

จลศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียไนเตรทรีดิวซิง
แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตแหนม

ไพโรจน์ วิริยจารี¹, ลักขณา รุจนะไกรกานต์¹
วิวรรณ วรรณจรรย์¹ และ สุทธยา บุญดอนม¹

KINETIC OF NITRATE REDUCING
BACTERIA FOR NHAM PRODUCTION

Pairote Wiriyaacharee¹, Lakkana Rujanakraikarn¹
Wiwat Wattanatchariya¹ and Suthaya Boonthanom¹

ABSTRACT : *Micrococcus varians* is a nitrate reducing bacteria which needs glucose as a carbon substrate for cell growth and its activity. Therefore, glucose was used for kinetics study in the model system. For this experiment, glucose was varied as studied factor to 0.22-0.40 % for *M.varians* at 48 hours of fermentation period. It was found that the maximum specific growth rate (μ_m) of *M.varians* was 0.2534 hr⁻¹ and saturation constant (K_s) was about 0.1799 %. However, *M.varians* can produce a few of lactic acid content. As a result of this, the pH was also higher. In the nitrate reduction activity, it can reduce nitrate to nitrite with amount of 80 % in the first period of 12-18 hours. But the reduction of nitrate was dependent upon the nitrate level in the system.

¹ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200.

¹ Faculty of Agro-industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

บทคัดย่อ : *Micrococcus varians* เป็นไมโครทริคิวริงแบคทีเรียที่ต้องการกลูโคสเป็นสารอาหารสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์และการทำกิจกรรมต่าง ๆ ดังนั้น การศึกษาจุลศาสตร์ของเชื้อดังกล่าวใน model system จึงนำกลูโคสมาใช้เป็นปัจจัยสำคัญ โดยแปรที่ระดับร้อยละ 0.22-0.40 ในเวลา 48 ชั่วโมง ของการหมักโดย *M. varians* จากการทดลองพบว่า *M. varians* มีค่า maximum specific growth rate (μ_m) เท่ากับ 0.2534 ชั่วโมง⁻¹ และ saturation constant (K_s) มีค่าร้อยละ 0.1799 อย่างไรก็ตาม *M. varians* สามารถผลิตกรดลิกเตียนกรดแลคติกได้น้อยมาก จึงมีผลให้ค่าความเป็นกรดค้าง (pH) ค่อนข้างสูง สำหรับกิจกรรมในการรีดิวสารประกอบไนเตรท พบว่า สามารถเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรที่ได้นมากถึงร้อยละ 80 ในช่วง 12-18 ชั่วโมงแรกของการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารประกอบไนเตรทเริ่มต้นด้วย.

คำนำ

เทคโนโลยีการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในอุตสาหกรรมเนื้อหมักในปัจจุบัน นับว่าประสบความสำเร็จมากเนื่องจากสามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้คงที่ ควบคุมเวลาในการผลิต และสามารถประกันความปลอดภัยในการบริโภคได้มากกว่าการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. (Nummi, 1966; Everson *et al.*, 1970; Bacus, 1984; Gilliland, 1985 และ Gibbs, 1987) *Pediococcus* sp. (Deibel and Niven, 1957; Bacus and Brown, 1981; Bacus, 1984; Gillil and, 1985 c และ Gibbs, 1987) และ *Micrococcus* sp. (Ninivaara, 1955; Nummi, 1966 และ Coretti, 1977) ซึ่ง *Lactobacilli* และ *Pediococci* เป็นจุลินทรีย์ประเภทแลคติกแอซิคแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรดทั้งหมักแลคติกเพิ่มสูงขึ้นขณะเดียวกันค่าความเป็นกรดค้าง (pH) จะมีค่าลดลง การลดลงของ pH จะทำให้โปรตีนในเนื้อถูกทำลายไป มีการเกิดเจลและทำให้เนื้อเริ่มแข็งและเหนียวขึ้นโดยพบว่าเมื่อใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ร่วมกับเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* จะช่วยให้มีการสร้างกรดมากขึ้น ทั้งนี้เพราะ *L. plantarum* สามารถสร้างกรดได้ในช่วงแรกของการหมัก ส่วน *P. cerevisiae* สามารถสร้างกรดได้ในช่วงหลังของการหมัก นอกจากนี้สภาพความเป็นกรดที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ในเวลาอันรวดเร็ว สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ เช่น *Staphylococcus aureus* (Daly *et al.*, 1973), *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. (H-Kittikun *et al.*, 1988) เป็นต้น นอกจากความต้องการให้เกิดกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแล้ว สีของผลิตภัณฑ์ก็สำคัญต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ และการยอมรับของผู้บริโภค จึงอาศัยความสามารถในการรีดิวไนเตรทเป็นไนโตรของจุลินทรีย์ พวก *Micrococci* ซึ่งในที่นี้คือ *Micrococcus varians* โดยเชื้อดังกล่าวจะมีผลต่อการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรในช่วงแรกของการหมัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ (Wiriacharee, 1990) Deibel *et al.* (1961) รายงานว่ากิจกรรมดังกล่าวของเชื้อชนิดนี้จะเกิดขึ้นในช่วง 2-18 ชั่วโมงแรกของการหมัก ได้ถูกรอกทั่วไป ขณะที่การสร้างกรดจะเริ่มขึ้นหลังจาก 8-16 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า *M. varians* ควรจะมีกิจกรรมเกิดขึ้นก่อนที่จะถูกยับยั้งเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดมากขึ้น จากนั้นเมื่อ

