โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนากระบวนการเพื่อลดการเสื่อมเสียผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่ม

ชื่อนิสิต นางสาวอภิวัณ บวรรัตนเวช
นางสาวอรญา นทีสำเริง

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2653

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนากระบวนการเพื่อลดการเสื่อมเสีย ผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่ม

โดย

นางสาวอภิวัณ บวรรัตนเวช
นางสาวอรญา นทีสำเริง

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประจำปีการศึกษา 2563

PROCESS DEVELOPMENT FOR SPOILAGE REDUCTION OF PICKLED MANGO

Apiwan Bovornratanavech

Oraya Nateesumroeng

Project Advisor

Associate Professor Cheunjit Prakitchaiwattana , Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

หัวข้องานวิจัย การพัฒนากระบวนการเพื่อลดการเสื่อมเสีย ผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่ม

โดย นางสาวอภิวัณ บวรรัตนเวช

นางสาวอรญา นทีสำเริง

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ประจำปีการศึกษา 2563

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การพัฒนากระบวนการเพื่อลดการเสื่อมเสีย ผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่ม
โดย นางสาวอภิวัณ บวรรัตนเวช
นางสาวอรญา นทีสำเริง
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา
ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ปัญหาบรรจุภัณฑ์โป่งพองในอาหารหมักดองมักมีสาเหตุจากจุลินทรีย์ชนิดสร้างก๊าซที่ทนต่อสภาพแวดล้อมการหมัก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียและสร้างก๊าซที่ทำให้บรรจุภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มโป่งพอง ทดสอบสมบัติการสร้างก๊าซ ระบุสายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ และประเมินวิธียับยั้งการเจริญ จากการวิจัยสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีสมบัติในการสร้างก๊าซได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. parabailii* และ *Z. rouxii* ประเมินวิธียับยั้งการเจริญของทุกไอโซเลท (i) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐานที่เติมสาร ได้แก่ เกลือ แปรความเข้มข้น 0.7-3% (w/v), ซูโครส 6-12% (w/v), โพแทสเซียมซอร์เบต 0.05-0.11% (w/v) และโซเดียมเบนโซเอต 0.06-0.19% (v/w) ผลการเติมสารชนิดเดียวพบว่า การเติมเกลือต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 3% (w/v), โพแทสเซียมซอร์เบต 0.11% (w/v) และโซเดียมเบนโซเอต 0.1%. (w/v) จึงยับยั้งการเจริญของทุกไอโซเลทได้ ส่วนซูโครสไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญ ผลการเติมสารผสมพบว่า โพแทสเซียมซอร์เบตกับเกลือมีผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งทุกไอโซเลท สามารถลดค่า MICs ของสารทั้งสองลงประมาณ 50% และโพแทสเซียมซอร์เบตกับโซเดียมเบนโซเอตมีผลเสริมฤทธิ์กันโดยสามารถลดค่า MICS ลงประมาณ 35% (ii) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมสารให้ความหวานในการดองมะม่วงโดยการใช้ซอร์บิทอล 70% เทียบกับการใช้ไฮฟรุคโตสไซรัป 55% ปรับความเข้มข้นเป็น 22 และ 25 °Brix ร่วมกับการแปรระดับ pH 3.0 และ 3.5 ด้วยกรดซิตริก เติมเกลือเข้มข้น 1%(w/v) ตามสภาวะของผู้ผลิตมะม่วงดองพบว่า การใช้สารเสริมความหวานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 25 °Brix ที่ pH 3 สามารถยับยั้งการเจริญของทุกไอโซเลทได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.1$) และเมื่อเติมสารกันเสียในช่วงความเข้มข้นเดียวกับที่ประเมินได้จาก (i) ร่วมกับสารให้ความหวานพบว่า การใช้สารกันเสียความเข้มข้นต่ำกว่า คือ โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น 0.05% (w/v) และโซเดียมเบนโซเอต 0.06% (w/v) สามารถลดการเจริญของทุกไอโซเลทได้

Project Title	Process development for spoilage reduction of pickled mango
Student	Apiwan Bovornratanavech
	Oraya Nateesumroeng
Student Program	Bachelor of Science in Food Technology
Advisor	Associate Professor Cheunjit Prakitchaiwattana, Ph.D.
Academic Year	2020

ABSTRACT

The swelling problem in the packaging of fermented foods are often caused by gas-forming spoilage microorganisms tolerant to the fermentation environment. This study aimed to isolate the gas-producing microbes associated to in sweet-pickled mango spoilage, identify by DNA sequencing, and evaluate an effective means to inhibit their growth. The gas-producing spoilages were isolated from culturing under aerobic condition at room temperature, identified as *Lactobacillus plantarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. parabailii* and *Z. rouxii*. Methods for inhibition of growth all species was then investigated. (i) Culturing spoilage isolates in standard liquid medias added with single four additives in the ranges of 0.7-3% for salt (w/v), sucrose 6-12% (w/v), potassium sorbate 0.05-0.11% (w/v) and sodium benzoate 0.06-0.1% (w/v). It was found that with single additive, all spoilage isolates could be inhibited by salt at a concentration higher than 3% (w/v), potassium sorbate 0.11% (w/v) and sodium benzoate 0.1% (w/v). Sucrose was not potential to control the growth. With mixed preservatives, potassium sorbate and salt showed synergistic effect for every isolate th at could decrease the MICs of single up to 50% whilst potassium sorbate and sodium benzoate could reduce the MICs by 35%. (ii) Culturing spoilage isolates in standard liquid medias with 1% salt supplemented with sweeteners, 70% sorbitol compared with 55% high-fructose syrup, adjusted the sugar content to 22 and 25 °Brix togerther with pH 3 and 3.5 by citric acid. according to the condition provided by manufacturer. Under 25 °Brix with 70% sorbitol and 55% HFS and pH 3 condition significantly inhibited all isolates ($p<0.1$). Under these culturing conditions, lower concentration of preservatives, potassium sorbate and sodium benzoate, could inhibit the growth of all isolates that were 0.05% and 0.06% (w/v), respectively.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจาย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ได้ให้ความรู้ คำเสนอแนะ ความช่วยเหลือ ตลอดจนการช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด จนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้ทำงานวิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ บริษัท ผลไม้แปรรูปวรพร จำกัด ที่ได้ให้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และให้ข้อมูลต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ได้ให้คำเสนอแนะ และให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ มาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณผู้ปกครอง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา รวมทั้งสละเวลาเพื่ออธิบายและสอนใช้อุปกรณ์ต่างๆ ภายในห้องทดลอง

ขอบคุณนิสิตปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วงแช่อิ่ม 3

2.2 ส่วนประกอบสำคัญ 3

2.2.1 มะม่วง 3

2.2.2 ซูโครส 5

2.2.3 เกลือ 5

2.2.4 วัตถุเจือปนอาหาร 6

2.2.4.1 โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) 6

2.2.4.2 โซเดียมเบนโซเอต 7

2.3 การเสื่อมเสียลักษณะที่ดีของมะม่วงแช่อิ่ม 8

2.3.1 ด้านกายภาพและเคมี 8

2.3.2 ด้านชีวภาพ 9

2.3.2.1 ยีสต์ และรา 9

2.3.2.2 แบคทีเรีย 10

2.4 การระบุสาเหตุของปัญหาบรรจุภัณฑ์โป่งพองในมะม่วงแช่อิ่ม 10

2.4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ 10

2.4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม 10

2.5 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์นอกเหนือการใช้วัตถุกันเสีย 11

2.5.1 pH 11

2.5.2 Water activity 11

2.5.3 Salinity 12

2.5.4 Sugar content 13

2.5.5 อื่นๆ 14

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ 15

3.1.1 วัสดุ 15

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 15

3.1.3 สารเคมี 16

3.2 วิธีการดำเนินงาน 16

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์ 16

3.2.2 การตรวจสอบสมบัติในการสร้างก๊าซและการระบุสายพันธุ์ 17

3.2.3 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของไอโซเลทสร้างก๊าซ 18

3.2.3.1 การยับยั้งการเจริญ ด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบชนิดเดี่ยว (single effect) 18

3.2.3.2 การยับยั้งการเจริญด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบผลเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) 18

3.2.3.3 การยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1% 19

บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์สร้าง และการระบุสายพันธุ์ 21

4.2 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของไอโซเลทสร้างก๊าซ 24

4.2.1 การยับยั้งการเจริญ ด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบชนิดเดี่ยว (single effect) 24

4.2.2 การยับยั้งการเจริญด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบผลเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) 28

4.3 การยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1% (w/v) 31

บทที่ 5 สรุปการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากมะม่วงแช่อิ่มที่บรรจุภัณฑ์โป่งพอง 36

5.2 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สร้างก๊าซ 36

5.3 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1% (w/v) 36

เอกสารอ้างอิง 37

ภาคผนวก ก. 40

ภาคผนวก ข. 41

ภาคผนวก ค. 45

ประวัติผู้วิจัย 46

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของมะม่วงต่อ 100 กรัมส่วนที่บริโภคได้ 4

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ของโพแทสเซียมซอร์เบตในอาหารแต่ละประเภทหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 7

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ของโซเดียมเบนโซเอตในอาหารแต่ละประเภท หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 8

ตารางที่ 2.4 Minimum water activity values of spoilage microorganisms 12

ตารางที่ 2.5 Water activity (aw) of salt solution 13

ตารางที่ 3.1 การแปรค่าระหว่าง pH และ °Brix ในอาหารเพาะเชื้อเหลว 8 สูตร 19

ตารางที่ 3.2 สัดส่วน potassium sorbate และ sodium benzoate ในอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตร A-K 20

ตารางที่ 4.1 การเจริญของจุลินทรีย์ ที่สภาวะต่างๆ บนอาหารเพาะเชื้อแข็งชนิดต่างๆหลังการบ่ม 5 วัน 21

ตารางที่ 4.2 การสร้างก๊าซของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเชื้อเหลวชนิดต่างๆหลังการบ่ม 5 วัน 22

ตารางที่ 4.3 ลักษณะจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างก๊าซที่แยกได้จากวิธี Harrison’s disc method 23

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ 24

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของตัวแปรร่วมระหว่าง Potassium sorbate และ Sodium benzoate 30

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของตัวแปรร่วมระหว่าง Potassium sorbate และ เกลือ 31

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ไอโซเลท ในสภาวะอาหารและระดับสารกันเสียที่ต่างกัน 35

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 โครงสร้างน้ำตาลซูโครส 5

รูปที่ 2.2 โครงสร้างผลึกโซเดียมคลอไรด์ 5

รูปที่ 4.1 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับเกลือเข้มข้นสุทธิ 0, 0.7, 1, 2 และ 3 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 25

รูปที่ 4.2 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับซูโครสเข้มข้นสุทธิ 0, 6, 8, 10 และ 12 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 26
รูปที่ 4.3 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับโพแทสเซียมซอร์เบตเข้มข้นสุทธิ 0, 0.05, 0.07, 0.09 และ 0.11 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 27
รูปที่ 4.4 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นสุทธิ 0, 0.06, 0.07, 0.09 และ 0.1 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 28
รูปที่ 4.5 synergistic effect ระหว่าง potassium sorbate (แนวนอน) และ sodium benzoate (แนวตั้ง) ของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) และ M (e) ที่มีการแปรระดับวัตถุกันเสียในอาหารเพาะเชื้อเหลวมาตรฐาน 29
รูปที่ 4.6 synergistic effect ระหว่าง potassium sorbate (แนวนอน) และ เกลือ (แนวตั้ง) ของ ของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) และ M (e) ที่มีการแปรระดับวัตถุกันเสียในอาหารเพาะเชื้อเหลวมาตรฐาน 30
รูปที่ 4.7 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่มีการแปรระดับ pH และ °Brix โดยมีความเข้มข้นเกลือ 1%(w/v) 34

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในประเทศไทยมะม่วงแช่อิ่มเป็นอาหารทานเล่นที่เป็นที่นิยม และเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค จึงมีการขยายกระบวนการผลิตเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีหมักดอง ซึ่งเป็นวิธีที่หลีกเลี่ยงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ยาก ทั้งในส่วนที่มาจากตัววัตถุดิบ หรือเกิดการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิตที่อาจมีวิธีการฆ่าเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพมากพอ ส่งผลให้จำนวนเชื้อเริ่มต้นหรือเชื้อที่เหลือในผลิตภัณฑ์ทั้งในรูปแบบของเซลล์และสปอร์ สามารถเจริญและสร้างความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ได้ในที่สุด โดยส่วนมากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเสื่อมเสีย (spoilage) นั้นจะมักทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ จึงเป็นเรื่องที่น่ากังวลของผู้ผลิตว่าสินค้านั้นจะยังมีคุณภาพคงเดิมเมื่อส่งถึงมือผู้บริโภคหรือไม่

ข้อบกพร่องหลักของผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มที่มีผลต่อการเลือกซื้อ คือ การโป่งพองของบรรจุภัณฑ์ การบวมของบรรจุภัณฑ์เกิดขึ้นจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็น เมทาบอไลท์ของจุลินทรีย์ที่หลงเหลือในผลิตภัณฑ์

โดยทั่วไปอาหารหมักที่เป็นกรดสูงอย่างมะม่วงแช่อิ่ม (pH 2-3) จะมีสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค จึงไม่จำเป็นต้องผ่านการ sterilization ที่ใช้ความร้อนสูง นอกจากนี้หากผลิตภัณฑ์ผ่านความร้อนสูง อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณลักษณะด้าน สี กลิ่น เนื้อสัมผัส และ รสชาติอันเป็นเอกลักษณ์ ของมะม่วงแช่อิ่มไป ทั้งนี้แม้มะม่วงแช่อิ่มจะมีความเป็นกรดสูง แต่จากการศึกษาในหลายงานวิจัยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียหลายๆชนิดก็ยังสามารถเจริญ และสร้างสารต่างๆ รวมถึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ แต่เนื่องจากข้อจำกัดในการใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อดังที่กล่าวข้างต้น จึงจำเป็นต้องประเมินหาวิธีที่เหมาะสมในการลดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ต่างๆอย่างจำเพาะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยไม่มีผลกระทบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ และปลอดภัย

เนื่องจากในกระบวนการอุตสาหกรรมนั้น มีกฎหมายที่ต้องปฏิบัติตามอย่างเคร่งครัด เพราะอาหารเป็นผลิตภัณฑ์ที่ส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้โดยตรง ผลิตภัณฑ์อาหารจึงไม่สามารถที่จะใส่วัตถุเจือปนอาหารเกินกว่ากฎหมายกำหนด ดังนั้นการศึกษา และปรับปรุงสภาวะแวดล้อมของกระบวนการดอง ร่วมกับการใช้

วัตถุเจือปนอาหาร เพื่อต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับผู้ผลิต และผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาแนวทางในการลดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มโดยการหาสาเหตุ และสภาวะที่เหมาะสมซึ่งสามารถลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สร้างก๊าซได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียจากผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่ม
2. ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดก๊าซภายในผลิตภัณฑ์
3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการลดหรือยับยั้งจุลินทรีย์ในข้อ 1.3.2 ผ่านการปรับค่าทางเคมี
4. หาระดับวัตถุเจือปนอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบสภาวะการลดการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของมะม่วงแช่อิ่มที่สามารถประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป
2. พัฒนาทักษะและกระบวนการคิดวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์รวมถึงการวางแผนการทำงานอย่างเป็นระบบ ทำให้การทำงานเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วงแช่อิ่ม

มะม่วงแช่อิ่มเป็นผลไม้แปรรูปที่ใช้การดองหวานเพื่อถนอมอาหาร มีขั้นตอนหลักคือนำมะม่วงแช่ในน้ำเชื่อมเข้มข้นซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันไปในแต่ละสูตรและอาจมีขั้นตอนอื่นประกอบขึ้นอยู่กับผู้ผลิต อาทิ แช่น้ำปูนใสเพื่อความกรอบหรือเติมเกลือเพื่อปรับปรุงรสชาติ เป็นต้น ส่วนประกอบหลักโดยทั่วไปสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ มะม่วง น้ำตาล เกลือ และ วัตถุเจือปนอาหาร ในระดับอุตสาหกรรมปัญหาที่พบมากไม่ใช่การเน่าเสียแต่เป็นการโป่งพองของบรรจุภัณฑ์ซึ่งส่งผลให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและความคุ้มค่าทางการผลิตขึ้นโดยมีสาเหตุหลักจากการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดสร้างก๊าซสูง

2.2 ส่วนประกอบสำคัญ

2.2.1 มะม่วง

มะม่วงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mangifera indica* จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีถิ่นกำเนิดในเอเชียเขตร้อน ซึ่งมะม่วงที่พบในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ สามารถแบ่งตามลักษณะการบริโภคได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. มะม่วงสำหรับรับประทานผลดิบ เช่น น้ำดอกไม้ แรด เขียวเสวย พิมเสนมัน หนองแซง ฟ้าลั่น เบาสงขลา มันหวานปากช่อง เป็นต้น
2. มะม่วงสำหรับรับประทานผลสุก เช่น น้ำดอกไม้ อกร่อง อกร่องพิกุลทอง หนังกลางวัน ทองดำ เป็นต้น
3. มะม่วงเพื่ออุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้ สามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท ได้แก่ มะม่วงสำหรับดองอย่าง แก้วกับโชคอนันต์ เป็นต้น และมะม่วงสำหรับบรรจุกระป๋อง น้ำคั้นและแช่อิ่มอย่าง สามปีกับมหาชนก เป็นต้น

มะม่วงเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกมากในประเทศไทย เนื่องจากมีหลากหลายสายพันธุ์จึงสามารถปลูกและเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปีในทุกภูมิภาคของประเทศ ทำให้มะม่วงเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย (ญาณกร ศิวะวัฒนะวงศ์ และอนนต์ อดิโรจนานนท์, 2550) โดยสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน ทองดำ อกร่อง เขียวเสวย พิมเสนมัน แก้ว สามปี แรด และโชคอนันต์ (วิจิตร วังใน, 2529) องค์ประกอบหลักที่สำคัญของมะม่วงประกอบด้วย น้ำและคาร์โบไฮเดรต โดยมะม่วงอ่อนจะมีสารให้รสฝาด (Astringent) กรด และวิตามินซีในปริมาณมาก ขณะที่มะม่วงสุกจะมีรสหวานมีปริมาณวิตามินเอและสารให้กลิ่นปริมาณสูง (Lakshminarayana, 1980) ช่วงการเจริญเติบโตของมะม่วงจะมีการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 70 ในระยะผลอ่อนเป็นร้อยละ 86 เมื่ออายุประมาณ 6 สัปดาห์หลังออกผล ปริมาณแป้งเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 13 โดยมีการ

