+)	L(+) (3%D(-))	DL	DL	DL	DL	L(+)
Litmus milk reaction									
Acid	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+	+	ND
Reduction	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+	+	ND
Clotting	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+	ND
Acid produced from or spliting of									
Arabinose	+/-	-	-	+	-	-	+	-	+/-
Ribose	+	-	-	+	-	-	+	+	ND
Xylose	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	ND

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 (ต่อ)

Character*	*P. acidilactici*	*P. damnosus*	*P. dextrinicus*	*P. halophilus*	*P. inopinatus*	*P. parvulus*	*P. pentosaceus*	*P. pentosaceus* subsp. *intermedius*	*P. urinaeequi*
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+
Maltose	-	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+
Trehalose	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Sucrose	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	+/-	+
Lactose	+/-	-	+/-	-	+	-	+	+	+/-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	ND
Melezitose	-	+/-	-	+	-	-	-	-	ND
Raffinose	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+
Maltotriose	-	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	ND
Dextrin	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-
Starch	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-
Glycerol	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-
Mannitol	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
α - Methyl glucoside	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-	ND
Salicin	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+
Amygdalin	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-	ND

*Characters in bold are useful for discrimination of species.

+ Symbol: + > 90% strains positive; +/-, 10-90% strains positive; -, < 10% strains positive; ND, not determined.

ที่มา: Holzapfel and Wood, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 การจัดจำแนก *Leuconostoc spp.* ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

Characteristics	*Leu. mesenteroides* subsp.			*Leu. paramesenteroides*	*Leu. lactis*	*Leu. oenos*	*Leu. gelidum*	*Leu. carnosum*	*Leu. pseudomesenteroides*	*Leu. citreum*	*Leu. amelibiosum*	*Leu. argentinum*	*Leu. fallax*
	mesenteroides	*dextranicum*	*cremoris*										
Acid from	+	-	-	d	-	d	+	-	d	+	+	d	-
Arabinose	d	-	-	-	-	ND	+	-	d	+	ND	-	-
Arbutin	d	d	-	(d)	-	d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cellulose	d	-	-	d	-	d	+	d	d	d	+	d	-
Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+
Galactose	+	d	+	+	+	d	-	-	d	-	ND	+	-
Lactose	d	+	d	d	+	-	-	-	d	-	-	+	-
Maltose	+	+	-	+	+	-	d	-	+	+	+	+	+
Mannitol	d	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	(d)
Mannose	d	d	-	+	d	d	+	d	+	+	ND	+	+
Melibiose	d	d	-	+	d	d	+	d	d	-	-	+	-
Raffinose	d	d	-	d	d	-	+	-	d	-	-	+	-
Ribose	d	ND	-	+	-	d	d	d	+	-	-	-	+
Salicin	d	-		-	d	d	+	d	d	+	+	-	-
Sucrose	+	+	-	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+
Trehalose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	d	(d)
Xylose	d	d	-	-	-	d	+	-	+	-	-	d	-
Hydrolysis of esculin	+	d	-	d	-	+	+	d	d	+	ND	-	ND
Dextran formation	+	+	-	-	-	+	+	+	ND	ND	+	-	ND

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 (ต่อ)

Characteristics	*Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*	*Leu. mesenteroides* subsp. *remoriscs*	*Leu. paramesenteroides*	*Leu. lactis*	*Leu. oenos*	*Leu. gelidum*	*Leu. carnosum*	*Leu. pseudomesenteroides*	*Leu. citreum*	*Leu. amelibiosum*	*Leu. argentinum*	*Leu. fallax*
Growth at pH 4.8	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
Requirement for TJF	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 10% ethanol	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nad-dependent G6PDH present	+	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Growth at 37 °C	d	+	-	d	+	d	-	-	+	d	ND	+	+
Peptidoglycan type	Lys-Ser-Ala_2	Lys-Ser-Ala_2	Lys-Ser-Ala_2	Lys-Ala_2	Lys-Ala_2	Lys-Ser_2-Lys-Ala-Ser	ND	ND	Lys-Ser-Ala_2	ND	Lys-Ser-Ala_2	ND	Lys-Ser-Ala_2

+ Symbol: +, 90% or more of the strains positive; -, 90% or more of the strains negative; d, 11-98% of the strains positive; (d), delayed reaction; ND, no data.

Data for *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. lactis* and *Leu. oenos* are from Garvie (1986). Data for *Leu. galidum* and *Leu. carnosum* are from Shaw and Harding (1989), *Leu. pseudomesenteroides* and *Leu. citreum* from Farrow et al. (1989), *Leu. amelibiosum* from Schillinger et al. (1989), *Leu. argentinum* from Dicks et al. (1993), and *Leu. fallax* from Martinez-Murcia and Collins (1991).

