การประเมินคุณลักษณะ การจำแนก และการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้กรอกหมักพื้นบ้านของไทย (หม้ำ)เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก

วรรณี สมัปปิโต[*]

บทคัดย่อ

หม้ำเป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักพื้นบ้านของไทยซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการใช้ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมาใช้ปรับปรุงกระบวนการผลิตหม้ำยังมีน้อยมาก ดังจะเห็นได้จากกระบวนการผลิตซึ่งใช้วิธีดั้งเดิมโดยไม่ได้ใช้เชื้อเริ่มต้น แต่จะอาศัยทักษะและประสบการณ์ในการผลิตมากกว่าเทคโนโลยี ดังนั้นกระบวนการผลิตจึงขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติที่มีอยู่ในวัตถุดิบ ทำให้ผลผลิตที่ได้ในแต่ละรอบการผลิตมีคุณภาพแตกต่างกัน เช่น กลิ่น เนื้อสัมผัส คุณค่าทางอาหาร ความปลอดภัย และคุณลักษณะอื่นๆ ของหม้ำ การแยกและการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสามารถช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ ปลอดภัย และใช้ระยะเวลาสั้นในการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก และศึกษาคุณลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่มีอยู่ตามธรรมชาติของหม้ำ นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและศึกษาคุณลักษณะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ต้องการเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมโดยอาศัยคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตหม้ำ โดยนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาประสิทธิภาพการหมักร่วมกันและติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักหม้ำ ตัวอย่างหม้ำที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อในการศึกษานี้มาจาก 5 แหล่งจากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ได้แก่ ชัยภูมิแหล่งที่ 1 (Chaiyaphum 1, CP1) ชัยภูมิแหล่งที่ 2 (Chaiyaphum 2, CP2) ขอนแก่น (Khon Kaen, KK) มหาสารคาม (Maha Sarakham, MK) และกาฬสินธุ์ (Kalasin, KS) จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างหม้ำมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา แลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Micrococaceae*, *enterococci* และ *Staphylococcus aureus* ปริมาณสูง อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 ในจำนวนกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มหลักที่พบในปริมาณสูงและมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักของหม้ำ ซึ่งพบในปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 6.0×10^6, 7.8×10^6, 5.4×10^6, 6.4×10^6 และ 1.0×10^7 cfu/g ในตัวอย่างหม้ำจากแหล่ง CP1, CP2, KK, MK และ KS ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียนี้ด้วยการทดสอบทางชีวเคมีโดยอาศัยชุดทดสอบสำเร็จรูป (API 50 CH) พบว่าประกอบด้วย *Lactobacillus curvatus, L. delbrueckii, L. acidophilus, L. paracasei, L. brevis, L. pentosus, L. mesenteroides, L. plantarum, L. farciminis, Carnobacterium divergens, Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus* จากการศึกษาปริมาณแลคติกแอซิดแบคทีเรียในวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตหม้ำ พบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถตรวจพบได้ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหม้ำมากน้อยแตกต่างกันไป โดยจะพบมากที่สุดในไส้ธรรมชาติ (natural casing) ในขณะที่ยีสต์และราพบมากในเนื้อวัว ตับ และม้าม ส่วน *Micrococcaceae* และ enterococci ส่วนใหญ่พบในม้าม เนื้อวัว ตับและไส้ธรรมชาติ

---

[*] ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร) คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 243 หน้า.