สลายตัวเป็นน้ำตาลเมื่อผลสุก ในระยะผลดิบพบน้ำตาลรีดิวซิ่งชนิดกลูโคสและฟรุกโตสจำนวนมาก แต่ระยะผลสุกกลับพบน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งชนิดซูโครสเพิ่มขึ้น กรดที่พบส่วนมากเป็นกรดซิตริกหรือกรดมาลิก ซึ่งในมะม่วงดิบมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 4-5 และลดลงเหลือร้อยละ 0.5-1.0 เมื่อสุก ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 0.5-1.0 ในระยะผลสุก ปริมาณวิตามินซีในผลมะม่วงดิบมีสูงและลดลงเมื่อผลแก่ขึ้น และปริมาณสารประกอบฟีนอลที่ส่งผลให้เกิดรสฝาดพบมากในระยะแรกของการเจริญเติบโตแต่ลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 8 และเริ่มมีปริมาณคงที่ โครงสร้างหลักของผนังเซลล์ คือ เซลลูโลสและสารประกอบเพคตินซึ่งส่งผลให้เนื้อมะม่วงแข็งแรงในขณะดิบ มะม่วงดิบจึงมีเนื้อที่แน่นกว่ามะม่วงสุก เพราะในระหว่างการสุกจะมีเอนไซม์ชนิดย่อยสลายสารเพคตินเกิดขึ้น โดยรงควัตถุที่พบในผลมะม่วง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแซนโทฟิลล์ ซึ่งมีสัดส่วนเปลี่ยนแปลงตามระยะการสุกของผลระยะสุกสีเขียวของคลอโรฟิลล์ที่เปลือกจะหายไปและเกิดสีเหลืองของแคโรทีนอยด์ซึ่งมีทั้งแอลฟ่า และบีต้าแคโรทีนแทนที่ (Lakshminarayana, 1980 ; นิธิยา รัตนาปนนท์ และ ดนัย บุณยเกียรติ, 2533)

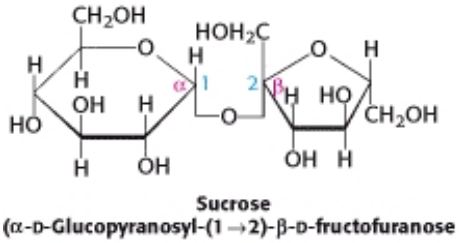
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของมะม่วงต่อ 100 กรัมส่วนที่บริโภคได้

องค์ประกอบ	ปริมาณ		
	มะม่วงดิบ	มะม่วงหาม	มะม่วงสุก
ความชื้น (กรัม)	82.90	81.10	82.60
พลังงาน (กิโลแคลอรี่)	60.00	69.00	62.00
ไขมัน (กรัม)	0.40	0.60	0.30
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (กรัม)	15.50	17.50	15.90
สารเยื่อใยในอาหาร (กรัม)	0.40	0.20	0.50
โปรตีน (กรัม)	0.60	0.40	0.60
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	10.00	10.00	10.00
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	15.00	15.00	15.00
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.20	0.30	0.30
เรตินอล (ไอ.ยู.)	183.00	392.00	3,133.00
ไทอามีน (มิลลิกรัม)	0.06	0.06	0.06
ไรโบฟลาวิน (มิลลิกรัม)	0.05	0.05	0.05
ไนอะซีน (มิลลิกรัม)	0.60	0.60	0.60
กรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัม)	62.00	48.00	36.00

ที่มา: กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530)

2.2.2 ซูโครส

น้ำตาลซูโครส หรือน้ำตาลทราย มีรสหวาน และสามารถละลายน้ำได้ง่าย นิยมใช้เป็นสารให้ความหวาน (sweetener) ผลิตจากพืชและผลไม้ เช่น อ้อย บีทรูท และปาล์ม เป็นต้น



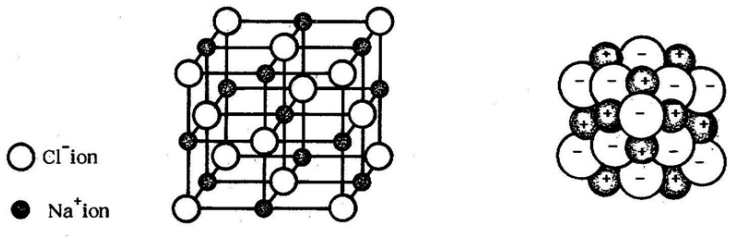
ที่มา: ชุติวัต อรรถบูรณ์วงศ์ (2558)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างน้ำตาลซูโครส

น้ำตาลซูโคสมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น สูตรเคมีคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส (glucose) และน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) จัดเป็นน้ำตาลประเภท non-reduction sugar มีจุดหลอมเหลวที่ 186 องศาเซลเซียสและให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม (ชุติวัต อรรถบูรณ์วงศ์, 2558) โดยการแช่ผลไม้ในสารละลายน้ำตาลเป็นขั้นตอนสำคัญในการแช่อิ่ม มีวัตถุประสงค์เพื่อดึงน้ำออกจากผลไม้และเพิ่มความหวานผ่านกระบวนการออสโมซิส ปริมาณน้ำที่สูญเสียในขั้นตอนนี้ทำให้น้ำหนักของผลิตภัณฑ์ลดลง 40-50% ซึ่งในผลิตภัณฑ์แช่อิ่มควรมีน้ำตาลมากกว่า 65 องศาบริกซ์ จึงจะสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน

2.2.3 เกลือ

เกลือแกง หรือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) สูตรเคมีคือ NaCl มีลักษณะเป็นของแข็ง ใส ไม่มีสี ผลึกรูปร่างเป็นลูกบาศก์ เกิดจากโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออน ที่มีการยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไอออนิก ซึ่งเกิดจากแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตระหว่างไอออนบวกและไอออนลบเนื่องจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอน



ที่มา: อนุสิษฐ์ เกื้อกูล (2560)

รูปที่ 2.2 โครงสร้างผลึกโซเดียมคลอไรด์

โครงสร้างผลึกของโซเดียมคลอไรด์ประกอบด้วยโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนที่เรียงแถวสลับกัน ลักษณะคล้ายตาข่าย โดยแต่ละไอออนมีไอออนชนิดตรงข้ามล้อมรอบอยู่ 6 ไอออน เกลือเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารซึ่งทำให้เกิดรสชาติเค็ม นอกจากนี้สามารถเก็บรักษาอาหารและช่วยแปรสภาพอาหารผ่านการหมักดอง โดยเกลือความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้เนื่องจากการแตกตัวของโมเลกุลสามารถสร้างแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกของเซลล์ซึ่งเป็นการรบกวนสภาพสมดุลของเซลล์ได้ แต่ในการแช่อิ่มที่ต้องการความเข้มข้นเกลือไม่สูงนักเพราะปัจจัยด้านรสชาติและความกรอบของผลไม้ซึ่งจะลดลงหากมีการใช้เกลือความเข้มข้นสูง (นันทนาถ กิติศรีวรพันธุ์, 2543)

2.2.4 วัตถุเจือปนอาหาร

วัตถุที่ใส่เพิ่มลงในอาหารเพื่อประโยชน์ในการผลิตในขั้นตอนหนึ่งๆ โดยอาจมีหรือไม่มีคุณค่าทางโภชนาการก็ตาม รวมถึงวัตถุที่ไม่ได้เจือปนในอาหารแต่ใส่รวมกับอาหารในบรรจุภัณฑ์ ทั้งนี้สารอาหารที่เติมเพื่อปรับให้คงคุณค่าทางโภชนาการไม่ถือเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (สถาบันอาหาร, 2543 ; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา [อย.], 2556) ซึ่งวัตถุเจือปนอาหารส่วนมากที่ใช้ในกระบวนการผลิตมะม่วงแช่อิ่มระดับอุตสาหกรรมคือ วัตถุเจอปนเพื่อยืดอายุการเก็บอาหารหรือวัตถุกันเสีย (preservative) สารกลุ่มนี้ใช้เพื่อการถนอมหรือยืดอายุการเก็บของอาหาร เป็นสารป้องกันการเน่าเสียอันมีสาเหตุจากจุลินทรีย์อย่างแบคทีเรีย ยีสต์ และรา รวมถึงจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคเช่นกัน โดยเมื่อคำนึงปัจจัยด้านต้นทุนการผลิตและสภาพแวดล้อมของอาหารที่มีความเป็นกรด ดังนั้นสารกันเสียที่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมมะม่วงแช่อิ่ม มีดังนี้

2.2.4.1 โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate)

โพแทสเซียมซอร์เบตหรือ $C_6H_7KO_2$ มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว มีกลิ่นเล็กน้อย และละลายน้ำได้ดี เป็นสารเคมีที่มีความเป็นกรด ช่วงเหมาะสมในการทำงานคือ pH 5-6 (Jorge K., 2003) สามารถยับยั้งความเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากแบคทีเรีย รา และยีสต์ ได้อย่างครอบคลุม แม้มีงานวิจัยว่าโพแทสเซียมซอร์เบตไม่สะสมในร่างกายหากมีปริมาณไม่สูงนัก สามารถย่อยผ่านกระบวนการสลายกรดไขมันเป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (EFSA, 2015) แต่เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงมีปริมาณกำหนดปริมาณสูงสุดที่สามารถใช้ได้โดยขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร ในประเทศไทยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาหรือ อย. เป็นหน่วยงานออกกฎเกณฑ์ดังกล่าว ซึ่งผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มมีปริมาณสูงสุดที่ 500 ppm ของกรดซอร์บิก

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ของโพแทสเซียมซอร์เบตในอาหารแต่ละประเภทหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	ชื่อและกลุ่มหน้าที่ในอาหาร	ชนิดของอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ (มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม) เว้นแต่ได้ระบุปริมาณเฉพาะไว้แล้ว
172. (INS 202)	โพแทสเซียมซอร์เบต **ชื่ออื่น :** - Potassium sorbate - Potassium salt of trans, trans 2,4-hexadienoic acid - Potassium (E,E)-2,4-hexadienoate **กลุ่มหน้าที่ :** - กันเสีย	โพรเซสชีส	- 2,000
		เวย์ชีส	- 1,000 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก
		เนยเทียม	- 1,000 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก
		มะกอกดอง	- 500 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก
		แยมและเยลลี	- 1,000 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก
		อโปริกอตแห้ง	- 500 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก
		เครื่องดื่ม	- 200 คำนวณเป็นกรดซอร์บิก

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2547)

2.2.4.2 โซเดียมเบนโซเอต

โซเดียมเบนโซเอตหรือ $C_7H_5NaO_2$ มีลักษณะเป็นเกล็ดเล็กๆ หรือรูปแท่งคล้ายเข็ม ไม่มีสี และกลิ่น สามารถละลายน้ำได้ดีเนื่องจากอยู่ในรูปเกลือของกรดเบนโซอิกต่างจากกรดเบนโซอิกที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ (Chipley, 1993; World Health Organization, 2000; Davidson, Juneja and Branen, 2002) เป็นวัตถุกันเสียที่เก่าแก่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ยา เครื่องสำอาง และอาหาร โซเดียมเบนโซเอตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุดเมื่ออยู่ในสภาพไม่แตกตัวหรืออยู่ในอาหารที่มีค่าพีเอชใกล้เคียงกับค่า pKa (ศิวาพร, 2546) โดยโซเดียมเบนโซเอตเป็นสารกันเสียชนิดแรกที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในอาหารจากคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สามารถพบในพืชธรรมชาติ เช่น แคนเบอรี่ ลูกพรุน อบเชย และกานพลู เป็นต้น (World Health Organization, 2000; Davidson, Juneja and Branen, 2002) โดยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีผ่านกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบ และหน้าที่การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆเปลี่ยนแปลงไปจึงขัดขวางการเลือกสารที่เข้าสู่เซลล์ รวมทั้งการแตกตัวของสารภายในเซลล์ทำให้เอนไซม์ต่างๆสูญเสียความสามารถในการดำเนินกิจกรรมไป (Davison et al., 2002) การบริโภคโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณน้อย ร่างกายสามารถขับออกได้ทางปัสสาวะในรูปกรดฮิพพิวริก แต่หากได้รับในปริมาณสูงหรือมากกว่า 2 กรัมต่อวันอาจมีผลข้างเคียง อาทิ คลื่นไส้และอัมพาต เป็นต้น (วีรยา ,2018) ดังนั้นจึงมีการกำหนดปริมาณสูงสุดที่สามารถใช้ได้เช่นกัน ซึ่งคณะกรรมการอาหารและยาอนุญาตให้ผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มใส่โซเดียมเบนโซเอตได้ไม่เกิน 1000 ppm ของกรดเบนโซอก

ตารางที่ 2.3 ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ของโซเดียมเบนโซเอตในอาหารแต่ละประเภท หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	ชื่อและกลุ่มหน้าที่ในอาหาร	ชนิดของอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ (มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม) เว้นแต่ได้ระบุปริมาณเฉพาะไว้แล้ว
107. (INS 211)	โซเดียมเบนโซเอต **ชื่ออื่น :** - Sodium benzoate - Sodium salt of benzenecarboxylic acid - Sodium salt of phenylcarboxylic acid **กลุ่มหน้าที่ :** - กันเสีย	ขนมหวานที่ทำจากนม เช่น ไอศกรีม พุดดิ้ง โยเกิร์ตปรุงแต่งหรือผสมผลไม้ เป็นต้น	- 300 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		เนยเทียม	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์อิมัลชั่น ประเภทน้ำในน้ำมันที่มีปริมาณน้ำมันต่ำกว่าร้อยละ 80 เช่น มินารีน	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์อิมัลชั่นอื่น ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์อิมัลชั่นที่ใช้แต่งหน้าขนม เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ขนมหวานที่ทำจากไขมันอื่นที่มิใช่ไขมันนม เช่น ไอศกรีมดัดแปลง เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลไม้ในน้ำส้มสายชู น้ำมัน หรือน้ำเกลือ	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์ป้ายขนมที่ทำจากผลไม้ ยกเว้นแยม เยลลี่ และมาร์มาเลด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลไม้กวน	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์ผลไม้บด ผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่ใช้ราดหน้า และรวมทั้งกะทิ	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ขนมหวานที่ทำจากผลไม้ เช่น ขนมเยลลี่ เป็นต้น และรวมทั้งขนมหวานชนิดน้ำที่มีผลไม้เป็นส่วนประกอบ เช่น ผลไม้ลอยแก้ว เป็นต้น	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลไม้ดอง	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่ใช้ทำไส้ขนม	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลไม้ปรุงสุกหรือผลไม้ทอด	- 1,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก
		ผลิตภัณฑ์ผักหรือสาหร่ายในน้ำส้มสายชู น้ำเกลือ หรือซีอิ๊ว	- 2,000 คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2547)

2.3 การเสื่อมเสียลักษณะที่ดีของมะม่วงแช่อิ่ม

2.3.1 ด้านกายภาพและเคมี

การผลิตมะม่วงแช่อิ่มเป็นการนำมะม่วงแช่ในสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งมีข้อควรระวังมาก เนื่องจากอาจเกิดปัญหาที่ส่งผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางกายภาพและเคมีได้ ยกตัวอย่างกรณีมะม่วงแช่อิ่มมีเนื้อสัมผัสแข็งเกินไป ซึ่งอาจเกิดจากการแช่ผลไม้ในน้ำเชื่อมน้อยเกินไปหรือเติมกรดในน้ำดองหวานน้อยเกินไป ควรใช้เวลาเชื่อมนานขึ้นโดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลให้ช้าลง (ประสิทธิ์ อติวีระกุล, 2527) หรือกรณีผิวของผลไม้เหี่ยวย่นซึ่งมีเหตุจาการต้มหรือลวกมะม่วงนานเกินไป เมื่อนำมาแช่อิ่มผลไม้จึงหดตัวมากจนเกิดการเหี่ยวย่น นอกจากนีสามารถพบได้จากการใช้น้ำเชื่อมเข้มข้นสูงตั้งแต่การแช่อิ่มครั้งแรก ดังนั้นควรใช้น้ำเชื่อมที่ความเข้มข้นไม่เกิน 30 องศาบริกซ์สำหรับครั้งแรกของการแช่อิ่ม (สุวิช ศิริวัฒนโยธิน, 2530 ; ธนวรรณ บุญปั้น, 2537) และกรณีการเกิดสีน้ำตาลของมะม่วงแช่อิ่มซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์และปฏิกิริยาทางเคมี ป้องกันได้โดยการลวกวัตถุดิบเพื่อทำลายเอนไซม์ โดยใช้เวลาและอุณหภูมิให้เพียงพอต่อการทำลายเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) หรือใช้สารประกอบซัลไฟต์ในรูปของสารละลายโซเดียมหรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ เข้มข้นไม่เกิน 2000 ppm ซึ่งสามารถสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการผลิตและเหลือตกค้างในผลิตภัณฑ์เพียง 50-100 ppm ซึ่งหากใช้ในปริมาณที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีสีซีด ทำลายวิตามินบี มีกลิ่นของซัลเฟอร์ และอาจทำผู้บริโภคเกิดอาการแพ้ (ประสาร สวัสดิ์ชีตัง, 2538 ; สุคนธ์ชื่น ศรีงาม, 2539)

2.3.2 ด้านชีวภาพ

พื้นฐานการผลิตมะม่วงแช่อิ่มไม่มีการผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเป็นกรดสูงและความร้อนระดับที่สามารถฆ่าเชื้อได้ทำให้สูญเสียรสสัมผัสของมะม่วงแช่อิ่มย่อมเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายหากกระบวนการผลิตไม่สะอาดเพียงพอ โดยลักษณะเบื้องต้นของมะม่วงแช่อิ่มแม้ไม่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคแม้รับประทานเข้าไปอาจไม่ส่งผลถึงชีวิตแต่อาจทำให้เกิดอาการระคายเคืองหรือรบกวนระบบย่อยอาหารได้ หรืออาจอันตรายต่อผู้ที่มีร่างกายไม่แข็งแรงในบางกรณี แต่จุลินทรีย์ชนิดก่อให้เกิดการเน่าเสียที่ทนต่อสภาวะการหมักยังสามารถเจริญได้ ซึ่งลักษณะเสื่อมเสียที่พบมากในอุตสาหกรรมมะม่วงแช่อิ่มคือ การโป่งพองหรือการเกิดก๊าซในบรรจุภัณฑ์ซึ่งมีสาเหตุจากจุลินทรีย์ผลิตเมทาบอไลท์ขณะย่อยแป้งหรือน้ำตาล หรือเกิดระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาล เป็นต้น ทั่วไปการสร้างก๊าซมักพบร่วมกับสภาพของอาหารที่มีความเป็นกรดมากขึ้นจึงทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว เกิดฟอง หรือเปลี่ยนสี ได้ ทั้งนี้นอกจากส่งผลให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงจนไม่เป็นที่ยอมรับ ในบางกรณียังอาจทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยในการบริโภคได้ (อรพิน ชัยประสพ, 2558 ; Niu et al., 2020) โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของมะม่วงแช่อิ่ม มีดังนี้