ที่มา: Holzapfel and Wood, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประเภทที่สาม คือ พวกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่เหลือทั้งหมด ได้แก่ Lactobacilli group II, Enterococci, Pediococci, Streptococci, Tetragenococci และ Vagococci ซึ่งอยู่กึ่งกลางระหว่าง 2 พวกแรก โดยเหมือนพวก Obligate homofermentative เนื่องจากสามารถสร้าง FDP aldolase ได้ตลอดเวลา เป็นผลให้เกิดการหมักน้ำตาล hexose โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส และพบว่า สามารถหมักน้ำตาล pentose, glucotanate และ pentitols ได้ และสารเหล่านี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้สร้าง phosphoketolase ทำให้สามารถเกิดการหมักแบบ heterolactic fermentation ได้ ดังนั้นแลคติคแอสิดแบคทีเรียประเภทนี้จะทำการหมักน้ำตาล hexose แบบ homofermentative หมักน้ำตาล pentose และสับสเตรทอื่นๆบางชนิดแบบ heterofermentative ดังนั้นจึงเรียกการหมักแบบนี้ว่า facultative heterofermentative (Kandler, 1983; Kandler and Weiss, 1986; Axelsson, 1993)

แลคเตทเป็นผลผลิตสุดท้าย ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณมากจากการหมักแลคเตท (lactate fermentation) โดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะมี saccharolytic pathway สูง แต่ขาด anabolic pathway เป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนอย่างมากในการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงพบแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้จากส่วนต่างๆ ของพืช นมและทางเดินอาหารของสัตว์ โดยส่วนใหญ่แลคติคแอสิดแบคทีเรียมักจะเป็น aerotolerant ด้วย เช่น cytochromes ภายใต้สภาวะที่แน่นอน ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตไปเป็นแลคเตทของ species ต่างๆ *Lactobacillus*, *Sporolactobcillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Bifidobacterium* ใน 3 pathway ดังต่อไปนี้

(1) Homofermentative pathway (รูป 1)

กลูโคสถูกย่อยผ่านทาง Embden - Meyerhof pathway ได้เป็น ไพรูเวท (pyruvate) จากนั้น pyruvate จะถูกใช้เป็น O_2-acceptor โดยตรง ได้แลคเตท 2 โมล และ 2 ATP ต่อ กลูโคส 1 โมล ตามปฏิกิริยาดังสมการ

Homofermentative pathway

Glucose ⟶ 2 lactate

(2) Heterofermentative pathway (รูป 2)

การเปลี่ยนแปลงของกลูโคส ดำเนินตาม oxidative pentose phosphate cycle นั่นคือ ribulose-5-phosphate ถูกสร้างขึ้นผ่านทาง 6-phosphogluconate จากนั้นเกิด epimerization ได้ xylulose-5-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase จากนั้น acetyl phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

acetyl-Co A โดยเอนไซม์ phosphotransacetylase และ acetyl-Co A จะถูก reeduce โดยเอนไซม์ acetaldehyde dehydrogenase ได้เป็น acetaldehyde และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทธานอล (ethanol) โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ส่วน glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็นแลคเตทโดยทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosphoketolase เช่นเดียวกับใน homofermentative pathway

การหมักแบบ heterofermentative จะได้ 2 $NADH_2$ และได้ 1 ATP จากกลูโคส 1 โมล ซึ่งได้ 1 ATP เพียงครึ่งหนึ่งของ homofermentative pathway โดยกลูโคสถูกย่อยสลายผ่านเส้นทาง heterofermentative pathway ได้แลคเตท เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างละ 1 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล ตามปฏิกิริยาของการเปลี่ยนแปลงดังสมการ

$$\text{glucose} \xrightarrow{\text{homofermentative pathway}} \text{lactate} + \text{ethanol} + CO_2$$

โดยปกติแล้วแลคติคแอสิดแบคทีเรียพวก homofermentative จะผลิตแลคเตท 1.8 โมล ต่อ กลูโคส 1 โมล ส่วนพวกที่เป็น heterofermentative จะผลิตแลคเตท 0.8 โมล และอะซิเตทบ้าง นอกนั้นจะเป็นเอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์หนึ่งจะเฉพาะเจาะจงสำหรับ xylulose-5-phosphate โดยมีกลไกของทั้ง 2 ปฏิกิริยาที่เหมือนกัน คือ เอนไซม์ fructose-6-phosphate phosphoketolase จะย่อย fructose-6-phosphate ให้เป็น acetyl phosphase และ erythrose-4-phosphate

(3) Bifidum pathway (รูป 3)

การย่อยสลายกลูโคสโดยแบคทีเรีย *Bifidobacterium bifidum* จะใช้เอนไซม์ phosphoketolase 2 ตัว เอนไซม์ตัวหนึ่งจะเฉพาะเจาะจง กับ frutose-6-phosphate และเอนไซม์อีกตัวลำดับปฏิกิริยาที่น่าสนใจ คือ กลูโคส 2 โมล ถูกเปลี่ยนให้เป็น acetate 3 โมล และ glyceraldehyde-3-phosphate 2 โมล โดยปราศจากปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydrogenation) และปฏิกิริยาการเอาน้ำออก (dehydrogenation) และได้แลคเตท โดยอาศัย glyceraldehyde-3-phosphate และเอนไซม์ lactate dehydrogenase การสังเคราะห์ acetate จาก acetyl phosphate เกิดร่วมกับการสังเคราะห์ ATP จาก ADP โดยเอนไซม์ acetate kinase

$$CH_3\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}O\text{-}POH + ADP \xrightleftharpoons{\text{acetate kinase}} CH_3\text{-}COOH + ATP$$