ระบบการหมักเปลี่ยนไป โดยมีสภาพความเป็นกรดมากขึ้นสารไนโตรที่เกินขึ้นจะสลายตัวไปเป็นไนโตรออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกับรงควัตถุในเนื้อ (Myoglobin) และเปลี่ยนเป็นสีชมพูแดงของไนโตรโซไมโอโกลบิน (Nitroso myoglobin) ซึ่งเป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์.

สำหรับในประเทศไทยเทคโนโลยีการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมได้เข้ามามีบทบาทต่อการผลิตอาหารหมักคอง โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์แหม ซึ่ง Wiriacharee (1990) ได้ศึกษาทดลองนำเชื้อทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการผลิตแหม และพบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพแหมได้ โดยผลิตภัณฑ์มีการผลิตกรดที่ต่ำ แหมมีคุณภาพดีมากในแง่ลักษณะเนื้อสัมผัสและสี และมีความปลอดภัยต่อการบริโภคสูง แต่ก่อนที่จะมีการศึกษาต่อไปในด้านกรรมวิธีการผลิต ควรศึกษาเกี่ยวกับจุลศาสตร์ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด เพื่อให้ทราบถึงพฤติกรรมและการเจริญ การใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานในการศึกษา และพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ชนิดต่อไป.

จุลศาสตร์ของ *Micrococcus varians* มีความสำคัญโดยเฉพาะในด้านความสามารถวิธีในแบคทีเรียให้เป็นไนโตรที่ ซึ่งมีผลให้เกิดสีในผลิตภัณฑ์ขึ้นดังกล่าวข้างต้น เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ในการเจริญเติบโตเพื่อให้มีกิจกรรมสูงสุด โดยในการศึกษาทดลองนี้จะศึกษาถึงอัตราการใช้สารอาหาร (กลูโคส) (Specific substrate uptake rate; q_s) อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดโดยวัดในรูปน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Maximum specific growth rate; μ_{max}) ตลอดจนอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (Specific product rate; q_p) ซึ่งในที่นี้คือกรดแลคติก และประสิทธิภาพในการเปลี่ยนไนโตรที่เป็นไนโตรที่ของเชื้อ *M. varians* ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับปริมาณของสารไนโตรและกลูโคสที่จำเป็นในการผลิตแหมเพื่อให้ได้คุณภาพตามต้องการ.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากจุลินทรีย์ *Micrococcus varians* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Difco) และในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปดังกล่าวพบว่ามีกลูโคสอยู่ในปริมาณต่ำ (ปริมาณร้อยละ 0.2) ดังนั้น จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ในการศึกษาทดลองนี้และเติมสารละลายกลูโคสเพิ่มเข้าไปที่หลัง เพื่อเป็นปัจจัยในการศึกษาการใช้ไปของกลูโคส โดยเชื้อในแบคทีเรียเชิงแบคทีเรีย

ดังกล่าว วิธีการคือ นำอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายกลูโคส (ร้อยละ 20) มาเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงให้เย็นแล้วเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ให้มีปริมาณกลูโคสระดับต่าง ๆ ดังนี้

1. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.22 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.25 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.275 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.30 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.35 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.40 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับในการศึกษาจุลศาสตร์การเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ อาศัยการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน แต่ให้มีปริมาณกลูโคสในอาหารเท่ากันคือ ร้อยละ 0.22 แล้วเติมสารละลายโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร BHI ดังกล่าว ให้มีปริมาณต่าง ๆ ดังนี้

1. ปริมาณโซเดียมไนเตรท 100 ส่วนในล้านส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ปริมาณโซเดียมไนเตรท 200 ส่วนในล้านส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ปริมาณโซเดียมไนเตรท 300 ส่วนในล้านส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ปริมาณโซเดียมไนเตรท 400 ส่วนในล้านส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. ปริมาณโซเดียมไนเตรท 500 ส่วนในล้านส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ.