2.3.2.1 ยีสต์ และรา

ยีสต์ เป็นเชื้อราเซลล์เดียว (Eukaryotic cell) ส่วนราเป็นสิ่งมีชีวิตในตระกูลฟังไจ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนโดยที่ใช้แป้งและน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร (Science Buddies, 2014) จึงพบได้ตามธรรมชาติจากแหล่งที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมากรวมถึงมะม่วง สามารถประยุกต์ใช้กับอาหาร เช่น การหมักไวน์ (เอทานอล) การขึ้นฟูของโดว์ขนมปัง (คาร์บอนไดออกไซด์) แต่ทั้งนี้การเจริญของยีสต์หรือราอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนที่ไม่พึงประสงค์กลายเป็นสาเหตุของการเน่าเสียหรือสร้างความเสียหายได้ เช่น การหมักน้ำตาลด้วยยีสต์ทำให้เกิดก๊าซซึ่งอาจทำให้บรรจุภัณฑ์โป่งพอง (Wang et al., 2015) เกิดจุดเส้นใยสีต่างๆในอาหาร และอาจเกิดเมือกบนผิวสัมผัส เป็นต้น นอกจากนี้บางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างเมทาบอไลท์ที่ทำลายองค์ประกอบของอาหารอย่างโปรตีนและเซลลูโลสได้อย่าง เอนไซม์ไลติส (Hernandez et al., 2018) และบางชนิดมีกลไกการเจริญที่ผลิตไนไตรต์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ (Ao et al., 2019) ในการศึกษาของ Wang และคณะ (2015) พบว่า ยีสต์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอุตสหกรรมเกี่ยวกับการแปรรูปผลไม้ส่วนใหญ่มาจากแหล่งเก็บเกี่ยววัตถุดิบ อาทิ ดิน และอากาศเป็นต้น ดังนั้นในอุตหกรรมมะม่วงแช่อิ่มที่ไม่ควบคุมและฆ่าเชื้อพื้นที่การผลิตอย่างระมัดระวังอาจทำให้ยีสต์หรือราปนเปื้อนในอาหาร (Science Buddies, 2014) หรือกระทั่งสร้าง mycotoxins ที่มีความเป็นพิษซึ่งมีความเสถียรสูงได้ โดยทั่วไปยีสต์สามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ดี (Majumdar, 2018) จากงานวิจัยของ Tournas และคณะ (2001) กล่าวว่า สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของยีสต์ต้องการ water activity เพียง 0.85 หรืออาจน้อยกว่านั้น รวมถึงมีช่วง pH ที่เอื้อต่อการเจริญที่กว้างทั้งยังสามารถต่อต้านจุลินทรีย์อื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพในวงกว้าง (Lowes et al., 2000) จึงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่น่ากังวลว่าอาจทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์

2.3.2.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กกว่ายีสต์หรือราที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้อย่างรวดเร็ว มักพบในอาหารที่มีความชื้นสูง สำหรับมะม่วงแช่อิ่มนั้น แบคทีเรียที่คาดว่าเป็นต้นเหตุของการสร้างก๊าซซึ่งเป็นหนึ่งในคุณลักษณะที่ทำให้อาหารไม่เป็นที่ยอมรับคือ แบคทีเรียแกรมบวกตระกูลบาซิลลัสและแลคโทบาซิลลัส (Nui et al., 2019) ที่มีกิจกรรมย่อยคาร์โบไฮเดรตทำให้เกิดกรดอินทรีย์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นได้ (Blackburn, 2006) และถึงแม้แลคติกแอซิกแบคทีเรียจะมีประโยชน์ต่อการผลิตอาหารหมักดอง แต่แบคทีเรียเหล่านี้สามารถกลายเป็นเหตุที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้หากอยู่ในสภาวะไร้อากาศหรือมีอากาศน้อยและมีอุณหภูมิไม่สูงนัก (Rawat, 2015) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างสปอร์ในสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเพื่อเติบโตอีกครั้งได้ซึ่งกำจัดได้ยากกว่าแบคทีเรียมาก

2.4 การระบุสาเหตุของปัญหาบรรจุภัณฑ์โป่งพองในมะม่วงแช่อิ่ม

2.4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์

ในการระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ทราบมาก่อน ขั้นตอนสำคัญคือการแยกเชื้อจากแหล่งที่ต้องการออกเป็นโคโลนีเดี่ยวโดยวิธีที่ดีที่สุดคือการเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Ruangpan และ Lila, 2004) ซึ่งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นกับองค์ประกอบพื้นฐานของแหล่งที่ต้องการแยก ชั้นหรือลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะพบ อาทิ การศึกษาของ Nui และคณะ (2018) พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างก๊าซในอาหารประเภทหมักดองได้ คือ Bacillus licheniformis ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใหม่ของ Nui et al.(2019) ที่ชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างก๊าซในอาหารหมักดอง ได้แก่ Bacillus licheniformis, Lactobacillus Alimentarius และ L. acidipiscis โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ RMS, LB และ RCM และเนื่องจากเป็นการแยกเชื้อเพื่อระบุหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ จึงควรทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 2 ประเภททั้งในสภาวะมีอากาศและไร้อากาศแล้วทำการระบุด้วยสัณฐานวิทยาหรือปฏิกิริยาเคมีเฉพาะและวิเคราะห์ข้อมูลทางจุลวิทยาเพื่อระบุสายพันธุ์ที่แน่นอนต่อไป เช่นการใช้เทคนิคด้านการวิเคราะห์สารพันธุกรรม

2.4.2 การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม

วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม (Sequence Analysis) เป็นการวิเคราะห์ลำดับที่ครอบคลุมทั้ง DNA, RNA และ เปปไทด์ในเทคนิคต่างๆ เพื่อศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ โครงสร้างและการทำงานของลำดับชีววิทยานั้นๆ (Prjibelski, 2019) ซึ่งจะเทียบกับระบบฐานข้อมูลที่เป็นที่รวบรวมลำดับทางชีววิทยา มีหลักการการวิเคราะห์พื้นฐานโดยระบบจะค่อยๆไล่ตามลำดับของเบสไปเรื่อยๆจนจบช่วง หรือ sequence alignment แต่มีความซับซ้อนอยู่ที่การแปรรหัสโปรตีนนั้นใช้ลำดับของช่วงเอกซอนเท่านั้นแต่ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ในสายส่วนมากจะประกอบด้วยอินตรอนและยังมี frameshift ที่อาจทำให้การหาลำดับผิดพลาดทว่าในส่วนของเฟรมชิฟท์นั้นปัจจุบันมีหลายอัลกอรึทึมที่สามารถลดข้อผิดพลาดในจุดนี้ได้ นอกจากนี้ยังนิยมใช้เพื่อหาความสัมพันธ์แบบ homology อีกด้วย

2.5 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์นอกเหนือการใช้วัตถุกันเสีย

2.5.1 pH

เป็นตัวชี้ระดับความเข้มข้นของโปรตอน ซึ่งทั่วไปจุลินทรีย์ชนิดต่างๆจะมีสภาวะของ pH ที่เหมาะสมกับการเจริญแตกต่างกัน ระดับของโปรตอนที่ไม่เหมาะสมส่งผลต่อสรีรวิทยาและโครงสร้างของเซลล์ (Jin Qusheng and Kirk F. matthew, 2018) อันดับแรกในสภาวะกรดสูงจะทำลายความสามารถในการควบคุมสารเข้า-ออกของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยในภาวะกรดสูงโครงสร้างตาข่ายเดิมของเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นโครงสร้างตาข่ายหกเหลี่ยมเมื่อความเป็นกรดสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้ความหนาแน่นและระยะห่างระหว่างโมเลกุลเปลี่ยนไป เป็นเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมประสิทธิภาพ (Leung et al., 2013) ดังนั้นจึงไม่สามารถควบคุมปริมาณโปรตอนที่จะเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งโปรตอนที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นอย่างมากเพื่อขับโปรตอนส่วนเกินออกไปเพื่อรักษาสมดุลภายในไซโทพลาสซึม (Lee sun-young, 2004) และกระทบต่อโมเลกุลโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเอนไซม์และสารพันธุกรรมอีกด้วย คุณสมบัติของโปรตีนสามารถตกตะกอนหรือเสียสภาพได้เมื่อถึงจุด Isoelectric point ดังนั้นการปรับค่า pI สามารถคลายโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ได้ (Xu et al., 2020) การใช้กรดอ่อน เช่น กรดอะซิติก เหมาะสมกับเป้าหมายในการต้านจุลินทรีย์มากกว่า เนื่องจาก กรดอ่อนที่แตกตัวไม่หมดในหนึ่งครั้งจะสามารถผ่านเยื้อหุ้มเซลล์และแตกตัวอีกครั้งภายในไซโทพลาสซึม จึงออกฤทธิ์ได้ดีกว่ากรดแก่อย่างน้อย 10 เท่า (Lee sun-young, 2004) และสำหรับกรดอะซิติกการใช้เกลือสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการรบกวนสมดุลของจุลินทรีย์ได้ (Yamamoto et al., 1984a) แต่ทั้งนี้จุลินทรีย์บางชนิดก็อาจสร้างกลไกในการตอบโต้สภาวะเครียดจากสภาวะความเป็นกรดสูงได้

2.5.2 Water activity

เป็นค่าชี้ระดับปริมาณน้ำต่ำที่สุดในอาหารที่จุลินทรีย์จะสามารถนำไปใช้เจริญและทำกิจกรรมต่างๆได้ (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2546) โดยหลักการถนอมอาหารทั่วไปที่อาศัยหลักการลดความชื้นอิสระของอาหารลง อาทิ การอบแห้ง การดองเกลือ หรือการแช่อิ่ม เป็นต้น เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถแลกเปลี่ยนสารจำเป็นต่างๆระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ผ่านรูปสารละลายที่ละลายในน้ำเท่านั้น (FDA, 2014) เป็นเหตุให้เมื่อลดปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ดังกล่าว จึงทำให้กิจกรรมในเซลล์หยุดชะงักและเกิดอันตรายต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงค่า water activity ยังส่งผลต่อแรงดันออสโมติกที่อาจกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกิดสภาวะเครียดขึ้น ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย (Tapia et al., 2007) โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีค่า water activity ที่ต่างกัน จึงสามารถใช้ค่า A_w เป็นพารามิเตอร์หนึ่งเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อที่ต้องการได้

ตารางที่ 2.4 Minimum water activity values of spoilage microorganisms

Microbe group	Minimum a_w	Example	Food source	Reference
Most bacteria	0.91	*Pseudomonas, E. coli, Proteus*	Highly perishable fresh and canned foods	Sperber (1983), Beuchat (1983)
Most yeast	0.88	*Candida, Micrococcus*	Most fruit juice concentrates, flour, rice	Troller (1986), Christian (1963)
Most mold	0.80	*Most halophilic bacteria*	Jam, marmalade, glace fruits	Leistner (2000)
Halophilic group	0.75	*Xerophilic mold*	peanut butter	Abdullah et al. (2000), Gram and Dalaard (2002)
Xerophilic group	0.65	*Aspergillus echinulatas*	Some dried fruits	Gock et al. (2003)
Osmophilic group	0.60	*S. bisporus*	Dried friits containing 15-20% moisture; honey	Jay (2012)

ที่มา: Majumdar (2018)

2.5.3 Salinity

การใช้เกลือเป็นวิธีหนึ่งในการลดค่า water activity โดยในอุตสหกรรมอาหารนิยมใช้เกลือแกง หรือ NaCl ในการเติมลงในผลิตภัณฑ์ เกลือจะแตกตัวอยู่ในรูปของไอออนแล้วสร้างพันธะกับน้ำอิสระ ทำให้น้ำที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ลดน้อยลง ทว่าในความเป็นจริงไม่สามารถที่จะลดค่า A_w ลงได้ต่ำกว่า 0.75 หากใช้เพียงเกลือเนื่องจากความสามารถในการละลายของ NaCl (Lee sun-young, 2004) และสำหรับการผลิตมะม่วงแช่อิ่มที่ต้องการเกลือปริมาณน้อยย่อมไม่อาจใช้เกลือเป็นปัจจัยหลักในการลดค่ากิจกรรมของน้ำ

ตารางที่ 2.5 Water activity (aw) of salt solution

a_w value	Content of solution in g NaCl/100g H_2O
0.995	0.88
0.99	1.75
0.98	3.57
0.96	7.01
0.95	8.82
0.85	23.55
0.80	30.10
0.75	36.06

ที่มา: Lee sun-young (2004)

แต่ทั้งนี้โซเดียมคลอไรด์ยังมีกระบวนการอื่นๆที่ใช้ต้านจุลชีพ อาทิ ในงานวิจัยของ Burlot และคณะ (1994) ชี้ให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของเกลือสูงจะยืดช่วงระยะ lag phase ของจุลินทรีย์และวิธีปรับความเข้มข้นเกลือนี้จะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับวิธีต้านจุลินทรีย์อื่นๆ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Jenkins และคณะ (2000) ที่ศึกษาการจำลองเพื่อทำนายระยะเวลาและปัจจัยในการเจริญเติบโตของ *Zygosaccharomyces bailii* ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดสูงใน 29 วัน พบว่า ขอบเขตที่สามารถชะลอการเจริญของเชื้อที่ศึกษาได้มากกว่า 120 วัน คือกรดอะซิติกความเข้มข้นมากกว่า 2.6% v/v, pH ต่ำกว่า 3.55, NaCl ความเข้มข้นมากกว่า 2.05% v/v และความเข้มข้นของน้ำตาลฟรักโตสมากกว่า 3.50% v/v โดยเมื่อปรับค่าใดค่าหนึ่งจะส่งผลต่อการปรับ ระดับค่าอื่นด้วย

2.5.4 Sugar content

การเพิ่มระดับปริมาณน้ำตาลในอาหารเป็นวิธีในการต้านจุลินทรีย์จากหลักการเกี่ยวกับการออสโมซิส ซึ่งเกี่ยวข้องกับ water activity การดึงน้ำออกจากโมเลกุลอาหารทำให้จุลินทรีย์ไม่อาจใช้น้ำนั้นเพื่อทำกิจกรรมได้ นอกจากนี้ยังมีกลไกทางอ้อมอื่นๆ ที่ช่วยในกระบวนการยับยั้งจุลชีพ ในการศึกษาของ Scientific American (2020) ชี้ให้เห็นว่าน้ำตาลสามารถรบกวนการทำงานของเอนไซม์และทำให้โครงสร้างสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์นั้นลดความเสถียรลง และสามารถเร่งการสะสมของสารต้านจุลชีพอื่นๆได้ เช่น เอทานอล เป็นต้น ทั้งนี้ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างเซคันดารีเมทตาบอไลท์อย่างแอลกอฮอล์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เช่นกัน โดยหน่วยการวัดนิยมใช้ °Brix โดยในความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆหรือมีค่าบริกซ์สูงนั้น (ตั้งแต่ 55 ขึ้นไป) ไม่จำเป็นต้องใช้สารต้านจุลินทรีย์อื่นๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Meimer et al., 1992) ที่ค่อนข้างทนต่อสภาวะเครียดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์เฉพาะ (Majumdar,

2018) แต่หากระดับความเข้มข้นของน้ำตาลน้อยอาจไม่ส่งผลต่อการควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ pH และสารกันเสียอื่นๆ (Battey et al., 2002)

2.5.5 อื่นๆ

นอกจากปัจจัยที่ได้กล่าวถึงก่อนหน้ายังมีปัจจัยอื่นที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ได้แก่ อุณหภูมิ จากการวิจัยของ Mullam and Michael (2000) พบว่าสามารถลดการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การใช้แบคเทอริโอซินอย่างไนซินยังมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มักเป็นสาเหตุของจุลินทรีย์สร้างก๊าซ ซึ่งให้ผลดีกว่าวัตถุกันเสียทั่วไปอาทิ โพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมเบนโซเอตมากเนื่องจากสามารถขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ส่วน peptidoglycan ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จัดเป็น bactericidal ชนิดหนึ่ง แต่มีข้อจำกัดด้านต้นทุนเนื่องจากไนซินผลิตจากแบคทีเรียจึงมีขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์มากส่งผลให้ราคาสูงตามไปด้วย

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

3.1.1 วัสดุ

- มะม่วงแช่อิ่มที่บรรจุภัณฑ์โป่งพองและบรรจุภัณฑ์ปกติจากการผลิต 4 รุ่น ช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2563 - พฤศจิกายน พ.ศ. 2563 (วรพร, ไทย)
- ซูโครส (ลิน, ไทย)
- ฟรุกโตสเข้มข้น 55% (ใบไม้สีเขียว, ไทย)
- ซอร์บิทอล 70% (TTT, ไทย)
- เกลือแกง (ปรุงทิพย์, ไทย)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่ง (SHIMADZU, ญี่ปุ่น)
- จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri plate) (Hycon, ไทย)
- หลอดดักก๊าซ (Durham tube)
- หลอดทดลองแก้ว
- ไมโครปิเปต
- ตู้ปลอดเชื้อ (BSC class II)
- โถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- เครื่องเขย่าสาร (Shaker)
- เครื่องวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Refractometer) (Hunna, สหรัฐอเมริกา)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Tomy, ญี่ปุ่น)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Toledo, ไทย)
- หลอดไมโครทิวบ์ (Eppendorf tube) (Axygen, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Manual colony counter) (Digitech, จีน)
- จานเพาะเชื้อ 96 หลุม
- กระบอกฉีดยา
- ไซริงค์กรองสารขนาดรูพรุน 45 ไมโครเมตร (Syringe filter)

· ชุดสกัดสารพันธุกรรมแบคทีเรีย (Bacterial DNA extraction kit) (Vivantis, รัสเซีย)

· Spectrophotometry

· เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)

· Electrophoresis system

· เครื่องตรวจเอกลักษณ์สารพันธุกรรม (Gel documentation and analysis software)

3.1.3 สารเคมี

· น้ำกลั่น (Distilled water)

· TAE buffer

· อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง MRS agar, YM agar, RCM agar, LB agar และ PDA (Himedia,อินเดีย)

· อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth, YM broth, RCM broth, LB broth และ NB (Himedia, อินเดีย)

· ชุดสารเคมีสำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม

· สีย้อมสารพันธุกรรม

· แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

· เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

· อะกาโรส (Agarose)

· โพแทสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate)

· โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate)

· กรดซิตริก (Citric acid)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

<u>ตอนที่ 1</u> การคัดแยกและศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียแบบสร้างก๊าซในมะม่วงแช่อิ่ม