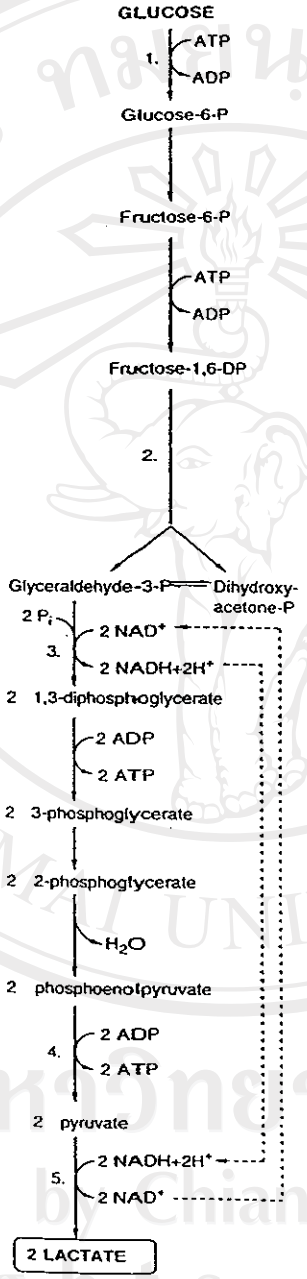
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 แลคติคแอสิดแบคทีเรียพวก homofermentative และ heterofermentative และโครงร่างของกรดแลคติค

Genera and species	Homofermentative	Heterofermentative	Configuration of Lactic acid
Lactobacillus delbruedkii	+	-	D(-)
Lb. lactis	+	-	D(-(
Lb. bulgaricus	+	-	D(-)
Lb. casei	+	-	L(+)
Lb. plantarum	+	-	DL
Lb. curvatus	+	-	DL
Lb. brevis	-	-	DL
Lb. fermentum	-	-	DL
Sporolactobacillus inulinus	+	-	D(-)
Streptococcus faecalis	+	-	D(-)
S. lactis	+	-	D(-)
Leuconostoc mesenteroides			
subsp. *mesenteroides*	-	+	D(-)
subsp. *dextranicum*	-	+	D(-)
Pediococcus cerevisiae	+	-	DL
Bifidobacterium bifidum	-	-	L(+)

ที่มา: Gottschalk, 1979

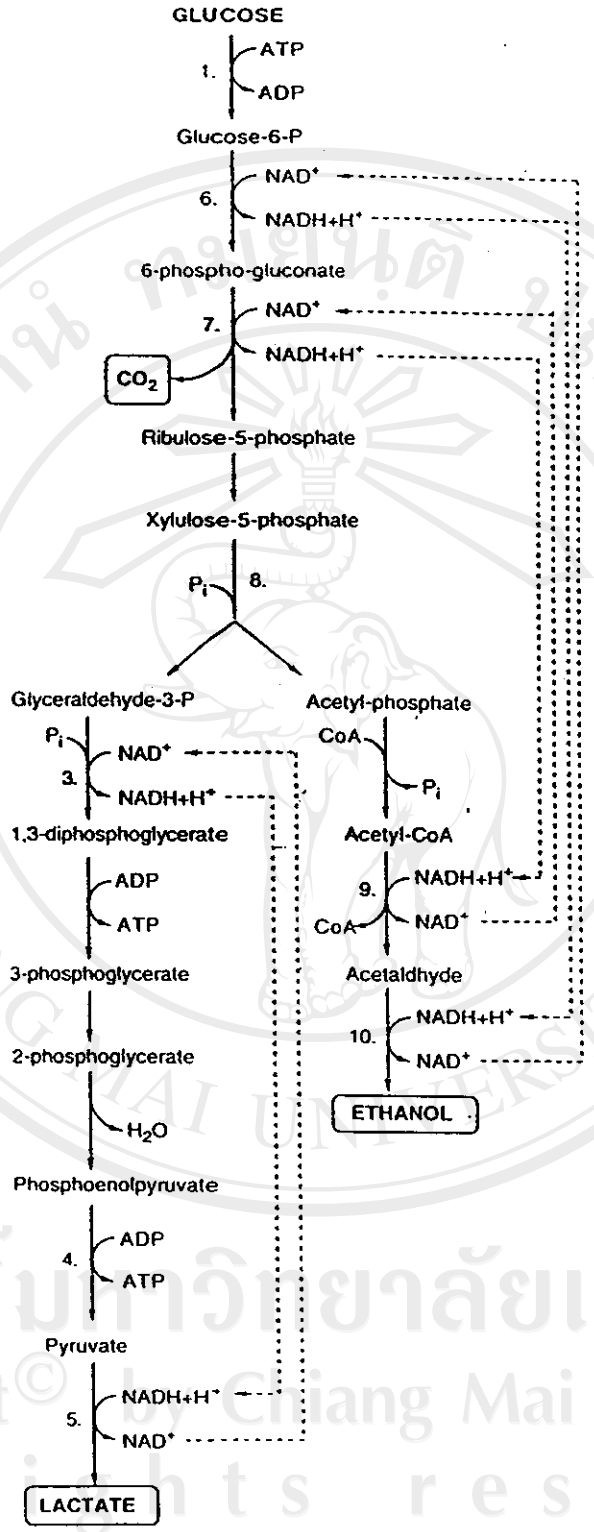
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 1 Homofermentative pathway