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

M. varians ถูกเตรียมขึ้นเป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในปริมาณเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เชื้อยาให้เข้ากัน จะได้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นตามต้องการ (การเตรียมในขั้นนี้อาศัยเทคนิคปลอดเชื้อทั้งสิ้น).

วิธีการทดลอง

ปีเปกเชื้อ *M. varians* บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณร้อยละ 5 เชื้อยาให้เข้ากัน บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำมาสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาหน้าหนักของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ปริมาณกรดทั้งหมด คิคเทียบกรดแลคติกและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และสำหรับการศึกษาจุลศาสตร์การเปลี่ยนไนโตรเจนให้สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาไนไตรท์ที่เหลืออยู่ (Residual nitrite) เมื่อเวลาผ่านไป 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ.

วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) กับน้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของเซลล์

เปิดเชื้อ *M. varians* บริสุทธิ์ที่เตรียมโคลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปในปริมาณร้อยละ 5 เขย่าให้เข้ากัน เก็บบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำมาผสมตัวอย่างเพื่อนำไปวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในรูปของความขุ่น ซึ่งได้เป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง Bausch and Lomb Spectronic 21 spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทั้งนี้ ตัวอย่างดังกล่าว 1 มิลลิลิตร จะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัด จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาปั่นแยกเซลล์ที่ 2,000 รอบต่อนาที ในอาหารส่วนบนออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จนน้ำหนักตะกอนคงที่ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยให้น้ำหนักแห้งของเซลล์เป็นแกนนอนจะได้กราฟมาตรฐานที่ใช้เทียบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ได้.

การวิเคราะห์ทางเคมี

การทดลองทั้ง 6 กลุ่มจะถูกสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ทางเคมี คือค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก (Total acidity as lactic acid) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ตามวิธีของ AOAC (1984), Miller (1959), Pearson (1976), Wriyacharee (1996) และวิธีจารี กับ หินพดักคิติกูล (2533, 2535) และวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่นในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (Pirt, 1975) สำหรับการศึกษาจุลศาสตร์การเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ การทดลองทั้ง 5 กลุ่มจะถูกสุ่มตัวอย่างออกมาเพื่อวิเคราะห์หาค่าไนไตรท์ที่เหลืออยู่ (Residual nitrite) ตามวิธีของ AOAC (1984).

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของ *M. varians* ในรูปของน้ำหนักแห้งที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ในช่วงร้อยละ 0.22-0.40 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Model system) พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมากที่แต่ละระดับความเข้มข้นสารอาหาร (กลูโคส) (ภาพที่ 1) เมื่อเทียบที่เวลาเดียวกัน ซึ่งน้ำหนักแห้งของเซลล์จะอยู่ในช่วง 0.8-0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ น้ำหนักแห้งของเซลล์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่ง

เป็นไปทำนองเดียวกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดเมื่อคิดเทียบกรดแลคติก (ภาพที่ 2) แต่พบว่าเชื้อ *M. varians* นี้สามารถผลิตกรดได้น้อยมากเพียงประมาณร้อยละ 0.17 ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้นที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง และค่าความเป็นกรดค้าง (pH) สุดท้ายประมาณ 6.6 (ภาพที่ 3) ด้วยเหตุนี้เชื้อ *M. varians* จึงไม่ใช่เชื้อหลักในการผลิตกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์ ส่วนอัตราการผลิตกรดแลคติก หรือค่า Specific product rate (qp) พบว่ามีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในแต่ละความเข้มข้นเช่นเดียวกันคือ มีค่าลดลงเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 1.