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์

เตรียมตัวอย่างน้ำคั้นมะม่วงดองจากผลิตภัณฑ์ที่มีการสร้างก๊าซโดยการบีบชิ้นมะม่วง ขีดน้ำคั้นบนอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar), Yeast Malt agar (YM agar), Luria-Bertani agar (LB agar), Reinforced clostridial agar (RCM agar) และ Potato dextrose agar (PDA) จำนวน 6 ชุด บ่มในสภาวะ anaerobic และ aerobic ที่อุณหภูมิห้อง, 30 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซเบื้องต้นโดยใส่ตัวอย่างน้ำคั้นมะม่วงดองจากผลิตภัณฑ์ที่มีการสร้างก๊าซปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงอาหารเพาะเชื้อชนิดเหลว 5 ชนิด ได้แก่ De Man, Rogosa and Sharpe

medium (MRS broth), Yeast Malt medium (YM broth), Luria-Bertani medium (LB broth), Reinforced clostridial medium (RCM broth) และ Nutrition broth (NB) ที่ภายในมีหลอกดักก๊าซ (durhame tube) จำนวน 6 ชุด ดำเนินการบ่มเช่นเดียวกับอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็ง (ดัดแปลงจาก Niu et al., 2020)

ทดสอบคุณสมบัติการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานเพาะเชื้อโดยเลือกจานเพาะเชื้อจากสภาวะ (ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระบบอากาศ) ที่พบปริมาณก๊าซในหลอดดักก๊าซมากจากการบ่มด้วยอาหารเหลวมาตราฐานตามขั้นตอนข้างต้น ใช้วิธีสุ่มตัวแทนแบบ Harrison's disc method (Harrigan and McCance, 1976) เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลวมาตรฐานที่มีหลอดดักก๊าซ จากนั้นบ่มตามสภาวะต้นเชื้อ เป็นระยะเวลา 5-12 วัน (ดัดแปลงจาก Niu et al., 2019) เก็บรักษาตัวแทนจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสร้างก๊าซสูง (high-performance positive test) ในสารละลายกลีเซอรอล (glycerol stock) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและเขี่ยเชื้อเก็บบนอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การตรวจสอบสมบัติในการสร้างก๊าซและการระบุสายพันธุ์

ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (resteak) โดยขีดเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวจากจานเพาะเชื้อเดิม ยืนยันความสามารถในการสร้างก๊าซของ isolate ซ้ำด้วยเทคนิค durham tube test ในอาหารเพาะเชื้อเหลวเป็นเวลา 6-12 วัน (ดัดแปลงจาก Niu et al., 2020) ศึกษาลักษณะตัวแทนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อแข็งที่ทำการต่อเชื้อใหม่ บันทึกลักษณะโคโลนี ชนิดอาหารเพาะเชื้อแข็ง ย้อมแกรม และ wet mount เพื่อแยกกลุ่มเบื้องต้น

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป รุ่น GF-1 สำหรับแบคทีเรียเตรียม Master mix ปริมาตร 45 µL ต่อ 1 ปฏิกิริยาโดยผสม Vi buffer 5 µL, $MgCl_2$ 1.5 µL, dNTPs mix 0.5 µL, primer (forward) ชนิด 357F 0.5 µL, primer (reverse) ชนิด 518R 0.5 µL, Tag DNA 0.4 µL และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปราศจากสารพันธุกรรม 36.6 µL กับสารพันธุกรรมตัวอย่างที่สกัดได้ (template) 5 µL และสำหรับยีสต์ราใช้ primer ITS1 (forward) และ ITS4 (reverse) แทน การทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction, PCR) ด้วยเครื่อง Thermal cycler เริ่มดำเนินปฏิกิริยาด้วย 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าวัฏจักรอุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ทั้งหมด 30 รอบ คงระดับอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอส่งวิเคราะห์เป็นลำดับต่อไป (Zhou et al., 2017;Muyzer et al., 1993 ; Prakitchaiwattana et al., 2010)

ตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยการแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) เตรียมอะกาโรส (agarose) ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ใช้แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 1kb เป็นเครื่องบ่งชี้ขนาดสารพันธุกรรม (marker) และเตรียมตัวอย่างโดยผสม template ปริมาตร 10 µL กับสีย้อม (dye 6X) ปริมาตร 2 µL ดำเนินการด้วยเครื่องแยกวิเคราะห์สารพันธุกรรม (electrophoresis system) ตั้งค่ากระแสไฟฟ้าชนิดตรง (DC) ที่ 100V เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสแช่ใน

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างน้ำกลั่นปราศจากสารพันธุกรรมเป็นเวลา 10 นาที ติดตามผลโดยโปรแกรม Gene snap ด้วยเครื่องตรวจเอกลักษณ์สารพันธุกรรม (gel documentation and analsysissoftware) รุ่น InGeniusl เพื่อส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (DNA sequencing) โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท แปซิฟิก ไซเอ็นซ์ จำกัด วิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมด้วย program Blast เทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (เข้าถึงเมื่อ 05/05/2021)

3.2.3 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของไอโซเลทสร้างก๊าซ

3.2.3.1 การยับยั้งการเจริญ ด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบชนิดเดี่ยว (single effect)

ใช้วัตถุเจือปนอาหาร 4 ชนิดแปรระดับความเข้มข้นเพื่อหาค่า MICs ของจุลินทรีย์ตัวแทนแต่ละชนิด เตรียมสารละลายเข้มข้นที่มีความเข้มข้นดังนี้ เกลือแกง 20% (W/V), ซูโครส 20% (w/v), โพแทสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) 12% (w/v) และ โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate) 20% (W/V) โดยสารละลายเกลือแกงเข้มข้นและซูโครสเข้มข้นเจือจางด้วยอาหารเพาะเชื้อเหลวให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 0.7, 1, 2 และ 3 %(w/v) และ 6, 8, 10 และ 12 %(w/v) ตามลำดับ ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที Potassium sorbate และ Sodium benzoate ฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองขนาดรู 45 ไมโครเมตรที่ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยา (Syringe) ก่อนใช้งาน เจือจางด้วยอาหารเพาะเชื้อเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุทธิ 0.11, 0.09, 0.07 และ 0.05 %(w/v) และ 0.1, 0.09, 0.07 และ 0.06 %(w/v) ตามลำดับ

ถ่ายเชื้อปริมาณ 10^4 cfu/ml ซึ่งเตรียมจากการเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลวมาตรฐาน เขย่าที่ 150 เป็นเวลา 1 คืนแล้วเจือจาง 10 เท่าปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแก้วที่เตรียมข้างต้นซึ่งมีปริมาตรสุทธิ 9 มิลลิลิตร เก็บผลด้วยจานเพาะเชื้อ 96 หลุม (microplate 96 well) ที่เวลา 0, 5, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อวัดค่าด้วยเครื่องวัดค่าแสงส่องผ่าน (Spectrophotometry) ที่ OD_{600} โดยโปรแกรม Digiread จากนั้นสร้าง Growth curve และ spread plate ตัวแปรควบคุมเพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อและค่า OD_{600}

3.2.3.2 การยับยั้งการเจริญด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบผลเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

พิจารณาผลจากข้อ 3.2.3.1 เพื่อเลือกคู่ตัวแปร (วัตถุเจือปนอาหาร) ที่จะทำการทดสอบด้วย synergistic effect จำนวน 2 คู่ ดำเนินการทดลองใน microplate 96 well ปริมาตรสุทธิในแต่ละช่องเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตร แปรความเข้ม 6 ระดับ ได้แก่ 0, 1/8MIC, 1/4MIC, 1/2MIC, 2/3MIC และ MIC ของตัวแทนจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง ติดตามผลด้วยปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นและการวัดค่า OD_{600}

3.2.3.3 การยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1%

เนื่องจากในอุตสาหกรรมการผลิตมะม่วงแช่อิ่มไม่นิยมให้เกลือมีความเข้มข้นสูงนัก จึงต้องอาศัยปัจจัยอื่นเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ ดังนั้นการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์นอกเหนือการใช้วัตถุกันเสียทำได้ด้วยการปรับ pH และเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเพื่อทำให้สภาพแวดล้อมเป็นอุปสรรคในการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้ High fructose syrup เป็นสารให้ความหวาน แต่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากไม่สามารถนำน้ำตาลบางชนิดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อคำนึงปัจจัยอื่นเพิ่มเติมจึงมีการเพิ่ม sorbitol ในการทดลองเพื่อเป็นแนวทางตัดสินใจ

ถ่ายเชื้อปริมาณ 10^4 cfu/ml ตามวิธีในข้อ 3.2.3.1 ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดที่มีการปรับสภาวะไว้ดังตารางที่ 7 โดยอาหารเพาะเชื้อเหลวปรับความเข้มข้นเกลือและน้ำตาลก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ และใส่กรดภายหลังเพื่อปรับ pH สารละลายกรดที่ใช้เตรียมจากสารละลายกรดซิตริกเข้มข้ม 7%(W/V) เก็บผลด้วย microplate 96 well ที่เวลา 0, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง วัดค่าด้วยเครื่อง Spectrophotometry ที่ OD_{600} โดยโปรแกรม Digiread สร้าง Growth curve และวิเคราะห์ข้อมูลผ่าน one-way analysis of variance (ANOVA) โดยโปรแกรม SPSS ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.1$ ใช้ข้อมูลทั้งสองพิจารณาร่วมเพื่อเลือกสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับแปรระดับความเข้มข้นของสารกันเสีย

ตารางที่ 3.1 การแปรค่าระหว่าง pH และ °Brix ในอาหารเพาะเชื้อเหลว 8 สูตร

ลำดับ	°Brix		pH
	55% High fructose syrup	70% Sorbitol	
สูตรที่ 1	25	-	3.5
สูตรที่ 2	25	-	3
สูตรที่ 3	22	-	3.5
สูตรที่ 4	22	-	3
สูตรที่ 5	-	25	3.5
สูตรที่ 6	-	25	3
สูตรที่ 7	-	22	3.5
สูตรที่ 8	-	22	3

จากการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติเลือกสูตรอาหารในตารางที่ 7 ที่สามารถขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดเป็น base medium สำหรับสูตรอาหารเหลวในตารางที่ 8 ซึ่งมีจุดประสงค์แปรระดับความเข้มข้นระหว่างสารกันเสีย 2 ชนิดได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมเบนโซเอต เพื่อหาสัดส่วนการใช้สารกันเสียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สร้างก๊าซ โดยคำนวณความเข้มข้นของสารกันเสียสุทธิไม่เกินปริมาณที่กฎหมายกำหนด

ตารางที่ 3.2 สัดส่วนของ potassium sorbate และ sodium benzoate ในอาหารเพาะเชื้อเหลวสูตร A-K

ลำดับ	วัตถุกันเสีย %(w/v)	
	Sodium Benzoate	Potassium Sorbate
A	0.03	0
B	0.06	0
C	0.088	0
D	0	0.018
E	0	0.034
F	0	0.05
G	0.11	0
H	0.088	0.018
I	0.06	0.034
J	0.03	0.05
K	0	0.067
Control	0	0

บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์สร้าง และการระบุสายพันธุ์

เมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำคั้นมะม่วงดองจากผลิตภัณฑ์ที่มีการโป่งพอง พบเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด RCM, LB, PDA, YM และ MRS ระบบมีอากาศ ที่อุณหภูมิห้องและ 30 องศาเซลเซียส และสามารถแยกเชื้อได้จากระบบไม่มีอากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้จากอาหาร LB agar เพียงอย่างเดียวดังตารางที่ 4.1 เนื่องจาก LB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective media) ที่เอื้อต่อการเจริญของ *Escherichia coli* และสายพันธุ์อื่นที่มีความใกล้เคียงหรือจุลินทรีย์ที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากกรดอะมิโนแทนน้ำตาล (Sezonov et al., 2007 ; Liao and MacEWilliams, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพราะ *E. coli* สามารถเจริญในอุณหูมิสูงสุดถึง 49 องศาเซลเซียสทั้งระบบมีอากาศและไม่มีอากาศ (Fotadar et al., 2005 ; Colville et al., 2013) เมื่อทดสอบสมบัติการสร้างก๊าซของจุลินทรีย์ด้วยตัวอย่างเดียวกันพบการสร้างก๊าซปริมาณน้อยจากจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลว RCM ที่อุณหภูมิห้องและ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในระบบมีอากาศและไม่มีอากาศ พบการสร้างก๊าซปริมาณมากจากจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิห้องและ MRS ที่อุณหภูมิห้องและ 30 องศาเซลเซียส ในระบบมีอากาศดังตาราง 4.2 จากการสังเกตุลักษณะโคโลนีที่พบมากในอาหารประเภท RCM และ MRS ที่พบการสร้างก๊าซปริมาณสูง คือ กลมมน ขอบเรียบ ขนาดเล็ก และมีสีขาวอมเหลือง ส่วน YM มีลักษณะกลมเล็กคล้ายจุดสีขาว ทั้งนี้บริษัทผู้ผลิตมะม่วงแช่อิ่มไม่ได้บรรจุผลิตภัณฑ์แบบสุญญากาศหรือมีการปรับอัตราส่วนอากาศในบรรจุภัณฑ์ รวมถึงจัดเก็บและขนส่งผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง จึงเลือกจุลินทรีย์สร้างก๊าซจากอาหารชนิด YM และ MRS ในระบบมีอากาศที่อุณหภูมิห้องสำหรับการสุ่มเลือกโคโลนีด้วยวิธี Harrison's disc method และเมื่อทดสอบคุณสมบัติ gas-forming spoilage ซ้ำพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกมีคุณสมบัติในการสร้างก๊าซจริง

ตารางที่ 4.1 การเจริญของจุลินทรีย์ ที่สภาวะต่างๆ บนอาหารเพาะเชื้อแข็งชนิดต่างๆหลังการบ่ม 5 วัน

ชนิดอาหาร	Aerobe			Anaerobe		
Agar	Room temp	30°C	37°C	Room temp	30°C	37°C
RCM	+	+	-	+	+	-
LB	+	+	+	+	+	+
PDA	+	+	+	+	-	-
YM	+	+	+	-	-	-
MRS	+	+	-	+	+	-

หมายเหตุ : + คือ มีโคโลนีเกิดขึ้น

- คือ ไม่มีโคโลนีเกิดขึ้น

ตารางที่ 4.2 การสร้างก๊าซของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเชื้อเหลวชนิดต่างๆหลังการบ่ม 5 วัน

ชนิดอาหาร	Aerobe			Anaerobe		
Broth	Room temp	30°C	37°C	Room temp	30°C	37°C
RCM	+	+	-	+	+	-
LB	-	-	-	-	-	-
NB	-	-	-	-	-	-
YM	++	-	-	-	-	-
MRS	+++	++++	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ พบก๊าซใน durham tube ปริมาณน้อย

++++ คือ พบก๊าซใน durham tube ปริมาณมาก

- คือ ไม่พบก๊าซในการทดสอบด้วย durham tube

ภาพแสดงการสร้างก๊าซ แสดงในภาคผนวก ก

สุ่มเลือกโคโลนีจาก Harrison's disc method จำนวน 14 ไอโซเลท ยืนยันความสามารถในการสร้างก๊าซพบว่า ไอโซเลทที่สามารถสร้างก๊าซมากได้แก่ลำดับที่ 1 กับ 5 สร้างก๊าซปานกลางได้แก่ ลำดับที่ 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลทตัวแทนได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท 1, 5, 6, 8, 9, 10 และ 11 จากการพิจารณาความสามารถในการสร้างก๊าซ ปริมาณที่พบ และสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ระบุสายพันธุ์ตัวแทนไอโซเลทด้วย PCR product พบว่าไอโซเลท 1 ตรงกับลักษณะดีเอนเอของ *Lactobacillus plantarum* ที่ 100% similarity ไอโซเลท 5 ตรงกับลักษณะดีเอนเอของ *Zygosaccharomyces parabailii* ที่ 98% similarity, ไอโซเลท 6, 8 และ 10 ตรงกับลักษณะดีเอนเอของ *Zygosaccharomyces rouxii* ที่ 97, 95 และ 97% similarity ตามลำดับ โดยเลือกไอโซเลท 10 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์นี้ และไอโซเลท 9 ตรงกับลักษณะดีเอนเอของ *Zygosaccharomyces bailii* ที่ 96% similarity

จากงานวิจัยของ Grimbaum et al. (1994) กล่าวว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Zygosaccharomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเหตุการณ์บรรจุภัณฑ์โป่งพองในผลิตภัณฑ์อาหารได้ผ่านกระบวนการหมักน้ำตาลซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตพลอยได้ จึงพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้มากในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลสูง (Martorell et al., 2007) อย่างมะม่วงแช่อิ่มเป็นต้น และยังยากต่อการกำจัดเนื่องจากความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทั้งอุณหภูมิ ความดันและสารกันเสียชนิดกรดอินทรีย์ (Rodrigues et al, 2001) แม้

Zygosaccharomyces จะเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างกลิ่นเฉพาะตัวได้แต่หากมีจำนวนเกินกว่า 10^6-10^7 cfu/g มักพบว่าเป็นเหตุให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ (Combina et al., 2008)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างก๊าซที่แยกได้จากวิธี Harrison's disc method

อาหาร	จำนวน	ลำดับ	ลักษณะ colony	สัณฐานวิทยาของเซลล์	คุณสมบัติในการสร้างก๊าซ
YM	3	1	กลมเล็กคล้ายจุด สีขาวอมเหลืองอ่อน	round-pair	+++
		2	กลมแบนผิวหน้าเป็นคลื่น สีขาว	rod	-
		3	กลมนูนขนาดกลาง สีขาว	budding yeast	+
MRS	11	4	กลมนูนขนาดกลาง มีสีขาว	rod	-
		5	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาว	rod	+++
		6	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาวอมเหลืองอ่อน	rod	++
		7	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาว	rod	++
		8	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาวอมเหลืองอ่อน	rod	++
		9	กลมนูนขนาดเล็ก สีสีส้มอ่อน	rod	++
		10	กลมนูนขนาดกลาง สีขาวอมเหลืองอ่อน	rod	++
		11	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาวอมเหลืองอ่อน	rod	++
		12	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาว	rod	-
		13	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาว	rod	+
		14	กลมนูนขนาดเล็ก สีขาว	rod	-

หมายเหตุ: + คือ พบก๊าซใน durham tube ปริมาณน้อย

+++ คือ พบก๊าซใน durham tube ปริมาณมาก

- คือ ไม่พบก๊าซในการทดสอบด้วย durham tube

ภาพ cell morphology แสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

Isolate	Identity	% Similarity	Properties
1	Lactobacillus plantarum	100	Lactic acid bacteria associated with plant
5	Zygosaccharomyces parabailii	98	Osmophilic yeast
6	Zygosaccharomyces rouxii	97	Osmophilic yeast
8	Zygosaccharomyces rouxii	95	Osmophilic yeast
9	Zygosaccharomyces bailii	96	Osmophilic yeast
10	Zygosaccharomyces rouxii	97	Osmophilic yeast