ที่มา: Axelsson, 1993



รูป 2 Heterofermentative pathway

ที่มา: Axelsson, 1993

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยาดังกล่าวจัดเป็นส่วนสำคัญมากในการสังเคราะห์ acetate สำหรับแบคทีเรียพวก anaerobe ทุกชนิด เนื่องจากจะไปมีผลต่อการสังเคราะห์ ATP (ATP synthesis) ผ่านทาง substrate-level phosphorylation

ผลลัพธ์ที่ได้คือ ATP 2.5 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล ซึ่งสูงกว่า ATP ที่ได้จากทั้ง homo- และ heterofermentative pathway

โดยทั่วไปกลูโคสถูกย่อยสลายด้วยเส้นทาง bifidum pathway ได้อะซิเตท และแลคเตท ในอัตราส่วน 3 : 2 จากกลูโคส 2 โมล ดังสมการ

$$2 \text{ glucose} \xrightarrow{\text{bifidum pathway}} 3 \text{ acetate} + 2 \text{ lactate}$$

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักนอกจากจะมีความเปรี้ยวอันเกิดจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียแล้ว ยังให้กลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวแบบเดียวกับอาหารหมักชนิดอื่นๆด้วย สารที่ให้กลิ่นรสที่สำคัญคือ acetoin diacetyl (better aroma), 2,3-butanediol ได้จากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสใน Embden-Meyerhof pathway (รูป 4) โดยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) แลคเตท (lactate) และสารระเหยอื่นๆ เช่น เอทานอล บิวทานอล ฟอร์เมท เป็นต้น (Kandler, 1983) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารให้กลิ่นรส diacetyl และ acetoin ต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาลและความเป็นกรด-ด่างต่ำ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี Emden-Meyerhof pathway ทำงานได้ดี (Hugenholtz, 1993) แบคทีเรียต่างชนิดกันจะให้ชนิดของสารระเหยที่ให้กลิ่นรสต่างกันในปริมาณที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยของ Gendy *et al.* (1983) พบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียพวกเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จะสร้าง acetoin และ diacetyl จากซิเตรทได้มากกว่าจากไพรูเวท และการผลิต acetoin และ diacetyl สูงสุดและคงที่ที่ชั่วโมง 12-24 จากการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเติมซิเตรท (citrate) ในอาหารเลี้ยงเชื้อของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ทั้งพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ หมักที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า ซิเตรทจะเป็นตัวกระตุ้นการเจริญและการผลิตกรด ซึ่งเป็นผลให้เกิดการผลิต acetoin และ diacetyl ได้มากขึ้น การผลิต acetoin จะเพิ่มมากขึ้นในช่วง log phase และสูงสุดที่ stationary phase คือประมาณชั่วโมงที่ 10 ของการหมัก และเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ จะไม่สามารถผลิต acetoin หรือ diacetyl ได้เลย ถ้าไม่มีซิเตรท แต่พวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ สามารถผลิตได้ แต่ถ้าหากมีซิเตรทจะผลิตได้มากขึ้น (Drinan *et al.*, 1976)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