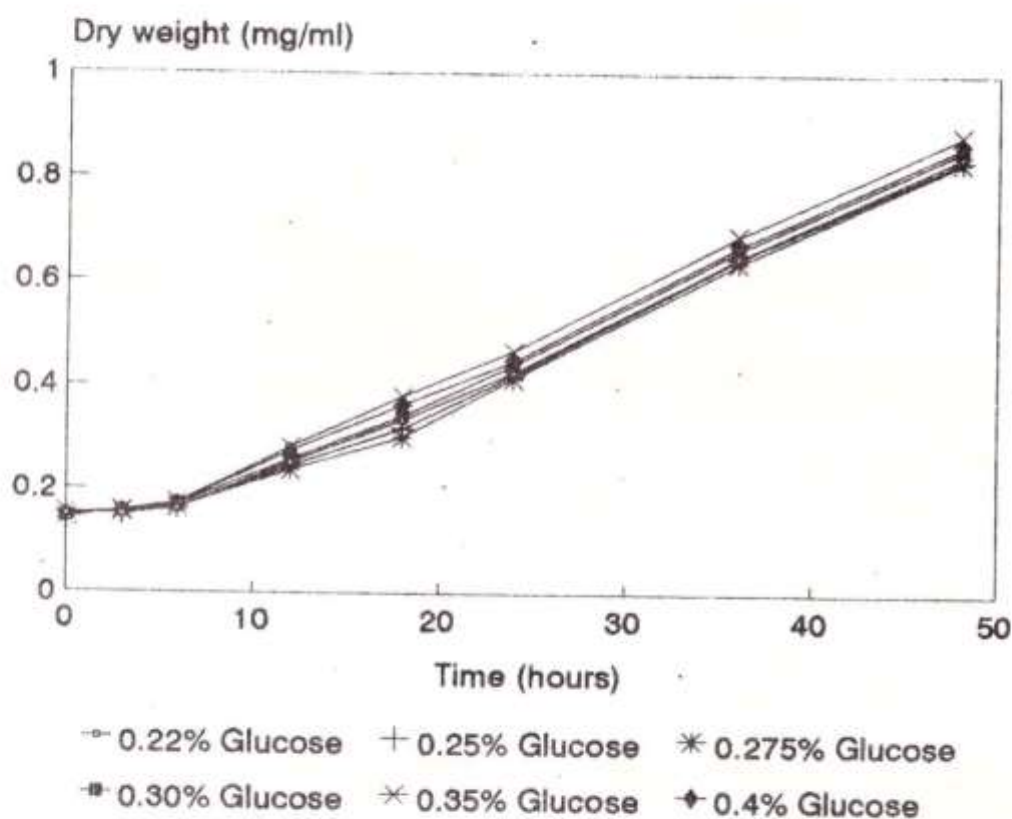


Figure 1 The growth of *M. varians* in term of dry weight (mg/ml) during 48 hours in model system (6 levels of glucose as main factors).

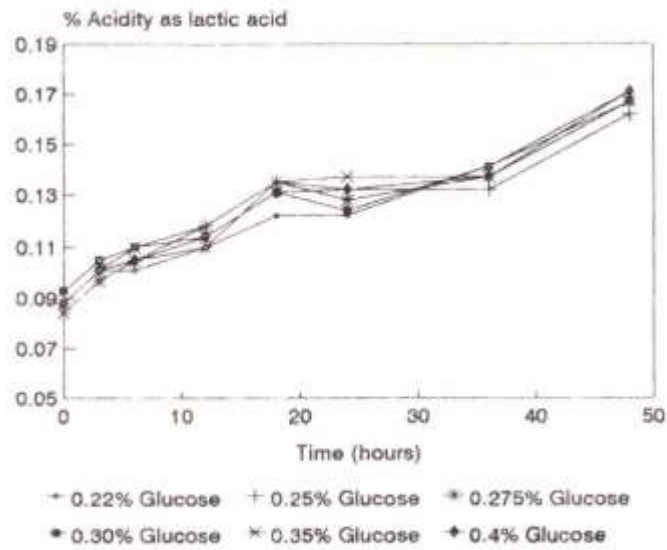


Figure 2 Total acidity as lactic acid (%) changes during 48 hours in model system of *M. varians* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