ตาราง DNA sequence แสดงในภาคผนวก ข

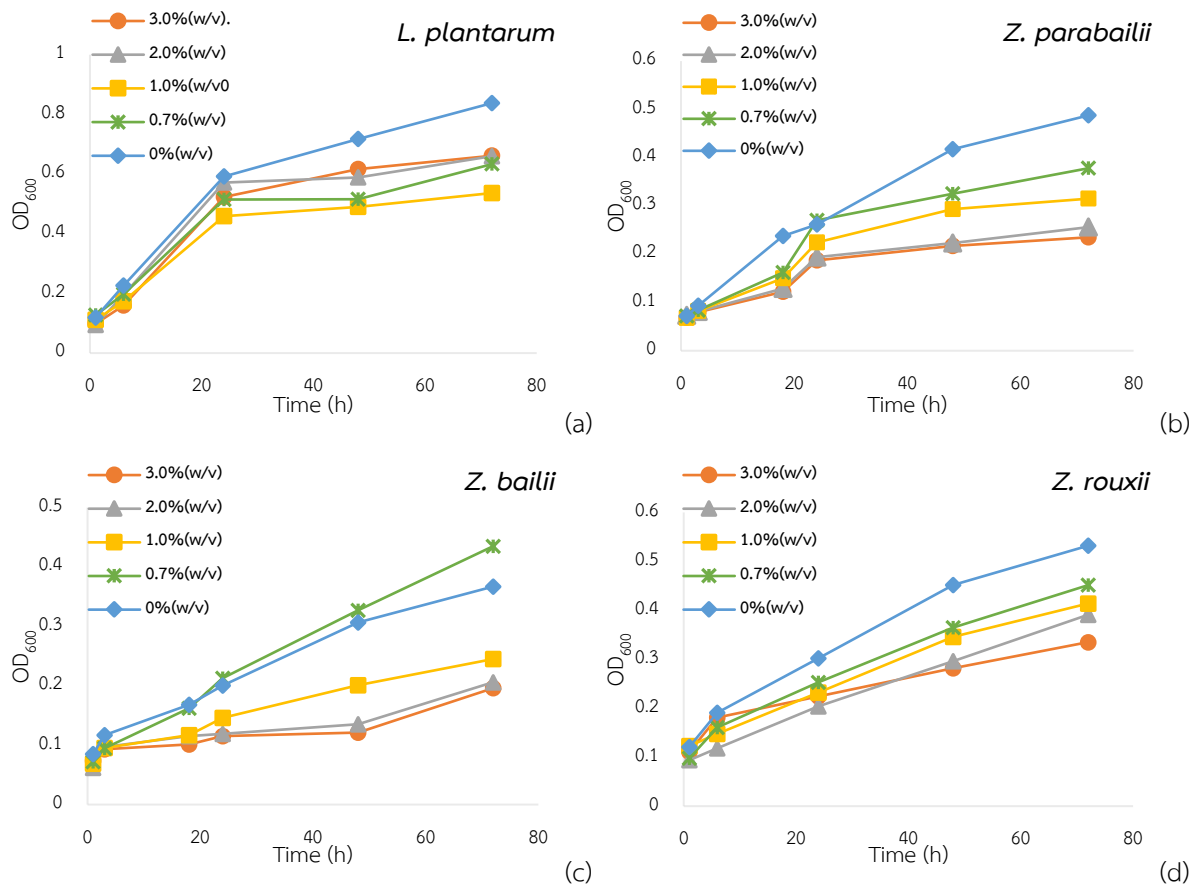
4.2 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของไอโซเลทสร้างก๊าซ

4.2.1 การยับยั้งการเจริญ ด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบชนิดเดี่ยว (single effect)

1. เกลือ

ปรับเกลือความเข้มข้น 0-3 %(w/v) ลงในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 10^4 cfu/ml พบว่าเกลือทุกระดับไม่สามารถยืดระยะ lag phase ของ *Lactobacillus. plantarum* ได้แต่สามารถลดการเพิ่มของจุลินทรีย์ได้หลังผ่านไป 24 ชั่วโมงและคงปริมาณเชื้อไม่เกิน 10^8 cfu/ml ทุกระดับความเข้มข้นเกลือซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุม ดังรูปที่ 4.1(a) ขณะที่ *Zygosaccharomyces parabailii* เกลือทุกระดับสามารถยืดระยะ lag phase ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสามารถยืดระยะ lag phase ของยีสต์ได้ (Burlot et al., 1994 ; Logothetis, Walker and Nerantzis, 2007) และที่เกลือความเข้มข้นตั้งแต่ 2%(w/v) ขึ้นไปเชื้อไม่เพิ่มจำนวนหลังชั่วโมงที่ 24 ซึ่งหมายความว่าเกลือความเข้มข้น 2 %(w/v) สามารถชะลอการเจริญได้ ในทำนองเดียวกับ *Zygosaccharomyces bailii* แม้มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้นอีกหลังชั่วโมงที่ 48 แต่ *Zygosaccharomyces rouxii* ที่เกลือเข้มข้น 3% (w/v) ยังพบการเจริญของจุลินทรีย์ในปริมาณ 10^8 cfu/ml ซึ่งหมายความว่า *L. plantarum* และ *Z. rouxii* เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือได้ดีซึ่งเชื้อทั้งสองสามารถพบในอาหารชนิดที่มีปริมาณเกลือสูงอย่างกิมจิ (Lorenzo et al., 2018) และซีอิ๊ว (Tilbury, 1980) ตามลำดับเป็นต้น

ภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์และค่า OD_{600} แสดงในภาคผนวก ค

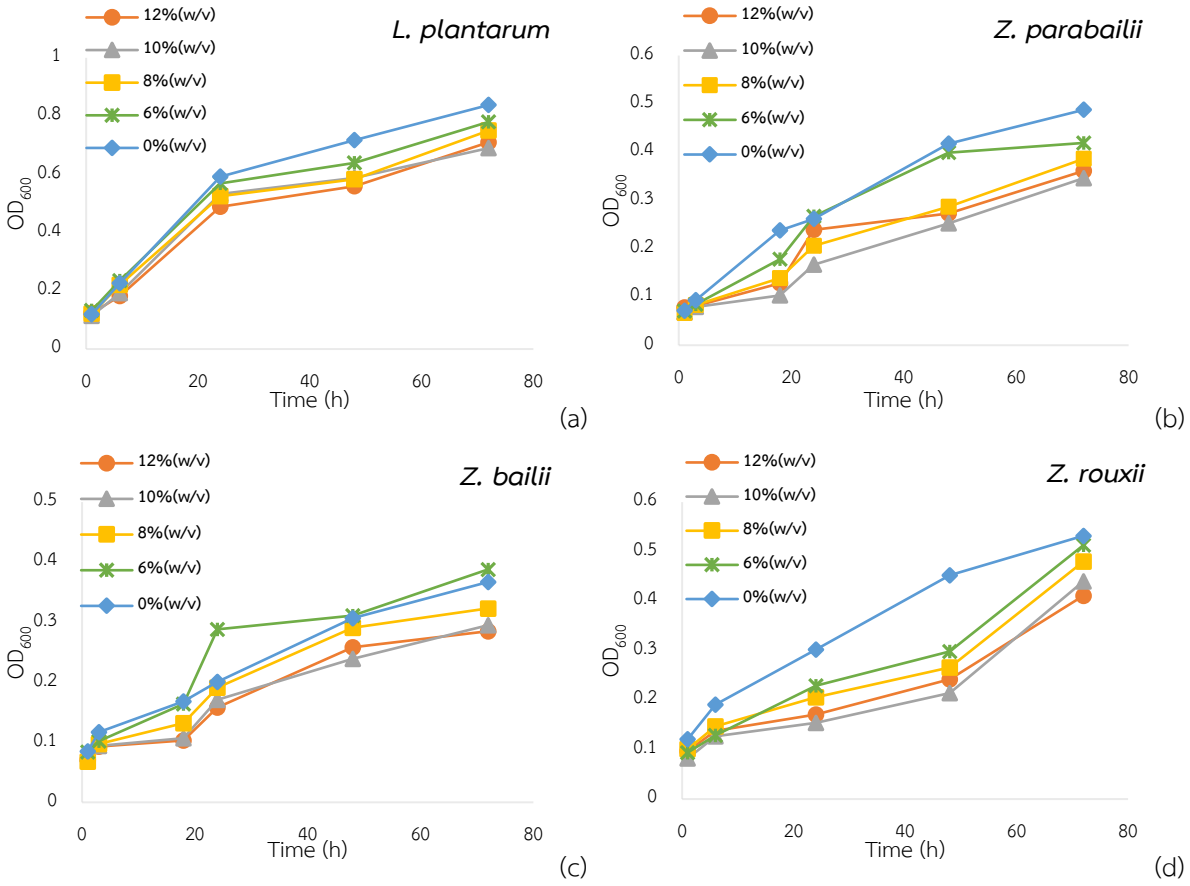


รูปที่ 4.1 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับเกลือเข้มข้นสุทธิ 0, 0.7, 1, 2 และ 3 % (w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. ซูโครส

การแปรระดับซูโครสของ *L. plantarum* พบว่าซูโครสความเข้มข้น 0-12% (w/v) ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ตรงกับงานวิจัยของ Battery et al. (2002) ที่พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ต่ำไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่ง *Z. parabailii*, *Z. rouxii* และ *Z. bailii* เป็นไปในทำนองเดียวกัน จากการศึกษาจุลินทรีย์เหล่านี้มีความทนต่อน้ำตาล เนื่องจากยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็น osmophilic yeast สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำตาลสูง (Richter, 1912) ที่ทำให้มีแรงดันออสโมซิสสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Erich Maimer และ Martin Busse (1992) พบว่าที่ pH 5.5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม *Zygosaccharomyces* ต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 55 °Brix ขึ้นไป และเมื่อพิจารณา *Z. rouxii* หลังการบ่ม 72 ชั่วโมงมีปริมาณเชื้อมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นอยู่ 1-2 log จึงคาดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกดังกล่าวได้มากที่สุด ซึ่งเป็นไปตามงานวิจัยของ Gardon et al. (2008) และ Martorell et al. (2007) ที่ศึกษาถึงความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดของจุลินทรีย์กลุ่ม *Zygosaccharomyces* พบว่า *Z. rouxii* มีความสามารถในการเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ตามสภาพแวดล้อมจึงมีคุณสมบัติทั้ง

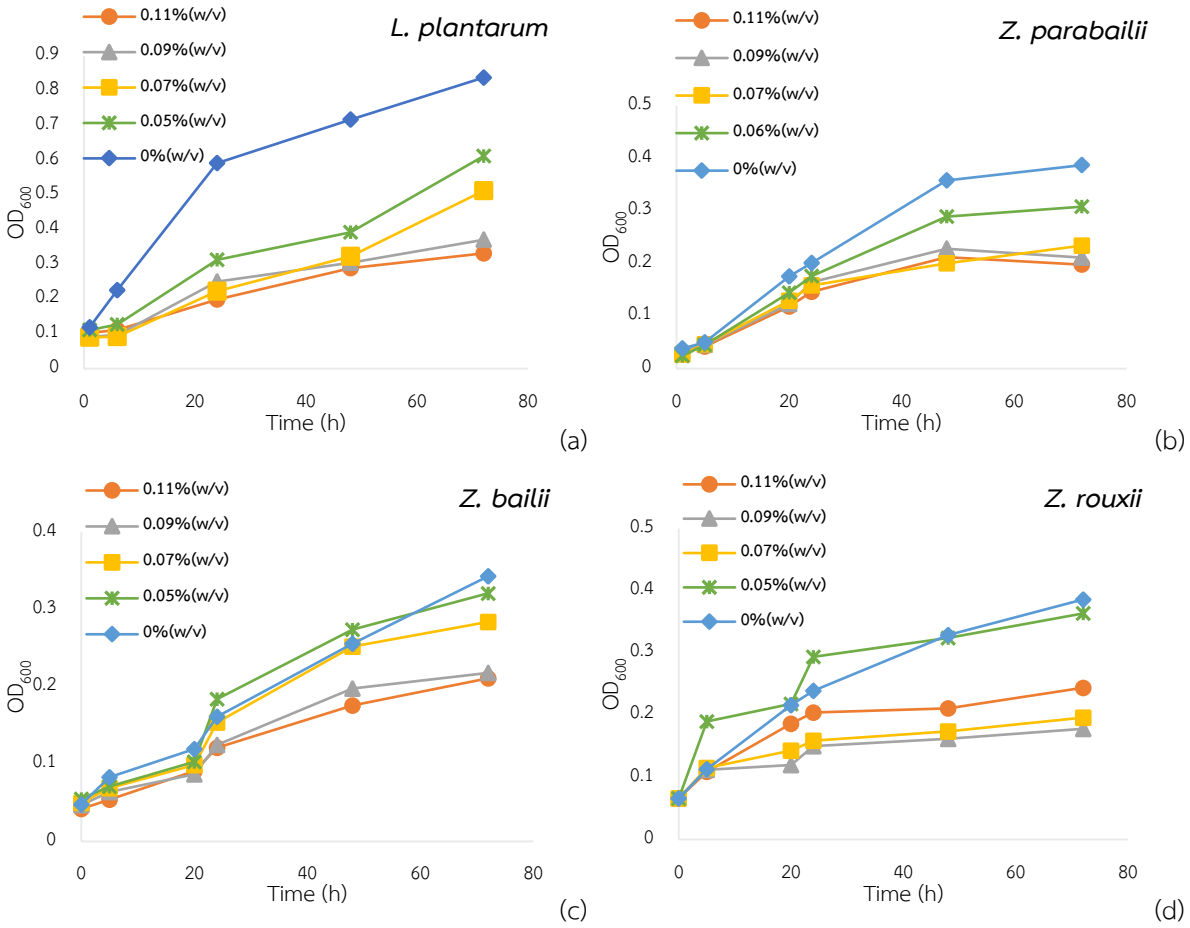
osmophilic, xerophilic และ acid-tolerant แต่ *Z. parabailii* และ *Z. bailii* ไม่มีคุณสมบัติ xerophilic (Gardon et al., 2008)



รูปที่ 4.2 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับซูโครสเข้มข้นสุทธิ 0, 6, 8, 10 และ 12 % (w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. โพแทสเซียมซอร์เบต

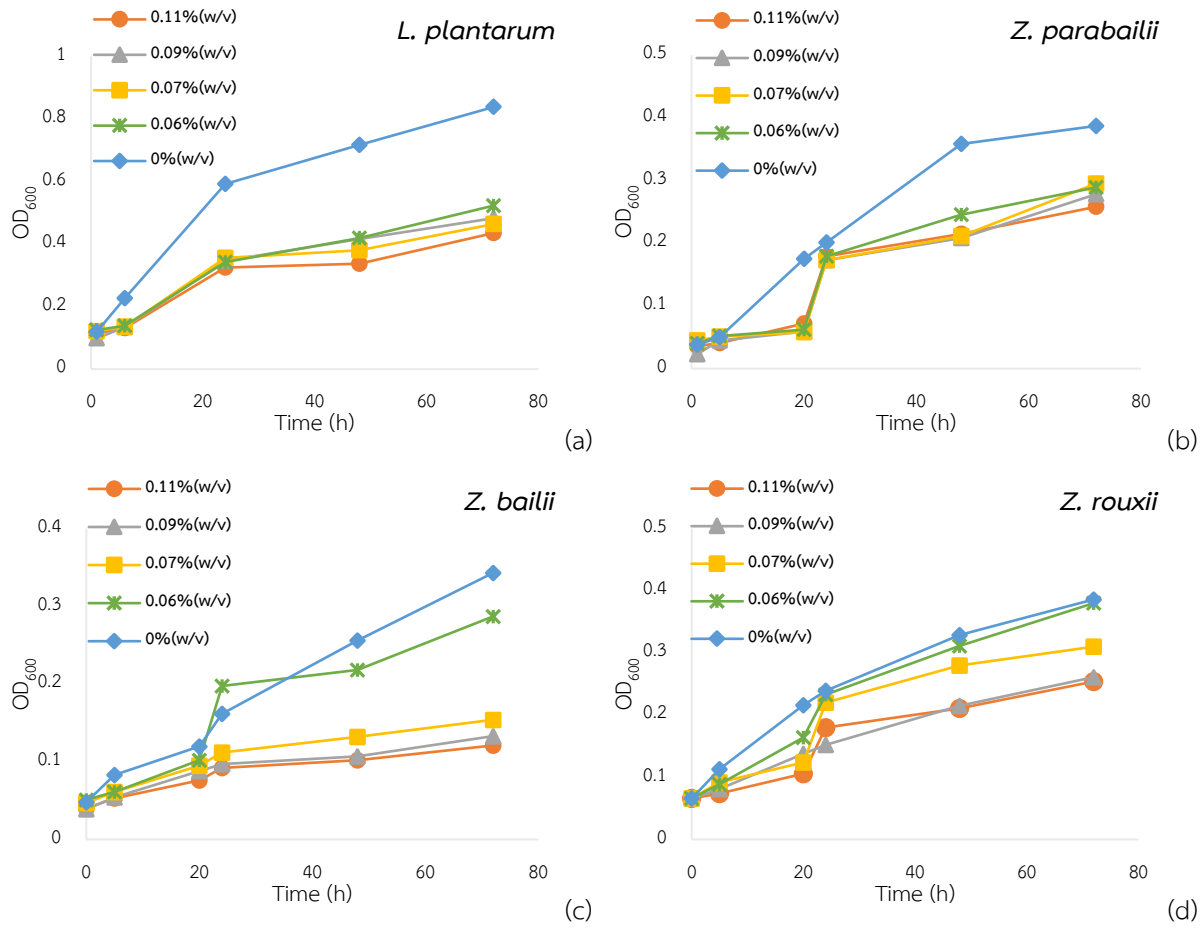
การแปรระดับโพแทสเซียมซอร์เบตของ *L. plantarum* พบว่า โพแทสเซียมซอร์เบตทุกระดับสามารถเพิ่มระยะ lag phase ได้และตั้งแต่ความเข้มข้น 0.09% (w/v) ไม่พบการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์อีกหลังผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่วน *Z. parabailii* คล้ายกับ *Z. rouxii* คือ โพแทสเซียมซอร์เบตตั้งแต่ 0.07%(w/v) ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ขณะที่ *Z. bailiii* ยังพบการเจริญของจุลินทรีย์แม้โพแทสเซียมซอร์เบตเข้มข้นถึง 0.11% (w/v) ซึ่งสำหรับโพแทสเซียมซอร์เบตว่าด้วยประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 389 พุทธศักราช 2561 เรื่องวัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 5) ห้ามไม่ให้ใส่โพแทสเซียมซอร์เบตเกิน 500 ppm ของกรดซอร์บิกหรือเท่ากับ 0.07%(w/v) ของโพแทสเซียมซอร์เบตหรือต่ำกว่าสำหรับผลิตภัณฑ์ผลไม้แช่อิ่ม ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีความทนต่อวัตถุกันเสียชนิดกรดอ่อนโดยไม่ขึ้นกับโครงสร้าง (Stratfoed et al., 2013 ; Martorell et al., 2007)