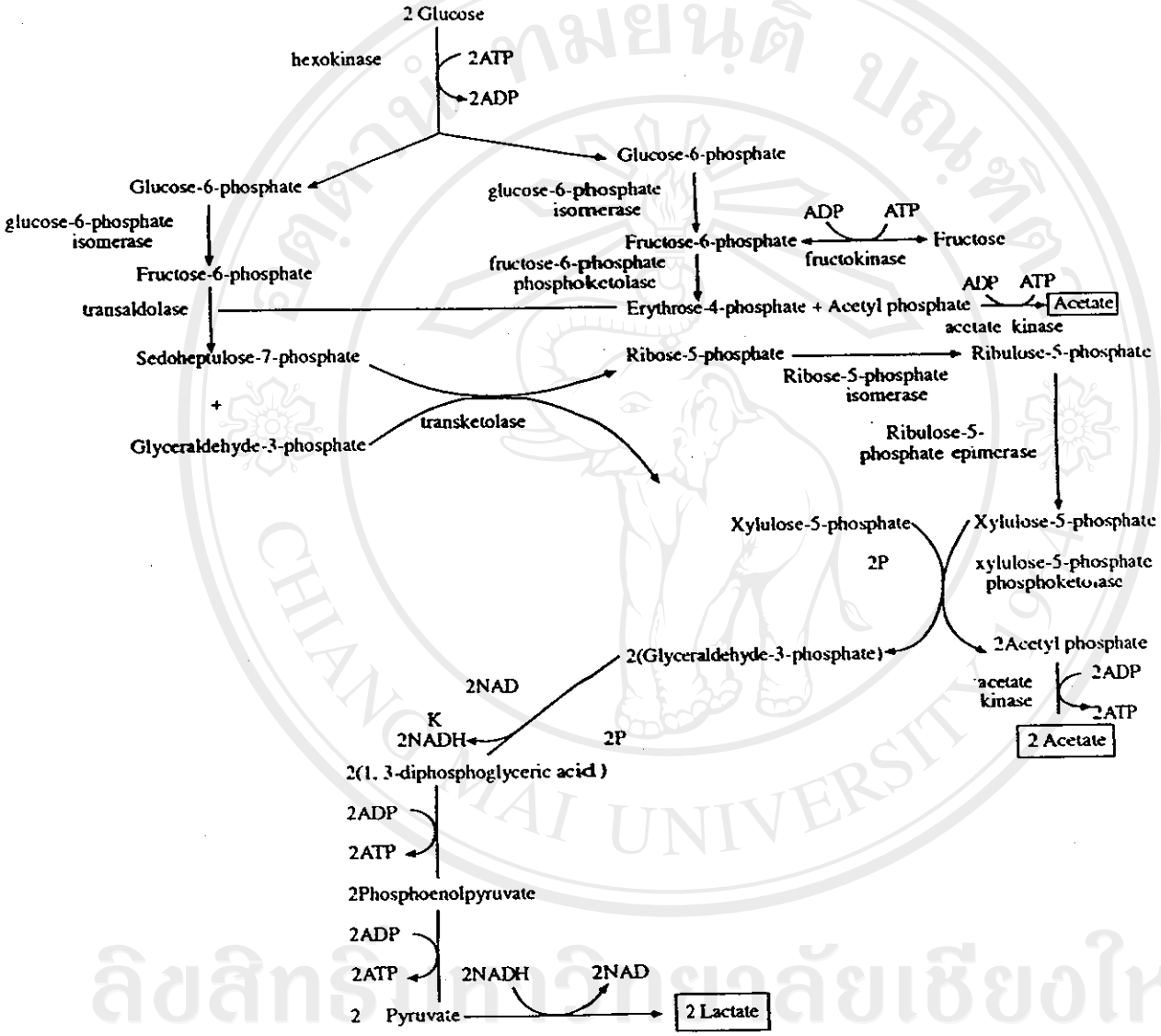
8. การใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในอาหารหมักดอง

การใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น หมายถึง การเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่กำลังมีการเจริญเติบโตลงในส่วนผสม โดยเติมลงไปหลังจากการผสมส่วนผสมที่เป็นของแห้งและเนื้อแล้ว หรืออาจเติมลงไปผสมกับเนื้อก่อนเพื่อให้มีการกระจายตัวอย่างทั่วถึง จากนั้นจึงเติมส่วนผสมอื่นๆ ลงไป สิ่งที่ควรระวังคือ ต้องพยายามหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรงระหว่างเชื้อบริสุทธิ์กับส่วนผสมที่ช่วยในการหมัก เช่น สารไนไตรท์ เกลือ เพราะสารพวกนี้อาจทำให้ความสามารถในการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงได้ เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของสารแขวนลอย (Suspension) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนั้นในการผสมจึงควรเจือจางลงให้ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำปราศจากเชื้อก่อน เพื่อให้เกิดการกระจายตัวอย่างทั่วถึงระหว่างการผสม หรือถ้าเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในรูปผง (Freeze-dried) ก็ควรละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการก่อนใช้งานเช่นกัน (ไพโรจน์, 2539)

ในปี ค. ศ. 1940 Jensen และ Paddon เสนอให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Lactobacillus* เป็นกล้าเชื้อในการหมักเนยแข็งเป็นครั้งแรก และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมาก (Gillespie, 1960) ต่อมาได้มีความพยายามที่จะพัฒนาการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก กล้าเชื้อชนิดแรกสำหรับการหมักอาหารประเภทเนื้อ คือ Pediococcus cerevisiae (Gilliand, 1985) ซึ่งอยู่ในรูปไลโอฟิลไลส์ Diebel *et al.* (1961) เป็นกลุ่มแรกที่ใช้เชื้อชนิดนี้ในการหมักไส้กรอกเรียกว่ากล้าเชื้อสำหรับเนื้อ(Meat starter culture) Smith and Palumbo (1983) ได้ให้คำจำกัดความของคำ "meat starter culture" ว่าหมายถึงจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต ใช้ใส่ในเนื้อเพื่อปรับปรุงคุณภาพของการหมักให้ดีขึ้น และทำให้อาหารหมักที่ได้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค นอกจากนั้นสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เนื้อได้แก่ *Micrococcus spp., Pediococcus spp.* และ *Latobacillus spp.* (Bacus and Brown, 1981) โดยเฉพาะเชื้อ Lactobacilli และ Pediococci ถูกเลือกนำมาใช้ด้วยเหตุผลที่ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้อย่างสม่ำเสมอและสามารถควบคุมได้ นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทอื่นที่ไม่เป็นที่ต้องการได้ (Ingolf and Skjelkrade, 1982) ส่วน Micrococci ถูกนำมาใช้ด้วยเหตุผลที่ว่าเชื้อดังกล่าวมีกิจกรรมที่สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และสามารถปรับปรุงคุณภาพในแง่สีที่ปรากฏ และกลิ่นที่ดีต่อผลิตภัณฑ์ (Niinivara, 1955; Nurmi, 1966; Coretti, 1977)