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างหม้ำนำมาคัดเลือกเบื้องต้นโดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC13565, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC25904, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Psudomonas* sp. และ *Staphylococcus epidermidis* ทดสอบโดยใช้วิธี disc diffusion และตรวจวัดความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC จากผลการศึกษาพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้โดยพบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 10 ไอโซเลทจากจังหวัดชัยภูมิแหล่งที่ 1 ได้แก่ CP105, CP108, CP114, CP115, CP116, CP120, CP124, CP129, CP130, CP131 และ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดชัยภูมิแหล่ง ที่ 2 ได้แก่ CP210, CP222 และ 4 ไอโซเลท จากจังหวัดมหาสารคาม ได้แก่MK116, MK112, MK113, MK114 และ 1 ไอโซเลท จากจังหวัดขอนแก่น ได้แก่ KK111 และ 2 ไอโซเลท จากจังหวัดกาฬสินธุ์ ได้แก่ KS111, KS105, KS115 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 มากที่สุด ในขณะที่ไอโซเลท CP115, CP116, CP120, CP210, CP213, MK114 และ KS103 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ และเมื่อตรวจวัดความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลท ได้แก่ CP136, CP129, KK114, KK111, CP117, CP130, CP220, KK113, CP131, CP218, CP114, CP210, CP118, CP222, CP120, MK114, KS103 และ CP138 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง (>15 g/l) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ CP116, CP120, CP210, MK114 และ KS103 จากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง หลังจากนั้นนำมาศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะต่างๆ เช่น การทนกรด อุณหภูมิ น้ำตาล และความเค็ม พบว่าสามารถคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท ได้แก่ CP120, CP210 และ MK114 เนื่องจากสามารถเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นของกรดแลคติก และความเค็มได้ดี

แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลทนำมาศึกษาประสิทธิภาพการหมักร่วมกัน เพื่อเลือกไอโซเลทที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก โดยศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของหม้ำ และการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักหม้ำ พบว่าหม้ำที่ได้จากการทดลองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.62 ถึง 4.66 การสูญเสียน้ำหนักเริ่มต้นที่ 10.18–15.48 % (วันที่ 1) และจะสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็น 54.36–58.33% ในระหว่างกระบวนการหมัก คู่ไอโซเลท CP120 + CP210 ใช้เวลาในการหมักสั้น (7 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยสามารถลดปริมาณของเชื้อ enterococci และ *Staphylococcus aureus* ได้และสามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในทางกลับกันการสร้างกรดอะซิติก จะสร้างได้น้อยกว่าสิ่งทดลองอื่น ปริมาณของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างกรดแลคติก และสามารถลดปริมาณเชื้อ enterococci และ *Staphylococcus aureus* ได้มากกว่าตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามลักษณะทางประสาทสัมผัสของหม้ำที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อเริ่มต้นได้ผลไม่ต่างจากตัวอย่างควบคุม

Characterization, Identification and Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Traditional Fermented Sausage (Mhom) for their Potential Use as Starter Cultures

Wannee Samappito*

Abstract

Mhom, Thai traditional fermented sausage, is a popular food mostly consumed in the Northeastern region of Thailand and yet little scientific and technology information is applied in production. These meat products are manufactured with traditional technologies without added starter cultures. Their manufacture depends on the skill and experience of the meat manufacturer rather than technology. Hence, the process depends on the growth of autochthonous microflora which influences the product qualities i.e. flavor, texture, nutritional values, safety, and other characteristics. The isolation and selection of lactic acid bacteria (LAB) which can be used as starter cultures may help in achieving the products with consistent quality, safety and shorter ripening time. Thus, the aims of this study were to isolate and characterize groups of microorganisms from naturally fermented Mhom product. This investigation also intends to characterize and identify the desirable groups of LAB in order to select the most suitable strains, according to their antimicrobial activity against food borne pathogens and large amounts of lactic acid to be used as Mhom starter cultures. Then, the selected LAB in combinations were determined for their fermentation efficiency and the dynamic microbial profiles were also monitored during Mhom fermentation. Mhom samples used for microbial isolation were sampled from five different locations in the Northeastern provinces of Thailand i.e., Chaiyaphum 1 (CP1), Chaiyaphum 2 (CP2), Khon Kaen (KK), Maha Sarakham (MK), and Kalasin (KS) provinces. The results showed high counts of total aerobic plate count, yeast and mould, LAB, *Micrococaceae*, enterococci and *Staphylococcus aureus*. However, *Escherichia coli* O157:H7 was not detected in the products. Obviously, LAB was the main microbial group found in high numbers and had an important role in Mhom fermentation. They were found at 6.0×10^6, 7.8×10^6, 5.4×10^6, 6.4×10^6 and 1.0×10^7 cfu/g in Mhoms coded CP1, CP2, KK, MK and KS, respectively. The LAB were further identified based on biochemical tests using API 50 CH and found that they were *Lactobacillus curvatus, L. delbrueckii, L. acidophilus, L. paracasei, L. brevis, L. pentosus, L. mesenteroides, L. plantarum, L. farciminis, Carnobacterium divergens, Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus.* The LAB numbers in the raw materials for Mhom production had also been investigated and found that LAB were observed in all raw materials with population varying in numbers. Particularly, natural casings were found with the highest LAB numbers whereas yeast and mold were mainly found in beef, liver, and spleen. Furthermore, *Micrococcaceae* and enterococci were also mostly found in spleen, beef, liver, and natural casings.

---

* Doctor of Philosophy (Food Technology), Faculty of Technology, Khon Kaen University. 243 pages.

In addition, Mhom isolated LAB were primary screened based on their antimicrobial activities against food spoilage and pathogenic microorganisms including *Staphylococcus aureus* ATCC13565, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC25904, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus epidermidis* using disc diffusion method and organic acid production using HPLC. All the LAB isolates were found to exhibit antimicrobial activities on the indicator bacteria. 10 LAB isolates from Chaiyaphum 1 (CP105, CP108, CP114, CP115, CP116, CP120, CP124, CP129, CP130 and CP131), 2 isolates from Chaiyaphum 2 (CP210 and CP222), 4 isolates from Maha Sarakham (MK116, MK112, MK113 and MK114), 1 isolate from Khon Kaen (KK111), and 3 isolates from Kalasin (KS101, KS105 and KS115) exhibited the greatest inhibitory effect on *Escherichia coli* O157:H7 while CP115, CP116, CP120, CP210, CP213, MK14 and KS103 displayed a higher inhibition against *L. monocytogenes* than others. The capability for organic acid production using HPLC was also determined and found that seventeen isolates i.e. CP136, CP129, KK114, KK111, CP117, CP130, CP220, KK113, CP131, CP218, CP114, CP210, CP118, CP222, CP120, MK114, KS103, and CP138 showed the higher production of lactic acid (>15 g/l) compared to the other LAB isolates. Therefore, 5 LAB isolates including CP116, CP120, CP210, MK114 and KS103 were selected based on their broad-spectrum inhibitory activity against indicator bacteria and huge production of lactic acid. Afterwards, different cultural conditions were also tested i.e. acid tolerance, temperature, sugar and salt and found that 3 LAB isolates of CP120, CP210, and MK114 were selected based on their ability to grow at high temperature and tolerance to lactic acid and NaCl concentrations.

Finally, those 3 LAB strains were studied in combinations for their fermentation efficiency to achieve the suitable strains for fermentation based on their physical and chemical characteristics and also microbial population changes during Mhom fermentation. It was found that Mhom produced had the pH values ranging from 4.62 to 4.66, weight loss increased from initial values of 10.18–15.48 % (day 1) to 54.36–58.33% during the ripening process. Also, strains of CP120 and CP210 produced highest amounts of lactic acid ($p \leq 0.05$) compared to the other strain combinations and control and took very short period for Mhom fermentation (7 days) compared to control. Besides, they also reduced the numbers of enterococci and *Staphylococcus aureus*. Interestingly, production of acetic acid by these LAB strains was less than the others ($p \leq 0.05$) whereas the populations of LAB increased rapidly compared to the control which was related to the lactic acid production. However, the organoleptic properties were similar between Mhom fermented with starter culture and without starter culture (control).