รูปที่ 4.3 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับโพแทสเซียมซอร์เบตเข้มข้นสุทธิ 0, 0.05, 0.07, 0.09 และ 0.11 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. โซเดียมเบนโซเอต

การแปรระดับโซเดียมเบนโซเอตของ *L. plantarum* พบว่า โซเดียมเบนโซเอตตั้งแต่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.06% (w/v) หรือสูงกว่าสามารถลดความชันของกราฟช่วง log phase และสามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยไม่มีความแตกต่างกันภายใน 72 ชั่วโมง ซึ่งผลลัพธ์คล้ายกับ *Z. parabailii* ส่วน *Z. bailii* ใช้โซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นตั้งแต่ 0.07%(w/v) ขึ้นไปจึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ขณะที่ *Z. rouxii* ยังพบการเจริญของจุลินทรีย์ปริมาณ 10^7 cfu/ml แม้ใช้เข้มข้นถึง 0.1% (w/v) จากการศึกษาของ Alyce Stiles Battey, Siobain Duffy และ Donald W. Schaffner (2002) พบว่าการใช้โซเดียมเบนโซเอตในยีสต์กลุ่ม Zygosaccharomyces มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์เบต แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียชนิดกรดอ่อนขึ้นอยู่กับค่า pH ที่เหมาะสมเป็นสำคัญ (Turantas et al., 1999) ดังนั้นหากมีการปรับ pH ของอาหารเหลวให้อยู่ในสภาวะกรดสูงสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารได้ (Jenkins et al., 2000) มากถึง 40% (Rojo et al., 2014)

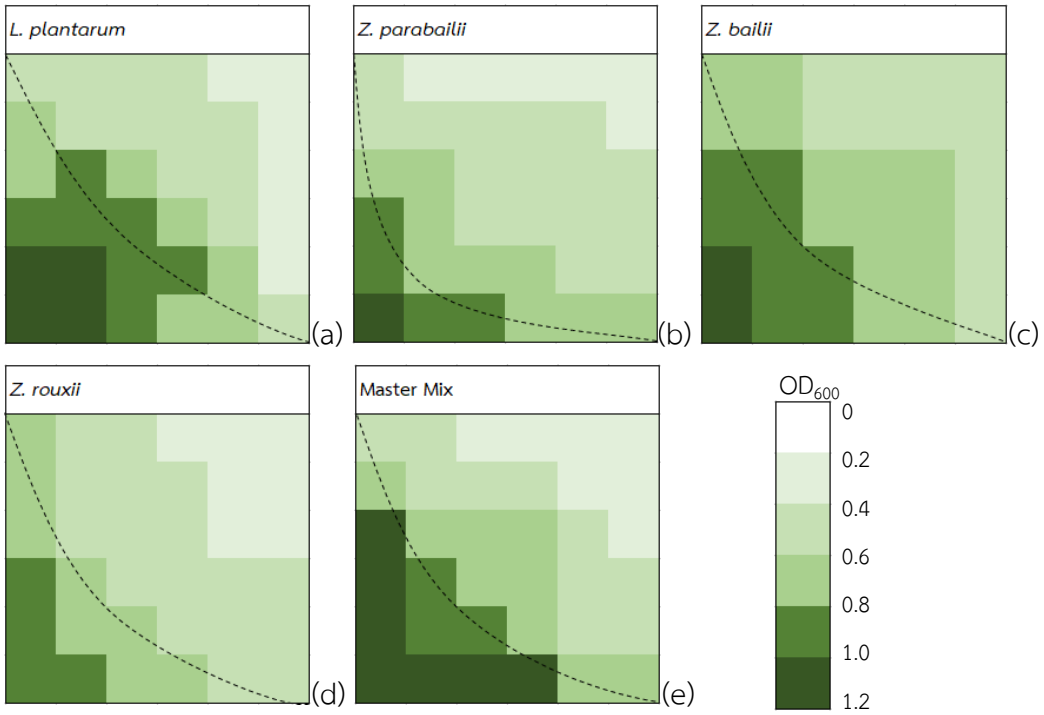


รูปที่ 4.4 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่แปรระดับโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นสุทธิ 0, 0.06, 0.07, 0.09 และ 0.1 %(w/v) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

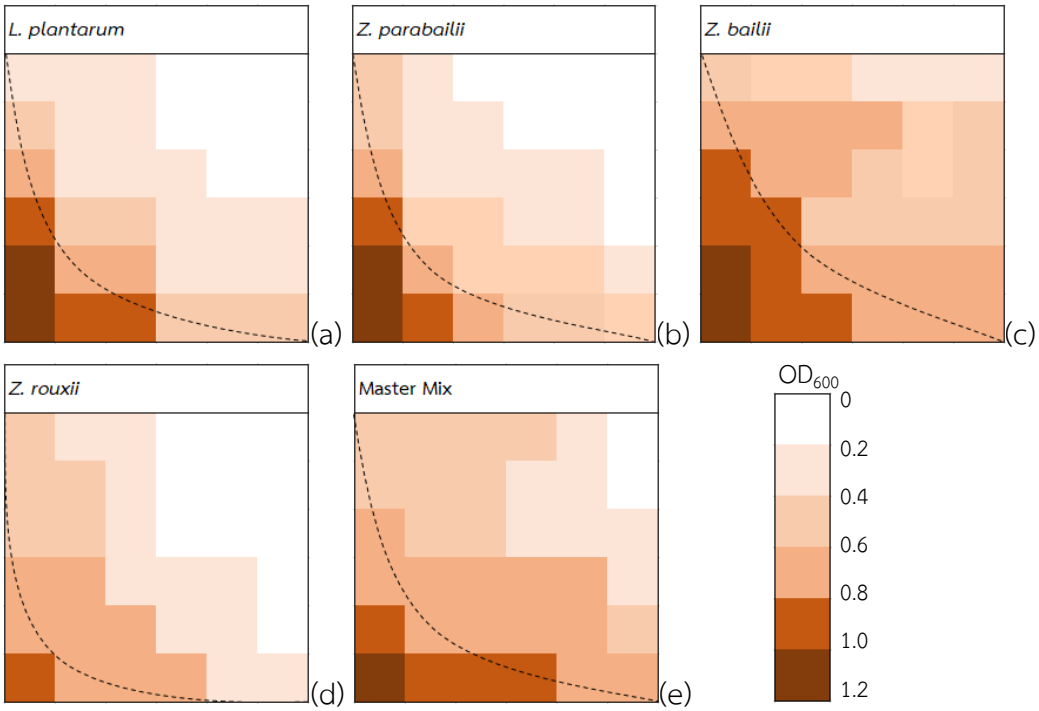
4.2.2 การยับยั้งการเจริญด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบผลเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

จากการทดลองพบว่าการใช้ potassium sorbate ร่วมกับ sodium benzoate ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในทุกการทดสอบ เมื่อพิจารณาเชื้อผสมระหว่างไอโซเลท 1, 5, 6, 8, 9 และ 10 หรือ เชื้อผสม M การใช้สารทั้งสองร่วมกันสามารถลด MICs ลงได้ประมาณ 35% เมื่อเทียบกับการใช้สารเดี่ยว ดังตารางที่ 4.5 และการใช้ potassium sorbate ร่วมกับเกลือให้ผลในทำนองเดียวกันแต่มีประสิทธิภาพมากกว่า สามารถลดค่า MICs ลงได้ถึง 50% สำหรับเชื้อผสม M ดังตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาการทดลองทั้งสองสภาวะเห็นได้ว่า *Z. bailiii* มีอาการต้านวัตถุกันเสียมากที่สุดในกลุ่ม *Zygosaccharomyces* สำหรับสายพันธุ์ที่ทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่ยืนยันคุณสมบัติทนต่อสารกันเสียชนิดกรดอ่อน (Martorell et al., 2007) ของจุลินทรีย์ การเติมเกลือลงในอาหารเหลวจะเพิ่มความเป็นกรดของสภาพแวดล้อมจากการแตกตัวของเกลือซึ่งเอื้อต่อการทำงานของวัตถุกันเสียทั้งสองที่มีกลไกในการยับยั้งคือ สร้างความผิดปกติในกระบวนการแลกเปลี่ยนสารของเซลล์และขัดขวางการสร้างเอนไซม์ (วีรยา, 2018) ด้วยการเพิ่มความเป็นกรดภายในไซโทพลาซึม ดังนั้นโปรตีนอันเป็นโครงสร้างของเอนไซม์จะเสียสภาพไป ทั้งนี้ยังคงมีบางเซลล์ที่มีค่า pH ของไซโทพลาซึมน้อยกว่าเซลล์อื่นๆ ความแตกต่างระหว่าง pH ที่น้อยกว่าทำให้เซลล์ยังคงดำเนินกิจกรรมภายในเซลล์ต่อได้จึงเกิดเป็น

คุณสมบัติทนกรดของจุลินทรีย์ขึ้น (Stratford et al., 2013) คาดว่าหากปรับ pH ให้มีความเป็นกรดสูงร่วมจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของวัตถุกันเสียทั้งสองได้ โดยช่วง pH ที่เหมาะสมกับโซเดียมเบนโซเอตอยู่ระหว่าง 2.5-4.0 (วีรยา, 2018) และกรดอ่อนสำหรับโพแทสเซียมซอร์เบต นอกจากนี้งานวิจัยของ Kang et al. (2021) พบว่า *L. plantarum* ช่วยส่งเสริมกระบวนการผลาญคาร์บอนไดออกไซต์ของเซลล์ยีสต์ให้เข้าสู่กระบวนการหายใจ เป็นการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทางหนึ่งทำให้การทดสอบ M ให้ผลดีกว่าการทดสอบ *Z. bailii* เพียงสายพันธุ์เดียว ทั้งนี้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่กระทบต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ ณ ความเข้มข้นหนึ่งของวัตถุกันเสีย (Sofos and Bustra, 1993 ; Tfouni and Toledo, 2002)



รูปที่ 4.5 synergistic effect ระหว่าง potassium sorbate (แนวนอน) และ sodium benzoate (แนวตั้ง) ของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) และ M (e) ที่มีการแปรระดับวัตถุกันเสียในอาหารเพาะเชื้อเหลวมาตรฐาน



รูปที่ 4.6 synergistic effect ระหว่าง potassium sorbate (แนวนอน) และ เกลือ (แนวตั้ง) ของ ของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) และ M (e) ที่มีการแปรระดับวัตถุกันเสียในอาหารเพาะเชื้อเหลวมาตรฐาน

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของตัวแปรร่วมระหว่าง Potassium sorbate และ Sodium benzoate

จุลินทรีย์ (ไอโซเลท)	**MICs Single effect**		**MICs Synergistic effect**		**% MICs ที่ลดลง**	
	PS[1] %(w/v)	SB[2] %(w/v)	PS %(w/v)	SB %(w/v)	PS	SB
L. plantarum (1)	0.11	0.090	0.11	0.060	0	33
Z. parabailii (5)	0.11	0.10	0.11	0.050	0	50
Z. bailii (9)	0.090	0.10	0.090	0.10	0	0
Z. rouxii (10)	0.090	0.10	0.045	0.067	50	33
M[3]	0.11	0.10	0.073	0.067	33	33

หมายเหตุ [1] คือ potassium sorbate

[2] คือ sodium benzoate

[3] คือ เชื้อผสมของไอโซเลท 1, 5, 6, 8, 9, 10 และ 11

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของตัวแปรร่วมระหว่าง Potassium sorbate และ เกลือ

จุลินทรีย์ (ไอโซเลท)	MICs Single effect		MICs Synergistic effect		% MICs ที่ลดลง	
	PS %(w/v)	เกลือ %(w/v)	PS %(w/v)	เกลือ %(w/v)	PS	เกลือ
L. plantarum (1)	0.11	3	0.055	1.50	50	50
Z. parabailii (5)	0.11	2	0.028	1.00	75	50
Z. bailii (9)	0.090	1	0.090	0.50	0	50
Z. rouxii (10)	0.090	3	0.060	2.00	33	33
M	0.11	3	0.055	1.50	50	50

4.3 การยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1% (w/v)

เมื่อคำนึงถึงการผลิตระดับอุตสาหกรรม มะม่วงแช่อิ่มที่ผ่านการผลิตด้วยปริมาณเกลือที่มากกว่า 1.5% (w/v) ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเนื่องจากรสชาติที่เค็มเกินไปจึงกำหนดปริมาณเกลือที่ 1% (w/v) และแปรระดับ pH และ °Brix โดยใช้สารให้ความหวานที่แตกต่างกันคือ ไฮฟรุคโตสซรัปและซอร์บิทอล ในสัดส่วนต่างๆดังตารางที่ 3.1 พบว่าสำหรับทุกไอโซเลท สูตรที่ 5-8 ที่ใช้ซอร์บิทอล 70% เป็นสารให้ความหวานมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่าสูตรที่ 1-4 ซึ่งใช้ไฮฟรุคโตสไซรัป 55% อย่างชัดเจนในระยะเวลาทดสอบ เนื่องจากการใช้ซอร์บิทอลทำให้จุลินทรีย์ขาดแหล่งคาร์บอนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี กระบวนการดึงซอร์บิทอลมาใช้ในจุลินทรีย์อาศัยเอนไซม์ที่ต่างจากน้ำตาลหกคาร์บอนชนิดอื่น ดังนั้นสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวย่อมไม่สามารถหาแหล่งคาร์บอนได้ในสภาพแวดล้อมที่ถูกทำขึ้นในหลอดทดลอง แต่คาดว่าหากมีการใช้จริงในระบบอุตสาหกรรมจุลินทรีย์สามารถปรับตัวและย่อยแป้งจากมะม่วงมาใช้แทนได้จึงอาจพบปริมาณจุลินทรีย์มากกว่าการทดลองในระดับห้องทดลองแต่ย่อมน้อยกว่าการใช้ไฮฟรุคโตสไซรัปที่จุลินทรีย์สามารถย่อยน้ำตาลได้ทันที และจากงานวิจัยของ Escott et al. (2018) *Z. rouxii*, *Z. parabailii* และ *Z. bailii* เป็นจุลินทรีย์ชนิดชอบฟรุคโตสหรือ fructophilic yeast แม้การเพิ่ม °Brix ซึ่งส่งผลให้ค่ากิจกรรมของน้ำลดลงแต่ *Z. parabailii* และ *Z. bailii* สามารถทนต่อสภาพดังกล่าวได้ถึง 0.85 และน้อยกว่าสำหรับ *Z. rouxii* (Jermini and Schmidt-Lorenz, 1987a) ซึ่งมีสมบัติ xerophilic ส่วน pH นั้นจุลินทรีย์กลุ่ม *Zaccharomyces* ทั้งสามสามารถทนได้ถึง 2.2 (Martorell et al, 2006) และต่ำกว่าสำหรับ *L. plantarum* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิดสร้างกรดจึงเป็นการยากที่จะปรับเพียงสภาพการหมักให้ยับยั้งการเจริญทั้งหมด โดยจากการทดลองสูตรที่ 6 และ 8 ซึ่งมีค่า pH เท่ากับ 3 สามารถต้านการเจริญได้ดีกว่าสูตรที่ 5 และ 7 ที่มี pH เท่ากับ 3.5 อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.1$) สอดคล้องไปกับเหตุผลก่อนหน้าที่กล่าวถึงสัดส่วนของเซลล์บางส่วนที่มีระดับ pH ในไซโทพลาสซึมต่ำกว่าเซลล์อื่นในสายพันธุ์เดียวกัน ยิ่งมีความเป็นกรดสูงยิ่งมีสัดส่วนน้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีระดับกรดในไซโทพลาซึมปกติ ทั้งนี้จุลินทรีย์ทั้งสี่สายพันธุ์มักพบว่ามาจากการปนเปื้อนจากแหล่งวัตถุดิบหรือตกค้างภายในโรงงาน จากคุณสมบัติทั้งหมดที่อ้างอิงการลดโอกาสปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มกระบวนการผลิตจึงเป็น

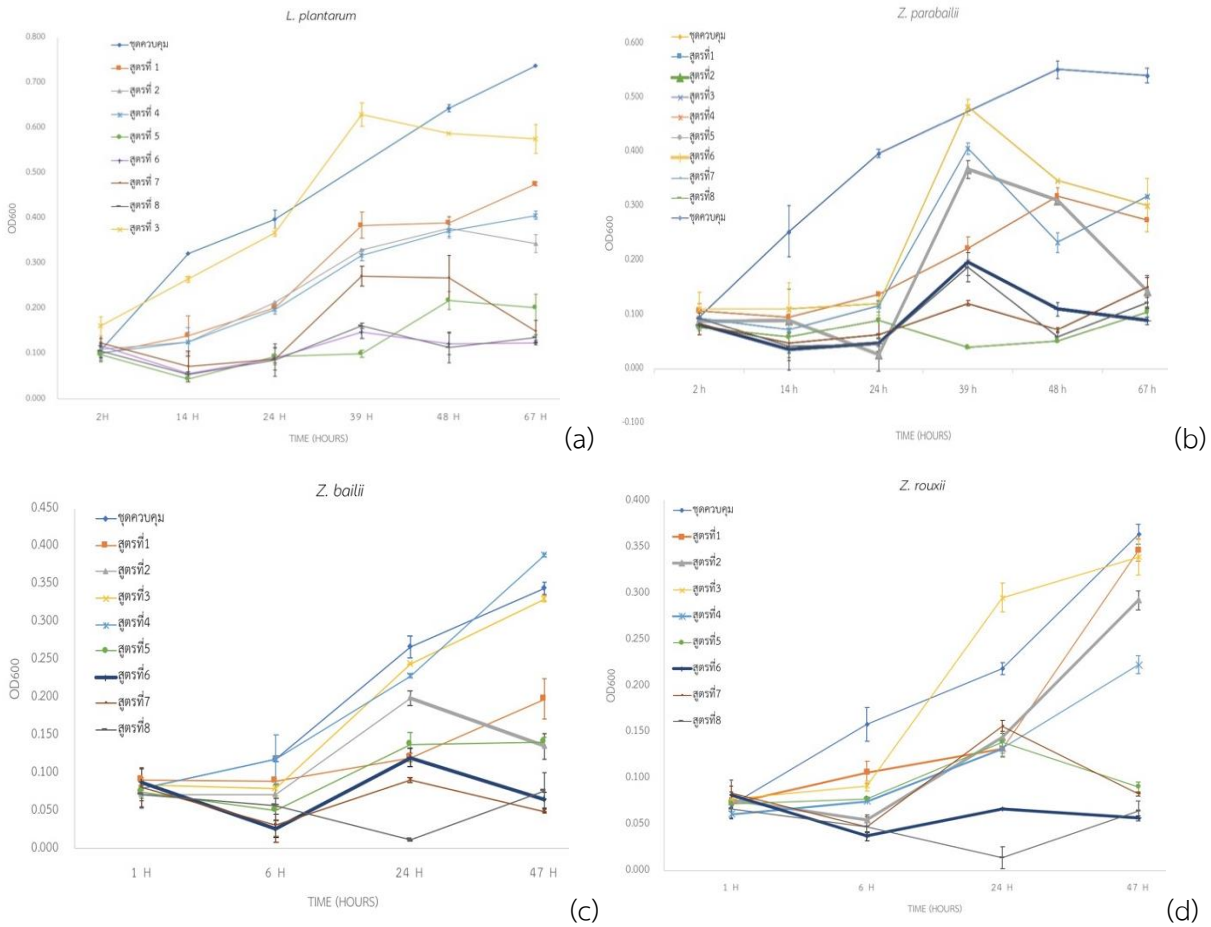
สิ่งที่ควรคำนึงถึง โดยอาจใช้กรด peracetic ในการทำความสะอาดวัตถุดิบก่อนเข้ากระบวนการ และใช้ทำความสะอาดโรงงานเมื่อเกิดการปนเปื้อนขึ้น ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเรื่องความเข้มข้นและเวลาสัมผัสที่ใช้ โดยอาจแปรระดับการล้างที่สัมผัสอาหารระหว่าง 60-100 ppm เป็นเวลา 3-10 นาที (Martorell et al., 2006 ; จอมขวัญและคณะ,2014)

แม้ว่าการใช้ sorbital 70% แสดงผลลัพธ์ที่ดีกว่าแต่ปริมาณความเข้มข้นของสารให้ความหวานทั้งสองแตกต่างกันรวมถึงรสสัมผัสที่ซอร์บิทอลให้ความหวานที่ต่ำกว่า (relative sweetness = 0.5 ,sucrose = 1) จึงควรมีการทดลองเพิ่มเติมในการใช้เดี่ยวหรือผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น ทั้งนี้การใช้ซอร์บิทอลมีจุดน่าสนใจเพิ่มเติมคือ เหมาะสำหรับสินค้ากลุ่มสุขภาพ เนื่องจากมีค่า GI เท่ากับ 10±3 และให้พลังงานเพียง 2.4 แคลลอรี่ต่อกรัม และไม่ทำให้เกิดฟันผุ นอกจากนี้ซอร์บิทอลยังเป็นสารตั้งต้นของวิตามินซีแต่การบริโภคเกินกว่า 50 กรัมต่อวันอาจส่งผลให้ความดันออสโมซิสเกิดเสียสมดุลเป็นเหตุให้เกิดอาการถ่ายได้ (Merillun and Ramawat, 2018) เนื่องจากมีคุณสมบัติดูดความชื้นสูงจึงออกฤทธิ์เป็นยาระบายระดับอ่อนแต่อย่างไรก็ตามไม่มีข้อห้ามในการเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร สำหรับความคุ้มค่าในการผลิต HFS 70% มีราคาอยู่ที่ 0.14 บาทต่อกรัม ขณะที่ sorbitol 70% มีราคาอยู่ที่ 0.10 บาทต่อกรัมตามราคา alibaba ณ เดือนพฤษภาคม 2021 แต่การผลิตผลิตภัณฑ์มะม่วงแช่อิ่มที่ผ่านมาไม่ปรากฏกระบวนการแช่อิ่มด้วย sorbitol 70% ดังนั้นจึงควรทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคเพิ่มเติม และเมื่อประเมินสภาวะที่เหมาะสมในการต้านการเจริญของไอโซเลททั้งหมดร่วมกับปัจจัยต่างๆ จึงเลือกสูตรที่ 2 (pH 3 และ 22 °Brix ปรับด้วย 55% HFS), 6 (pH 3 และ25 °Brix ปรับด้วย 70% sorbitol) และ 8 (pH 3 และ22 °Brix ปรับด้วย 70% sorbitol) ในการทดลองลำดับต่อไป

สำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทมีความเป็นกรดสูงและมีความเข้มข้นน้ำตาลมากอย่างมะม่วงแช่อิ่ม การใช้วัตถุกันเสียอย่างโพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมเบนโซอิกเป็นที่นิยมมากกว่าสารชนิดอื่น เนื่องจากสารอื่นที่สารมารถใส่ลงอาหารได้นั้นจุลินทรีย์กลุ่ม *Zygosaccharomyces* มีความต้านทานได้ดี ทั้งต่อสารประกอบซัลไฟต์ (Escott et al., 2018) และ ไคโตซาน (Rojo et al., 2011) แม้ว่าไคโตซานจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอย่าง *L. plantarum* แต่อาจเกิดปัญหาสำหรับผู้แพ้กุ้ง ปูได้ จึงเลือกวัตถุกันเสียชนิดกรดอินทรีย์แทนซึ่งทำการทดลองแปรระดับสารกันเสียทั้งสองดังตารางที่ 3.2 หลังปรับองค์ประกอบน้ำดองมะม่วงตามสูตรอาหารที่ 2, 6 และ 8 พบว่า โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น 0.05% (w/v) และโซเดียมเบนโซเอต 0.06% (w/v) สามารถลดการเจริญของทุกไอโซเลทได้ในระดับห้องทดลอง คาดว่าในการผลิตจริงอาจต้องมีการใส่สารกันเสียในระดับที่สูงขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบเป็นเพียงจุลินทรีย์ในกลุ่ม gas-forming spoilage แต่ในกระบวนการจริงอาจมีจุลินทรีย์อื่นหรือมีการเกิดอันตรกริยาระหว่างจุลินทรีย์ทำให้มีความทนทานมากขึ้น และเนื่องจากผลการทดลองผลการสริมฤทธิ์พบว่า สารทั้งสองมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กัน

และ โซเดียมเบนโซเอตมีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของน้ำดองมะม่วงมากกว่า จึงอาจใช้อัตราส่วนผสม G หรือ H หรือ I สำหรับการทดลองในระดับนำร่องเพื่อหาปริมาณวัตถุกันเสียที่เหมาะสมต่อไป

ทั้งนี้อุณหภูมิมีผลอย่างมากในการลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสี่ สายพันธุ์เหล่านี้มีความทนทานต่อสิ่งเร้าอื่นสูงยกเว้นปัจจัยด้านอุณหภูมิ โดยที่ 4 องศาเซลเซียสไม่พบการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์และ มากกว่า 37 องศาเซลเซียสขึ้นไป พบเพียงการเจริญของ *Z. bailii* เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น (Martorell et al., 2006) ส่วน *L. plantarum* สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส จึงคาดว่าอาจพบปัญหาบรรจุภัณฑ์โป่งพองมากนอกช่วงฤดูร้อน จากการผลิตและจัดส่งที่อุณหภูมิห้องซึ่งอาจมีการสะสมของความร้อนมาก จึงทำหน้าที่เสมือนอุปสรรคอย่างนึงที่ขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดสร้างก๊าซ ดังนั้นในช่วงที่มีโอกาสพบปัญหาได้มากจึงควรรักษาสุขลักษณะของพนักงานและโรงงานอย่างเข้มงวด สำหรับวิธีอื่นในการควบคุมปัญหาดังกล่าวอาจใช้การบรรจุสุญญากาศแต่ยังอาจพบปัญหาได้บ้างเล็กน้อยเนื่องจากจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาสามารถเจริญได้ในระบบที่มีออกซิเจนต่ำ โดยการเจริญอาจเพิ่มในช่วงที่ทำการดองและสร้างก๊าซในระหว่างบรรจุได้ หรือการใช้ carbon absorber เป็นตัวช่วยในการซึมซับก๊าซส่วนเกินซึ่งอาจใช้งบประมาณสูง แต่ไม่แนะนำการใช้ CAP เนื่องจากจุลินทรีย์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมแม้ปรับให้มีออกซิเจนต่ำก็ยังสามารถเจริญได้ในอัตราที่ไม่สูงนัก (Sahan and Golge, 2017) ทั้งนี้วิธีเหล่านี้ย่อมมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับวัตถุกันเสีย



รูปที่ 4.7 การเจริญของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d) ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่มีการแปรระดับ pH และ °Brix โดยมีความเข้มข้นเกลือ 1%(w/v)

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ไอโซเลท ในสภาวะอาหารและระดับสารกันเสียที่ต่างกัน

สายพันธุ์	สูตรอาหาร	Control	SB			PS				SB:PS			
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
L. plantarum	2	+++++	+++	-	-	+++++	++++	++	-	+	+	+	+
	6	++++	++++	+	-	+++	++	+	-	-	-	+	+
	8	+++	++++	++	++	+++	++	++	+	++	++	++	++
Z. parabailii	2	+++++	+++	-	-	+++++	++++	-	-	-	-	-	-
	6	++	+	-	-	+++	+	-	-	-	-	-	+
	8	+++	+++	++	+	++	+	+	-	-	+	+	+
Z. bailii	2	+++++	++	-	-	++++	+++	-	-	-	-	-	-
	6	++	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
	8	+++	+++	+	-	++	+	+	-	-	+	+	+
Z. rouxii	2	+++++	+++	-	-	++++	+++	-	-	-	-	-	-
	6	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	8	+++	+++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-
M*	2	+++++	+++	-	-	++++	++	-	-	-	-	-	--
	6	++++	+++	-	-	++++	+	-	-	-	+	-	-
	8	++++	+++	-	-	++++	+++	+	-	-	-	+	+

หมายเหตุ: + คือ พบเชื้อปริมาณน้อย

+++++ คือ พบเชื้อปริมาณมาก

- คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อ

บทที่ 5 สรุปการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากมะม่วงแช่อิ่มที่บรรจุภัณฑ์โป่งพอง

จุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้จากมะม่วงแช่อิ่มที่บรรจุภัณฑ์โป่งพอง คือ *Lactobacillus plantarum, Zygosaccharomyces parabailii, Zygosaccharomyces bailii* และ *Zygosaccharomyces rouxii*

5.2 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สร้างก๊าซ

ประเมินสภาวะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดี่ยว ได้แก่ เกลือ, ซูโครส, โพแทสเซียมซอร์เบต และโซเดียมเบนโซเอต พบว่า ต้องใช้เกลือความเข้มข้นสูงกว่า 3% (w/v) ในการยับยั้งการเจริญของทุกจุลินทรีย์ ซูโครสไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดที่คัดแยกได้ ต้องใช้โพแทสเซียมซอร์เบตเข้มข้นมากกว่า 0.11% (w/v) และโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นถึง 0.1% (w/v) เพื่อยับยั้งการเจริญครอบคลุมทุกจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ประเมินสภาวะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวัตถุเจือปนอาหารแบบผลเสริมฤทธิ์ พบว่า การใช้ potassium sorbate ร่วมกับ sodium benzoate ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และการใช้ potassium sorbate ร่วมกับเกลือให้ผลเสริมฤทธิ์กันเช่นเดียวกันแต่มีประสิทธิภาพดีกว่า สามารถลดค่า MICs ของสารกันเสียได้มากกว่า

5.3 ประเมินสภาวะในการยับยั้งการเจริญด้วยการแปรค่า pH ร่วมกับเกลือ 1% (w/v)

เมื่อกำหนดปริมาณเกลือที่ 1% (w/v) และแปรระดับ pH และ °Brix โดยใช้สารให้ความหวาน 2 ชนิด คือ ไฮฟรุคโตสซรัปและซอร์บิทอล พบว่าสภาวะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดคือ pH 3 และ 25 °Brix เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มสารให้ความหวานชนิดเดียวกัน แต่การใช้ซอร์บิทอล 70% สามารถลดการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้ไฮฟรุกโตสไซรัป 55% และจากค่า pH และ °Brix ที่คัดเลือกสามารถใช้ Potassium sorbate เพียง 0.05% (w/v) และ Sodium benzoate เพียง 0.06% (w/v) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสร้างก๊าซที่พบมีความทนต่อสภาพแวดล้อมของมะม่วงแช่อิ่มสูงดังนั้นสิ่งที่จำเป็นกว่าการควบคุมคือการรักษาสุขลักษณะที่ดี เกิดการปนเปื้อนน้อยที่สุดโดยอาจใช้กรด peracetic ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในการทำความสะอาดวัตถุดิบ เครื่องมือและโรงงานในกรณีที่เกิดการบวมของบรรจุภัณฑ์ในชุดการผลิตก่อนหน้าหรือเป็นประจำทุกเดือน และสำหรับผลการทดลองควรมีการทดสอบเพิ่มเติมในระดับนำร่องเพิ่มเติม ทั้งนี้การใช้ซอร์บิทอลเป็นสารให้ความหวานอาจมีการออกแบบการทดลองแบบ Mixture design เพื่อหาสัดส่วนการผสมที่สามารถลดการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเนื่องจากมีความน่าสนใจในแง่โภชนาการสูง

เอกสารอ้างอิง

สิรีนาถ เกียรติธนาพงษ์. (2533). ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของมะม่วงชิ้นในน้ำเชื่อม บรรจุกระป๋อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2556). แนวทางการใช้วัตถุเจือปนอาหารและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง.

อัญชนา ดุจจานุทัศน์. (2545). การยืดอายุการเก็บรักษาหมูยอโดยใช้โซเดียมเบนโซเอต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Carlos, E., Juan, M.F., Iris, L., Antonio, M., and José, A.S.L. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. *Fermentation.* 4(3): 69

Carolina, P.L., Sergio, R.V. and Mariana, C. (2020). Application of high pressure-assisted infusion treatment to mango pieces: Effect on quality properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 64: 102431

Cole, M.B., and Keenan, M.H.J. (1987). A quantitative method for predicting shelf life of soft drinks using a model system. *Journal of Industrial Microbiology.* 2: 59-62.

Corsetti, A., and Valmorri, S. (2011). Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus spp.*: *Lactobacillus plantarum*. *Encyclopedia of Diary Sciences.* 2: 111-118

Dai, J., Li, K., Song, N., Yao, W., Xia, H., Yang, Q., Zhang, Z., Yao, L., Yang, S., and Chen, X. (2020) *Zygosaccharomyces rouxii*, an Aromatic Yeast Isolated From Chili Sauce, Is Able to Biosynthesize 2-Phenylethanol via the Shikimate or Ehrlich Pathways. *Microbiol.* Retrieved From https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.597454.

Fotadar, U., Zaveloff, P., and Terracio, L. (2005). Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basis Microbiology*. 45(5): 403-404.

Golden, D.A., and Beuchat, L.R. (1992). Effects of potassium sorbate on growth patterns, morphology, and heat resistance of *Zygosaccharomyces rouxii* at reduced water activity. *Can J Microbiol.* 38(12): 1252-9.

International Food Information Coulcil (IFIC) and U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2010) *Overview fo Food Ingredients, Additives & Colors.* Retrieved from https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors#foodadd.

Jin, Q., and Kirk, M.F. (2018). pH as a primary Control in Environmental Microbiology: 1

Thermodynamic Perspective. *Frontiers Environmental Bioenergetics.* Retrieved from https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2018.00021/full.

Kang, X., Gao. Z., Zheng. L., Zhang. X., and Li, H. (2021). Regulation of *Lactobacillus plantarum* on the reactive oxygen species related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Science and Technology*. 147: 111492.

Karaman, K., and Sagdic, O. (2019). *Zygosaccharomyces bailii* and *Z. rouxii* induced ethanol formation in apple juice supplemented with different natural preservatives: A response surface methodology approach. *Journal of Microbiological Methods*. 163: 105659.

Lakshminarayana, S., Subhadra, N. V. and Subramanyam, H. (1970). Some aspects of Developmental physiology of mango fruit. *Journal o Horticultural Science.* 45: 133-143.

Lee, S. (2004). Microbial Safety of Pickled Fruits and Vegetables and Hurdle Technology. *Internet Journal of Food Safety*. 4: 21-32.

Lennerz, B.S., Vafai, S.B., Delaney, N.F., Clish, C.B., Deik, A.A., Pierce, K.A., Ludwig, D.S., and Mootha, V.S. (2015). Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular Genetics and Metabolism.* 114(1): 73-79.

Leung, C., Palmer, L.C., Kewalramani, S., Qiao, B., Stupp, S.I., Olvera de la Cruz, M., and Bedzyk, M.J. (2013). Crystalline polymorphism induced by charge regulation in ionic membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110: 16309-16314.

Liang, P., Zhao, C., Lin, Y., Geng, J., Chen, Y., Chen, D., and Zhang, X. (2020). Effects of sodium benzoate on growth and physiological characteristics of wheat seedlings under compound heavy metal stress. *Journal of Integrative Agriculture.* 19(4): 1010-1018.

Logothetis, S., Walker, G., and Nerantzis, E.T. (2007). Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. *Matica Srpska Novi Sad*. 113: 271-284.

Majumdar, A., Pradhan, N., Sadasivan, J., Acharya, A., Ojha, N., Babu, S., and Bose, S. (2018). Food Degradation and Foodborne Diseases: A Microbial Mpproach. *Microbial Contamination and Food Degradation*. 3: 109-148.

Maimer, E., and Busse, M. (1992). Growth properties and gas formation by yeasts isolated from processed fruits in media eith various brix values and sorbic acid contents. I*nternational Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians*. 55: 192-197.

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Espinar, M.T., and Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology.* 114: 234-242.

Merillon, J.M., and Ramawat, K.G. (2017). Sweeteners. Cham: Springer Nature.

Niu, C., Xue, Y., Liu, C., Zheng, F., and Wang, J. (2020). Identification of gas-forming spoilage bateria in chili sauce and its control using nisin abd salt. *LWT-Food Science and Technology.* 118: 108658.

Niu, C., Xue, Y., Liu, C., Zheng, F., and Wang, J. (2018). Isolation and identification of gas-producing spoilage microbes in fermented broad bean paste. *Food control.* 84:8-16.

Ogbadu, L.J. (2014). PRESERVATIVES | Permitted Preservatives – Benzoic Acid. *Encyclopedia of Food Microbiology.* 2: 76-81.

Prakitchaiwattana, C., Chanprasartsuk, O., Sanguandeekul, R., and Fleet, G.H. (2010). Autochthonous yeast associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments;and the chemical changes during nature fermentation. *Bioresource Technology*. 101(9): 7500-7509.

Prjibelski, A.D., Korobeynikov, A.I., and Lapidus, A.L. (2019). Sequence Analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 3: 292-322.

Rojo, M.C., Lopez, F.N., Lerena, M.C., Mercado, L., Torres, A., and Combina, M. (2015). Evaluation of different chemical preservatives to control *Zygosaccharomyces rouxii* growth in high sugar culture media. *Food control*. 50: 349-355.

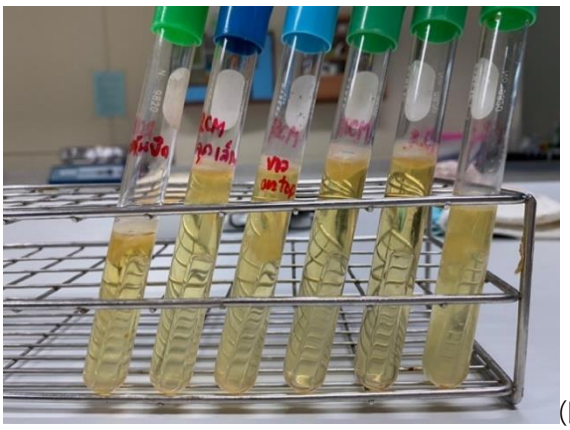
Suh, S.O., Gujjari, P., Beres, C., Beck, B., and Zhou, J. (2013). Proposal of *Zygosaccharomyces parabailii sp*. nov. and *Zygosaccharomyces pseudobailii sp.* nov., novel species closely related to *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63(5).

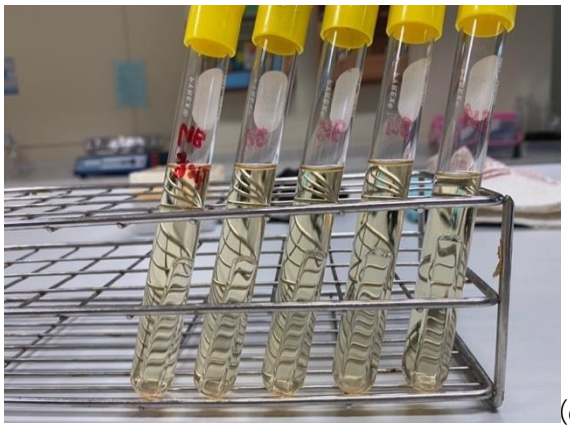
Wolfe, B. (2014). Microbe Guide: *Zygosaccharomyces rouxii*. *Microbe guides.* Retrieved from http://microbialfoods.org/microbe-guide-zygosaccharomyces-rouxii/.

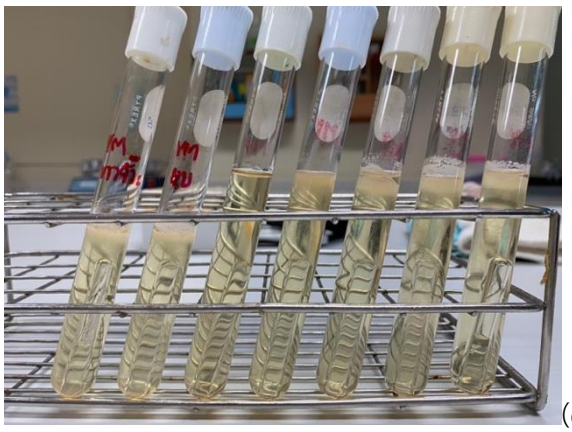
Xu, Y., Zheng, L., Geng, H., Liu, R., and Dai, X. (2020). Enhancing acidogenic fermentation of easte activated slude via isoelectric-point pretreatment: Insights from physical structure and interfacial thermodynamic. *Water Reserch*. 185: 116237.

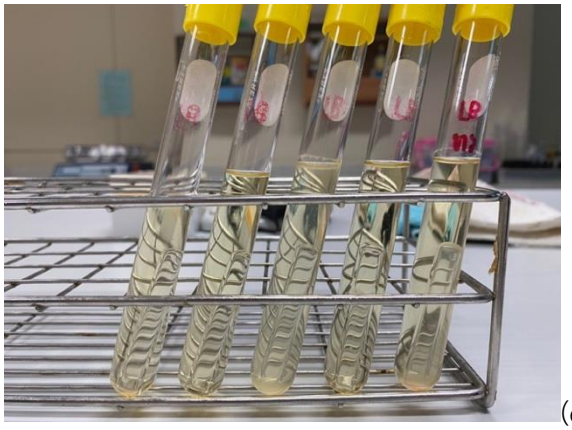
ภาคผนวก ก.

(a)


(b)


(c)

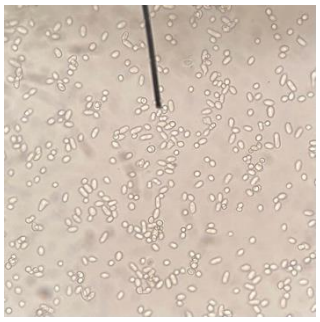
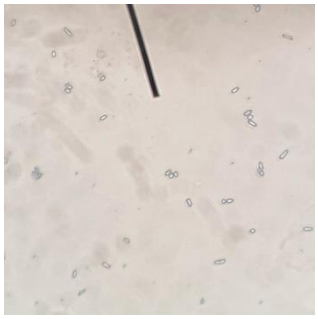
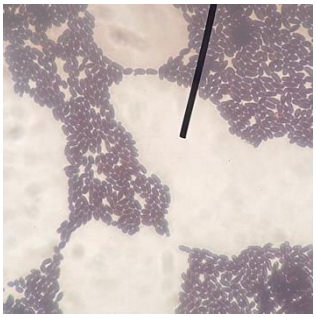
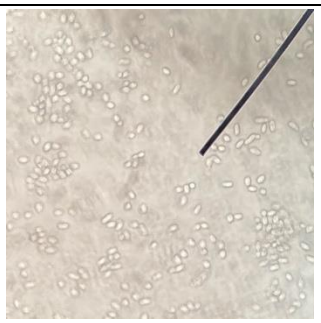
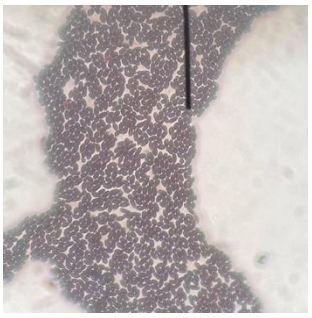
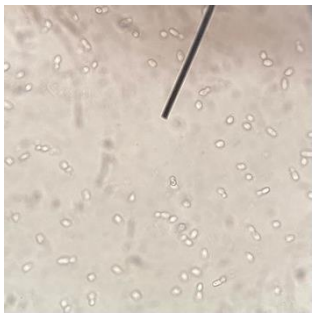

(d)

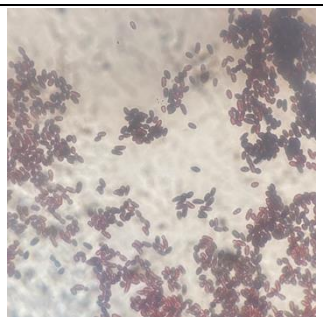
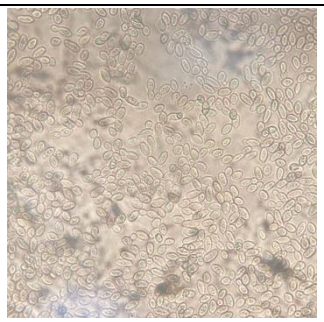
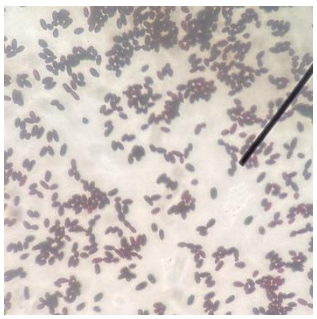
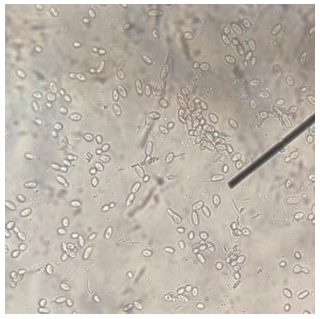
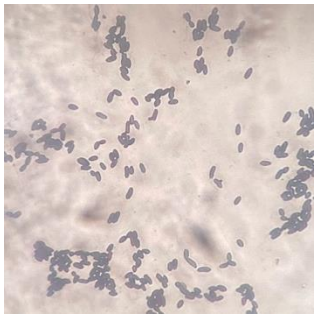
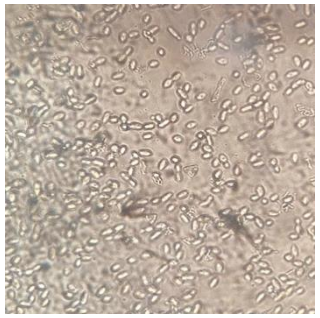
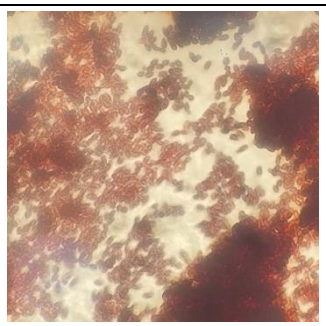
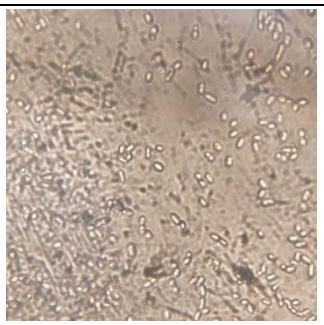
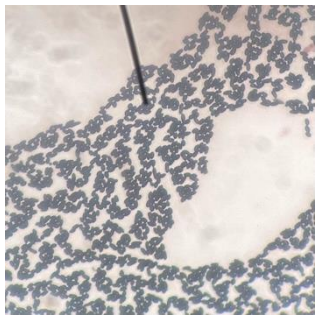

(e)

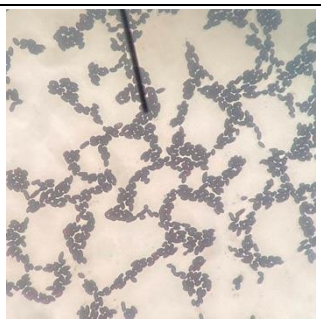
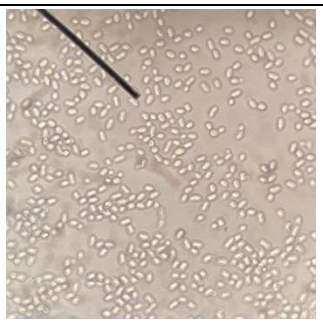
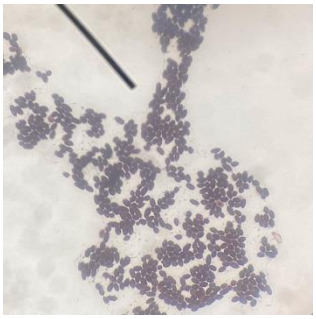
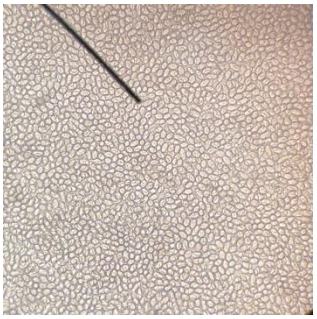
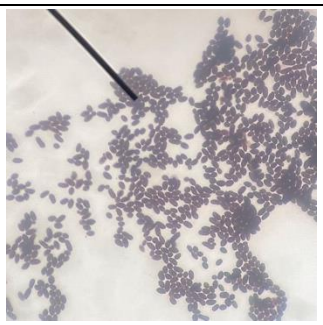
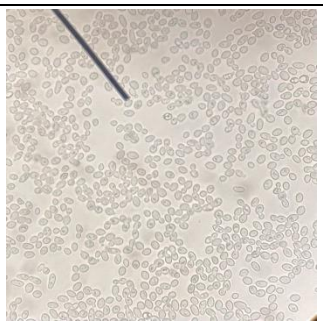
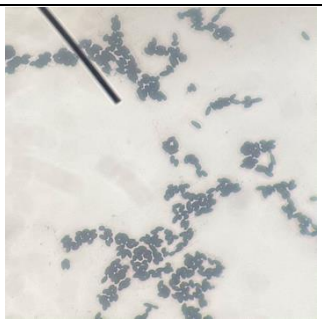
รูปที่ ก.1 การทดสอบการสร้างก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS (a), RCM (b), NB (c), YM (d) และ LB (e) ตามลำดับหลังทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ในขั้นตอนคัดแยกจุลินทรีย์

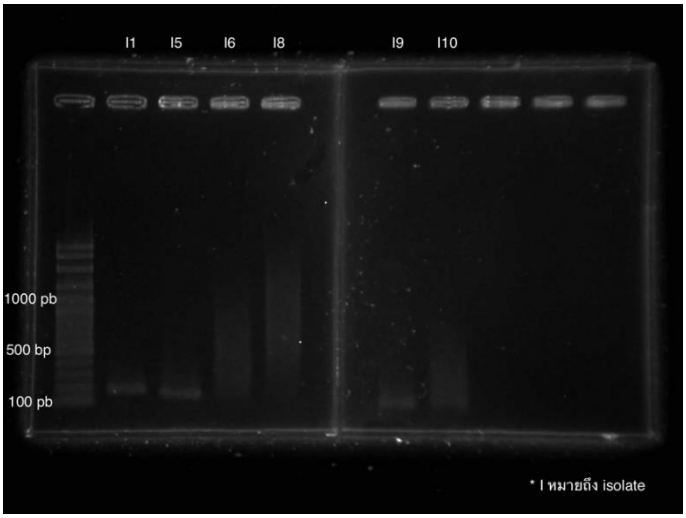
ภาคผนวก ข.

ตารางที่ ข.1 ผลการย้อมแกรม และ wet mount ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกจำนวน 14 ไอโซเลท

ไอโซเลท	Gram strain	Wet mount
1	-	
2	-	
3	-	
4		
5		

6		
7		
8		
9		
10		

11		
12		
13		
14		

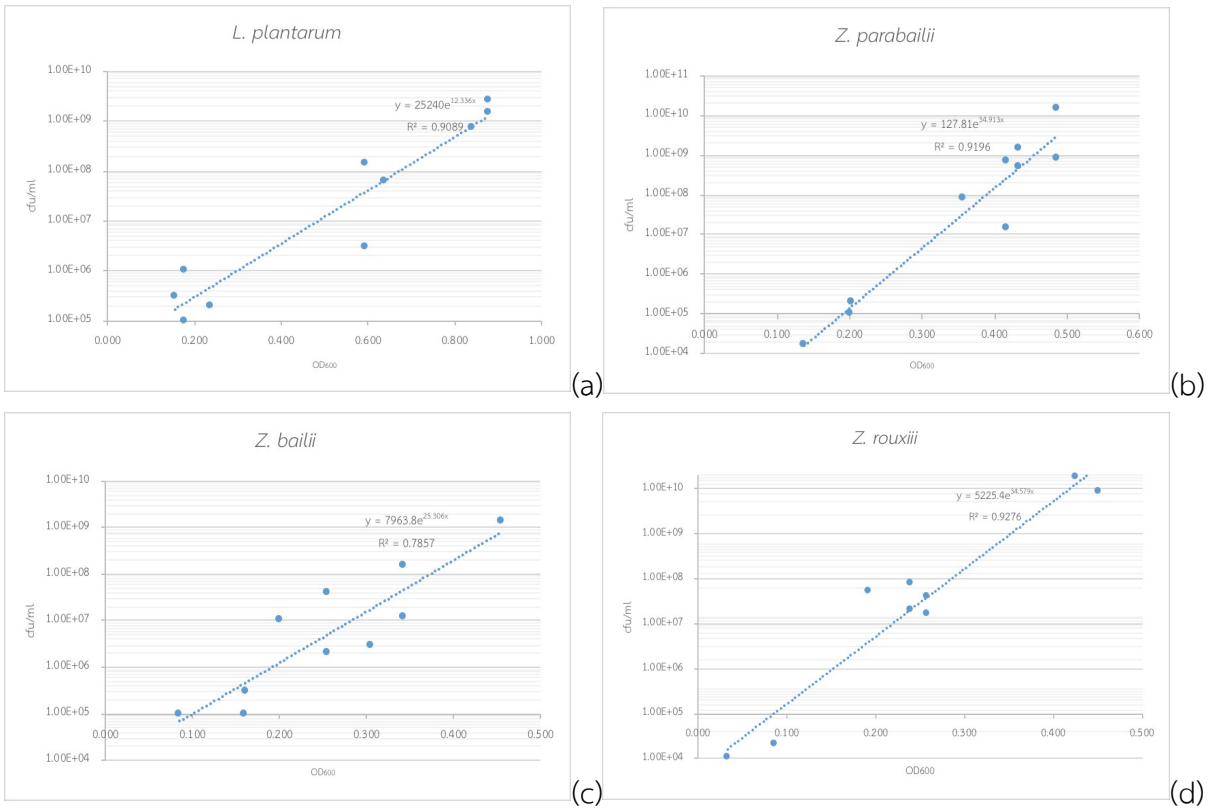


รูปที่ ข.1 gel electrophoresis ของไอโซเลท 1, 5, 6, 8, 9 และ 10

ตารางที่ ข.2 ลำดับดีเอ็นเอของไอโซเลทที่คัดแยก

Isolate	Identity	Accession number	Nucleotide
1	*Lactobacillus plantarum*	KJ775808	CCCGCCCATCNNGGCGAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG AAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG AGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACT
5	*Zygosaccharomyces parabailii*	CP019500.1	CTGCCGGTCGTCGTGATAAGGTAGGTAGTGACAATAAATAACGATACAG GGCCCTTACGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAA CGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC TACCTGCCCGCAGCCGCCGGAATAATGATGTAATATTTTATATTATATT TTAGTAGCCCTAACCAAGATTTGTGCTAGCGTCCGCTGTTCTATCGCGC ACAGTC
6	*Zygosaccharomyces rouxii*	XR_002648417.1	CCCNTTGGGGGCGCCCAAATTCCTTCTCTGATANCGTAAGGATTTAGCN CAATAAATAACGATACAGGGCCCTTACGGGTCTTGTAATTGGAATGAGT ACAATGTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC AGCAACCACCGTAATACTCTCATACAGCAGACACGATAATACTCTCCNAC GGGGAGAGGGG
8	*Zygosaccharomyces rouxii*	MH592597.1	CTCCTTGGGTCGCTCCGTTCCTCTCTGATAACGTTAAGGTTCTGACNAAT AAATAACGATACAGGGCCCTTACGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAAT GTAAATACCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAA CCACCGTAATACTCTCCTACAGCAGACACTATAATATTCTCATATACGA
9	*Zygosaccharomyces bailii*	MF662276.1	CCCGCCCCATCGCCTGATAAGGTAGGTAGTGACAATACAATAACGATACA GGGCCCTTACGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAA CGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAACCGCGGGAATACT ACCTGCCAGCAGCCGCGGTAATAATC
10	*Zygosaccharomyces rouxii*	MH592597.1	CTCTTAAGACGTCGATCACGTGTGGGTAGATGTGACATAAATAACGATACA GGGCCCTTACGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATACCTTAAC GAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGAAACCGCGGTAATACTCCCC

ภาคผนวก ค.



รูปที่ ค.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD600 และจำนวนจุลินทรีย์หน่วย cfu/ml ของ *L. plantarum* / ไอโซเลท 1 (a), *Z. parabailii* / ไอโซเลท 5 (b), *Z. bailii* / ไอโซเลท 9 (c) และ *Z. rouxii* / ไอโซเลท 10 (d)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวอรญา นทีสำเริง
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2563
โทรศัพท์	084-661-9103
Email	b.on@hotmail.co.th

ชื่อ-สกุล	นางสาวอภิวัณ บวรรัตนเวช
ตำแหน่ง	ผู้ร่วมวิจัย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2563
โทรศัพท์	084-466-4445
Email	beauisvip@hotmail.com