การเลือกใช้กล้าเชื้อเติมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อ มีจุดประสงค์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีคุณภาพที่ดีกว่า มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยสูง ช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ และเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น (Raccach

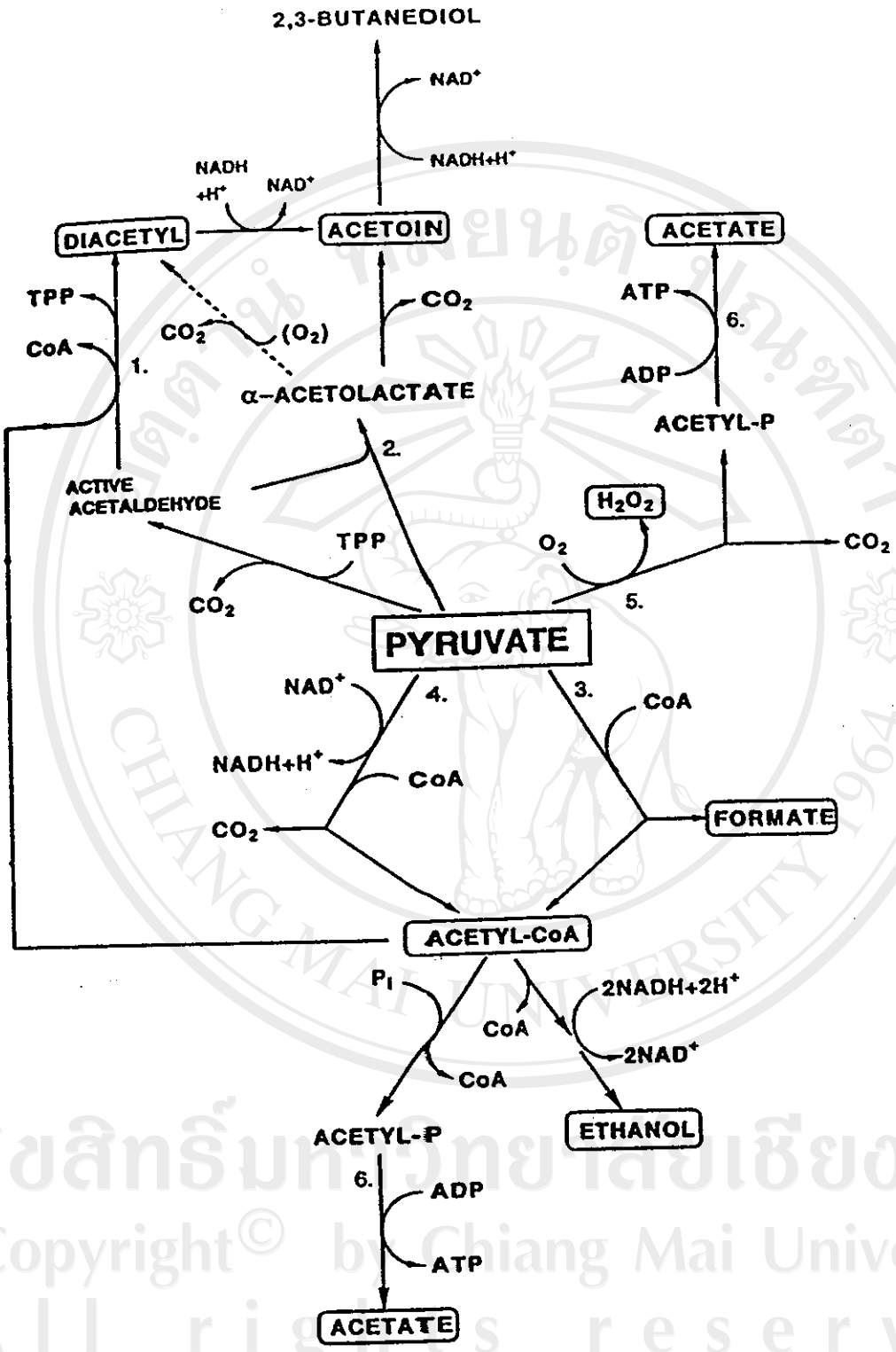
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3 Bifidum pathway