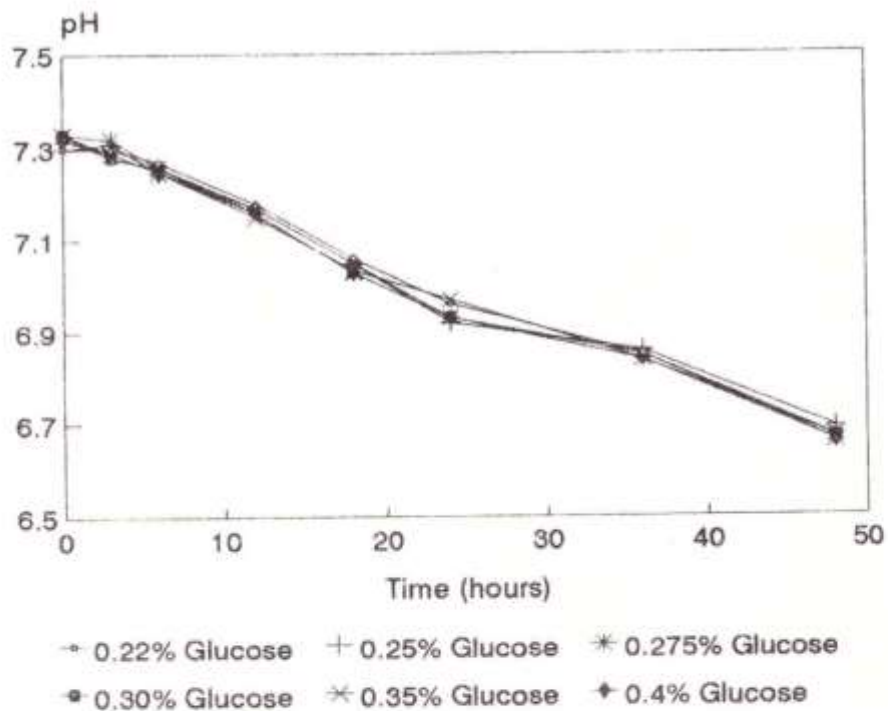


Figure 3 pH changes during 48 hours in model system of *M. varians* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

Table 1 Specific substrate uptake rate (q_s) and specific product rate (q_p) of *M. varians* during 48 hours.

% Glucose	TIME (HOURS)													
	3		6		12		18		24		36		48	
	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p
0.220	0.076	0.058	-0.008	0.022	-0.005	0.013	-0.007	0.012	-0.009	0.009	-0.010	0.010	-0.010	0.009
0.250	0.100	0.061	0.008	0.027	-0.001	0.019	-0.006	0.017	-0.009	0.011	-0.009	0.008	-0.009	0.008
0.275	0.104	0.052	0.018	0.033	0.002	0.016	-0.005	0.018	-0.008	0.011	-0.008	0.009	-0.009	0.009
0.300	0.102	0.051	0.025	0.026	0.005	0.014	-0.004	0.014	-0.007	0.008	-0.009	0.009	-0.010	0.009
0.350	0.114	0.053	0.017	0.035	0.004	0.019	-0.003	0.018	-0.010	0.014	-0.010	0.010	-0.009	0.010
0.400	0.104	0.054	0.028	0.028	0.004	0.016	-0.002	0.016	-0.006	0.012	-0.008	0.010	-0.007	0.010

Note :

- $q_s = -u / y_{x/s}$ (% glucose / mg cells / hr)
- $q_p = Y_{p/x} u$ (% acidity / mg cells / hr)

$Y_{x/s}$ = Cell yield (mg cells / % glucose)
 $= (X - X_0) / (S_0 - S)$

$Y_{p/x}$ = Product yield (% acidity / mg cells)
 $= (P - P_0) / (X - x_0)$

สำหรับการใช้สารอาหาร (กลูโคส) ของ *M.varians* พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีอัตราการใช้สารอาหารที่ใกล้เคียงกัน สังเกตได้จากค่า Specific substrate uptake rate (qs) ในแต่ละช่วงเวลา (ตารางที่ 1) และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ในระบบการหมัก (ภาพที่ 4) พบว่าในช่วงเริ่มต้นประมาณ 3-6 ชั่วโมงแรกของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในทุกความเข้มข้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการสลายสารอาหารประเภทอื่นที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ.

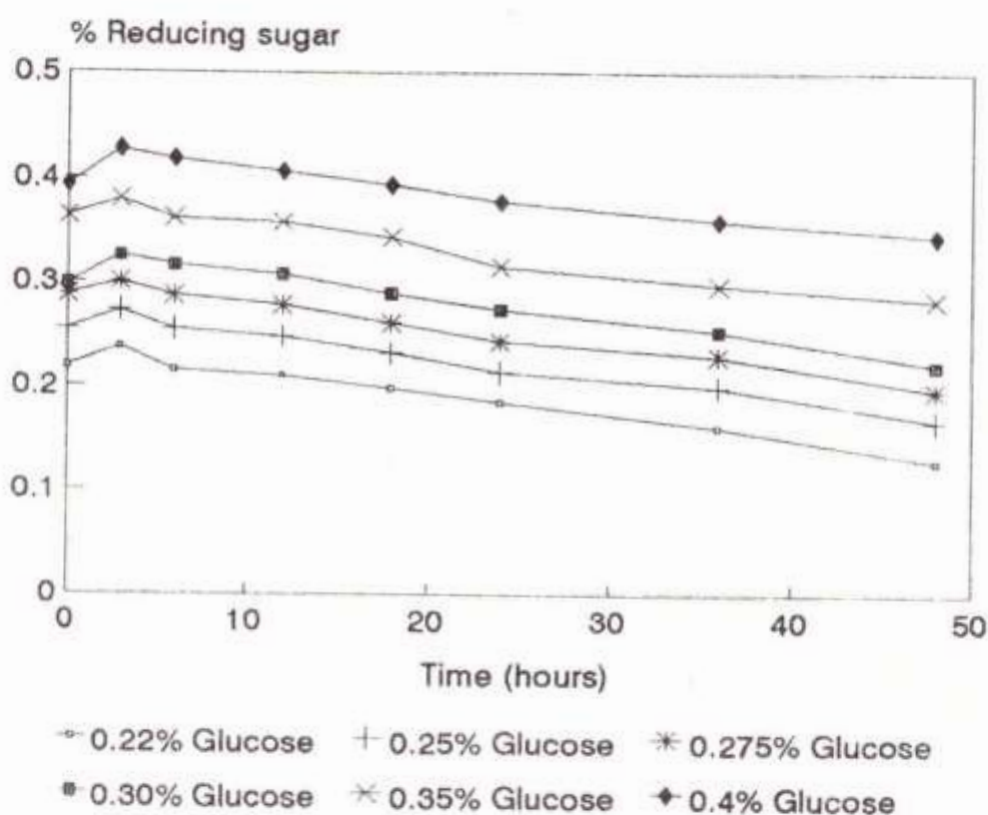


Figure 4 Reducing sugar changes during 48 hours in model system of *M.varians* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

ส่วนค่า Specific growth rate (μ) ที่ได้จากการคำนวณในช่วง Exponential phase พบว่ามีค่าแตกต่างกันคือ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5) แต่ที่ความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.4 พบว่าค่า μ หรืออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *M.varians* ลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นกลูโคสระดับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *M.varians* โดยตรงก็ได้.

อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ความเข้มข้นกลูโคสต่ำกว่าร้อยละ 0.4 สอดคล้องกับสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า μ กับค่าความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (S_0) ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในระบบการหมักโดย J.Monod ที่พบว่าค่า μ จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (วิริยาริ, 2535).

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S_0}{K_s + S_0}$$

และเพื่อให้ง่ายต่อการคำนวณหาค่า Maximum specific growth rate (μ_m) และค่า Saturation constant (K_s) จึงเปลี่ยนสมการดังกล่าวให้อยู่ในรูปสหการเชิงเส้นตรง ดังนี้ (ภาพที่ 6)

$$\begin{aligned} 1/\mu &= (K_s/\mu_m \cdot 1/S_0) + 1/\mu_m \\ \text{intercept} &= 1/\mu_m \\ \text{slope} &= K_s/\mu_m \end{aligned}$$

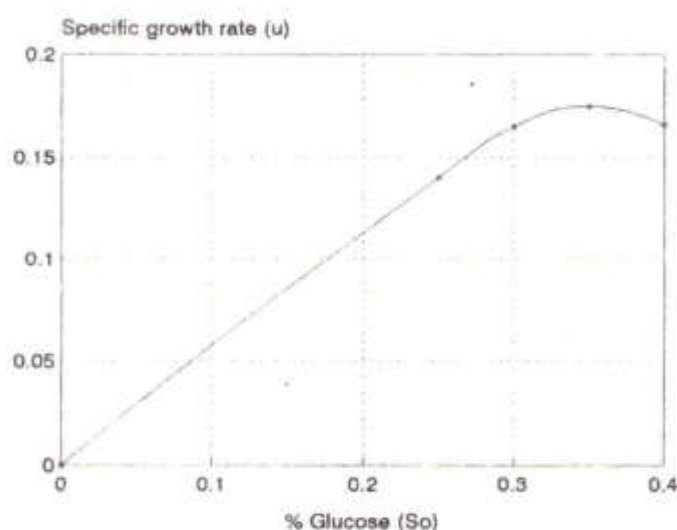


Figure 5 Specific growth rate (μ) of *M.varians* in model system.

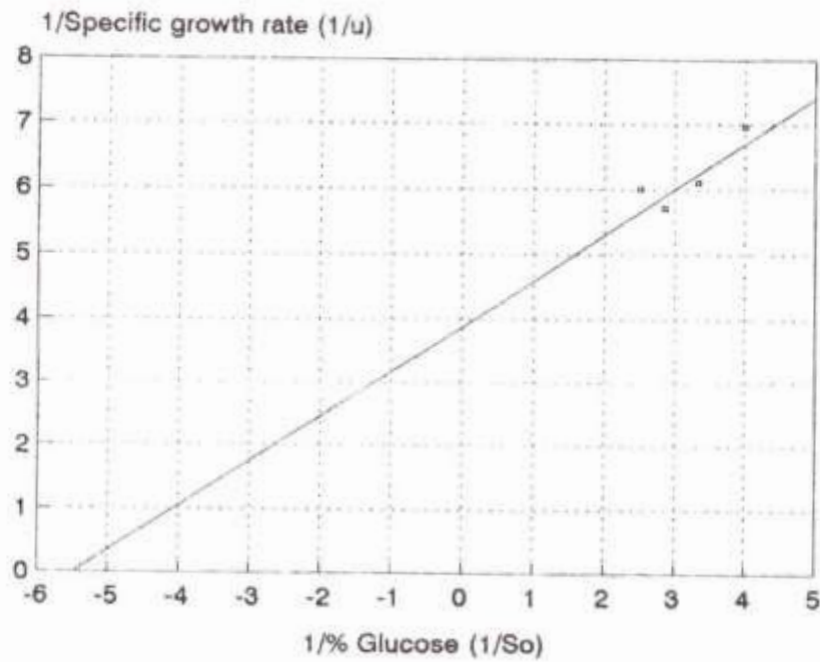


Figure 6 Maximum specific growth rate (u_m) and saturation constant (K_s) of *M.varians* in model system.

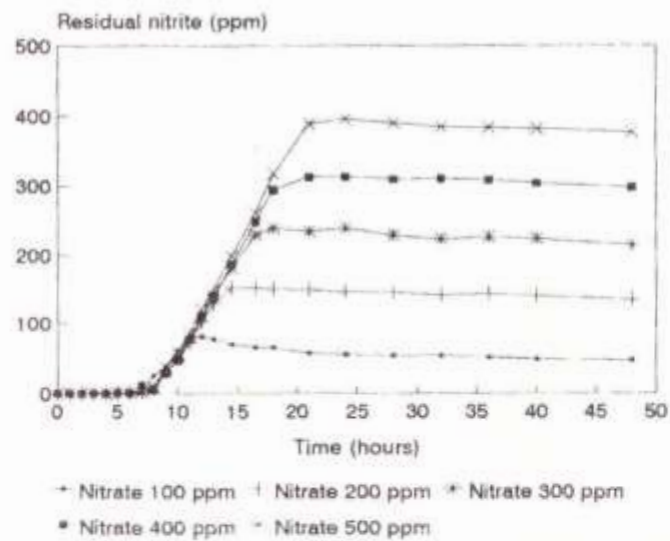


Figure 7 Changing of residual nitrite (ppm.) by *M.varians* in model system during 48 hours (use 0.22 % glucose as initial substrate).

สำหรับในการทดลองนี้พบว่าค่า Maximum specific growth rate (μ_m) มีค่าเป็น 0.2534 ชั่วโมง⁻¹ และ Saturation constant (K_s) มีค่าร้อยละ 0.1799 ซึ่งหมายความว่าเชื้อ *Mvarians* ต้องการปริมาณแกลูโคสเท่ากับร้อยละ 0.1799 เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตไปได้ครึ่งหนึ่งของ Exponential phase ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งถ้าปริมาณแกลูโคสน้อยกว่านี้การเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว จะเป็นไปได้ไม่สมบูรณ์.

เมื่อพิจารณาสารอาหารเริ่มต้น (แกลูโคส) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการทำกิจกรรมของเชื้อ *Mvarians* พบว่าที่ความเข้มข้นแกลูโคสร้อยละ 0.22 ก็เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้น จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการรีดิวไนเตรทเป็นไนไตรท์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่ากิจกรรมดังกล่าว จะเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเวลาการหมักผ่านไปประมาณ 3-4 ชั่วโมง แต่สังเกตเห็นได้ชัดเจนที่เวลาประมาณ 8 ชั่วโมงจากกราฟในภาพที่ 7 โดยเชื้อ *Mvarians* ใน Model system นี้มีจำนวนมากพอที่จะทำกิจกรรมดังกล่าว ซึ่งพบว่าสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ประมาณร้อยละ 80 ที่ทุก ๆ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เติมลงไป หลังจากนั้นค่าไนไตรท์ที่เหลืออยู่ (Residual nitrite) ที่ตรวจพบจะลดลงเล็กน้อย ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจมีการสลายตัวไปอยู่ในรูปสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ (NO , N_2) ซึ่งจากการศึกษาจุลศาสตร์ของ *Mvarians* ในด้านการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์พบว่าเชื้อ *Mvarians* เองสามารถสร้างกรดได้ด้วย จึงอาจทำให้ไนไตรท์ที่ได้เปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูปไนไตรคออกไซด์ แต่สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเนื้อหมัก ปริมาณกรดที่สร้างจาก *Mvarians* เพียงเชื้อเดียวอาจจะไม่เพียงพอต่อการเกิดไนไตรคออกไซด์ จึงจำเป็นต้องอาศัยเชื้อชนิดอื่นที่ผลิตกรดได้ร่วมด้วย เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* สำหรับอัตราการเกิดสารประกอบไนไตรท์ หรือค่า Specific product rate (qp) พบว่าจะเริ่มมีค่าสูงที่เวลาการหมักผ่านไปประมาณ 12 ชั่วโมง ส่วนจะมีค่าสูงที่เวลาการหมักใดขึ้นกับความเข้มข้นของไนเตรทใน Model system ดังตารางที่ 2.

Table 2 Specific product rate (qp) (Residual nitrite) of *M.varians* during 48 hours (use 0.22 % glucose as initial substrate).

SODIUM NITRATE (ppm.)	TIME (HOURS)						
	6	6	12	18	24	36	48
100	0.00	1.05	48.29	22.89	14.09	8.76	5.25
200	0.04	1.04	61.44	52.94	37.50	25.32	15.38
300	0.00	1.22	67.34	84.07	60.92	40.28	24.32
400	0.02	1.06	66.54	103.38	80.24	54.62	33.77
500	0.17	1.82	73.51	111.48	101.48	68.47	42.71

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาจุลศาสตร์ของเชื้อ *Micrococcus varians* ซึ่งเป็นไนโตรเจนตรึง แบคทีเรียพบว่ามีค่า Maximum specific growth rate (μ_m) เท่ากับ 0.2534 ชั่วโมง⁻¹ และต้องการปริมาณกลูโคสอย่างน้อยที่สุดในการเจริญเติบโตให้ได้ครึ่งหนึ่งของ Exponential phase ร้อยละ 0.1799 เชื้อชนิดนี้สร้างกรดลิกเตนกับกรดแลคติกได้น้อยมาก แต่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นไนไตรท์ได้ถึง ร้อยละ 80 อย่างไรก็ตามในการใช้ประโยชน์จริง ๆ ในระบบการหมักควรมีสภาพความเป็นกรดค่อนข้างสูงเพื่อให้เกิดสมดุลแก๊สอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของไนไตรท์ ดังนั้นจึงควรใช้ *M.varians* นี้ร่วมกับแลคติกแอซิกแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งจะทำได้คุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ติดตามต้องการ.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พันธุ์ชีวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนการวิจัย มา ณ โอกาสนี้ด้วย.

เอกสารอ้างอิง

- วริยจารี, ไพโรจน์. และ หันพงศ์กิตติกุล, อรุณ. (2533, 2535). ปฏิบัติการอุตสาหกรรมการหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วริยจารี, ไพโรจน์. (2535). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- AOAC. (1984). Official Methods of Analysis (13th edition) Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Bacus, J. (1984). Utilization of Microorganisms in Meat Processing. Research Studies Press, Ltd., England.
- Bacus, J.N., and Brown, W.L. (1981). Use of microbial cultures : Meat products. Food Technol. 35 : 74 -78, 83.
- Coretti, K. (1977). Starter cultures in the meat industry. Die Fleischwirtschaft. 3 : 368 - 388.
- Daly, C., Chance, M.L., Sandine, W.E., and Elliker, P.R. (1973). Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter cultures and chemical acidulation. J. Food Sci. 38 : 426 - 430.
- Deibel, R.H., and Niven, C.F., Jr. (1957). *Pediococcus cerevisiae* : A starter culture for summer sausage. Bacteriol. Proc. 14-15.
- Deibel, R.H., Niven, C.F. Jr., and Wilson, G.D. (1961). Microbiology of meat curing III. Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sausages. Appl. Microbiol., 9 : 156-165.
- Everson, C.W., Danner, W.E., and Hammes, P.A. (1970). Bacterial starter cultures in sausage products. J. Agr. Food Chem. 18 : 570-571.
- Gibbs, P.A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, 515-585.
- Gilliland, S.E. (1985). Bacterial Starter Cultures for Foods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- H-kittikun, A., Wiriacharee, P., and Rujanakraikarn, L. (1988). Nham (Thai fermented pork) making with starter cultures. p. 427-429. In Proceedings 34th International Congress of Meat Science and Technology. Brisbane, Australia.

- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31 : 426-428.
- Niinivaara, F.P. (1955). The influence of pure bacterial cultures on aging and changes of the red color of dry sausage. *Suomen Maataloustieteellisen Seuran Julkaisuja No.84, Acta Agr. Fennica (Helsinki)*. 97 : 45-49.
- Nurmi, E. (1966). Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. Thesis, University of Helsinki, Finland. *Acta Agr. Fennica*. No.108.
- Pearson, D. (1976). *The Chemical Analysis of Food*. Churchill Livingstone. London and New York.
- Pirt, A.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publication. London.
- Wiriacharee, P. (1990). The Systematic Development of a Controlled Fermentation Process Using Mixed Bacterial Starter Cultures for Nham, a Thai Semi-dry Sausage. Ph.D. Thesis in Product Development in Food Fermentation, Massey University, New Zealand.
-