ที่มา: Gottschalk, 1979



รูป 4 การเกิดสารให้กลิ่นรสจากการหมักน้ำตาลกลูโคสใน Embden-Meyerhof pathway

ที่มา: Axelsson, 1993

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and Baker, 1978) ส่วนประโยชน์อื่นๆ ของการใช้กล้าเชื้อประเภทนี้คือทำให้อาหารหมักปลอดภัยจากสารพิษต่างๆ ที่เกิดจากแบคทีเรียพวกสร้าง toxin เช่น ฮีสตามิน ไนโตรซามิน และทูโบลิน เนื่องจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีปริมาณมาก จะผลิตกรดอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้ระดับความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะไปเร่งให้ไนไตรท์ (residual nitrite) ที่ได้จากการใส่ดินประสิว (KNO_3) ในอาหารหมักถูกสลายเป็นไนตริคออกไซด์ (N_2O) จึงทำให้การสะสมของไนไตรท์ลดลง เป็นผลให้การสะสมของ nitrosamine ลดลงเช่นกัน

Smith and Palumbo (1983) ใช้ *Lactobacillus plantarum* ร่วมกับ *Pediococcus cerevisiae* ในผลิตภัณฑ์เปปเปอร์โรนี สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella dublin* และ *Sal. typhimurium* ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinums* ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกซัมเมอร์ (Christiansen *et al.*, 1975) การใช้เชื้อ *P. cerevisiae* เพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cl. perfringens* ได้ (Baran and Stevenson, 1975)

การเติมสารเคมีบางชนิดลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจะเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว ศิพัฒน์ (2539) ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น 3 ชนิดในการหมักแหนม คือ *Lb. plantarum, P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians* ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.05 และโซเดียมไนไตรท์ร้อยละ 0.02 สามารถทำลาย *Staphylococcus aureus* ได้ หมดภายใน 5 วัน

การนำเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นมาใช้ในการหมักอาหารของประเทศสหรัฐอเมริกามี 2 รูปแบบ คือ แช่แข็ง (Frozen form) และระเหิดแห้ง (Freeze-dried form) ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดหรือมากกว่า อาจเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่หลายสายพันธุ์ที่ใช้กันโดยทั่วไปคือสกุล *Pediococcus, Micrococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งสายพันธุ์และอัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นความลับของบริษัท (Clarke, 1991) แต่เชื้อที่นิยมใช้ในการหมักเนื้อมากที่สุดคือสายพันธุ์ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* ซึ่ง *P. pentosaceus* เป็นเชื้อที่เริ่มใช้ไม่นานมานี้ เนื่องจากเป็นเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตกรดได้มากและเร็วกว่า *P. acidilactici* จึงทำให้การหมักด้วยเชื้อ *P. pentosaceus* สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยลง เนื่องจากไม่ต้องใช้พลังงานในการเพิ่มอุณหภูมิของตู้บ่ม อีกทั้งจะได้ผลิตภัณฑ์ในเวลาเร็วขึ้น (Smith and Palumbo, 1983)

Kearney *et al.* (1990) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของการหมักระหว่างเซลล์ของกล้าเชื้ออิสระ (free cell culture) กับกล้าเชื้อที่ผ่านการไลโอฟิลไลซ์ของเชื้อ *Lb. plantarum* พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในเม็ดอัลจิเนต (alginate) ให้อัตราการหมักที่ดีกว่า เนื่องจากเม็ดอัลจิเนตมีส่วนในการป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างการไลโอฟิลไลซ์ และควบคุมสภาพแวดล้อมระหว่างการทำแห้ง ตลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จนระหว่างการใส่กล้าเชื้อในการหมัก ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Champagene and Cotes (1987) และ Spettoli *et al.* (1982) ในการหมักไวน์ด้วยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

ตัวอย่างของการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก แสดงดังตารางที่ 9

ในประเทศไทย ได้เริ่มนำเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตแหนม โดย Kittikun *et al.* (1988) ได้นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย สายพันธุ์เดี่ยวมาใช้ในการผลิต คือ *Lb. plantarum* ที่แยกได้จากแหนมในท้องตลาด เติมลงในส่วนผสมในการหมักแหนมเมื่อหมักได้ 3วัน พบว่ามีปริมาณ *E. coli* ต่ำ และ และตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* เลย เมื่อเปรียบเทียบกับแหนมที่ผลิตโดยวิธีปกติไม่มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น จะตรวจพบ *E. coli* ในปริมาณที่สูง และตรวจพบ *Salmonella* ในช่วงแรกของการหมัก ผลการตรวจสอบทางด้านประสาทสัมผัสพบว่าแหนมที่ผลิตโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นกับแหนมตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น ไม่มีความแตกต่างทางด้านประสาทสัมผัส โดยเฉพาะทางด้านลักษณะเนื้อสัมผัสและลักษณะสีที่ปรากฏในผลิตภัณฑ์ ด้วยเหตุผลนี้เป็นการกระตุ้นให้มีการวิจัยต่อโดยการหันมาใช้เทคโนโลยีการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม (Mixed bacterial starter cultures technology) แทนที่จะใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยว ในกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์ และสร้างมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น

เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *Lb. plantarum, Pediococcus cerevisiae* และ *Micrococcus varians* ซึ่งในสมมุติฐานที่ตั้งไว้ว่าการใช้เทคนิคดังกล่าวนี้อาจจะทำให้แหนมมีคุณภาพที่ดีขึ้น มีความปลอดภัย มีความสม่ำเสมอ สามารถลดระยะเวลาการหมักลงได้ รวมทั้งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งในปี 1990 Wiriyacharee *et al.* ได้ใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมระหว่างเชื้อ *Lb. plantarum* NHI 110, *P. cerevisiae* NZ DRI) และ *Micrococcus varians* ATCC 15360 ในปริมาณ 10^3, 10^6 และ 10^3 โคโลนี/กรัม ตามลำดับในสูตรการผลิตแหนม พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของแหนมได้อย่างมีประสิทธิภาพในด้านความแน่นเนื้อ สีที่ปรากฏ และความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ให้โทษ อีกทั้งการผลิตแหนมโดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์ดังกล่าว มีการยอมรับของผู้บริโภคสูงกว่าแหนมในท้องตลาด

เชื้อบริสุทธิ์ผสมเริ่มต้น *Lb. plantarum* จะมีผลต่อการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงแรกของการหมัก โดยการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนและข้าวสุกให้กลายเป็นกรดแลคติค เมื่อความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อยๆ จะทำให้โปรตีนถูกทำลายไป (denature) มีการเกิดเจลขึ้น ทำให้เนื้อเริ่มแข็งเหนียวขึ้น และพบว่าเชื้อ *P. cerevisiae* จะมีผลต่อการเกิดความแน่นเนื้อในช่วงหลังของการหมัก การเจริญที่เหมาะสมของ *P. cerevisiae* จะอยู่ที่ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.0 (Buchanan and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Gibbons, 1974) ดังนั้นสภาวะในการหมักช่วงสุดท้ายจึงเหมาะสมที่เชื้อดังกล่าวจะเจริญเติบโต และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเหนียวมากขึ้น

เชื้อบริสุทธิ์ *Micrococcus varians* จะมีผลต่อการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ในช่วงแรกของการหมักอย่างยิ่ง Deible *et al.* (1961) ได้รายงานว่ากิจกรรมของเชื้อในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์นั้นเกิดขึ้นระหว่าง 2-16 ชั่วโมงแรกของการหมักไส้กรอก ขณะที่การสร้างกรดจะเริ่มขึ้นหลังจาก 8-16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า *Micrococcus varians* มีกิจกรรมเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกยับยั้งเนื่องมาจากสภาพสิ่งแวดล้อมที่เป็นกรดมากขึ้น ไนไตรท์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนตริคออกไซด์ ซึ่งจะรวมกับรงควัตถุในเนื้อ (Myoglobin) และเปลี่ยนเป็นสีชมพูของไนโตรโซไมโอโกลบิน (Nitrosomyoglobin) ซึ่งอัตราการเกิดสีชมพูดังกล่าวจะเกิดได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.5 (Nurmi, 1966) ดังนั้นการเกิดสีชมพูของแหนมเนื่องมาจาก *Micrococcus varians* ร่วมกับ *Lb. plantarum* จะช่วยให้เกิดการเปลี่ยนสีในผลิตภัณฑ์แหนมได้เร็วขึ้น แหนมที่ผลิตโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ผสมดังกล่าวจะเริ่มเปลี่ยนสี จากสีน้ำตาลอ่อนเป็นสีแดงหลังจาก 3 ชั่วโมงนับแต่เริ่มบรรจุในถุงพลาสติก (ไพโรจน์ และคณะ, 2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 การใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นของแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิดในผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์
แบคทีเรีย	
Pediococcus cerevisiae	- ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage, cervelat, thuringer, pork roll, summer style turkey sausage - ไส้กรอกหมักแบบแห้ง dry sausage, dry turkey sausage - Processed meat country-style ham
Pediococcus pentosaceus	- ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage - ไส้กรอกหมักแบบแห้ง pepperoni, genoa
Lactobacillus plantarum	- ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage - ไส้กรอกหมักแบบแห้ง salami, European-type dry sausage - Processed meat bacon, country-style ham
Lactobacillus brevis	- เนื้อสด เนื้อบด
Mixed of *P. cerevisiae* and *L. plantarum*	- ไส้กรอกหมักแบบกึ่งแห้ง summer sausage, lebanon bologna, cervet - ไส้กรอกหมักแบบแห้ง pepperoni, dry turkey sausage

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์
	- Processed meat cooked, mechanically deboned poultry meat
	- เนื้อสด mechanically deboned poultry meat, ground poultry breast meat
Mixture of *P. cerevisiae*	- ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
and *Micrococcus varians*	Genoa, dry sausage
Fungi and yeast	
Individual *Penicillium spp.*	- ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
P. janthinellus	mold-ripened salami sausage
P. siamplicissmum	
p. cyclopium or *P. viridicatum*	
Thamnidium elegans	- เนื้อสด
	Beef carcass aging
Candida lipolytica	- เนื้อสด
	ปลา

ที่มา: Smith and Palumbo, 1983

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved