ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *Bacillus cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย

EFFECT OF HEAT TREATMENT, TIME AND POTASSIUM SORBATE ON SURVIVAL OF *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES IN THAI PANDAN CUSTARD PRODUCTION

สายรุ้ง พวงบุรี

SAIRUNG PUANGBUREE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AI-M-054-245

ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *Bacillus cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย

EFFECT OF HEAT TREATMENT, TIME AND POTASSIUM SORBATE ON SUVUVAL OF *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES IN THAI PANDAN CUSTARD PRODUCTION

สายรุ้ง พวงบุรี

SAIRUNG PUANGBUREE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

KMITL-2015-AI-M-054-245

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF HEAT TREATMENT, TIME AND POTASSIUM SORBATE ON SUVUVAL OF *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES IN THAI PANDAN CUSTARD PRODUCTION

SAIRUNG PUANGBUREE

A THESIS SUBMITTED IN PATIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2015

KMITL-2015-AI-M-054-245

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลาและการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *Bacillus cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย

EFFECT OF HEAT TREATMENT, TIME AND POTASSIUM SORBATE ON SURVIVAL OF *Bacillus cereus* CELLS AND SPORES IN THAI PANDAN CUSTARD PRODUCTION

ชื่อนักศึกษา นางสายรุ้ง พวงบุรี

รหัสประจำตัว 56608021

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์	
ดร.กิตติชัย บรรจง	
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์	

วัน / เดือน/ ปีที่ 8 ธันวาคม 2558 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 21 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใช้ความร้อน ระยะเวลา และการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *Bacillus cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย
นักศึกษา	นางสายรุ้ง พวงบุรี
รหัสนักศึกษา	56608021
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการประเมินคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตสังขยาใบเตย จากโรงงานขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลางของประเทศไทย โดยแบ่งวัตถุดิบออกเป็น 2 ประเภท คือ วัตถุดิบที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ ใบเตยสด ไข่ไก่สด และกะทิพาสเจอไรซ์ สุ่มเก็บตัวอย่าง มาอย่างละ 20 รุ่นการผลิต และวัตถุดิบที่มีความเสี่ยงต่ำ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และน้ำตาลทราย สุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 10 รุ่นการผลิต ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชี้บ่งคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ Aerobic Plate Count, Yeasts & Molds, Coliforms, *E. coli, Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* พบว่าใบเตยสดตรวจพบเชื้อชนิดก่อโรคปนเปื้อนได้แก่ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) ปริมาณ 3.40 ± 0.45 log CFU/g และ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (10%) ปริมาณ 23 - 93 MPN/g และไข่ไก่สด ตรวจพบเชื้อชนิดก่อโรค *Salmonella* spp. จำนวน 4 ตัวอย่าง (20%) ในขณะเดียวกันได้สุ่มตัวอย่างสังขยาใบเตย มาจำนวน 20 รุ่นการผลิตๆ ละ 3 ถุง ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ตรวจพบ *B. cereus* จำนวน 9 ตัวอย่าง (45%) ปริมาณตั้งแต่ 2.0 ถึง 3.9 log CFU/g โดยในวันที่ 0 วัน พบ 3 ตัวอย่าง (15%) วันที่ 1 พบ 5 ตัวอย่าง (25%) และวันที่ 2 พบ 9 ตัวอย่าง (45%) ในขณะที่ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในวัตถุดิบ โดยเชื้อ *B. cereus* ที่พบในใบเตยสดส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ที่ทนความร้อนสูง จากการทดลองระยะเวลาในการผลิตสังขยาใบเตย โดยให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส อุณหภูมิกึ่งกลางเฉลี่ยของสังขยาใบเตยอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 60 นาที พบว่าเซลล์ของ *B. cereus* ที่เติมในปริมาณที่ตรวจพบการปนเปื้อน (4 log CFU/g) ในนาทีที่ 30 ปริมาณลดลงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ไม่เกิน 100 CFU/g และในนาทีที่ 50 ตรวจไม่พบปริมาณเชื้อ เซลล์ที่เติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง Worst case (6 log

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CFU/g) ในนาทีที่ 60 ตรวจพบ 3.11 $\pm$ 0.06 log CFU/g ส่วนสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในนาทีที่ 60 ของเชื้อเริ่มต้นที่ระดับต่ำ ตรวจพบ 3.84 $\pm$ 0.19 log CFU/g และสปอร์ที่ระดับสูง Worst case ตรวจพบ 4.69 $\pm$ 0.30 log CFU/g ซึ่งยังเกินเกณฑ์กฎหมายกำหนด แสดงว่าความร้อนในการผลิตสังขยาใบเตยไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้ จึงได้ศึกษาผลร่วมระหว่างความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส และสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต ซึ่งผู้ประกอบการนิยมใช้ โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.07% นำไปผ่านกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยพบว่าหลังผ่านความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์ลดลง เฉลี่ย 1.42 log CFU/g และโปแตสเซียมซอร์เบตทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยในชั่วโมงที่ 72 พบสังขยาใบเตยเสื่อมเสีย มีกลิ่นบูดเหม็นเปรี้ยวในทุกตัวอย่าง และปริมาณเชื้อ *B. cereus* เพิ่มขึ้นเฉลี่ยจากชั่วโมงที่ 0 ไปชั่วโมงที่ 168 ประมาณ 1.56 log CFU/g อันเนื่องมาจากค่า pH ของสังขยาใบเตยหลังกวนมีค่าอยู่ในช่วง pH 6.25 - 6.28 ซึ่งเป็นช่วงค่า pH ที่โปแตสเซียมซอร์เบตแตกตัวกรดซอร์บิคได้เพียงเล็กน้อย จากการทดลองปรับ pH ร่วมกับการเติมโปแตสเซียมซอร์เบต 0.07% พบว่าที่ค่า pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ได้ และจากผลการทวนสอบกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยเพิ่มการทำความสะอาดใบเตยสด ตัดแต่งโคนไม่ให้มีคราบดินโคลน ล้างด้วยน้ำสะอาดและแช่ด้วยสารละลายคลอรีนเข้มข้น 50 ppm นาน 10 นาที ก่อนนำไปผลิตสังขยาใบเตย หลังการผลิตสังขยาใบเตยด้วยเครื่องกวนขนาดเล็ก และนำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ทุกตัวอย่างเกินกฎหมายกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effect of heat treatment, time and potassium sorbate on survival of *Bacillus cereus* cells and spores in Thai Pandan custard production
Student	Mrs. Sairung Puangburee
Student ID	56608021
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2015
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate microbiological quality of Thai pandan custard and their main ingredients used in the product such as pandan leaves, whole egg, pasteurized coconut milk, cornstarch, wheat flour and sugar. The ingredients and Thai pandan custard were collected from some small and medium enterprises in the center of Thailand by sampling 20 samples of high risk ingredients (pandan leaves, whole egg, pasteurized coconut milk), 10 samples of low risk ingredients (cornstarch, wheat flour, sugar) and 20 samples of Thai pandan custard. The samples were tested for quality and safety microbiological including Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. It was found that *B. cereus* was mostly detected in pandan leaves. This pathogenic microorganism was found to contaminate of 19 samples the leaves (95%) with load 3.10 $\pm$ 0.45 log CFU/g. Besides, *S. aureus* was detected in two samples (10% of the leave sample) with load 23 - 93 MPN/g. *Salmonella* spp. was shown positive in four samples (20% of whole egg samples). Moreover, *B. cereus* was detected in three samples (15%) of the sampling Thai pandan custard at 0-day storage, the detection of this microorganism in the samples was raised up to five samples (25%) after one-day storage at room temperature and the positive samples were raised up to 9 samples (45%) after two-day storage with the microbial load from 2.0 to 3.9 log CFU/g, while *Salmonella* spp. and *S. aureus* were not detected in any sample of pandan custard products. The study of bacterial spores count in fresh pandan leaves revealed that most of spores found in the fresh pandan leaves were *B. cereus.* Validation the survival of *B. cereus* vegetative cells and spores by heat treatment at 95^{o}C in water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bath and let the core temperature of pandan custard lead up to 80°C within 60 mins. The results revealed that *B. cereus* vegetative cells were totally diminished from 4.37 ± 0.21 log CFU/g (at 0 min) after heated Thai pandan custard samples for 50 mins. In worst case samples which vegetative cells of *B. cereus* were spiked in the samples for 6.10 ± 0.08 log CFU/g, the cells were reduced to 3.11 ± 0.06 log CFU/g after heated for 60 mins. The spores of *B. cereus* which were spiked in pandan custard samples from 4.75 ± 0.06 log CFU/g were reduced to 3.84 ± 0.19 log CFU/g heated for 60 mins and worst case were reduced from 6.30 ± 0.45 log CFU/g to 4.69 ± 0.30 log CFU/g, that were not conformed to standard for pathogenic microorganism in food (Thai FDA, 2013). The results also showed that cooking of this product with high number of *B. cereus* spores below 100°C cannot diminish the whole contaminated spores of this pathogenic microorganism. Combination of heat treatment and preservative (potassium sorbate) at 0.04 and 0.07% showed no significant impact ($p \leq 0.05$) on the inactivation of *B. cereus* vegetative cells and spores. *B. cereus* vegetative cells and spores were average reduced 1.42 log CFU/g after heated pandan custard samples and products of pandan custard were spoiled after storage at room temperature for 72 hrs. *B. cereus* vegetative cells and spores had increased average 1.56 log CFU/g in the pandan custard samples with 0.07% of potassium sorbate after keeping in the room temperature for 168 hrs due to the pH of the pandan custard samples were 6.25-6.28, thus, no inhibitory effect from potassium sorbate on *B. cereus* occurred in the samples . Validation process of Thai pandan custard at some small and medium enterprises by washed in clean water and sanitizing pandan leaves by soaking in chlorine solution 50 ppm for 10 mins before pandan custard production had been investigated. It was implied that when adding the washing and sanitizing step of pandan leaves before production, *B. cereus* could be reduced effectively after heated process by small table top mixer. The pandan custard products produced by the adding of washing and sanitizing step of pandan leaves before production, the products could be stored at room temperature for 168 hrs and conformed with the standard which set by Thai FDA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อพัชชา จินดาประเสิริฐ และ ดร. กิตติชัย บรรจง กรรมการสอบหัวข้อและโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้เสนอแนะการอภิปรายผลจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้

ขอขอบคุณคุณดวงดาว วงศ์สมมาตร และคุณสมภพ วัฒนมณี สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อ

ขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท คณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกสาขา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและการอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคุณสุนันทา ชวนประพันธ์ที่ให้ลาศึกษาต่อ และคุณวาสนา เพ็งพี ที่สอนวิธีการทำสังขยาใบเตยและอนุเคราะห์ตัวอย่าง

ที่สำคัญที่สุดขอขอบคุณบิดา มารดา ครอบครัว และคุณณัฐพงษ์ พวงบุรี สามีที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ กำลังใจที่ดีเสมอมาและคอยเคี่ยวเข็ญให้การทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

สายรุ้ง พวงบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 สังขยาใบเตย..... 4

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย..... 4

2.1.2 วิธีการผลิตสังขยาใบเตย..... 11

2.1.3 เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสังขยา (มผช. 527/2547)..... 12

2.2 วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่..... 14

2.2.1 กลไกลในการชะลอการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ของวัตถุกันเสีย..... 14

2.2.2 ประเภทวัตถุกันเสีย..... 14

2.3 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสังขยาใบเตย (Microbial Contaminate)..... 19

2.4 *Bacillus cereus* 20

2.4.1 ลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus* 20

2.4.2 การก่อโรคและการระบาด..... 20

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย..... 24

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ..... 24

3.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทำสังขยาใบเตย. 24

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ..... 24

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ 25

3.5 เครื่องมือ 26

3.6 อุปกรณ์ 27

3.7 สถานที่ดำเนินการทดลอง..... 28

3.8 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง 28

3.9 วิธีการทดลอง..... 28

3.9.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตและสุ่มเก็บตัวอย่างสังขยาใบเตย ในโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลางมาทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์..... 28

3.9.2 ศึกษาระยะเวลาในการความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ที่มีผลต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* 36

3.9.3 ศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ต่อการยับยั้งของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*..... 39

3.9.4 ทวนสอบ (Validate process) กระบวนการผลิต..... 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 41

4.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ในตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตและสังขยาใบเตย ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง..... 41

4.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ในผลิตสังขยาใบเตย..... 41

4.1.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสปอร์ *B. cereus* ในวัตถุดิบ..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.3 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สังขยาใบเตย…….. 47

4.2 ศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับปริมาณเชื้อตามที่ตรวจพบ (3-4 log CFU/g) และปริมาณเชื้อในระดับ Worst Case (6 log CFU/g) ในการผลิตสังขยาใบเตย…….. 52

4.2.1 การเตรียมเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ที่ได้จากการปนเปื้อนในสังขยาใบเตย ……. 52

4.2.2 ทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้การผลิตสังขยาใบเตย ปริมาตร 2 กิโลกรัมต่อรุ่นการผลิต …….. 52

4.2.3 ผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ที่มีต่อการเหลือรอดของเซลล์ และสปอร์ *B. cereus*…….. 53

4.3 ศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*……..……. 57

4.4 ทวนสอบ (Validate process) กระบวนการให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ในการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง …….. 61

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง …… 64

5.1 สรุปผลการทดลอง ……... 64

5.2 ข้อเสนอแนะ …… 66

บรรณานุกรม ……. 67

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ …… 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ข การตรวจวิเคราะห์เชื้อและวิธีการวัด pH และค่าความหวาน..... 86

ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง..... 95

ประวัติผู้เขียน..... 108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เกณฑ์ที่กำหนดทางจุลินทรีย์ของกะทิสำเร็จรูป …….	9
2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด	16
2.3 สรุปลักษณะอาการก่อโรคอาหารเป็นพิษ ของเชื้อ *Bacillus cereus*……	21
3.1 รายการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ …….	30
4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพ และปริมาณที่ตรวจพบในวัตถุดิบ (Food quality indicator results of high and low risk ingredients) …….…….	43
4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร และปริมาณที่ตรวจพบในวัตถุดิบ (Food safety results of high and low risk ingredients) ……	45
4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพในสังขยาใบเตย และปริมาณที่ตรวจพบ (Food quality of Thai Pandan Custard (n = 20) …….……..……	48
4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหารในสังขยาใบเตย (Food safety of Thai Pandan Custard) (n = 20) ……..……..	49
4.5 ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดจากกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการผลิตสังขยาใบเตย……	56
ข.1.1 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B. cereus*……..	90
ข.1.2 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group ……..	90
ข.1.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus*……..	92
ค.1 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบใบเตยสด ……..	96
ค.2 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบกะทิพาสเจอร์ไรซ์ …….	97
ค.3 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบไข่ไก่สด ……	98
ค.4 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบแป้งข้าวโพด …….	99
ค.5 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบแป้งสาลี ……	99
ค.6 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบน้ำตาลทราย ……	100
ค.7.1 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย ในวันที่ 0……..……..	101
ค.7.2 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย ในวันที่ 1 ……..……	102
ค.7.3 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย ในวันที่ 2 ……..……	104
ค.8 แสดงผลการวินิจฉัยสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* จากสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร ……..……..	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ภาพใบเตยสดตัดแต่งทั้งใบหลังล้างน้ำสะอาด (2.1a) และใบเตยหั่นหยาบ (2.1b)…….. 5

2.2 ไข่ไก่ทั้งฟอง (2.2a) ไข่เหลวหรือไข่ไก่ที่ผ่านการตอก (2.2b-2.2c)……..…….…….. 6

2.3 สังขยาใบเตยสำหรับสอดไส้ขนมปังหรือผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (2.3aและ 2.3b) และสังขยาใบเตยสำหรับจิ้มขนมปังหรือปาท่องโก๋บรรจุในกระปุกพลาสติก (2.3c)…….. 12

2.4 สูตรโครงสร้างของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต ……..…….. 16

2.5 กราฟแสดงค่า pH ที่มีต่อผลต่อการแตกตัวของโปแตสเซียมซอร์เบต เป็น กรดซอร์บิค..... 18

3.1 ขั้นตอนการผลิตสังขยาใบเตย …..……..……. 35

4.1 แสดง *B. cereus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP เชื้อ *B. cereus* จากใบเตยก่อน Heat Shock (4.1a) หลัง Heat Shock (4.1b) และ Hemolytic activity บนอาหาร TSA- Sheep Blood ซึ่ง *B. cereus* ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จะเกิดโซนใสรอบโคโลนี (4.1c) ……. 47

4.2 แสดงปริมาณของ *B. cereus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างสังขยาใบเตย ที่อายุ 0 วัน 1 วัน และ 2 วัน จำนวน 20 ตัวอย่าง (Number of *Bacillus cereus* (Log CFU/g) in Thai pandan)…… 51

4. 3 แสดงลักษณะเซลล์ติดสีม่วงแกรมบวก (4.3a-4.3b) และสปอร์ที่ติดสีเขียวของ Malachite green (4.3c-4.3d) ของเชื้อ *B. cereus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า……. 52

4.4 แสดงผลทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้ผลิตสังขยาใบเตย ที่ให้คุณลักษณะค่าความ TSS และ pH (4.4a) ตามที่กำหนด และอุณหภูมิใจกลางขณะผลิตสังขยาใบเตย (4.4b)……...… 53

4.5 แสดงผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ของเซลล์ที่เชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/g (4.5a), 6 log CFU/g (4.5b) และสปอร์ เชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/g (4.5c), 6 log CFU/g (4.5d) ในการผลิตสังขยาใบเตย…….. 55

4.6 แสดงปริมาณของเชื้อ *B. cereus* ที่เติมลงไปก่อนการผลิตสังขยาใบเตย (Spiked) หลังการผลิต (0 hr) และที่ 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง โดยมีตัวอย่างควบคุมที่เติมเซลล์และสปอร์ *B. cereus* และไม่เติม Sorbate (4.6a) ตัวอย่างที่เติมเซลล์และสปอร์ *B. cereus* และ Sorbate 400 ppm (4.6b) และ Sorbate 700 ppm (4.6c)……. 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.7 แสดงผลของการยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ของโปแตสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 0.04 และ 0.07% ที่ pH 6.0 (4.7a) , pH 5.5 (4.7b) , pH 5.0 (4.7c) และ pH 4.5 (4.7d)……. 60

4.8 แสดงค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (TSS) และค่า pH ที่ช่วงเวลาต่างๆ (4.8a) และอุณหภูมิกึ่งกลางระหว่างผลิตโดยใช้ Water bath ที่ 95°C ของการผลิตสังขยาใบเตย ใบเตย (4.8b) …….. 62

4.9 แสดงผลการตรวจเชื้อ *B. cereus* ในสังขยาใบเตยหลังการผลิตที่โรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็ก จัดเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง……. 62

ข.1.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) *Bacillus cereus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate ….. 87

ข.1.2 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *Bacillus cereus*……. 88

ข.1.3 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group ……. 89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

สังขยา เป็นขนมไทยชนิดหนึ่งที่ขึ้นชื่อ และเป็นที่นิยมมานาน ซึ่งในปัจจุบันได้ขยายกลุ่มผู้บริโภค ไปในแถบภูมิภาคเอเชีย และนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่นิยมรับประทานขนมหวาน โดยสังขยาเป็นที่นิยมในทุกกลุ่มผู้บริโภคทั้งเด็ก วัยรุ่น ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ สังขยา เป็นชื่อเรียกขนม มี 2 ลักษณะ คือ สังขยาที่มีการนำน้ำตาลมะพร้าว กะทิ อาจมีการเพิ่มฟักทอง เผือก มะพร้าวอ่อน ฯลฯ นำไปนึ่ง รับประทานเป็นขนมหวาน หรือรับประทานคู่กับข้าวเหนียวมูนก็ได้ และอีกรูปแบบ คือ ไส้สังขยา เป็นสังขยาอีกลักษณะหนึ่งมีส่วนผสมของ ไข่ น้ำตาลทราย นมหรือกะทิ แป้ง และนำไปตุ๋น หรือกวนให้ข้นหนืด ใช้ทำไส้ จิ้มหรือทาขนมปัง มีหลายรสชาติ ที่ทำง่ายและเป็นที่นิยมมากที่สุด คือ สังขยาใบเตย และสังขยานมสด (อรอนงค์, 2556)

สังขยาใบเตย เป็นรสชาติดั้งเดิมที่นิยมมาก เนื่องจากทำจากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีกลิ่นหอมของใบเตยที่เป็นธรรมชาติ มีรูปแบบในการนำมาบริโภคหลากหลายรูปแบบ เช่น ขนมปังสอดไส้สังขยา ขนมปังหรือปาท่องโก๋จิ้มสังขยา ซาลาเปาไส้สังขยา ขนมปังทาหน้าสังขยา รวมไปถึงเอแคร์ และครีมฮอร์นไส้สังขยา และอื่นๆ

การผลิตสังขยาใบเตยนั้น มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก โดยนำวัตถุดิบส่วนผสม คือ น้ำคั้นใบเตย ไข่ไก่ กะทิ น้ำตาลทรายหรือน้ำตาลมะพร้าว แป้งข้าวโพด แป้งสาลี บางสูตรอาจมีการเติมนมข้นจืดเพื่อให้มีรสชาติหวานมันกลมกล่อมขึ้น และอาจมีการเติมวัตถุปรุงแต่งกลิ่น สี เพื่อเพิ่มความสวยงามน่ารับประทานมากยิ่งขึ้น นำส่วนผสมต่างๆ ผสมให้เข้ากันและทำให้สุกโดยการให้ความร้อนในลักษณะการตุ๋นหรือการกวนบนหม้อนึ่ง คือ มีหม้อ 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นหม้อขนาดใหญ่กว่าใส่น้ำและต้มให้เดือดใช้ไอน้ำให้ความร้อนกับหม้อด้านบนที่มีขนาดเล็กกว่าหนึ่งเบอร์ ในหม้อใบบนนี้มีส่วนผสมใช้ไม้พายหรือตะกร้อกวนไปเรื่อยๆ จนได้สังขยาใบเตยที่เนื้อเนียนข้นหนืดตามต้องการ

การผลิตสังขยาใบเตย มีทั้งในระดับครัวเรือน อุตสาหกรรมขนาดเล็ก (SMEs) จนถึงขนาดใหญ่ หากกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยไม่ถูกสุขลักษณะ ไม่มีการควบคุมที่เหมาะสม อาจมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตได้ ด้วยกระบวนการผลิตใช้อุณหภูมิในการกวนโดยให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิไม่เกิน 100°C ส่วนผสมส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ใบเตย ไข่ไก่ กะทิ เนื่องจากสังขยาใบเตย มีความชื้นสูง ค่า Water Activity (a_w) ประมาณ 0.96 - 0.97 ค่าของแข็งละลายน้ำ ประมาณ 36 - 38 °Brix ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 6.3 - 6.5 จึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้มีอายุการเก็บรักษาสั้น ทั้งนี้ด้วยกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิระดับพาสเจอไรซ์ หากวัตถุดิบมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ก่อโรคและสร้างสปอร์ เช่น เชื้อ *Bacillus cereus* นั้น มีแนวโน้มที่เชื้อดังกล่าวจะเหลือรอด และสปอร์สามารถงอกเจริญเพิ่มจำนวนจนทำให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่ไม่ปลอดภัยได้ จึงทำให้การผลิตสังขยาใบเตยดังกล่าวต้องนำปัจจัยอื่นมาช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผลิตภัณฑ์ เช่นการใช้วัตถุกันเสีย ดังนั้น เพื่อเป็นการรองรับการขยายตัวของตลาด และการเปิดประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC หรือ ASEAN Economics Community) จึงได้ทำการวิจัยกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก เพื่อมุ่งเน้นความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในกลุ่มที่สร้างสปอร์โดยใช้อากาศเป็นหลัก ซึ่งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ระหว่างกระบวนการผลิต จนถึงการบรรจุก่อนส่งจำหน่ายแก่ผู้บริโภค

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาสภาวะของอุณหภูมิความร้อนจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 95 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยที่ใช้สำหรับสอดไส้ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ต่อการลดลงของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus*ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งยังไม่พบรายงานการวิจัยการศึกษาในสังขยาใบเตยมาก่อน ทั้งนี้ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว และใช้เป็นแนวทางในการผลิตสังขยาใบเตย เพื่อรองรับการขยายตลาดสู่ประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจสอบความเสี่ยงของการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งคุณภาพ (Food Quality) ได้แก่Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms และ *Escherichia coli* กับจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (Food Safety) ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* และ*Clostridium perfringens* ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตและสังขยาใบเตย และทำการคัดแยกเชื้อชนิดก่อโรค คือ *B. cereus* ที่พบการปนเปื้อนในสังขยาใบเตย

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของความร้อนและระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยมีผลต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ต่อการยับยั้งเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตย

1.2.4 เพื่อตรวจสอบ (Validate process) กระบวนการการให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตต่อการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ทำการตรวจสอบความเสี่ยงในการพบเชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบที่ใช้ผลิตและในสังขยาใบเตยและทำการคัดแยกเชื้อ *B. cereus* ที่ตรวจพบในสังขยาใบเตยส่งยืนยันผลที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1.3.2 นำเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้มาทดสอบสภาวะการทนความร้อน ที่ระยะเวลาต่างๆ ที่ใช้ในการผลิต โดยใช้ไอน้ำให้ความร้อนจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 95°C ซึ่งจำลองการปนเปื้อนทั้งเซลล์และสปอร์ในระดับปริมาณเชื้อที่ระดับต่ำ (4 log CFU/g) และปริมาณเชื้อในระดับสูง Worst Case (6 log CFU/g) เพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสม

1.3.3 ทำการทดสอบผลของการยับยั้งเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับ Worst Case (6log CFU/g) โดยใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ที่ระดับความเข้มข้น 0.04 และ 0.07% ร่วมกับการให้ความร้อนในการผลิตสังขยาใบเตยและตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในสังขยาใบเตยที่จัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

1.3.4 ทำการตรวจสอบ (Validate process) กระบวนการให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตที่มีผลต่อการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงความเสี่ยงของเชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย

1.4.2 ทราบผลของอิทธิพลร่วมของการใช้ความร้อนและโปแตสเซียมซอร์เบตที่มีผลต่อการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ทั้งเซลล์และสปอร์ในระหว่างการผลิตสังขยาใบเตย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สังขยาใบเตย

สังขยา เป็นขนมไทยชนิดหนึ่งที่ขึ้นชื่อและเป็นที่นิยมมานาน ในปัจจุบันได้ขยายกลุ่มผู้บริโภคไปในแถบภูมิภาคเอเชีย และนักท่องเที่ยวชาวต่างชาติที่นิยมรับประทานขนมหวาน สังขยาที่เรียกในประเทศไทยรู้จักกันมี 2 ลักษณะ คือ รูปแบบแรกเป็นสังขยาที่มีการนำน้ำตาลมะพร้าว กะทิ อาจมีการเพิ่มฟักทอง เผือก มะพร้าวอ่อน ฯลฯ นำไปนึ่ง รับประทานเป็นขนมหวาน หรือรับประทานคู่กับข้าวเหนียวมูนก็ได้ และอีกรูปแบบหนึ่ง คือ ไส้สังขยา เป็นสังขยาอีกลักษณะหนึ่งมีส่วนผสมของ ไข่ น้ำตาลทราย นมหรือกะทิ แป้ง และนำไปตุ๋น หรือกวนให้ข้นหนืด ใช้ทำไส้ จิ้ม หรือทาขนมปัง มีหลายรสชาติ ที่ทำง่ายและเป็นที่นิยมมากที่สุด คือ สังขยาใบเตย และสังขยานมสด (อรอนงค์, 2556)

สังขยาใบเตย เป็นสังขยาสีเขียวกลิ่นใบเตย เป็นรสชาติดั้งเดิมที่นิยม (อรอนงค์, 2556) เนื่องจากทำจากวัตถุดิบที่หาได้ง่าย และมีกลิ่นหอมของใบเตยที่เป็นธรรมชาติ มีรูปแบบในการนำมาบริโภคหลากหลายรูปแบบ เช่น ขนมปังสอดไส้สังขยา ขนมปังหรือปาท่องโก๋จิ้มสังขยา ซาลาเปาไส้สังขยา ขนมปังทาหน้าสังขยา รวมไปถึงเอแคร์และครีมฮอร์นไส้สังขยา และอื่นๆ

การผลิตสังขยาใบเตยนั้น มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก โดยนำวัตถุดิบส่วนผสม คือ น้ำคั้นใบเตย ไข่ไก่ กะทิ น้ำตาลทรายหรือน้ำตาลมะพร้าว แป้งข้าวโพด แป้งสาลี บางสูตรอาจมีการเติมนมข้นจืดเพื่อให้มีรสชาติหวานมันกลมกล่อมขึ้น และอาจมีการเติมวัตถุปรุงแต่งกลิ่น สี เพื่อเพิ่มความสวยงามน่ารับประทานมากยิ่งขึ้น

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ประกอบด้วย ใบเตยสด น้ำสะอาดสำหรับคั้นน้ำใบเตย ไข่ไก่ กะทิ น้ำตาลทราย แป้งข้าวโพด แป้งสาลีชนิดทำเค้ก เป็นส่วนผสมหลัก

2.1.1.1 ใบเตยสด (Pandan leaves)

เตยหอม (*Pandanus odorus Ridl.* หรือ *Pandanusam aryllifolius Roxb.*) เป็นไม้ยืนต้นพุ่มเล็ก ขึ้นเป็นกอ ลำต้นอยู่ใต้ดิน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับเวียนเป็นเกลียวขึ้นไปจนถึงยอด ใบเป็นทางยาวสีเข้มค่อนข้างแข็งเป็นมันขอบใบเรียบ ในใบมีกลิ่นหอมจากน้ำมันหอมระเหย Fragrant Screw Pine สีเขียวจากใบเป็นสีของคลอโรฟิลล์ใช้แต่งสีขนมได้ (ภูมิพิชญ์, 2535) ใบเตยมักถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาใช้ปรุงแต่งกลิ่นสีในอาหาร เพื่อให้มีสีสันสดใสและกลิ่นหอมน่ารับประทาน (พิชัย, 2526) ใช้แต่งสีเขียวให้กับขนมไทยที่ได้รับความนิยมมากที่สุด ใบเตยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ เตยหนามกับเตยหอม เตยหนามนำมาทำอาหารไม่ได้ ที่ใช้ทำอาหารคือ เตยหอม ใบมีกลิ่นหอม สารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมคือ linalyl acetate, bezyl acetate, linolol และ geraniol สีเขียวจากใบเตยเป็นสารคลอโรฟิลล์ เมื่อต้มใบเตยกับน้ำ น้ำที่ได้จะมีสีเหลืองเนื่องจากสาร Xanthaphyll ละลายออกมา (อบเชย, 2543) การสกัดเอาสีเขียวของใบเตย คือนำใบเตยสดมาล้างให้สะอาด ดังภาพที่ 2.1a หลังจากนั้นหั่นใบเตยแบบหยาบดังภาพที่ 2.1b และนำมาโขลกหรือปั่นให้ละเอียด แล้วเติมน้ำอัตราส่วน 1:1 คั้นและกรองเอาแต่น้ำใบเตยสีเขียว

(2.1a) (2.1b)

ภาพที่ 2.1 ภาพใบเตยสดตัดแต่งทั้งใบหลังล้างน้ำสะอาด (2.1a) และใบเตยหั่นหยาบ (2.1b)

เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ สำหรับใบเตยสดที่ใช้นำมาคั้นน้ำใบเตย ผู้วิจัยได้อ้างอิงเกณฑ์จากประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) ในหัวข้ออาหารดิบหรืออาหารอื่นๆ ที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือเป็นส่วนผสม ซึ่งกำหนดเกณฑ์ จำนวนจุลินทรีย์ น้อยกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม *Escherichia coli* น้อยกว่า 100 MPN ต่อกรัม *Staphylococcus aureus* น้อยกว่า 100 MPN ต่อกรัม *Clostridium perfringens* น้อยกว่า 1000 โคโลนีต่อกรัม *Bacillus cereus* น้อยกว่า 1000 โคโลนีต่อกรัม และ *Salmonella* spp. ไม่พบต่อ 25 กรัม

2.1.1.2 ไข่ (Egg)

ไข่เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเมื่อเทียบกับราคาที่ถูก เป็นอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนและเกลือแร่ที่เป็นประโยชน์ และสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิดทั้งอาหารคาวและอาหารหวาน นอกจากนี้ไข่ยังมีคุณสมบัติหน้าที่ต่างๆ ที่ใช้ในการประกอบอาหารได้อีกด้วย ได้แก่ ไข่มีคุณสมบัติเป็นโครงสร้างให้กับอาหาร เช่น ในเค้กต่างๆ ไข่เป็นตัวที่ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ขึ้นฟู เช่น ไข่ขาวเมื่อทำการตีจะเกิดการกักเก็บอากาศ ไข่เป็นตัวช่วยให้อาหารข้น เช่น ในไส้พาย ไข่เมื่อได้รับความร้อนไข่ขาวจะแข็งตัวและเกิดเป็นโครงสร้างของโปรตีนและทำให้เกิดเจล เช่น ในคัสตาร์ดและสังขยา ไข่ช่วยในการยึดเครื่องปรุงต่างๆ ให้ติดกัน เช่น ในขนมปัง ไข่แดงมีหน้าที่ช่วยให้ไขมันรวมตัวกับเครื่องปรุงที่เป็นน้ำและเครื่องปรุง ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ เช่น ในน้ำสลัด (ศิริลักษณ์, 2533) ไข่ที่มีใช้ในอาหารมีหลากหลายชนิด เช่น ไข่สดทั้งฟอง (ดังภาพที่ 2.2a) ไข่เหลวหรือไข่ที่ผ่านการตอกแยกเอาเปลือกออก (ดังภาพที่ 2.2b) ไข่แช่แข็งเก็บที่ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส ไข่ผงเป็นไข่ที่ได้จากการ Spray Dry ซึ่งดึงเอาความชื้นออกหมด ทั้งนี้การนำไปใช้มีหลากรูปแบบ เช่น ไข่ทั้งใบ (Whole eggs) ไข่แดง (Egg yolks) และไข่ขาว (Egg white) ซึ่งไข่แดงส่วนใหญ่อยู่ในรูปไขมัน ภายในไข่แดงจะมีเลซิตินเป็นตัวที่ทำให้เกิดอิมัลซิไฟเออร์และเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูง ไข่แดงจะเป็นตัวที่ใช้ในการทำครีมและช่วยทำให้ปริมาตรสูงขึ้น ไข่ขาวมีน้ำอยู่ประมาณ 86% ส่วนของไข่ขาวมีลักษณะเป็นเจลซึ่งเป็นคุณลักษณะของโปรตีนมิวซีนในไข่ขาว และโปรตีนอีกชนิดคือ โอวัลบูมิน (Ovalbumin) จะตกตะกอนรวมตัวกันและเป็นตัวที่ทำให้เกิดการคงตัวเมื่อถูกความร้อนหรือจากการตีแรงๆ และเร็ว ไข่เป็นแหล่งที่มีคุณค่าทางอาหารที่สมบูรณ์ที่สุดและสามารถเน่าเสียได้เหมือนกับอาหารอื่นๆ มีเพียงเปลือกที่ทำหน้าที่ปกป้องการปนเปื้อนจากทั้งภายในและภายนอก ซึ่งไม่สามารถครอบคลุมได้ทั้งหมด เช่น การปนเปื้อนจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคในคน ไข่ทุกฟองมีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโดยเฉพาะ *Salmonella* spp. เนื่องจากเปลือกและของเสียในตัวแม่ไก่จะถูกขับออกมาทางเดียวกัน หรือปนเปื้อนขณะออกจากตัวแม่ไก่ ผิวเปลือกไข่มีรูพรุน ดังนั้น จึงไม่ค่อยมีการแนะนำให้ล้างไข่เพราะจะทำให้สารเคลือบผิวไข่ที่มาจากแม่ไก่ (Natural protecting) หายไป และเชื้อโรคจากภายนอกมีโอกาสติดเข้าไปได้ แต่ในทางการผลิตไข่สดในด้านอุตสาหกรรม การควบคุมคุณภาพโดยกระบวนการล้างมีความจำเป็น โดยใช้สารล้างที่เหมาะสม เช่น น้ำคลอรีน เข้มข้น 20-200 ppm เป็นต้น ทำการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วยน้ำมันจากธรรมชาติ (Natural mineral oil) แต่ต้องอยู่ในการควบคุม (วินัย, 2007)

(2.2a) (2.2b) (2.2c)

ภาพที่ 2.2 ไข่ไก่ทั้งฟอง (2.2a) ไข่เหลวหรือไข่ไก่ที่ผ่านการตอก (2.2b-2.2c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณภาพของไข่จะเสื่อมลงตามเวลาที่เก็บ แต่จะเสื่อมเสียเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง ไข่ที่ดีควรเป็นไข่สดจึงมีลักษณะเช่น ช่องอากาศมีขนาดเล็กและไม่เคลื่อนที่ตามการหมุนไข่ เมื่อตอกไข่ไข่แดงไม่ติดเปลือกอยู่ด้านในไม่แตกเหลว ไข่แดงควรกลมนูนอยู่ตรงกลางและไข่ขาวส่วนข้นโอบล้อมยึดแน่น ไข่แดงไม่เน่าเสียไม่มีกลิ่นผิดปกติ การตรวจสอบไข่จะใช้การส่องไฟในที่มืด ไข่คุณภาพดีจะเห็นไข่แดงอยู่ตรงกลางของอากาศ ไข่แดงกับไข่ขาวจับแน่นเมื่อหมุนไข่ เมื่อตอกออกจะเห็นไข่แดงนูนบนไข่ขาวไม่พบจุดเลือด จุดเนื้อ ส่วนไข่เก่าเมื่อตอกออกมาจะเห็นลักษณะไข่แดงแบนราบไปกับพื้น และไข่ขาวไม่เป็นเจลแข็งไข่จะมีกลิ่นเหม็น (มกษ. 6702-2553)

โดยเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์สำหรับไข่ไก่สด ผู้วิจัยได้อ้างอิงเกณฑ์จากประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก (กรมปศุสัตว์, 2551) ในหัวข้อ ไข่ Non pasteurized ซึ่งกำหนดเกณฑ์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Aerobic Plate Count (APC)) ไม่เกิน 1 x 10^6 โคโลนีต่อกรัม Coliforms ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อกรัม *E. coli* ตรวจไม่พบใน 1 กรัม และ *Salmonella* spp. ตรวจไม่พบต่อ 25 กรัม

2.1.1.3 กะทิ (Coconut milk)

กะทิเป็นสัญลักษณ์ของอาหารไทยโดยเฉพาะขนมไทยซึ่งมีการใช้ มะพร้าวมาตั้งแต่สมัยสุโขทัยและกรุงศรีอยุธยาตอนต้น โดยใช้ร่วมกับข้าวและแป้ง กะทิเป็นของเหลวที่ได้จากการคั้นเนื้อมะพร้าวสดขูด น้ำกะทิที่ได้มีสีขาวขุ่นมีลักษณะคล้ายนม มีกลิ่นรสเฉพาะตัวของมะพร้าว (นริศรา, 2554) นิยมนำมาใช้กะทิแบบสด แต่โดยปกติแล้วจะมีอายุในการเก็บสั้น เนื่องจากเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (Low Acid Food) ค่า pH ประมาณ 6 จึงจำเป็นต้องมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ (สุดารัตน์ และคณะ, 2551) ขั้นตอนการคั้นกะทินั้นขั้นแรกเป็นการใช้แรงงานคน เช่น การปอกเปลือกและกะลา ปอกส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออกเพราะจะทำให้กะทิมีสีน้ำตาลและมีรสขม เนื้อมะพร้าวที่ได้มานำมาล้างและขูดด้วยเครื่องจักร การล้างเนื้อมะพร้าวด้วยน้ำที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 100 ppm ตามด้วยการลวกน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที ช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ แล้วใช้ Hammer mill ในการลดขนาด การคั้นกะทิในระดับครัวเรือนจะบีบเนื้อมะพร้าวที่ห่อด้วยผ้าขาวบางด้วยมือ เพื่อแยกเอาส่วนกะทิออกมา ปกติการคั้น 2-3 ครั้ง โดยการเติมน้ำที่อุณหภูมิห้องลงไปทำให้กะทิที่ได้ในแต่ละครั้งเจือจางลง เพื่อต้องการให้ได้ปริมาณกะทิให้ได้มากที่สุด สำหรับการคั้นกะทิในระดับอุตสาหกรรมใช้ไฮดรอลิก (hydraulic) หรือ screw press บีบอัด กะทิที่ได้นำมากรองผ่านผ้าขาวบางหรือนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วต่ำ โดยใช้ basket centrifuge เพื่อแยกเอาอนุภาคเล็กๆ ที่หลงเหลืออยู่ออกโดยไม่ทำให้สภาพอิมัลชันของกะทิเสียไป (นุชราและคณะ, 2550) ปัจจุบันการปรุงอาหารตามครัวเรือนไม่ค่อยนิยมคั้นกะทิเอง เพราะยุ่งยากและเสียเวลามาก แม่บ้านสมัยใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิยมซื้อกะทิสดที่คั้นแล้วจากตลาด หรือซื้อมะพร้าวขูดมาคั้นเองก็มี แต่ถ้าให้สะดวก รวดเร็วยิ่งกว่าก็มีกะทิสำเร็จรูปในภาชนะบรรจุปิดสนิทจำหน่ายทั่วไปตามร้านค้าปลีกและซูเปอร์มาร์เก็ต ประเภทของกะทิที่พบเห็นทั่วไปในท้องตลาด (สถาบันอาหาร, 2555) มีดังนี้

1. กะทิสด ที่จำหน่ายในตลาดสด มี 2 แบบ คือ

1.1 กะทิที่ได้จากเนื้อมะพร้าวที่ไม่ได้เอาผิวออกก่อนบดให้ละเอียด น้ำกะทิชนิดนี้เหมาะสำหรับทำอาหารประเภทแกง สีของน้ำกะทิที่ได้จากเนื้อมะพร้าวที่ไม่ได้เอาผิวสีน้ำตาลออกจะส่งผลให้มีสีออกครีม (ไม่ขาวเหมือนน้ำนม)

1.2 กะทิที่ได้จากเนื้อมะพร้าวที่ผ่านการเอาผิวออกก่อนบดให้ละเอียดน้ำกะทิที่ได้จะเป็นสีขาวสะอาด ซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปทำขนมหวานประเภทต่างๆ สีสันของขนมดูสวย เนียน สะอาด น่ารับประทาน

2. กะทิบรรจุถุงพาสเจอไรซ์ เป็นกะทิสำเร็จรูปที่ผ่านการให้ความร้อนทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้อุณหภูมิสูงไม่เกิน 100°C และทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (มอก. 582-2528) จะมีกลิ่นรสใกล้เคียงน้ำกะทิสดมากที่สุด แต่ต้องเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อรักษาคุณภาพ มีอายุเก็บรักษาสั้น เทคโนโลยีผลิตปัจจุบันสามารถเก็บในที่เย็นได้ประมาณ 15 วัน

3. กะทิบรรจุกระป๋อง เป็นกะทิสำเร็จรูปชนิดสเตอริไลซ์ ที่ผ่านการให้ความร้อนทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100°C ซึ่งสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์และสปอร์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียในระหว่างการเก็บ ครอบคลุมถึงการฆ่าเชื้อแบบยู เอช ที ด้วย (มอก. 582-2528) มีอายุเก็บไว้ได้ประมาณ 2 ปี กะทิแบบนี้จะมีกลิ่นรสและสีเปลี่ยนไป เรียกว่า cooked เนื่องจากผ่านความร้อนในระดับสูง

4. กะทิสำเร็จรูปยู เอช ที (Ultra High Temperature: UHT) จะมีกลิ่นหอมที่แสดงความสดใหม่มากกว่าแบบกระป๋อง เพราะผ่านความร้อนไม่นานมาก มีอายุเก็บไว้ได้ ประมาณ 1 ปี

5. กะทิแช่แข็ง

6. กะทิผง

7. กะทิสำเร็จรูปปรุงแต่งกลิ่นรส เช่น กะทิสำเร็จรูปอบควันเทียน กะทิใบเตย น้ำแกงสำเร็จรูป เครื่องดื่มกะทิ นมมะพร้าว เป็นต้น

ทุกผลิตภัณฑ์เมื่อเปิดใช้แล้ว ต้องนำใส่ไว้ในตู้เย็นทันที เพื่อให้สามารถใช้ต่อได้ (สถาบันอาหาร, 2555) ส่วนการกำหนดเกณฑ์คุณภาพด้านจุลินทรีย์ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 582 (พ.ศ. 2528) เรื่อง มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกะทิพาสเจอไรส์ ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์ที่กำหนดทางจุลินทรีย์ของกะทิสำเร็จรูป

ชนิดจุลินทรีย์	เกณฑ์ที่กำหนด		วิธีวิเคราะห์ตาม
	ชนิดพาสเจอไรซ์	ชนิดสเตอริไลซ์	
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/dm^3) (Total Plate Count)	ไม่เกิน 20,000	ต้องไม่พบ	มอก. 335-2523 เล่ม 1
Salmonella spp.	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	มอก. 335-2523 เล่ม 1
S. aureus	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	มอก. 335-2523 เล่ม 1
Yeasts & Molds	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	มอก. 335-2523 เล่ม 1
Coliforms โดยวิธี MPN/ dm^3	< 3	< 3	AOAC (1980) ข้อ 46.016
C. perfringens	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	AOAC (1980) ข้อ 46.031 ถึงข้อ 46.036

ที่มา : มอก. 582-2531

นุชรา และคณะ (2550) ได้สำรวจปัจจัยที่มีผลต่อการปนเปื้อนแบคทีเรียในกะทิสด ในเดือนมีนาคม ถึงกันยายน 2550 ที่จำหน่ายกะทิสดในตลาดประเภทที่ 1 ใน 8 จังหวัด คือ กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ราชบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ผลตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งในหัวกะทิและหางกะทิ แต่พบเชื้อ Coliforms bacteria ในหัวกะทิและหางกะทิทุกตัวอย่าง และพบเชื้อ *S. aureus* ในหัวกะทิ ร้อยละ 75.0 และหางกะทิ ร้อยละ 79.2 แต่ยังไม่พบรายงานการสำรวจการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในกะทิพาสเจอไรซ์

2.1.1.4 น้ำตาล (Sugar)

น้ำตาลที่เรียกกันทั่วไปว่าน้ำตาลทราย คือ น้ำตาลซูโครส (sucrose) ใช้เป็นสารให้ความหวานอย่างกว้างขวางทั่วโลก พบอยู่ในพืชและผลไม้หลายชนิด แต่ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลทางการค้า คือ อ้อย และหัวบีท (beat root) (พิมพ์เพ็ญและนิธิยา, 2557) แต่นิยมนำมาใช้ทำขนมปัง และขนมหวาน คือน้ำตาลอ้อย หรือน้ำตาลทราย

กล้าณรงค์ และสิริวัฒนา (2539) ได้ตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำตาลทรายขาวของประเทศไทย โดยนำตัวอย่างน้ำตาลทรายขาวจากโรงงาน 37 โรงงานในประเทศไทยมาตรวจนับเชื้อ ไม่พบพวกกลุ่มโคลิฟอร์ม ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างพิษในทุกตัวอย่าง ส่วนจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง ตรวจไม่พบการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ ทั้งกลุ่มที่สร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และไม่สร้าง Hydrogen Sulfide (H_2S) ส่วนจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงที่พบเป็นพวกใช้อากาศทั้งหมด คือ จุลินทรีย์รูปท่อน แกรมบวก สร้างสปอร์ และไม่สร้างสปอร์ จากการจำแนกเชื้อเฉพาะที่เป็น *Bacillus* sp. นั้น สามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus macerans, Bacillus brevis, Bacillus circulans* และ *Bacillus coagulans*

ส่วนข้อกำหนดและมาตรฐานของน้ำตาลทรายนั้น ผู้วิจัยอ้างอิงตามหลักเกณฑ์และมาตรฐานประกอบการตรวจรับรองสินค้าเกษตรด้านพืช สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร (2556) ในหมวดข้อกำหนดและมาตรฐานของสินค้าน้ำตาลและผลิตภัณฑ์โดยกำหนดจำนวนเชื้อยีสต์และรา น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม *S. aureus* ตรวจไม่พบใน 0.1 กรัม *C. perfringens* ตรวจไม่พบใน 0.1กรัม *B. cereus* น้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม *E. coli* ตรวจไม่พบใน 0.1 กรัม และ *Salmonella* spp. ไม่พบต่อ 25 กรัม

2.1.1.5 แป้งข้าวโพด (corn flour หรือ corn starch)

แป้งข้าวโพด (corn starch, corn flour หรือ maize starch) ได้จากเอนโดสเปิร์มในเมล็ดจากกรรมวิธีโม่แบบเปียก ซึ่งมีขั้นตอนการแยกโปรตีนออกได้เป็นแป้งสตาร์ชสีขาวออกเหลืองเล็กน้อย โดยต้องแช่เมล็ดข้าวโพดในน้ำที่มีส่วนผสมของกำมะถันเผา ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 36 - 50 ชั่วโมง เพื่อให้เปลือกนุ่ม แล้วนำเมล็ดไปบดหยาบเพื่อแยกเปลือกชั้นนอกออก แล้วผ่านไปยังถังแช่น้ำเพื่อแยกเอ็มบริโอออก จะได้แป้งและโปรตีนเป็นเม็ดขนาดเล็ก จากนั้นนำไปผ่านเครื่องเหวี่ยง จะได้แป้งในรูปสารแขวนลอยเข้มข้นที่มีโปรตีนกลูเต็นปนอยู่เล็กน้อย เมื่อนำสารแขวนลอยมาปั่นแยกอีกครั้งด้วยเครื่องเหวี่ยงแรงสูง ล้างแป้ง แล้วทำให้แห้ง จะได้เป็น corn starch (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2556)

แป้งข้าวโพดนำมาใช้ในครัวเรือนในการทำเบเกอรี่ หรืออาหารที่ต้องการความข้นหนืดใช้ในอุตสาหกรรมจำพวก อาหารว่าง อาหารหวาน ฟิล์มถนอมอาหาร อุตสาหกรรม กระดาษ ผ้า สารเชื่อม เป็นต้น (วิกีพีเดีย, 2558 และมอก. 637-2529)

เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแป้งข้าวโพด (ชั้นคุณภาพอาหาร) ตาม มอก. 637-2529 กำหนดเกณฑ์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (APC) ไม่เกิน 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม จำนวนเชื้อราไม่เกิน 1×10^2 โคโลนีต่อกรัม *E. coli* ตรวจไม่พบใน 0.1 กรัม และ *Salmonella* spp. ไม่พบต่อ 25 กรัม โดยทั้งนี้ผู้วิจัยได้พิจารณาตรวจเชื้อ *B. cereus* เพิ่มเติมเนื่องจากมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในแป้งข้าวโพดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.6 แป้งสาลีชนิดทำเค้ก (Wheat flour)

แป้งสาลี (wheat flour) ได้จากการโม่ข้าวสาลี เริ่มด้วยการขจัดสิ่งเจือปนและสิ่งสกปรกออก นำเมล็ดมาสีผ่านลูกกลิ้งเพื่อแยกเปลือกและรำออก จากนั้นจึงโม่ด้วยลูกกลิ้งหลายต่อหลายครั้ง เพื่อให้แป้งมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ การสีและโม่ ทำให้รำ (bran) ซึ่งมีใยอาหาร วิตามิน แร่ธาตุ และโปรตีนส่วนหนึ่ง กับเอ็มบริโอซึ่งมีไขมันสูงหลุดออกจากเมล็ดข้าวสาลี เหลือเพียงเอนโดสเปิร์มซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก แป้งสาลีใช้ทำอาหารและขนมได้หลายชนิด แบ่งออกเป็น 3 ประเภท โดยแบ่งแยกตามความแข็งแรงและปริมาณโปรตีน

1. แป้งขนมปัง เป็นแป้งชนิดหนักมีโปรตีนสูง 11.5-14% ได้จากการโม่ข้าวสาลีชนิดแข็ง ขึ้นฟูได้ด้วยยีสต์เท่านั้น เนื้อแป้งหยาบ เหมาะที่จะใช้ทำขนมปัง หรือขนมที่มีลักษณะคล้ายขนมปัง เช่น โดนัทยีสต์ พิซซ่า ปาท่องโก๋ โรตี หรือ ผลิตภัณฑ์จำพวกเส้นบะหมี่ แผ่นเกี๊ยว

2. แป้งสาลีธรรมดา หรือแป้งอเนกประสงค์ มีปริมาณมีโปรตีน 9.5-11% ต่ำกว่าแป้งขนมปัง เป็นแป้งที่ได้จากการโม่ข้าวสาลีชนิดอ่อนกับชนิดแข็งเข้าด้วยกันซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการรวมตัวกันระหว่างแป้งขนมปังกับแป้งเค้ก และขึ้นฟูโดยใช้ยีสต์หรือผงฟู

3. แป้งเค้ก มีปริมาณโปรตีน 7.5- 9% เป็นแป้งที่ได้จากการโม่ข้าวสาลีชนิดอ่อน เหมาะที่จะใช้ทำขนมเค้ก และขนมที่มีเนื้อละเอียด เบา ฟู เช่น ขนมปุยฝ้าย ซาลาเปา แยมโรล ขนมไข่ แพนเค้ก ฯลฯ แป้งชนิดนี้ ใช้ผงฟู หรือเบคกิ้งโซดา เป็นตัวทำให้ฟู

แป้งสาลีที่มีคุณภาพดีลักษณะเป็นสีขาวสะอาด เนื้อละเอียด ไม่มีสิ่งเจือปนแห้งสนิท ไม่มีตัวมอด ไม่มีกลิ่นสาบวิธีเก็บแป้งสาลี ให้เก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เพราะถ้าแป้งมีความชื้นสูงจะทำให้แป้งเป็นตัวและขึ้นราได้ง่าย หรือเก็บในที่มีอุณหภูมิต่ำๆ เช่นเก็บไว้ในตู้เย็น (มหาวิทยาลัยมหิดล, 2556 และสถาบันส่งเสริมนวัตกรรมการเรียนรู้, 2558)

เนื่องจากตาม มอก. 373-2524 เรื่อง แป้งสาลีชนิดทำเค้ก ซึ่งเป็นแป้งที่นำมาใช้ผลิตสังขยาใบเตยไม่ได้กำหนดเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแป้งสาลีไว้ ผู้วิจัยจึงพิจารณาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ตามข้อกำหนด มอก.637-2529 เรื่อง แป้งข้าวโพด คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (APC) ไม่เกิน 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม จำนวนเชื้อยีสต์และรา ไม่เกิน 1×10^2 โคโลนีต่อกรัม *E. coli* ตรวจไม่พบใน 0.1 กรัม *Salmonella* spp. ไม่พบต่อ 25 กรัม และพิจารณาตรวจเชื้อ *B. cereus* เพิ่มเติมเนื่องจากมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในแป้งสาลีได้

2.1.2 วิธีการผลิตสังขยาใบเตย

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยประกอบด้วย ใบเตยสด น้ำสะอาดสำหรับคั้นน้ำใบเตย ไข่ไก่ กะทิ น้ำตาลทราย แป้งข้าวโพด แป้งสาลีชนิดทำเค้ก เป็นส่วนผสมหลัก

ขั้นตอนการทำสังขยาใบเตย ดังภาพที่ 2.4 โดยการทำในครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมขนาดเล็กจะเริ่มต้นโดยการนำใบเตยสดมาล้างให้สะอาด หั่นใบเตยเป็นท่อนสั้นๆ นำใส่โถปั่นเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำเปล่า อัตราส่วน 1:1 ปั่นจนละเอียด นำมาคั้นกับผ้าขาวบาง หรือใช้ตะแกรงกรองเอาเฉพาะน้ำสีเขียวพักไว้ จากนั้นตอกไข่ใส่ชามหรือกะละมัง ตีไข่และน้ำตาลทรายให้เข้ากันด้วยตะกร้อมือ ค่อยๆ เทกะทิลงไปและคนให้เข้ากัน ใส่น้ำใบเตย และค่อยๆ เติมแป้งข้าวโพด แป้งสาลี ลงไปคนตลอดเวลา จนเทแป้งข้าวโพดและแป้งสาลีเสร็จคนให้เข้ากันอย่าให้แป้งจับตัวเป็นเม็ด นำมากรองผ่านตะแกรงตาถี่หรือผ้าขาวบาง ใส่หม้อสแตนเลส นำส่วนผสมต่างๆ ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้สุกโดยการให้ความร้อนในลักษณะการตุ๋นหรือการกวนบนหม้อนึ่งคือ มีหม้อ 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นหม้อขนาดใหญ่กว่าใส่น้ำและต้มให้เดือดใช้ไอน้ำให้ความร้อนกับหม้อใบด้านบนที่มีขนาดเล็กกว่าหนึ่งเบอร์ ในหม้อใบบนนี้มีส่วนผสมใช้ไม้พายหรือตะกร้อมือกวน ส่วนผสมไปเรื่อยๆ ห้ามหยุด สำหรับสังขยาใบเตย ขนาด 1 - 2 กก. ใช้เวลาประมาณ 20 - 30 นาที จนได้สังขยาใบเตยที่เนื้อเนียนข้นหนืดตามต้องการจึงยกลง ดังภาพที่ 2.3a - 2.3b (ครัวบ้านพิมพ์, 2553 และ Thai Dessert Recipes, 2012) หากทำการผลิตขายในระดับครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมขนาดเล็กจะตักแบ่งบรรจุใส่กระปุกพลาสติกดังภาพที่ 2.3c หรือบรรจุในถุงพลาสติกขณะร้อน พักไว้ให้เย็นสามารถจัดเก็บได้ในอุณหภูมิตู้เย็น 3 วัน โดยไม่ใส่วัตถุกันเสีย

(2.3a) (2.3b) (2.3c)

ภาพที่ 2.3 สังขยาใบเตยสำหรับสอดไส้ขนมปังหรือผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (2.3aและ 2.3b) และสังขยาใบเตยสำหรับจิ้มขนมปังหรือปาท่องโก๋บรรจุในกระปุกพลาสติก (2.3c)

ที่มาภาพที่ 2.3c : สำนักงานไกด์อุบลดอทคอม (2557)

2.1.3 เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสังขยา (มผช. 527/2547)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. 527/2547) เรื่อง สังขยา มีขอบข่ายครอบคลุมสังขยาที่บรรจุในภาชนะบรรจุ ไม่ครอบคลุมถึงสังขยาที่เป็นขนมไทยประเภทหนึ่ง โดยสังขยาในมาตรฐานชุมชนนี้ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากกะทิ ไข่ แป้ง น้ำตาล เกลือ อาจเติมนมและอาจแต่งสีและกลิ่นด้วยส่วนประกอบต่างๆ เช่น วานิลลา ใบเตย ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนจนสุกและมีความข้นหนืดที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะของสังขยาที่ต้องการ ประกอบด้วย

1. ลักษณะทั่วไปต้องข้น เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่จับตัวเป็นก้อนหรือมีน้ำแยกออกมา
2. สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้
3. กลิ่นรสต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์
4. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์
5. วัตถุเจือปนอาหาร
   5.1 หากมีการใช้สี ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด
   5.2 หากมีการใช้กรดเบนโซอิกหรือเกลือของกรดเบนโซอิก (คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) กรดซอร์บิก หรือเกลือของกรดซอร์บิก (คำนวณเป็นกรดซอร์บิก) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกัน ต้องไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
6. เกณฑ์ด้านจุลินทรีย์
   6.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (APC) ต้องไม่เกิน 10,000 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
   6.2 โคลิฟอร์ม โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
   6.3 *Salmonella* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
   6.4 ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

โดยทั้งนี้ต้องพิจารณามาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ต้องเป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ตามบัญชีแนบท้ายหมายเลข 3 ในหมวดอาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภคทันทีที่ทำจากธัญพืช หรือมีแป้งเป็นส่วนประกอบหลัก โดยมีเกณฑ์กำหนด คือ *Salmonella* spp. ไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม *S. aureus* ไม่พบใน 0.1 กรัม และ *B. cereus* ต้องไม่เกิน 100 ใน 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

การเสื่อมเสียของอาหารส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์นำมาซึ่งความเสียหายต่อธุรกิจอาหาร จึงทำให้ผู้ผลิตส่วนใหญ่เห็นว่าการใช้วัตถุกันเสียนั้นเป็นส่วนหนึ่งที่จำเป็นในการทำให้กระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งการใช้วัตถุกันเสียมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถกระจายอาหารท้องถิ่นไปยังประเทศอื่น สามารถหลีกเลี่ยงมูลค่าการเสียหายจากการเสื่อมเสียระหว่างการเก็บรักษา สูญเสียคุณค่าทางอาหารน้อย หากมีการเลือกใช้สารกันเสียที่เหมาะสม จะทำให้ค่าใช้จ่ายในการถนอมอาหารต่ำ เมื่อเทียบกับการใช้วิธีทางกายภาพ (อรวรรณ, 2541)

สารวัตถุกันเสีย (Preservatives) คือวัตถุเจือปนอาหาร เป็นสารเคมีที่ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ช่วยชะลอหรือยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารได้

2.2.1 กลไกในการชะลอการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ของวัตถุกันเสีย

สารวัตถุกันเสีย (Preservatives) คือสารเคมีหรือของผสมของสารเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหาร ทำหน้าที่ยับยั้ง หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยอาจจะไปออกฤทธิ์ต่อออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ รบกวนการทำงานของเอนไซม์หรือกลไกทางพันธุกรรม (genetic mechanism) ในเซลล์ ยังผลให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวน วัตถุกันเสียจะทำให้คุณสมบัติของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ความสามารถในการยอมให้สารต่างๆ แทรกผ่านผนังเซลล์เปลี่ยนไปเป็นสาเหตุให้เส้นทางอาหารจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการขัดข้อง ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ชะงักและตายในที่สุด วัตถุกันเสียพวกเกลือเบนโซเอทหรือเกลือซอร์เบทจะไปเคลือบผนังเซลล์ ทำให้อาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่ได้ วัตถุกันเสียบางชนิดมีผลต่อกระบวนการสร้างหรือสังเคราะห์ส่วนประกอบของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์และทำให้จุลินทรีย์ตายได้ (พุทธรินทร์, 2558)

2.2.2 ประเภทวัตถุกันเสีย

วัตถุกันเสียที่ใช้ในอาหารมี 2 ประเภท คือวัตถุกันเสียที่เป็นสารอินทรีย์และวัตถุกันเสียที่เป็นสารอนินทรีย์ ตัวที่นิยมกันมากคือ วัตถุกันเสียที่เป็นสารอินทรีย์พวกกรดอ่อนต่างๆ เช่น กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท เพราะมีราคาถูกและไม่ทำให้รสชาติอาหารเปลี่ยน มักเติมลงในเครื่องดื่มต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ ซอส ผักดอง แยม เยลลี่ ผลไม้แช่อิ่ม และเครื่องแกงสำเร็จรูป สำหรับกรดโปรปิโอนิก และเกลือโปรปิโอเนตเหมาะสำหรับใช้ป้องกันการเจริญของเชื้อรา และเกิดเมือกหรือยางเหนียวในโด (dough) หรือแป้งขนมปังที่ผ่านการนวดแล้ว จึงเหมาะที่จะใช้ในอาหารประเภทขนมปัง เค้ก และเนยแข็งชนิดต่างๆ ส่วนกรดซิตริกเป็นส่วนประกอบของผลไม้ สามารถป้องกันแบคทีเรียและยีสต์ได้ดี เหมาะสำหรับใส่ในเครื่องดื่ม น้ำหวาน น้ำอัดลม เยลลี่ แยม เป็นต้น (พุทธรินทร์, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

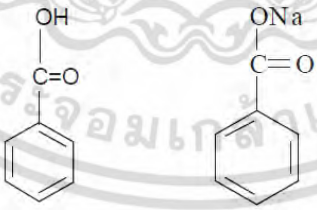
วัตถุกันเสียที่เป็นสารอินทรีย์ ส่วนใหญ่จะมีอยู่ในอาหารตามธรรมชาติหรือเกิดขึ้นจากระบวนการหมัก เช่น กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ มีดังนี้

2.2.2.1 สารวัตถุกันเสียกรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนต

กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนต (Propionic acid and Propionate salt; INS No.280) กรดโพรพิโอนิกเป็นกรดอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในผลไม้และพืชบางชนิด เช่น แอปเปิล สตรอเบอรี่ ชา มีสูตรโมเลกุล CH_3-CH_2-COOH มีกลิ่นแรงและกัดกร่อน จึงนิยมใช้เกลือโซเดียมโพรพิโอเนต (Sodiumpropionate; INS No. 281) หรือแคลเซียมโพรพิโอเนต (Calcium propionate; INS No. 282) มากกว่าเกลือทั้งสองชนิดนี้ละลายน้ำได้ดี Calcium propionate และ Sodium propionate ใช้ป้องกันเชื้อราและลักษณะที่เป็นเมือกในขนมปังและใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในเนยแข็ง ช็อคโกแลต ผัก ผลไม้ และคุกกี้ โดยการยับยั้งเชื้อราของเกลือโพรพิโอเนตจะได้ผลดีที่ pH 3.5-4.5 (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2550)

2.2.2.2 สารวัตถุกันเสียกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต (benzoic acid and benzoate salt)

กรดเบนโซอิก (Benzoic acid; INS No. 210) และเกลือเบนโซเอต เช่น โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate; INS No. 211) มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.4 เป็นสารกันเสียที่ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด (พุทธรินทร์, 2558) มีประวัติการใช้มานานในปี พ.ศ. 2487 (ค.ศ.1875) ได้ใช้กรดเบนโซอิกเพื่อทดแทนการใช้กรดซาลิซิลิก กรดเบนโซอิกนี้สามารถพบได้ตามธรรมชาติเช่น ลูกพรุน แครนเบอรี่ อบเชย และกานพลู (วีรยา, 2558)



Benzoic acid Sodium benzoate

ภาพที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต
ที่มา : WHO (2005)

ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต จะสูงที่สุดที่ช่วงความเป็น กรด-ด่าง 2.5-4.0 และจะมีประสิทธิภาพสูงในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวจึงเหมาะที่จะใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดสูง เช่น เครื่องดื่มชนิดต่างๆ น้ำหวานชนิดต่างๆ น้ำผลไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ แยม เยลลี่ผักดองผลไม้ดอง น้ำสลัด ฟรุตสลัดและเนยเทียม เป็นต้น ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลต่อผนังเซลล์และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยเบนโซเอตจะไปทำให้กระบวนการแทรกซึมของอาหารเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผิดปกติ ในขณะเดียวกันจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิดและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ดังรายงานผลการยับยั้งเชื้อชนิดต่างๆ และช่วง pH ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อในตารางที่ 2.2 (วีรยา, 2558)

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

Microorganism	pH	Minimum inhibitory concentration (μg/mL)
Bacteria, Gram Positive		
Bacillus cereus	6.3	500
Lactobacillus	4.3-6.0	300-1800
Listeria monocytogenes	5.6; 4°C, 5.6; 21°C	2000; 3000
Micrococcus	5.5-5.6	50-100
Streptococcus	5.2-5.6	200-400
Bacteria, Gram Negative		
Escherichia coli	5.2-5.6	50-120
Pseudomonas	6.0	200-480
Mold		
Aspergillus	3.0-5.0	20-300
Aspergillusparasiticus	5.5	>4000
Aspergillusniger	5.0	2000
Byssochlamysnivea	3.3	500
Cladosporiumherbarum	5.1	100
Mucorracemosus	5.0	30-120
Penicillium	2.6-5.0	30-280
Penicilliumcitrinum	5.0	2000
Penicilliumglaucum	5.0	400-500
Rhizopusnigricans	5.0	30-120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Microorganism	pH	Minimum inhibitory concentration (μg/mL)
Yeasts		
Candida krusei	-	300-700
Debaryomyceshansenii	4.8	500
Hansenula	4.0	180
Pichiamembranefaciens	-	700
Rhodotorula	-	100-200
Saccharomyces bayanus	4.0	330
Zygosaccharomycesbailii	4.8	4500
Zygosaccharomycesrouxii	4.8	1000

ที่มา: Chipley (1993); EI-Gazzar and Marth (1987); EI-Shenawy and Marth (1988); Jermini andSchmidt-Lorenz (1987); Marwan and Nagel (1986); Roland et al. (1984) (อ้างโดย วีรยา, 2558)

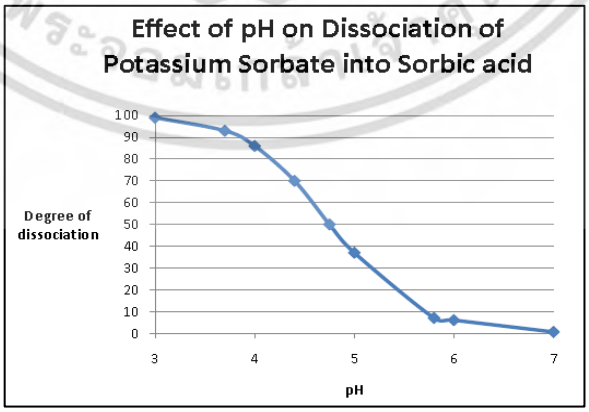
สำหรับอันตรายที่จะได้รับจากกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตนั้น โดยทั่วไปแล้วจะค่อนข้างปลอดภัย แต่ก็พบว่าทำให้เกิดอาการแพ้ได้ โดยเฉพาะคนที่มีประวัติเป็นโรคภูมิแพ้ จากการศึกษาทดลองพบว่าความเป็นพิษของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจัดอยู่ในประเภทพิษปานกลางถ้าได้รับในปริมาณน้อยจะไม่ทำให้เกิดการสะสมขึ้นในร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีกลไกในการขจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต แต่ถ้าได้รับในปริมาณที่สูงจะทำให้ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย อาการเลือดตกใน อัมพาต ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของตับและไตลดลงหรืออาจส่งผลถึงขั้นพิการได้ และถ้าได้รับเกิน 500 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อาจเสียชีวิตได้ ถ้าได้รับสารนี้เป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์และทารกในครรภ์มีรูปวิปริตได้ (พุทธรินทร์, 2558; วีรยา, 2558) กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตแม้จะช่วยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่ในขณะเดียวกันก็จะทำให้สีของอาหารเปลี่ยนไปรวดเร็วขึ้น และอาจทำให้รสชาติของอาหารผิดปกติจนรู้สึกได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ในปริมาณที่ต่ำมาก หรืออาจใช้ร่วมกับวัตถุกันเสียอื่น (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 สารวัตถุกันเสียกรดซอร์บิคและเกลือซอร์เบต (Sorbic acid and Sorbate salt)

กรดซอร์บิค (Sorbic acid; INS No. 200) และเกลือซอร์เบต เช่น โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate; INS No. 202) เป็นวัตถุกันเสียที่ใช้เติมลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่างๆ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บ (Shelf Life) ของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น กรดซอร์บิกจะขัดขวางการเจริญของยีสต์ รา และจุลินทรีย์หลายชนิดโดยขัดขวางการทำหน้าที่ของเอนไซม์ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl) บางชนิด กรดนี้มีความเสถียรมากถึงแม้จะมีพันธะคู่ในโมเลกุล และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยไม่มีผลต่อกลิ่น รสชาติหรือโครงสร้างของอาหาร นิยมใช้ในอาหารหลายประเภทมีความเป็นกรด pH ประมาณ 6.5 เช่นเนย เนยแข็งเนยเทียม ชีส (cheese)ไวน์ (wine) ผักและผลไม้ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2550) รวมไปถึงขนมปังที่ใช้ผงฟูและผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เช่น เค้ก ส่วนผสมของเค้ก พาย พายฟิลลิ่ง (pie filling) โดนัท (Saranraj and Geetha, 2011)

โปแตสเซียมซอร์เบตมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ทำหน้าที่ในการขัดขวางหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จากการละลายและแตกตัวของโปแตสเซียมซอร์เบตเป็นกรดซอร์บิคซึ่งกรดซอร์บิคที่ได้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนการแตกตัวตัวของโปแตสเซียมซอร์เบตไปเป็นกรดซอร์บิคขึ้นอยู่กับค่า pH ในวัตถุดิบหรืออาหาร ดังแสดงในภาพที่ 2.5 จากกราฟแสดงผลที่ pH 3.5 โปแตสเซียมซอร์เบตสามารถแตกตัวเป็นกรดซอร์บิคได้มากกว่า 90% ในขณะที่ pH >5.0 ความสามารถในการแตกตัวต่ำกว่า 40% ดังนั้น ค่า pH ของอาหารจึงมีความสำคัญต่อการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตที่ส่งผลต่อแตกตัวเป็นกรดซอร์บิคได้ดีในช่วง pH เป็นกรดที่ค่า pH <4.75 ซึ่งเป็นช่วงที่แตกตัวได้มากกว่า 50% จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้เพิ่มขึ้น (Livestock, 2002; Hawkins Watts Limited, 2009 และ Dharmadhikari, 2014)



ภาพที่ 2.5 กราฟแสดงค่า pH ที่มีต่อผลต่อการแตกตัวของโปแตสเซียมซอร์เบต เป็น กรดซอร์บิค
ที่มา : Hawkins WattsLimited (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณการใช้ (Dosage) กรดซอร์บิคหรือ เกลือซอร์เบตในอาหารอยู่ในช่วง 0.001– 0.1 % และปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์ โดยให้ใช้อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับวัตถุกันเสียอื่นๆ ได้ไม่เกิน 0.1% (1000 ppm) (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2547)

ICMSF (1996) ได้รายงานการศึกษาอิทธิผลของการใช้วัตถุกันเสีย (Preservative) กับเชื้อ *B. cereus* โดยใช้ 0.26% Sorbic acid ที่ pH 5.5 หรือ 0.39% Potassium sorbate ที่ pH 6.6 ใน Rice Filling สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาอิทธิผลของการใช้โปแตสเซียมซอร์เบตที่โรงงานอุตสาหกรรมนิยมใช้ในการผลิตไส้ขนมต่างๆ ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 281-2547) อนุญาตให้เติมในผลิตภัณฑ์ได้ ไม่เกิน 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.3 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสังขยาใบเตย (Microbial Contaminate)

สังขยาใบเตย จัดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค และอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูงที่จะก่อโรค (Potentially hazardous) เนื่องจากมีลักษณะที่มีความชื้นสูง ค่า Water Activity (a_w) ประมาณ 0.96-0.97 ค่าของแข็งละลายน้ำ ประมาณ 36-38^{o}Brix ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 6.3-6.5 จึงทำให้มีอายุการเก็บรักษาสั้น กระบวนการผลิตที่ระดับพาสเจอไรซ์จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค เช่น *S. aureus, B. cereus* เป็นต้น

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

บทบาทของจุลินทรีย์ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้อาหารเป็นพิษเป็นที่ทราบกันอยู่ทั่วไป อันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญมาก เนื่องจากอันตรายประเภทอื่นๆในการผลิตอาหาร เช่นอันตรายจากสารเคมี (สารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลง เป็นต้น) อันตรายทางกายภาพ (สิ่งปลอมปนต่างๆ เศษกรวด ดิน แก้ว) มีขอบเขตจำกัด ในการก่อให้เกิดปัญหาต่อผู้บริโภคสามารถตรวจสอบได้ด้วยตัวเอง แต่การบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคอย่างแพร่หลายและพิษที่เกิดขึ้นอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยจุลินทรีย์ในอาหาร (Microorganism in foods) สามารถแบ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ (อดิศร, 2538)

1. จุลินทรีย์ที่ต้องการให้มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ (desirable organisms) จุลินทรีย์ดังกล่าวมักเติมลงในผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกิดกลิ่นรสที่ต้องการ เช่น การเติมยีสต์ เพื่อผลิตแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ในเครื่องดื่มหรือขนมปัง การใช้เชื้อราในการบ่มเนยแข็งหรือไส้กรอกบางชนิดการเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติกในการหมักเนื้อสัตว์ต่างๆและผลิตภัณฑ์นมหมัก เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงคุณลักษณะ (indicator organisms) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่จัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค แต่มักใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำไส้ในผลิตภัณฑ์ โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีแหล่งที่มาจากลำไส้ของคนและสัตว์ซึ่งได้แก่ Coliforms, faecal Coliforms, Enterobacteria และ *E. coli*

3. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic organism) เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับผู้บริโภค ซึ่งผู้บริโภคได้รับประทานอาหารที่มีเชื้อเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมาก พอที่จะก่อให้เกิดโรคแล้วผู้บริโภคจะเกิดอาการผิดปกติในร่างกาย เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เป็นต้น เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา ไวรัส พาราสิต เป็นต้น

4. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย (spoilage organism) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มักเจริญได้ดีในผลิตภัณฑ์และเมื่อจุลินทรีย์ดังกล่าวเจริญในปริมาณมากแล้วจะทำให้เกิดกลิ่นรส ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่จัดว่าเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ แต่ถ้าพบว่ามีปริมาณมากในอาหาร เมื่อผู้บริโภคนำไปรับประทานแล้วอาจเกิดท้องเสียได้

2.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ สามารถพบได้ในอาหารหลากหลายชนิด และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อน ความแห้งแล้ง และสามารถมีชีวิตรอดจากการปรุงอาหาร (cooking) และการจัดเก็บในที่ที่แห้ง เมื่ออาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จัดเก็บในช่วงอุณหภูมิอันตราย (temperature danger zone) สามารถงอกและเพิ่มจำนวน สร้างสารพิษและเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้บริโภคป่วยอาหารเป็นพิษได้ (ICMSF, 1996 and NZFSA, 2010) โรคอาหารเป็นพิษมีลักษณะอาการ 2 ชนิด คือ Diarrheal syndrome เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดอาการช้า ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และ Emetic syndrome เป็นชนิดที่ก่อให้เกิดอาการเร็ว และทำให้อาเจียน (Granum and Baird-Parker, 2000)

2.4.1 ลักษณะของเชื้อ *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-1.2 μm ความยาว 3.0-5.0 μm สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้สามารถเจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative aerobe) สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 - 40°C ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 4-55°C ช่วงค่า pH ที่สามารถเจริญ คือ 4.5- 9.5 และช่วง pH ที่เหมาะสม คือ pH 6-7 มีค่า water activity (a_w) ต่ำสุด (ด้วยเกลือแกง) ที่เชื้อนี้เจริญได้คือ 0.93 (ICMSF,1996)

2.4.2 การก่อโรคและการระบาด

การก่อโรคของเชื้อชนิดนี้มี 2 ลักษณะ คือ อาการท้องเสีย (Diarrheal syndrome) และอาการอาเจียน (Emetic syndrome) ซึ่งอาการที่พบมักแสดงอาการอยู่นานประมาณ 12- 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง ไม่ส่งผลกระทบระยะยาว สามารถหายเองได้ โดยสามารถสรุปอาการเปรียบเทียบ 2 อาการได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สรุปลักษณะอาการก่อโรคอาหารเป็นพิษ ของเชื้อ *Bacillus cereus*

ลักษณะ	อาการท้องเสีย (Diarrheal syndrome)	อาการอาเจียน (Emetic syndrome)
ระยะเวลาฟักตัว	8 – 16 ชั่วโมง	0.5 – 6 ชั่วโมง
ระยะเวลาแสดงอาการ	12 - 24 ชั่วโมง	6 – 24 ชั่วโมง
ปริมาณของเชื้อ (Dose)	$10^5 – 10^7$ (total cells)	$10^5 – 10^8$ (per g. viable cells)
ตำแหน่งที่สร้างสารพิษ	สร้างในลำไส้เล็กของ host	สร้างในอาหาร
อาการ	ปวดเกร็งช่องท้อง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ	คลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน ครั่นเนื้อครั่นตัว

ที่มา : Kramer and Gilbert (1989) ; ICMSF (1996) ; NZFSA (2010)

การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *B. cereus* พบได้ทั่วโลกเช่น ในญี่ปุ่น พบอาการอาเจียน 1877 ครั้ง จากการปนเปื้อนในนมโรงเรียน นอร์เวย์ พบอาการท้องเสีย 20 ครั้ง จากซุปปลาที่ทำให้เย็นลงอย่างไม่เหมาะสมและพบมากกว่า 200 ครั้ง จากซอสวานิลลาที่มีการจัดเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน เดนมาร์ก พบอาการท้องเสีย มากกว่า 200 ครั้ง จากข้าวที่มีเนื้อสัตว์ด้วย สเปน พบอาการท้องเสีย 13 ครั้ง จากบะหมี่ปรุงสุก ที่กระบวนการทำบะหมี่ทำให้เย็นลงไม่เหมาะสมนิวซีแลนด์ พบ 5 ครั้ง จากแพนเค้กที่เกิดจากอุณหภูมิและการจัดเก็บไม่เหมาะสม และ 27 ครั้ง จาก Sovoury rice, potato, mashed pumpkin (NZFSA, 2010)

ในประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2547 พบการระบาดของเชื้อ *B. cereus* จากการบริโภคนมพาสเจอไรส์ของนักเรียนโรงเรียนประถมศึกษาในจังหวัดนครปฐม 2 แห่ง ในวันที่ 18 พฤศจิกายน 2547 โรงเรียนแห่งแรกคือโรงเรียนวัดหว้าเอน มีผู้ป่วยจำนวน 16 ราย ซึ่งมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน และโรงเรียนวัดโพรงมะเดื่อมีผู้ป่วยทั้งสิ้น 24 รายมีอาการเช่นเดียวกับผู้ป่วยจากโรงเรียนวัดหว้าเอน ซึ่งเมื่อทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระโดยทำ Rectal swab เก็บตัวอย่างถุงนมที่เหลือหลังการดื่มนมสดพาสเจอไรส์ที่ยังไม่เปิดถุงน้ำแข็งที่ใช้แช่ถุงนม และทำการ swab ตู้เย็น ผลตรวจจากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลนครปฐมพบว่า พบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ใช้แช่นมและถุงนม ซึ่งจากการสอบสวนพบว่า ในช่วงบ่ายของทุกวันผู้ประกอบการจะขนส่งนมสดพาสเจอไรส์บรรจุถุงพลาสติกขนาด 200 มิลลิลิตร ไปส่งที่โรงเรียนก่อนรับประทาน 1 วัน จากนั้นโรงเรียนได้จัดเก็บนมทั้งหมดในตู้เย็น เช้าวันรุ่งขึ้นจึงแจกให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นักเรียนดื่ม ซึ่งสภาพตู้เย็นที่ใช้ในการจัดเก็บนมที่มีความเย็นไม่เพียงพอ อาจทำให้นมเน่าเสียเป็นเหตุให้เกิดอาการป่วยดังกล่าวได้ (กลุ่มระบาดวิทยา , 2547 อ้างโดย เสาวคนธ์, 2551)

ในปีพ.ศ. 2552 พบการระบาดของเชื้อ *B. cereus* จากการบริโภคไข่และหมูพะโล้ของเด็กนักเรียนจากโรงเรียนอนุบาลเอกชนแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร ในวันที่ 18 ธันวาคม 2552 พบเด็กอนุบาล 20 กว่าราย เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล ด้วยอาการอาเจียน ปวดท้อง ผู้ป่วยที่ยืนยันคือผู้ป่วยที่มีอาการเข้าข่ายกับผู้ป่วยสงสัยร่วมกับผลการเพาะเชื้อจากอุจจาระหรือจากอาเจียนพบเชื้อ *B. cereus* โดยอาการป่วย คือ อาเจียน (ร้อยละ 100) ปวดท้อง (ร้อยละ 59) ถ่ายเหลว (ร้อยละ 31) และไข้ (ร้อยละ 26) นอกจากการนี้จากผลการส่งตัวอย่างอาเจียน อุจจาระ และอาหารที่สงสัย พบเชื้อ *B. cereus* ในอาเจียน 3 ตัวอย่างจาก 6 ตัวอย่าง และพบเชื้อนี้จากน้ำพะโล้ที่เป็นอาหารกลางวันของนักเรียน ดังนั้น การระบาดในครั้งนี้น่าจะมีสาเหตุจากเชื้อ *B. cereus* ชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin) ที่ปนเปื้อนในไข่และหมูพะโล้ ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่นการการเก็บอาหารในตู้เย็น เนื่องจากเปิดตู้เย็นบ่อยอาจทำให้อุณหภูมิไม่เหมาะสมในการเก็บอาหาร การเก็บและการใช้อุปกรณ์เดียวกันระหว่างอาหารที่ปรุงสุกแล้วรวมกับอาหารสด การผึ่งเครื่องใช้ในครัวเอาไว้ในบริเวณที่มีฝุ่นมาก การพักอาหารที่ปรุงสุกแล้วเป็นเวลานานก่อนเสิร์ฟ นอกจากนี้ยังมีการปรุงอาหารโดยแม่ครัวที่มีอาการทางระบบทางเดินอาหาร หั่นอาหารที่ปรุงสุกแล้ว เช่น ไข่ต้ม และอาหารชนิดอื่นๆ ที่พร้อมบริโภค เช่น แตงโม ขนมปัง โดยไม่ใส่ถุงมือ (กรมควบคุมโรคติดต่อ OSIR, 2555)

ส่วนรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับสังขยาใบเตยนั้น ในปีพ.ศ. 2556 มีรายงานอาหารเป็นพิษจากการบริโภคขนมปังสังขยา เป็นนักเรียนโรงเรียนอนุบาลแห่งหนึ่ง เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร จำนวน 166 ราย โดยมีผู้ป่วย 22 ราย ต้องเข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาล โดยทุกรายมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดมวนท้องถ่ายเหลว ไม่มีไข้ จากการสอบถามครูและนักเรียน พบการบริโภคขนมปังสังขยามีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นเหม็น ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ในตัวอย่างขนมปังสังขยา พบเชื้อ *S. aureus* และตรวจเชื้อทางทวารหนักของผู้ป่วย 24 ราย พบเชื้อ *S. aureus* 4 ราย ดังนั้น ขนมปังสังขยาจึงอาจเป็นสาเหตุให้อาหารเป็นพิษดังกล่าว (สำนักระบาดวิทยา, 2556)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

NZFSA (2007) รายงานการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ 69 ร้าน ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างเบเกอรี่ทั้งหมด 250 ชนิดตัวอย่าง (126 ในฤดูร้อน และ 124 ในฤดูหนาว) มีคุณภาพทางจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์คุณภาพอาหารพร้อมบริโภค (Food standards Australia New Zealand, 2001) เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานอาหาร Australia New Zealand guidelines พบว่า 217 ใน 250 ตัวอย่าง (86.8%) มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ดีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และ 33 ตัวอย่าง พบเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli, B. cereus, coagulase-positive staphylococci และ *Salmonella* spp. อยู่ในเกณฑ์เฝ้าระวัง ประกอบด้วย 24 ตัวอย่าง (9.6%) มีคุณภาพพอใช้หรือค่อนข้างต่ำ 6 ตัวอย่าง (2.4%) อยู่ในเกณฑ์ไม่พอใจ และ 3 ตัวอย่าง (1.2%) มีแนวโน้มเกิดอันตรายต่อผู้บริโภค (ไส้ครีม 1 ตัวอย่าง และไส้คัสตาร์ดครีม 2 ตัวอย่าง) คือ พบเชื้อ *B. cereus* สูง (>10^4 CFU/g) โดยผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจากฤดูร้อนหรือฤดูหนาวไม่มีความแตกต่างกัน

จากผลการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ของ NZFSA (2007) 250 ตัวอย่าง มีไส้ครีม 126 ตัวอย่าง ไส้คัสตาร์ดครีม 120 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่างผสมทั้งไส้ครีมและคัสตาร์ดโดยพบว่าไส้ครีมสำหรับสอดไส้ในผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่ 126 ตัวอย่าง พบ *E. coli* อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ 2 ตัวอย่าง(1.6%) และพบหนึ่งตัวอย่าง (0.8%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus* ส่วนตัวอย่างไส้คัสตาร์ดครีมสำหรับสอดไส้ในผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่ 120 ตัวอย่างพบว่า 3 ตัวอย่าง (2.6%) อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ และพบ 2 ตัวอย่าง (1.7%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus*

Valero et al. (2002) ได้สำรวจและแยกเชื้อ *B. cereus* จากผักสดและอาหารแช่เย็นที่ผ่านกระบวนการน้อยที่มีส่วนประกอบของผัก พบว่าในพริกไทย *พบ B. cereus* 11 ตัวอย่างจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง แตงร้านพบ 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มะเขือเทศพบ 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง หัวหอมใหญ่พบ 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง แครอทพบ 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง และในแตงกวาพบ 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ทั้งนี้เมื่อนำสปอร์ของ *B. cereus* ที่แยกได้จากผักดังกล่าวมาหาค่าการทนความร้อนที่ 90°C พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* ที่พบในพริกไทยแตงร้านมะเขือเทศหัวหอมใหญ่และแตงกวามีค่า D_{90} เท่ากับ 4.4 – 21.2 นาที 4.3 – 5.4 นาที 1.5 – 2.3 นาที 6.6 นาที และ 3.5 นาที ตามลำดับ และเมื่อทำการสำรวจหาเชื้อ *B. cereus* ในอาหารแช่เย็นที่ผ่านกระบวนการน้อยที่มีส่วนประกอบของผักคือ gazpacho พบ *B. cereus* 2 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง salmorejo พบ *B. cereus* 4 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง และ ajoblanco พบ *B. cereus* 1 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่าง ซึ่งสปอร์ของ *B. cereus* ที่พบใน gazpacho, salmorejo และ ajoblanco มีค่า D_{90} เท่ากับ 1.4 – 5.5 นาที 2.8 – 6.4 นาที และ 5.1นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *B. cereus* ที่แยกได้จากผักชนิดต่างๆ ซึ่งมีค่าการทนความร้อนต่างกัน

สำนักอนามัย (2557) ได้จัดทำโครงการกรุงเทพฯ เมืองอาหารปลอดภัย ภายใต้แผนพัฒนากรุงเทพฯ พ.ศ. 2556-2559 โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภค 4 ประเภท โดยมีกลุ่มอาหารปรุงสุกหรืออาหารผ่านกรรมวิธีเก็บรักษา ซึ่งมีขนมปังมีไส้และไม่มีไส้ส่งตรวจวิเคราะห์หาเชื้อชนิดก่อโรค โดยกลุ่มตัวอย่างขนมปังกลุ่มมีไส้หรือไม่มีไส้ อาจผสมวัตถุอื่นที่ไม่มีอันตรายต่อสุขภาพ เช่น ลูกพรุน ลูกเกด ช็อกโกแลต จากผลการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 220 ตัวอย่าง พบว่าไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.9%โดยพบทั้งกลุ่มมีไส้กับไม่มีไส้ กลุ่มละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ ขนมปังไส้สังขยา และขนมปังแผ่น โดยตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ที่แยกได้จากสังขยาใบเตย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ในการยืนยันสายพันธุ์เชื้อบริสุทธิ์จากสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทำสังขยาใบเตย

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Food Travel, 2011 ครัวบ้านพิมพ์, 2553 และ Thai Dessert Recipes, 2012)

3.2.1	กะทิพาสเจอไรส์ ตรา ชาวเกาะ	45%
3.2.2	น้ำตาลทราย ตรา มิตรผล	22%
3.2.3	ไข่ไก่สด ตรา ซีพี และเบทาโกร	13.8%
3.2.4	น้ำใบเตยสด (อัตราส่วน ใบเตยต่อน้ำ 1:1)	10%
3.2.5	แป้งข้าวโพด ตรา คนอร์	4.7%
3.2.6	แป้งสาลี ชนิดแป้งเค้ก ตรา พัดโบก	4.5%
3.2.7	โปแตสเซียมซอร์เบต	0.04% และ 0.07%

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ

3.3.1	Agar	(Bacto, USA)
3.3.2	Baird Paker base medium	(Difco, USA)
3.3.3	Beef extract	(Difco, USA)
3.3.4	Brilliant green lactose bile broth (BGLB)	(Oxoid, USA)
3.3.5	Brain heart infusion (BHI) broth	(Merck, Germany)
3.3.6	Bismuth sulfite agar (BS)	(Merck, Germany)
3.3.7	Cooked meat medium	(Difco, USA)
3.3.8	Dextrose	(Difco, USA)
3.3.9	Dichloran glycerol (DG18) agar base	(Oxoid, USA)
3.3.10	D (+) glucose	(Carlo Erba Reagent, Italy)
3.3.11	Glycine	(Merck, Germany)
3.3.12	Glycerol	(Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.13 EC broth (Merck, Germany)

3.3.14 Hektoenenteric agar (HE) (Oxoid, USA)

3.3.15 Lactose broth (LB) (Oxoid, USA)

3.3.16 Lauryl tryptosebroth (Oxoid, USA)

3.3.17 Levine's eosin-methylene blue (L-EMB) agar (Oxoid, USA)

3.3.18 Lysine-indole-motility (LIM) medium (Merck, Germany)

3.3.19 Lysozyme (Merck, Germany)

3.3.20 Mannitol egg yolk- polymyxin agar (MYP) (Difco, USA)

3.3.21 Nutrient agar (NA) (Oxoid, USA)

3.3.22 Proteose peptone (Bacto, USA)

3.3.23 Plate count agar (Oxoid, USA)

3.3.24 Peptone (Difco, USA)

3.3.25 Rappaport -vassiliadis (Merck, Germany)

3.3.26 Rabbit plasma (Merck, Germany)

3.3.27 Trypticase peptone (Tryptone) (Difco, USA)

3.3.28 Phytone peptone (soytone) (Difco, USA)

3.3.29 Tetrathionate broth (Oxoid, USA)

3.3.30 Triple sugar iron (TSI) Agar (Merck, Germany)

3.3.31 Trypticasesoy agar (TSA) (Difco, USA)

3.3.32 Trypticase soy broth (TSB) (Difco, USA)

3.3.33 Trypticasesoy-sheep blood agar (TSSBA) (Oxoid, USA)

3.3.34 Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Oxoid, USA)

3.3.35 Yeast extract (Oxoid, USA)

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อ

3.4.1 Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$) (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.2 Brilliant green dye, sterile (Merck, Germany)

3.4.3 Calcium chloride ($CaCl_2$) (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.4 Copper sulphatepenta-hydrate ($CuSO_4.5H_2O$) (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.5 D-cycloserine (Merck, Germany)

3.4.6 Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.\ 7H_2O$) (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 Ferric ammonia citrate (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.8 Iodine, resublimed (I2) (Merck, Germany)

3.4.9 Lithium chloride $6H_2O$ (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.10 Manganese sulfate monohydrate ($MnSO_4\ H_2O$) (Merck, Germany)

3.4.11 Manganese chloride tetrahydrate ($MnCl_2.4H_2O$) (Merck, Germany)

3.4.12 Magnesium sulfate ($MgSO_4$) (Merck, Germany)

3.4.13 Malachite green (APS, Australia)

3.4.14 Polymyxin B solution (Difco, USA

3.4.15 Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

3.4.16 Potassium iodide (KI) (Merck, Germany)

3.4.17 Potassium nitrate (KNO_3) (Merck, Germany)

3.4.18 Potassium tellurite (Merck, Germany)

3.4.19 Safranin O (Scharlau, Spain)

3.4.20 Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)

3.4.21 Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany)

3.4.22 Sodium metabisulfite (Merck, Germany)

3.4.23 Sodium pyruvate (Merck, Germany)

3.4.24 Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba Reagent, Italy)

3.4.25 น้ำกลั่นหรือ น้ำกรอง (ประเทศไทย)

3.4.26 เอทธานอล(95%Ethanol) (องค์กรสุราสรรพสามิต, ประเทศไทย)

3.5 เครื่องมือ

3.5.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) 25, 30°C และ 35°C (Memmert, Germany)

3.5.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) 121°CModel SS-245 และ ES315 (Tomy, Japan)

3.5.3 เครื่องชั่งดิจิตอล (Balance) 2 ตำแหน่ง รุ่น DRAGON 3002 (Mettler-Toledo, Switzerland)

3.5.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (Memmert, Germany)

3.5.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow) (Boss Tech, Thailand)

3.5.6 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) (Heraeus, Germany)

3.5.7 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex mixer) (Scientific Industries, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (INOLAB, Germany)

3.5.9 เครื่องวัดค่าความหวาน (Refractometer) รุ่น N-2E : 28-62% Brix (ATAGO, Japan)

3.5.10 เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer) (Delta Trak, USA)

3.5.11 ตู้เย็น (Refrigerator) (Mitsubishi, Japan)

3.5.12 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon, Japan)

3.5.13 เครื่องบดปั่นอาหาร (Blender) (TefalMixblend, Thailand)

3.5.14 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) (IUL-Masticator, Spain)

3.5.15 ไมโครเวฟ (Electrolux, Thailand)

3.5.16 นาฬิกาจับเวลา (Canon, Japan)

3.5.17 เครื่องกวนขนาดเล็ก (Kajiwara Table Top Mixer) (KR-Mini, Japan)

3.6 อุปกรณ์

3.6.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dishes) ขนาด 90 x 15 มิลลิเมตร

3.6.2 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.6.3 ขวดแก้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.4 หลอดทดลองมีฝาปิด

3.6.5 กระบอกใส่เพลท และกระบอกใส่ปิเปต

3.6.6 แท่งแก้วงอ

3.6.7 บีกเกอร์แก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

3.6.8 บีกเกอร์พลาสติกมีหู ขนาด 1 และ 2 ลิตร

3.1.1 กระบอกตวง ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.3 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.1.4 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.5 แผ่นสไลด์

3.1.6 กระบอกน้ำกลั่น

3.1.7 ช้อนตักสาร

3.1.8 ตะกร้อมือ

3.1.9 กะละมังและหม้อสเตนเลส

3.1.10 ทัพพีสเตนเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.11 ผ้าขาวบางและตะแกรงกรองสเตนเลส

3.7 สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสุขาภิบาลอาหาร (Food Sanitation Laboratory) คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.8 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

กรกฎาคม 2556 – พฤษภาคม 2558

3.9 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

3.9.1 **ขั้นตอนที่ 1** ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตและสุ่มเก็บตัวอย่างสังขยาใบเตย ในโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง มาทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

3.9.1.1 ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1) กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง คือ กลุ่มที่มีค่าความชื้นและค่า Water activity สูง ได้แก่ กะทิพาสเจอไรส์ ไข่ไก่สด และใบเตยสด ทำการสุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 20 รุ่นการผลิต

1.2) กลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ คือ กลุ่มที่มีค่าความชื้นและค่า Water activity ต่ำ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลีชนิดเค้ก และน้ำตาลทราย ทำการสุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 10 รุ่นการผลิต

3.9.1.2 รายการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มชี้บ่งคุณภาพ (Food quality indicator) และชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (Food safety indicator)โดยรายการของเชื้อจุลินทรีย์ทำการตรวจตามข้อกำหนด(Standard) ของวัตถุดิบนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รายการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ

ชนิดวัตถุดิบ	รายการที่ตรวจวิเคราะห์		ข้อกำหนดอ้างอิง
	Food Quality	Food Safety	
1. กะทิพาสเจอไรส์	Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms	*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens*	มอก. 582-2531
2. ไข่ไก่สด	APC, Coliforms, *Escherichia coli*	*Salmonella* spp., *S. aureus*	กรมปศุสัตว์ 2551 : ไข่ Non pasteurized
3. ใบเตยสด	APC, *E. coli*	*Salmonella* spp., *S. aureus, B. cereus, C. perfringens*	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2553 : 1.5
4. แป้งข้าวโพด	APC, Yeasts & Molds, *E. coli*	*Salmonella* spp., *S. aureus, B. cereus*	มอก. 637-2529
5. แป้งสาลีชนิดเค้ก	APC, Yeasts & Molds, Coliforms, *E. coli*	*Salmonella* spp., *S. aureus, B. cereus*	มอก.373-2524
6. น้ำตาลทราย	Yeasts & Molds, *E. coli*	*Salmonella* spp., *S. aureus, B. cereus, C. perfringens*	มอก. 56-2552และกรมวิชาการเกษตร (2556)

3.9.1.3 ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบแต่ละชนิดตามรายการในข้อ 3.9.1.2 โดยนำตัวอย่างมาทำการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

(1) **Aerobic Plate Count (APC)** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัมโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม Butterfield's phosphate buffered (BPB) ลงไป 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ $10^{-1} – 10^{-6}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar โดยวิธี pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Compendium of Method for The Microbiological Examination of Foods Chapter 7: 2001

(2) **Yeasts and Molds (Y&M)** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัมโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม 0.1% peptone water ลงไป 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ 10เท่า จนได้ความเจือจางที่เหมาะสมทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran 18% glycerol (DG 18) agar โดยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วันตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 18: 2001

(3) **Coliforms & *Escherichia coli*** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม BPB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10:90) จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Tryptose (LST) broth ที่มีหลอดดักก๊าซ (durham tube) โดยใส่ความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร โดยทำอย่างน้อย 3 ความเจือจางที่ต่อเนื่องกัน (เช่น10^{-1} – 10^{-3}) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลแก๊สที่เกิดแต่ถ้าไม่มีแก๊สเกิดขึ้นให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ทำการยืนยัน Coliforms โดยใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth ใส่ลงใน Brilliant green lactosebile (BGLB) broth จำนวน 1 loop ต่อ 1 หลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่มีแก๊ส ส่วน *E. coli* ทำการถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth โดยใช้ loop ใส่ใน EC broth จำนวน 1 loop ต่อ 1 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45.5°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน Water bath อ่านผลหลอดที่มีแก๊ส หากไม่มีแก๊สเกิดขึ้นให้นำไปบ่มต่อให้ครบ 48 ชั่วโมงและใช้ loop ถ่ายเชื้อจาก EC broth มา streak ลงบนผิวหน้าของ Levine' s eosin-methylene blue (EMB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงโดย *E. coli* บน EMB agar โคโลนีจะมีสีม่วงดำเป็นมันวาวปนสีเขียว (metallic sheen) หรือโคโลนีสีม่วงดำทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 4 : 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) ***Staphylococcus aureus*** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัมโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม BPB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้ข้ากันโดย stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10:90) จนได้ความเจือจางที่เหมาะสมใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจางต่างๆ ใส่ในหลอดอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ที่เติม 10%NaCl และ 1%Sodium pyruvate โดยใส่ความเจือจางละ 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 ความเจือจางที่ต่อเนื่องกัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48± 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขย่าตัวอย่างให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วจึงใช้loop ถ่ายเชื้อจากหลอดTSB ที่เติม 10%NaCl และ 1%Sodium pyruvate ที่มีความขุ่นมา streak ลงบนผิวหน้าที่แห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird – Parker medium (BP) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 12: 2001

(5) ***Salmonella* spp.** ทำการชั่งตัวอย่าง 25 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ lactose broth (LB) ลงไป 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60±5 นาที (1 ชั่วโมง) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2ชั่วโมง กรณีไข่ไก่ตอก (ไข่เหลว) ชั่งไข่ไก่ตอก 25 กรัม 15 ครั้ง โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) รวมกันให้ได้ปริมาณ 375 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อTrypticase (tryptic) soy broth (TSB) supplemented with ferroussulfate ลงไป 3,375 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 ± 5 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปิเปตถ่ายเชื้อจากอาหาร LB หรือ TSB supplemented with ferrous sulfate 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate broth (TT) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง และใช้ปิเปตถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร LB หรือ TSB supplemented with ferrous sulfate 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport – assiliadis (RV) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C (ใน water bath) เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมงทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 5 : 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(6) ***Bacillus cereus*** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัมโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม BPB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ10 เท่า (10:90) จนได้ความเจือจางที่เหมาะสมปิเปตตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ (10^{-1} – 10^{-3}) 0.1 มิลลิลิตร ใส่บนผิวหน้าที่แห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin agar (MYP) เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ จนกระทั่งผิวหน้าของอาหารแห้ง ทำระดับความเจือจางละ 2 Plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 14 : 2012

(7) ***Clostridium perfringens*** ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม 0.1%peptone water ลงไป 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ stomacher นาน 2 นาที ทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10:90) ปิเปตตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าที่แห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Sulfite Cycloserine egg yolk (TSC-EY) agar แล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอ (spread) ที่ปราศจากเชื้อจนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง (ประมาณ 5 นาที) เททับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร รอให้อาหารที่เททับหน้าแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (ใน anaerobic jar หรือ anaerobic incubator) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างความเจือจางละ 2 ซ้ำและทำการสำรองเชื้อ (back-up)โดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจาก 0.1%peptone water ซึ่งมีความเจือจางที่ 1:10 (10^{-1}) มา 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหาร Cooked meat medium (modified) ที่ผ่านการต้มไล่อากาศแล้ว 3 - 4 หลอดและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมงแล้วใช้ loop ถ่ายเชื้อจาก Cooked meat mediumแต่ละหลอดมา Streak ลงบน TSC – EY agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน(ใน anaerobic jar หรือ anaerobic incubator) ทำการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการของ BAM (*Online*) Chapter 16 : 2001

3.9.1.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสปอร์ *B. cereus* ในวัตถุดิบ

นำวัตถุดิบที่ตรวจพบเชื้อชนิดที่สร้างสปอร์ เช่น ใบเตย ที่ตรวจพบ *B. cereus* มาทำการตรวจหาปริมาณสปอร์โดยการให้ความร้อน (Heat Shock) ที่ 80 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยนำใบเตยสด 50 กรัม ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดใบเตยแบบหยาบใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วเติม Butterfield's phosphate buffered ปริมาตร 450 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดย stomacher นาน 2 นาที ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างส่วนใสมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปิดฝาให้สนิท นำหลอดทดลองไปให้ความร้อน (Heat Shock) ใน Water Bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาแช่เย็นในน้ำที่มีน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 2 นาที นำไปตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ตามวิธีการในข้อ 3.9.13 (6) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) ทำการตรวจวิเคราะห์ควบคู่กับตัวอย่างใบเตยสดที่ไม่ได้นำไปให้ความร้อน (Heat Shock) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.1.5 การตรวจยืนยันสายพันธุ์จุลินทรีย์ก่อโรค

ทำการเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในตัวอย่างวัตถุดิบ เช่น *S. aureus, B. cereus, Salmonella* spp. และ *C. perfringens* เก็บในอาหาร Nutrient Agar slant แล้วทำการส่งวินิจฉัยสายพันธุ์เชื้อที่สำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.9.1.6 ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สังขยาใบเตย

(1) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างสังขยาใบเตยในโรงงานขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง มาทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์โดยการตรวจวิเคราะห์เชื้ออ้างอิงมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ มผช. 527/2547 เรื่อง สังขยา โดยมีกระบวนการผลิตตามภาพที่ 3.1 ที่แสดงขั้นตอนการผลิตสังขยาใบเตย และบรรจุใส่ถุงพลาสติกปลอดเชื้อขณะร้อน ขนาด 5 กิโลกรัม โดยทำการเก็บตัวอย่างสังขยาใบเตย ที่ผลิตใน 1 วัน มาวันละ 1 รุ่นการผลิตๆ ละ3 ถุง จำนวน 20 รุ่นการผลิต

(2) นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการโดยทันที เพื่อตรวจวิเคราะห์ ตามช่วงระยะเวลาจัดเก็บ โดยทางโรงงานกำหนดอายุของไส้ที่ 2 วัน ดังนี้

2.1) ตัวอย่างหลังการผลิต และพักเย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-4 ชั่วโมง คือ ตัวอย่างที่ 0 วัน

2.2) ตัวอย่างที่จัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง คือตัวอย่างที่ 1 วัน

2.3) ตัวอย่างที่จัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง คือตัวอย่าง ที่ 2 วัน

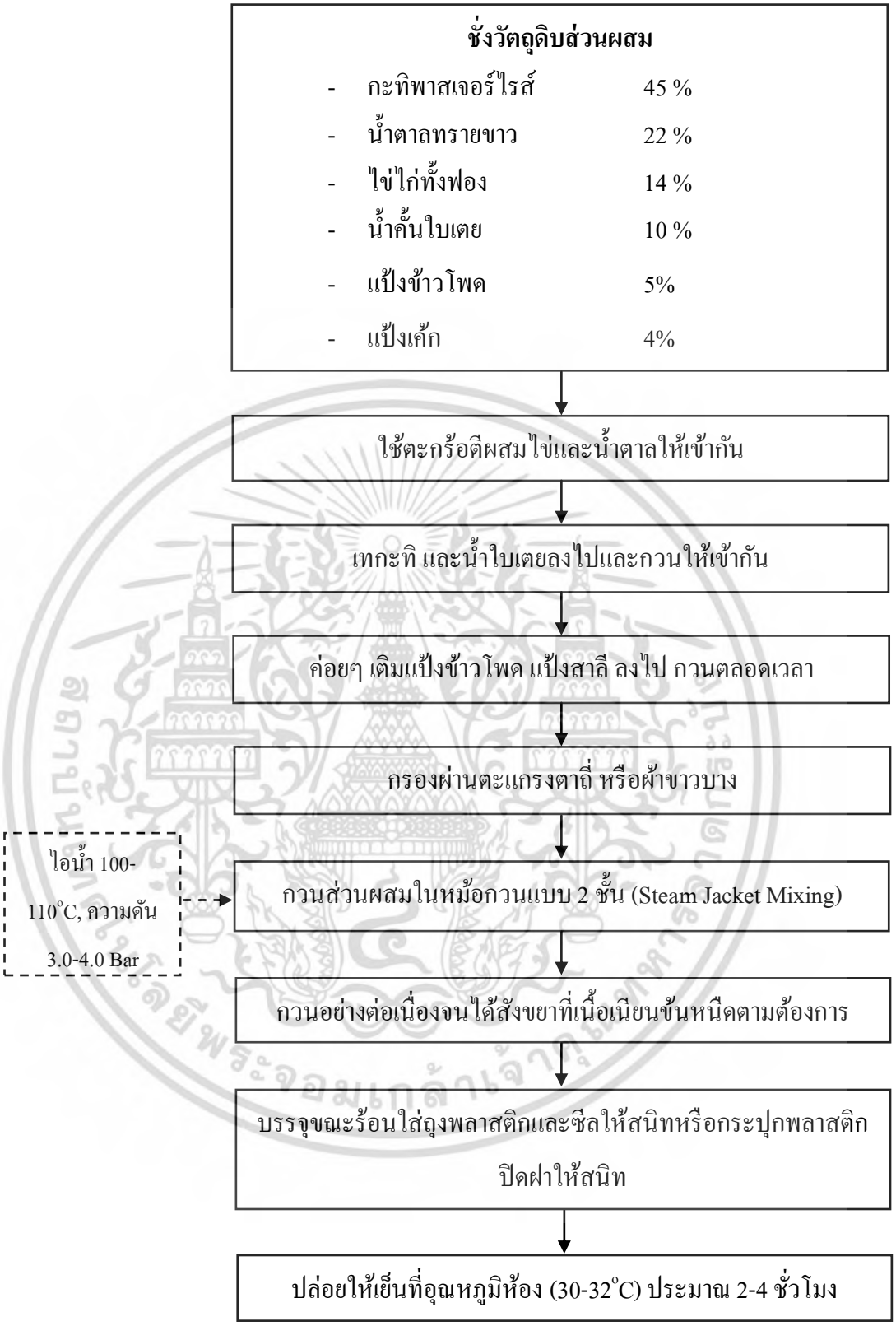
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) นำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพ (Food Quality) ได้แก่ Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms และ *E. Coli* และกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (Food Safety) ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *B. cereus* และ *C. perfringens* ตามขั้นตอนวิธีการตามข้อ 3.9.1.3

3.9.1.7 การตรวจยืนยันสายพันธุ์จุลินทรีย์ก่อโรคทำการเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในตัวอย่างอาหารซึ่งมีลักษณะเฉพาะของเชื้อ *B. cereus* ได้จากการทดสอบในข้อ 3.9.1.5 ทำการ Steak ลงอาหาร Nutrient Agar slant แล้วทำการส่งวินิจฉัยสายพันธุ์เชื้อที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาทดลองต่อในขั้นถัดไป

3.9.1.8 การวางแผนการทดลอง และวิจารณ์ผลในขั้นตอนที่ 1 นี้ เพื่อตรวจสอบความเสี่ยงในการพบเชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบที่ใช้ผลิตและในสังขยาใบเตยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยให้ Lot ของวัตถุดิบ เป็นบล็อก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตสังขยาใบเตย

ที่มา : ดัดแปลงจากครัวบ้านพิมพ์ (2553) และ Thai Dessert Recipes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.2 **ขั้นตอนที่ 2** ศึกษาระยะเวลาในการความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°Cที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ที่มีผลต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับปริมาณเชื้อตามที่ตรวจพบในข้อ 3.8.1.2 (3-4 log CFU/g) และปริมาณเชื้อในระดับ Worst Case (6 log CFU/g) ในการผลิตสังขยาใบเตยดังนี้

3.9.2.1 การเตรียมเชื้อ

3.9.2.1.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *B. cereus*

(1) นำเชื้อ *B. cereus* ที่ทำการคัดแยกได้จากข้อ 3.9.1.5 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) Slant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

(2) ทำการถ่ายเชื้อ 1 ลูป จากข้อ 3.9.2.1.1 (1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryticase Soy Broth (TSB) 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3) ตรวจนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น โดยทำการเจือจางด้วย Butterfied's phosphate buffer ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และ Spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) ระดับความเจือจางละ 2 plate บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีจะได้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นที่ 10^8 – 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.9.2.1.2 การเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

(1) นำเชื้อ *B. cereus* ที่ได้จากข้อ 3.9.2.1.1 (1) ทำการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fortified Nutrient Agar (FNA) Slant (ทัศพร, 2558) เพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ใช้ลูปปลอดเชื้อขูดเชื้อให้ละลายในน้ำกลั่น นำสปอร์ที่ได้ในหลอดน้ำกลั่นปลอดเชื้อมาให้ความร้อนที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ (El-Nourand Hammad, 2013)

(2) ตรวจนับจำนวนสปอร์เริ่มต้นโดยนำ Spore suspension ที่ได้จากข้อ 3.9.2.1.2 (1) มาทำการเจือจางด้วย Butterfied's phosphate buffer ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และ Spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) ระดับความเจือจางละ 2plate บ่มที่ 30°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีจะได้ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. ceruse* เริ่มต้นที่ $10^{8} – 10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.9.2.2 ศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

3.9.2.2.1 ขั้นตอนการผลิตสังขยาใบเตย

(1) ชั่งเตรียมส่วนผสมสำหรับทดสอบที่ 2 kg/batch ดังนี้

1.1) กะทิพาสเจอร์ไรส์ ตรา ชาวเกาะ	45%
1.2) น้ำตาลทราย ตรา มิตรผล	22%
1.3) ไข่ไก่สด ตรา ซีพี และเบทาโกร	13.8%
1.4) น้ำใบเตยสด (อัตราส่วน ใบเตยต่อน้ำ 1:1)	10%
1.5) แป้งข้าวโพด ตรา คนอร์	4.7%
1.6) แป้งสาลี ชนิดแป้งเค้ก ตรา พัดโบก	4.5%

(2) ขั้นตอนการผลิตสังขยาใบเตย

2.1) จัดเตรียมตะกร้อมือ ทัพพี ผ้าขาวบาง Blender และกะละมังสเตนเลสปลอดเชื้อ

2.2) ล้างทำความสะอาดไข่ไก่ และแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 ชั่งโมง

2.3) ล้างทำความสะอาดใบเตยด้วยน้ำสะอาด และปั่นรวมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ อัตราส่วน 1:1

2.4) ตอกไข่ไก่ใส่กะละมัง ใช้ตะกร้อตีไข่ และเติมน้ำตาลทรายลงไปคนให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมกะทิพาสเจอร์ไรส์ และค่อยๆ เทแป้งข้าวโพดและแป้งสาลี เติมน้ำใบเตย และกรองผ่านผ้าขาวบางปลอดเชื้อใส่กะละมังสเตนเลส กรณีเติมเชื้อเซลล์หรือสปอร์ให้เติมหลังกรองผ่านผ้าขาวบางเสร็จ

2.5) เปิดเครื่อง Water bath ที่ 95°C เมื่อเครื่องทำอุณหภูมิได้ที่ 95°C นำกะละมังสแตนเลสใส่ส่วนผสมวางด้านบนให้ไอน้ำให้ความร้อน ใช้ตะกร้อมือกวนไปทางเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ พร้อมเริ่มจับเวลา

2.6) วัดอุณหภูมิกึ่งกลาง และใช้ทัพพีปลอดเชื้อตักตัวอย่างตามช่วงระยะเวลาที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7) จัดเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก หรือกระปุกพลาสติกปิดสนิท

3.9.2.2.2 ทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้การผลิตสังขยาใบเตย โดยใช้Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C ทำการผลิตสังขยาใบเตย ตามข้อ 3.9.2.2.1 จนมีความข้นหนืดและวัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดอยู่ที่ 38-40°Brixใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิกึ่งกลางหม้อกวน จดบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ได้ระยะเวลาเฉลี่ยมากำหนดแผนการทดลองในขั้นต่อไป

3.9.2.3 ทดสอบผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ต่อการเหลือรอดของเซลล์ และสปอร์ *B. cereus* ที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือที่ระดับที่ตรวจพบตามข้อ 3.9.1.2 ทั้งเซลล์ และสปอร์ ที่ 4 log CFU/g และที่ระดับ Worst Case ทั้งเซลล์ และสปอร์ ที่ 6 log CFU/g โดยดำเนินการทดสอบดังนี้

(1) นำเซลล์และสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.2.1 ตามระดับความเข้มข้นที่กำหนด เติมลงในส่วนผสมไส้สังขยาใบเตย และทำการผลิตตามขั้นตอนข้อ 3.9.2.2 จำนวน 2 kg/batch ใช้ไอน้ำจาก Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C ให้ความร้อน และใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิกึ่งกลางหม้อกวน จดบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 10 นาที

(2) สุ่มชักตัวอย่างทุกๆ 10 นาที โดยชักตัวอย่างควบคุม (Control) 1 ชุดต่อการทดลอง 1 ซ้ำ ก่อนการเติมเชื้อ *B. cereus* (Control, 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60นาที) วิเคราะห์ควบคู่กันไปทุกครั้ง

(3) นำตัวอย่างมาทำการทดสอบหาค่า pH, วัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด และ *B. cereus* ตามขั้นตอนข้อ 3.9.1.3

(4) ทำผลจากการทดลองในข้อ (1) - (3) ซึ่งทำ 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยดูการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus*

3.9.2.4 การวางแผนการทดลอง และวิจารณ์ผลในขั้นตอนที่ 2 นี้เป็นการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตยที่อุณหภูมิน้ำ 95°C และเติมเซลล์ของ*B. Cereus* และสปอร์ของ*B. Cereus* ที่ 2 ระดับ คือ 4 log และ 6 log CFU/g และสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาที (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 นาที) มาทดสอบหาค่า pHค่าของแข็งละลายน้ำ และ *B. cereus* ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นการวางแผนการทดลองแบบสปลิตพลอตใน RCBD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3 **ขั้นตอนที่ 3** ศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ต่อการยับยั้งของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยระยะเวลาสูงสุดที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.3 มากำหนด ดังนี้

3.9.3.1 ทดสอบใช้ระดับความเข้มข้นของโปแตสเซียมซอร์เบต ที่โรงงานอุตสาหกรรมใช้ คือ 0.07% (700 ppm) และที่ระดับต่ำ คือ 0.04% (400 ppm) เพื่อลดปริมาณการใช้สารวัตถุกันเสียโดยมีวัตถุดิบคือ กะทิพาสเจอไรส์ ตราชาวเกาะ ที่มีการเติมโซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01% (1000 ppm)

3.9.3.2 ทำการผลิตตามขั้นตอนในข้อ 3.9.2.2 จำนวน 2 kg/batch ที่ระยะเวลาสูงสุดที่มีผลต่อเซลล์และสปอร์ *B. cereus* คือ 60 นาที และปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 นาทีที่ระดับ Worst Case ทั้งเซลล์ และสปอร์ (6 log CFU/g)

3.9.3.3 ทดสอบควบคู่กับตัวอย่างควบคุม 4 Treatment คือ

(1) สังขยาใบเตยที่ไม่มีการเติมวัตถุกันเสียและเชื้อ *B. cereus*

(2) สังขยาใบเตยที่มีการเติมเชื้อเซลล์หรือสปอร์ที่ 6 log CFU/g

(3) สังขยาใบเตยที่มีการเติมโปแตสเซียมซอร์เบต 0.04%

(4) สังขยาใบเตยที่มีการเติมโปแตสเซียมซอร์เบต 0.07%

3.9.3.4 สุ่มชักตัวอย่างที่ 0 (เริ่มเติม *B. cereus*) และ 60 นาที (อายุ 0 ชั่วโมง) นำตัวอย่างมาทำการทดสอบหาค่า pH, Brix และหาเชื้อ *B. cereus*

3.9.3.5 จัดเก็บสังขยาใบเตยในถุงพลาสติก หรือกระปุกพลาสติกปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง ตามอายุการจัดเก็บที่ 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมงและหาเชื้อ *B. cereus* ตามอายุการจัดเก็บดังกล่าว

3.9.3.6 ทำผลจากการทดลองในข้อ 3.9.3.1 - 3.9.3.5 ซึ่งทำ 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ยดูการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus*

3.9.3.7 การวางแผนการทดลอง และวิจารณ์ผลในขั้นตอนที่ 3 นี้เพื่อศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ทั้งเซลล์และสปอร์ (6 log CFU/g) ในการผลิตสังขยาใบเตยที่ 95°C ร่วมกับการเติม Potassium sorbate ที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ 0.04 และ 0.07% สุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 60 นาที มาทดสอบหาค่า pH ค่าของแข็งละลายน้ำและ *B. cereus* และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในสังขยาใบเตยที่จัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมงทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นการวางแผนการทดลองแบบสปลิตพลอตใน RCBD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3.8 การทดสอบผล pH ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของโปแตสเซียมซอร์เบต ปริมาณ 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ต่อการยับยั้งการเจริญของสปอร์ของ *B. cereus* โดยใช้เทคนิค Spread plate สปอร์ของ *B. cereus* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) แล้วนำแผ่น Antibiotic Assay Disks ที่บรรจุสารละลายโปแตสเซียมซอร์เบตปริมาณ 400 และ 700 ppm ซึ่งปรับค่า pH ที่ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางลงบนเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบดูโซนใสที่เกิดขึ้นบริเวณรอบแผ่น Antibiotic Assay Disks

3.9.4 **ขั้นตอนที่ 4** ทวนสอบ (Validate process) กระบวนการผลิตสังขยาใบเตย ในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยใช้เครื่องกวนขนาดเล็ก (Kajiwara Table Top Mixer KR-Mini, Japan) ใช้แก๊สหุงต้ม LPG ให้ความร้อน

3.9.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ กำหนดให้เพิ่มขั้นตอนการแช่ใบเตยในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 50 ppm โดยนำใบเตยมาทำการตัดแต่งโคนไม่ให้มีคราบดินโคลน ล้างด้วยน้ำสะอาดทีละใบ และแช่ด้วยสารละลายคลอรีน (โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์) ความเข้มข้น 50 ppm นาน 10 นาที หลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นและคั้นน้ำใบเตย

3.9.4.2 ทำการผลิตสังขยาใบเตย ตามขั้นตอนในข้อ ข้อ 3.9.2.2 จำนวน 5 kg/batch โดยใช้เครื่องกวนขนาดเล็ก (Kajiwara Table Top Mixer KR-Mini, Japan) ควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C ในโรงอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่ง ทำการวัดอุณหภูมิกึ่งกลางทุกๆ 10 นาที และชักตัวอย่างมาวัดค่า pH และค่าความหวานทุกๆ 10 นาที

3.9.4.3 การผลิตสังขยาใบเตย โดยให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) 0.07% และนำตัวอย่างมาตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

3.9.4.4 การวางแผนการทดลอง และวิจารณ์ผลในขั้นตอนที่ 4 นี้เพื่อดูผลการเหลือรอดของเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก และตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus*ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมงเป็น เป็นการวางแผนการทดลองแบบสปลิตพลอตใน RCBD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ในตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตและสังขยาใบเตย ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง

4.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ในผลิตสังขยาใบเตย

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างวัตถุดิบทุกชนิดที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย มาตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งคุณภาพ (Food Quality Indicator) ได้แก่ Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms และ *Escherichia coli* และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (Food Safety Indicator) ได้แก่ *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* ตามเกณฑ์เชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนด (Standard) ของวัตถุดิบนั้นๆ เช่น มอก. มกษ. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกาศกรมปศุสัตว์ เป็นต้น โดยแบ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงที่มีค่าความชื้นและค่า Water activity (a_w) สูง ได้แก่ กะทิพาสเจอไรส์ ไข่ไก่สด (ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและแช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 20 ppm นาน 5-10 นาที) และใบเตยสด (ที่ตัดแต่งโคนและล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาพร้อมนำไปใช้) ทำการสุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 20 รุ่นการผลิต และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำที่มีค่าความชื้นและค่า Water activity (a_w) ต่ำ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี ชนิดเค้ก และน้ำตาลทราย ทำการสุ่มตัวอย่างมาอย่างละ 10 รุ่นการผลิต

จากผลการสำรวจคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย (ตารางที่ 4.1) พบวัตถุดิบ 2 ชนิด ตรวจพบเชื้อชนิดก่อโรค ได้แก่ ใบเตยสด ตรวจพบเชื้อ *B. cereus และ S. aureus* และไข่ไก่ตรวจพบ *Salmonella* spp. ส่วนวัตถุดิบอื่นๆ ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค โดยผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชี้วัดคุณภาพในตัวอย่างวัตถุดิบกลุ่มเสี่ยง จำนวน 20 รุ่นการผลิต ได้แก่ ใบเตยสด ซึ่งได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบเตยที่ตัดแต่งโคนและล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาพร้อมนำไปใช้ในการคั้นน้ำใบเตยสำหรับใช้ผลิตสังขยาใบเตย ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Aerobic Plate Count) จำนวน 20 ตัวอย่าง (100%) โดยพบตั้งแต่ 2.2×10^5 ถึง 8.8×10^6 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งมีปริมาณเกินกว่าเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) กำหนดไว้ในอาหารดิบ (ข้อ 1.5 อาหารพร้อมปรุงหรืออาหารอื่นๆ ที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสม) กำหนดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1) และใบเตยสด ยังตรวจพบ *E. coli* จำนวน 18 ตัวอย่าง (90%) โดยพบตั้งแต่ 3.6 ถึงมากกว่า 1100 MPN/g ซึ่งมีปริมาณเกินกว่าเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) กำหนดปริมาณ *E. coli* ในอาหารดิบ (ข้อ 1.5) ไว้น้อยกว่า 100 MPN/g จำนวน 7 ตัวอย่าง (35%) (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1) สอดคล้องกับรายงานของ พิมพ์เพ็ญและสาทิป (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ตรวจพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ทั้งหมดในใบเตย 7.41 log CFU/g และปริมาณโคลิฟอร์มทั้งหมดในใบเตย 3.4 log CFU/g เนื่องจากใบเตยเป็นพืชครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลูกได้ดีตามชายน้ำ มีลำต้นเตี้ยโคนต้นแช่อยู่ในดินโคลนแฉะจึงมีโอกาสปนเปื้อนได้สูง (NACMCF, 1999 อ้างโดย พิมพ์เพ็ญและสาทิป, 2555) ประกอบกับใบเตยซึ่งมีพื้นผิวสัมผัสมาก ลักษณะใบเป็นกาบเรียงซ้อนทับกันทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ (พิมพ์เพ็ญและสาทิป, 2555) ถึงแม้ใบเตยที่นำใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยทำการตัดแต่งส่วนรากและโคนใบออกและล้างทำความสะอาดคราบสกปรกด้วยน้ำประปาแล้ว ก็ยังพบปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นสูงมาก

ส่วนตัวอย่างไข่ไก่ ซึ่งสุ่มเก็บจากไข่ไก่พร้อมนำไปใช้ผลิตที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและแช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 20 ppm นาน 5-10 นาที ตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดจำนวน 20 ตัวอย่าง (100%) โดยพบตั้งแต่ 70 ถึง 1.4×10^4 โคโลนีต่อกรัม พบเชื้อกลุ่ม Coliforms จำนวน 10 ตัวอย่าง (50%) โดยพบตั้งแต่ 3.6 ถึง 93 MPN/g และตรวจไม่พบ *E. coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม ในทุกตัวอย่าง ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของกรมปศุสัตว์ (2551) เรื่อง เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก (ไข่ Non pasteurized) กำหนดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไว้ไม่เกิน 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม Coliforms ไม่เกิน 100 โคโลนีต่อกรัม และตรวจไม่พบ *E. coli* ต่อกรัม ทั้งนี้การพบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Coliforms อาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น ฟาร์มเลี้ยงไก่ การขนส่ง ภาชนะรองรับไข่ไก่ การเก็บรักษา การล้างทำความสะอาด เป็นต้น (ณัฐา และคณะ, 2558)

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชี้วัดคุณภาพในกะทิพาสเจอไรส์ จากการสุ่มเก็บตัวอย่างกะทิพาสเจอไรส์ที่บรรจุถุงพลาสติกปิดสนิท ขนาด 1 กิโลกรัมต่อถุง มีการเก็บรักษาในตู้เย็น ตรวจพบเฉพาะปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวน 6 ตัวอย่าง (30%) โดยพบตั้งแต่ 90 ถึง 5.3×10^2 โคโลนีต่อกรัม และตรวจไม่พบจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค โดยยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ มอก. 582-2531 กำหนดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในกะทิพาสเจอร์ไรส์ ไม่เกิน 20,000 โคโลนีต่อกรัม แสดงว่ากระบวนผลิตกะทิพาสเจอไรส์สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับปลอดภัยได้ ซึ่งแตกต่างจากการกะทิสดที่ขายในตลาด ตามรายงานของนุชรา และคณะ (2550) ที่ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Coliforms ในหัวกะทิและหางกะทิทุกตัวอย่าง และพบเชื้อ *S. aureus* ในหัวกะทิ 75% และหางกะทิ 79.2% จากการสำรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียในกะทิสดที่จำหน่ายในตลาดที่ตั้งอยู่ใน 8 จังหวัด คือ กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ราชบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 24 ตลาด ตลาดละ 1 ร้าน ทุกร้านจะเก็บตัวอย่างหัวกะทิและหางกะทิ ซึ่งมีปัจจัยในการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์หลายปัจจัย เช่น การวางมะพร้าวกับพื้น การจัดวางเครื่องขูด เครื่องคั้น สูงไม่ถึง 60 เซนติเมตร โดยการสำรวจของนุชรา และคณะ (2550) พบว่าการจัดวางเครื่องขูด เครื่องคั้น ที่วางมะพร้าวลูก ที่วางจำหน่ายกะทิ สูงตั้งแต่ 60 เซนติเมตร ขึ้นไป ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ในหัวกะทิน้อยที่สุด และสถานที่ล้างมะพร้าวลูกสูงตั้งแต่ 60 เซนติเมตร ขึ้นไป ตรวจพบเชื้อ *S. aureus* น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพ และปริมาณที่ตรวจพบในวัตถุดิบ (Food quality indicator results of high and low risk ingredients)

Name of sample	No. of sample	Microbiological detected in samples				Microbiological results			
		APC (CFU/g)	Y&M (CFU /g)	Coliforms (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	APC (log CFU/g)	Y&M (log CFU/g)	Coliforms (log MPN/g)	*E. coli* (log MPN/g)
High Risk Ingredients									
Fresh Cut Pandan Leave	20	20 (100%)	-	-	18 (90%)	6.62 ± 0.39	-	-	1.83 ± 0.67
Pasteurized Coconut Milk	20	6 (30%)	0	0	0	2.29 ± 0.33	0	0	0
Whole Egg	20	20 (100%)	-	10 (50%)	0	3.11 ± 0.65	-	1.11 ± 0.59	0
Low Risk Ingredients									
Cornstarch	10	9 (90%)	3 (30%)	0	0	10	1.82 ± 0.52	1.00 ± 0.00	0
Cake Wheat flour	10	10 (100%)	10 (100%)	0	0	10	1.68 ± 0.39	1.35 ± 0.32	0
Sugar	10	-	0	0	0	10	-	0	0

Remark: 0 = Yeasts & Molds <10 CFU/g, Coliforms & *E. coli* <3MPN/g are not detected in lower limit of detection

- (Dash) = Not analysis

Y&M = Yeasts & Molds

APC = Aerobic Plate Count

จากผลการสำรวจคุณภาพเชื้อจุลินทรีย์ชี้วัดความปลอดภัยอาหาร ของวัตถุดิบกลุ่มเสี่ยง จำนวน 20 รุ่นการผลิต (ตารางที่ 4.2) ตัวอย่างวัตถุดิบที่นำมาศึกษาทั้งหมดตรวจไม่พบเชื้อ *C. perfringens* ส่วนในตัวอย่างใบเตยสดที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบเตยที่ตัดแต่งโคนและล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาพร้อมนำไปใช้ในการคั้นน้ำใบเตยสำหรับใช้ผลิตสังขยาใบเตย ตรวจพบเชื้อชนิดก่อโรค คือ พบ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) โดยพบตั้งแต่ 2.5 x 10^2 ถึง 1.0 x 10^4 โคโลนีต่อกรัม และ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (10%) โดยพบตั้งแต่ 23 ถึง 93 MPN/g โดยปริมาณ *B. cereus* เกินกว่าเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553) กำหนดไว้ในอาหารดิบ (ข้อ 1.5 อาหารพร้อมปรุงหรืออาหารอื่นๆ ที่มีอาหารดิบเป็นส่วนประกอบหรือส่วนผสม) กำหนดปริมาณ *B. cereus* น้อยกว่า 1 x 10^3 โคโลนีต่อกรัม จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) (ภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1) ตามรายงานของ พิมพ์เพ็ญและสาทิป (2555) ที่ทำการทดลองล้างใบเตยด้วยน้ำเปล่าเป็นเวลา 30 วินาที ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงได้ 1.59 log CFU/g จากจุลินทรีย์เริ่มต้น 7.41 log CFU/g เป็น 5.82 log CFU/g ทั้งนี้ขั้นตอนการล้างเป็นขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบที่สำคัญ เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก สิ่งแปลกปลอม และลดอันตรายในอาหารโดยเฉพาะอันตรายจากจุลินทรีย์ การล้างที่ดีต้องสามารถลดการปนเปื้อนที่พื้นผิวของวัตถุดิบได้ แต่อย่างไรก็ตามการล้างพื้นผิวด้วยน้ำเปล่า หรือน้ำประปาสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่มากนัก ส่วนใหญ่สามารถลดได้เพียง 1 log CFU/g เมื่อเทียบกับการใช้สารฆ่าเชื้อ (Singh et.al., 2002 อ้างโดย พิมพ์เพ็ญและสาทิป, 2555) เนื่องจากลักษณะใบเตยเป็นกาบเรียงซ้อนทับกันทำให้ง่ายต่อการยึดเกาะของจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง การล้างเฉพาะน้ำประปา จึงไม่สามารถลดปริมาณของเชื้อ *B. cereus* ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus* ในใบเตยนั้นตามขั้นตอนเก็บเกี่ยวใบเตยมีการสัมผัสกับมือคนในทุกขั้นตอนจนถึงการล้างและการขนส่ง จึงมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อที่เป็น normal flora ตามผิวหนังของคนและสัตว์ คือ *S. aureus* และจุลินทรีย์ที่มาจากสุขนิสัยส่วนบุคคลที่ไม่ถูกต้อง เช่น ไม่ล้างมือหลังหยิบจับอาหารดิบ หลังจากเข้าห้องน้ำห้องส้วมไม่ล้างมือให้สะอาด เช่น จุลินทรีย์กลุ่ม Coliforms และ *E. coli* (ดาริวรรณ และคณะ, 2556)

ผลการสำรวจคุณภาพเชื้อจุลินทรีย์ชี้วัดความปลอดภัยอาหารในไข่ไก่ ซึ่งสุ่มเก็บจากไข่ไก่พร้อมนำไปใช้ผลิตที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและแช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 20 ppm นาน 5-10 นาที ตรวจพบ *Salmonella* spp. จำนวน 4 ตัวอย่าง (20%) สอดคล้องกับรายงานของ ยศนันท์ (2550) ตรวจพบ *Salmonella* spp. ในไข่ไก่จากตลาดและห้างสรรพสินค้า ผลรายงานพบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella ruiru* ปริมาณ 4.76% ของตัวอย่างเปลือกไข่จากตลาดสด ส่วนตัวอย่างไข่ไก่จากห้างสรรพสินค้าตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งในเปลือกไข่และเนื้อไข่ รายงานของ อรวรรณ์ (2543) ได้สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. จากฟาร์มไก่ 3 ฟาร์ม ในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. 3.2% ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อม โดยพบการปนเปื้อนในถาดไข่พลาสติกมากที่สุด 26.7% รองลงมาพบในน้ำสำหรับเลี้ยงไก่ 13.5% มือคนเก็บไข่ 13.2% อาหารเลี้ยงไก่ 10.3% และอุจจาระไก่ 0.2% โดยไม่พบการปนเปื้อนในตัวอย่างเปลือกไข่และไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร และปริมาณที่ตรวจพบในวัตถุดิบ (Food safety results of high and low risk ingredients)

Name of sample	No. of sample	Microbiological detected in samples				Microbiological results			
		S. aureus (MPN/g)	*Salmonella* spp. (ND/25 g)	*B. cereus*[a] (CFU/g)	*C. perfringens*[a] (CFU/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (ND/25 g)	*B. cereus*[a] (log CFU/g)	*C. perfringens*[a] (log CFU/g)
High Risk Ingredients									
Fresh Cut Pandan leave	20	2 (10%)	0	19 (95%)	0	23-93	0	3.40 $\pm$ 0.45	0
Pasteurized Coconut Milk	20	0	0	0	0	0	0	0	0
Whole Egg	20	0	4 (20 %)[b]	0	-	0	NA	0	-
Low Risk Ingredients									
Cornstarch	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Cake Wheat flour	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Sugar	10	0	0	0	0	0	0	0	0

Remark: a = less than 100 CFU/g is not detected in lower limit of detection

b = *Salmonella* spp. of Whole Egg reported to Detected/375 g

NA = Not activity for quantitative test

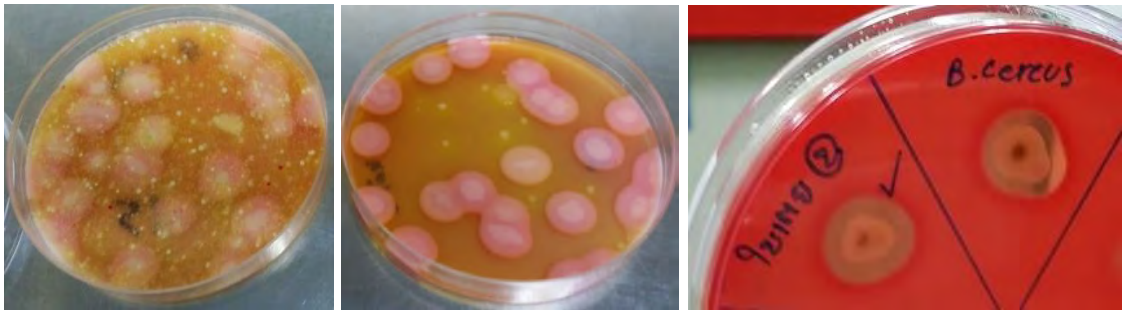
ส่วนรายงานของ ณัฐาและคณะ (2558) ที่สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในไข่ไก่ ไข่เป็ด และไข่นกกะทา ที่วางจำหน่ายในเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี พบการปนเปื้อน เชื้อ *Salmonella* spp. ในเปลือกไข่ไก่ จำนวน 9% และเนื้อไข่ไก่ 7% ของตัวอย่างไข่ไก่ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ทั้งนี้ในกรณีที่ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. จากทั้ง 3 รายงานดังกล่าวข้างต้น มีปัจจัยในการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. หลายปัจจัย เช่น เกิดการติดเชื้อซัลเนลลาในสัตว์ปีกหรือโรค salmonellosis ซึ่งสัตว์ที่ติดเชื้อจะมีแบคทีเรียดังกล่าวในท่อนำไข่ทำให้ Salmonellae มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการสร้างไข่ฟอง (Snoeyenbos, 1991 อ้างโดยณัฐาและคณะ, 2558) ฟาร์มเลี้ยงไก่มีการเก็บไข่ไก่ในภาชนะที่ไม่สะอาด ดังรายรายงานของอรวรรณ์ (2543) ที่ตรวจพบ Salmonellae ในถาดไข่พลาสติกและมือคนเก็บไข่น่าจะเป็นแหล่งสำคัญของการกระจายเชื้อ Salmonellae ข้อมูลจะเป็นประโยชน์สำหรับการบริหารจัดการและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ Salmonellae ในอุตสาหกรรมไข่ไก่ เพื่อให้การควบคุมคุณภาพของอาหารเก็บรักษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งการรักษาไข่ไก่ไว้ตามที่กำหนด จะสามารถชะลอการเสื่ยเสียได้

4.1.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสปอร์ *B. cereus* ในวัตถุดิบ

เมื่อนำใบเตยสด มาทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยการนำตัวอย่างใบเตยสดหั่นหยาบ 50 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) เติม Butterfield's phosphate buffered ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย stomacher นาน 2 นาที ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปิดฝาให้สนิท นำหลอดทดลองไปให้ความร้อนเพื่อทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยการทำ Heat Shock ใน Water Bath ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาแช่เย็นในน้ำที่มีน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 2 นาที นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ควบคู่กับตัวอย่างใบเตยสดที่ไม่ได้นำไป Heat Shock ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตดูลักษณะเฉพาะของเชื้อ *B. cereus* บนอาหาร MYP โคโลนี *B. cereus* ที่ขึ้นเป็นโคโลนีสีชมพู เกิด opaque zone รอบๆ โคโลนี ตามภาพที่ 4.1a และ 4.1b และยืนยันเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* โดยดูการสร้าง hemolysis ของเชื้อบนอาหาร TSA- Sheep Blood จะพบ hemolytic zone ขนาด 2 มิลลิเมตร รอบๆ โคโลนี

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างใบเตยสดก่อนการให้ความร้อนเพื่อดูปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อและหลังให้ความร้อนเพื่อตรวจหาปริมาณสปอร์ของเชื้อ พบว่าตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ปริมาณใกล้เคียงกัน คือ ก่อนการให้ความร้อนพบ จำนวน $4.80 \times 10^2 \pm 1.18 \times 10^2$ โคโลนีต่อกรัม และหลังการ ให้ความร้อนพบ *B. cereus* จำนวน $4.20 \times 10^2 \pm 0.95 \times 10^2$ โคโลนีต่อกรัม แสดงว่า *B. cereus* ส่วนใหญ่ ที่ตรวจพบในตัวอย่างใบเตยสด เป็นสปอร์ของ *B. cereus* ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(4.1a) (4.1b) (4.3c)

ภาพที่ 4.1 แสดง *B. cereus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP เชื้อ *B. cereus* จากใบเตยก่อน Heat Shock (4.1a) หลัง Heat Shock (4.1b) และ Hemolytic activity บนอาหาร TSA- Sheep Blood ซึ่ง *B. cereus* ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จะเกิดโซนใสรอบโคโลนี (4.1c)

โดยผลการตรวจวินิจฉัยยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella* spp. ที่พบการปนเปื้อนในวัตถุดิบ ยืนยันผลทั้งหมดเป็น เชื้อ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella* spp. โดยสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

4.1.3 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์สังขยาใบเตย

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างสังขยาใบเตย จำนวน 20 รุ่นการผลิตๆ ละ 3 ถุง จากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง มาทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ที่อายุ 0 วัน (2-4 ชั่วโมงหลังจากผลิตเสร็จ) อายุ 1 วัน และอายุ 2 วัน เนื่องจากทางโรงงานได้กำหนดอายุของสังขยาใบเตยไว้ 2 วัน โดยการวิเคราะห์อ้างอิงเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ มผช. 527/2547 เรื่อง สังขยา ซึ่งทำการแบ่งกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มชี้บ่งคุณภาพ (Food Quality Indictor) ได้แก่ Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliforms และ *E. coli* (ตารางที่ 4.3) และจุลินทรีย์กลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (Food Safety Indictor) ได้แก่ *S. aureus*, *Salmonella* spp., *B. cereus* และ *C. perfringens* (ตารางที่ 4.4)

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้วัดคุณภาพสังขยาใบเตย พบว่าเชื้อ Aerobic Plate Count (ตารางที่ 4.3) พบการเจริญเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 2 ซึ่งตรวจพบเชื้อ Aerobic Plate Count ที่อายุ 0 วัน อายุ 1 วัน และอายุ 2 วัน คือ 1.90 ± 1.21, 1.88 ± 1.47 และ 3.89 ± 1.13 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ โดยในวันที่ 0 วัน พบเชื้อ Aerobic Plate Count จำนวน 14 ตัวอย่าง (70%) โดยพบตั้งแต่ 10 ถึง 1.2×10^4 โคโลนีต่อกรัม ในวันที่อายุ 1 วัน พบเชื้อ Aerobic Plate Count จำนวน 18 ตัวอย่าง (90%) โดยพบตั้งแต่ 10 ถึง 8.5×10^4 โคโลนีต่อกรัม และที่อายุ 2 วัน พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) โดยพบตั้งแต่ 10 ถึง 8.2×10^4 โคโลนีต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพในสังขยาใบเตย และปริมาณที่ตรวจพบ (Food quality indicator results of Thai Pandan custard (n = 20)

Name of sample	No. of sample	Microbiological detected in samples				Microbiological results			
		APC (CFU/g)	Y&M (CFU /g)	Coliforms (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	APC (log CFU/g)	Y&M (log CFU/g)	Coliforms (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)
Pandan Custard 0 day[a]	20	14 (70%)	2 (10%)	0	0	1.90 ± 1.21	1.00 ± 0.00	0	0
Pandan Custard 1 day	20	18 (90%)	3 (15%)	0	0	1.88 ± 1.47	1.00 ± 0.00	0	0
Pandan Custard 2 days	20	19 (95%)	6 (30%)	0	0	3.89 ± 1.13	1.05 ± 0.12	0	0

Remark: 0 = Coliforms & *E. coli* <3 MPN/g are not detected in lower limit of detection

Y&M = Yeasts & Molds

APC = Aerobic Plate Count

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหารในสังขยาใบเตย (Food safety of Thai Pandan Custard) (n = 20)

Name of sample	No. of sample	Microbiological detected in samples				Microbiological results			
		S. aureus (MPN/g)	*Salmonella* spp. (ND/25 g)	*B. cereus*[a] (CFU/g)	*C. perfringens*[a] (CFU/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (ND/25 g)	*B. cereus*[b*] (log CFU/g)	*C. perfringens*[b] (log CFU/g)
Pandan Custard 0 day[a]	20	0	0	3 (15%)	0	0	0	2.10 ± 0.17	0
Pandan Custard 1 day	20	0	0	5 (25%)	0	0	0	2.94 ± 0.50	0
Pandan Custard 2 days	20	0	0	9 (45%)	0	0	0	3.34 ± 0.43	0

Remark : a = 0 day was after production and cool down (2-4 hrs.) to set point.

b = less than 100 CFU/g is not detected in lower limit of detection

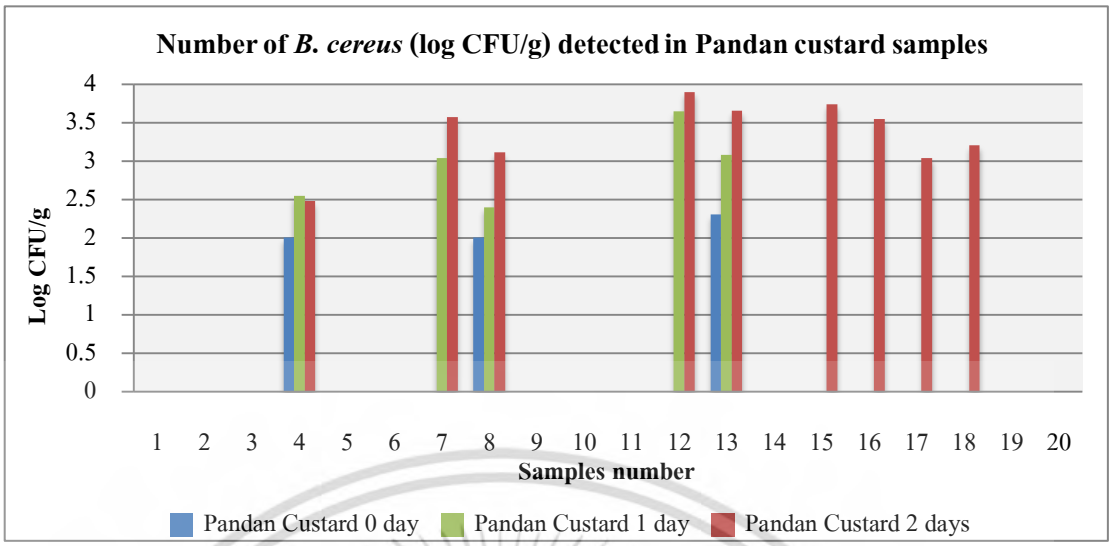
*ตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* ที่พบการปนเปื้อน โดยสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ส่วนผลการวิเคราะห์เชื้อยีสต์ (Yeasts) และรา (Molds) (ตารางที่ 4.3) ในตัวอย่างสังขยาใบเตย พบเชื้อ Yeasts & Molds ที่อายุ 0 วัน อายุ 1 วัน และอายุ 2 วัน คือ 1.00 ± 0.00, 1.00 ± 0.00 และ 1.05 ± 0.12 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ โดยในวันที่ 0 วัน พบเชื้อ Yeasts & Molds จำนวน 2 ตัวอย่าง (10%) โดยพบปริมาณ 10 โคโลนีต่อกรัม ในวันที่อายุ 1 วัน พบเชื้อ Yeasts & Molds จำนวน 3 ตัวอย่าง (15%) โดยปริมาณ 10 โคโลนีต่อกรัม และที่อายุ 2 วัน พบเชื้อ Yeasts & Molds จำนวน 6 ตัวอย่าง (30%) โดยพบตั้งแต่ 10 - 20 โคโลนีต่อกรัม

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร (ตารางที่ 4.4) ในตัวอย่างสังขยาใบเตย พบว่าผลสอดคล้องกับเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ มผช. 527/2547 เรื่อง สังขยา จำนวน 11 ตัวอย่าง (55%) คือ พบเชื้อ *B. cereus* น้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม แต่ในการตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ พบ เชื้อ *B. cereus* มากกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม จำนวน 9 ตัวอย่าง (45%) โดยปริมาณที่พบตั้งแต่ 100 ถึง 8.2×10^3 โคโลนีต่อกรัม ในวันที่ 0 วัน พบ *B. cereus* จำนวน 3 ตัวอย่าง (15%) วันที่ 1 พบ *B. cereus* จำนวน 5 ตัวอย่าง (25%) และวันที่ 2 พบ *B. cereus* จำนวน 9 ตัวอย่าง (45%) ในขณะที่ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ที่ตรวจพบในวัตถุดิบ ซึ่งแสดงได้ว่าความร้อนที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยซึ่งส่วนมากใช้ความร้อนสูงกว่า $94^{\circ}C$ เป็นเวลา 30 – 50 นาที มีผลในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ได้ ดังรายงานของ ICMSF (1996) ที่พบว่า เชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* การให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์เพียงพอต่อการทำลายแบคทีเรียดังกล่าว ส่วนมากถูกทำลายด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 15 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ (สุมณฑา, 2549) แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้

ผลการประเมินคุณภาพของสังขยาใบเตย สอดคล้องกับรายงานการสำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ของ New Zealand Food Safety Authority (NZFSA, 2007) ทำเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เบเกอรี่จาก 69 ร้านค้า จำนวน 250 ชนิดตัวอย่าง ประกอบด้วย ไส้ครีม 126 ตัวอย่าง ไส้คัสตาร์ดครีม 120 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่าง ผสมทั้งไส้ครีมและคัสตาร์ดโดยพบว่าไส้ครีมสำหรับสอดไส้เบเกอร์รี่ พบ *E. coli* อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.6%) และพบหนึ่งตัวอย่าง (0.8%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus* ส่วนตัวอย่างไส้คัสตาร์ดครีมสำหรับสอดไส้เบเกอร์รี่ พบว่า 3 ตัวอย่าง (2.6%) อยู่ในระดับที่ไม่พอใจ และพบ 2 ตัวอย่าง (1.7%) มีแนวโน้มที่ก่อให้เกิดความไม่ปลอดภัยจากเชื้อ *B. cereus* ที่พบในปริมาณสูง (10^4 CFU/g)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณของ *B. cereus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างสังขยาใบเตย ที่อายุ 0 วัน 1 วัน และ 2 วัน จำนวน 20 ตัวอย่าง (Number of *Bacillus cereus* (Log CFU/g) in Thai pandan)

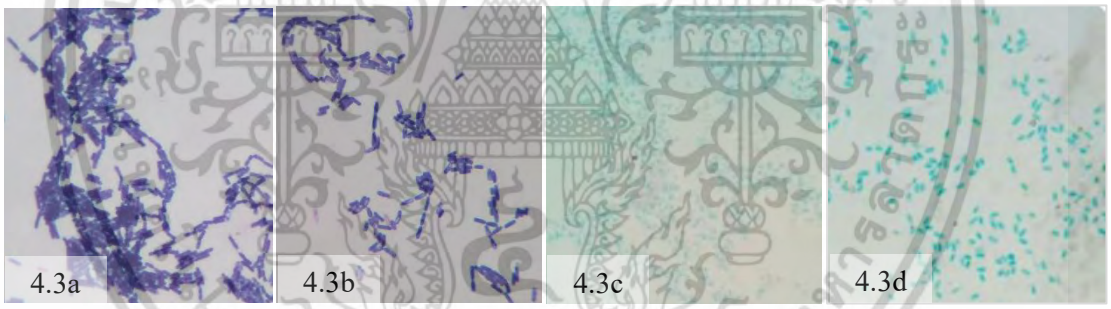
ผลวิเคราะห์สังขยาใบเตย (ภาพที่ 4.2) พบเชื้อ *B. cereus* ในวันที่อายุ 0 วัน คือ ตัวอย่างหลังจากพักเย็น 2- 4 ชั่วโมง จำนวน 3 ตัวอย่าง (15%) โดยพบปริมาณตั้งแต่ 1 x 10^2 (2 log CFU/g) ถึง 2 x 10^2 (2.3 log CFU/g) โคโลนีต่อกรัม ในวันที่ อายุ 2 วัน พบเชื้อ *B. cereus* จำนวน 5 ตัวอย่าง (25%) โดยพบปริมาณตั้งแต่ 2.5 x 10^2 (2.4 log CFU/g) ถึง 4.5 x 10^3 (3.65 log CFU/g) โคโลนีต่อกรัม และในวันที่อายุ 3 วัน พบเชื้อ *B. cereus* จำนวน 9 ตัวอย่าง จาก 20 ตัวอย่าง โดยพบปริมาณตั้งแต่ 3.0 x 10^2 (2.48 log) ถึง 8.2 x 10^3 (3.9 log) โคโลนีต่อกรัม การเก็บรักษาสังขยาใบเตยที่อุณหภูมิห้อง ที่อายุ 0 วัน ถึง 2 วัน มีผลต่อการตรวจพบเชื้อ *B. cereus* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบมากถึง 3.0 log CFU/g ปริมาณนี้มีโอกาสเพิ่มจำนวนจนสร้างสารพิษที่ทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วยได้ ทั้งนี้ การตรวจพบ *B. cereus* ที่หลงเหลือในสังขยาใบเตยหลังกระบวนให้ความร้อนแล้วอาจเกิดขึ้นจากหลายปัจจัย เช่น วัตถุดิบเกษตรใบเตยมีเชื้อ *B. cereus* อยู่ในปริมาณสูงการล้างใบเตยด้วยน้ำประปาไม่เพียงพอต่อการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยได้ กระบวนการผลิตที่ใช้ระดับความร้อนพาสเจอร์ไรส์ไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ที่ปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบได้ รวมไปถึงอาจเกิดจากการควบคุมกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม สภาวะแวดล้อม วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือไม่สะอาด เป็นต้น เป็นสาเหตุให้ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวหลงเหลือในสังขยาใบเตย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่ระดับปริมาณเชื้อตามที่ตรวจพบในข้อ 4.1 (3-4 log CFU/g) และปริมาณเชื้อในระดับ Worst Case (6 log CFU/g) ในการผลิตสังขยาใบเตย

4.2.1 การเตรียมเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ที่ได้จากการปนเปื้อนในสังขยาใบเตย

จากการเตรียมเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) Slant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีจะได้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นที่ 10^8 – 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสปอร์เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Fortified Nutrient Agar (FNA) Slant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีจะได้ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. ceruse* เริ่มต้นที่ 10^8 – 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำย้อมแกรมดูลักษณะเซลล์ (ภาพที่ 4.3 a, b) และสปอร์ (ภาพที่ 4.3 c, d) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

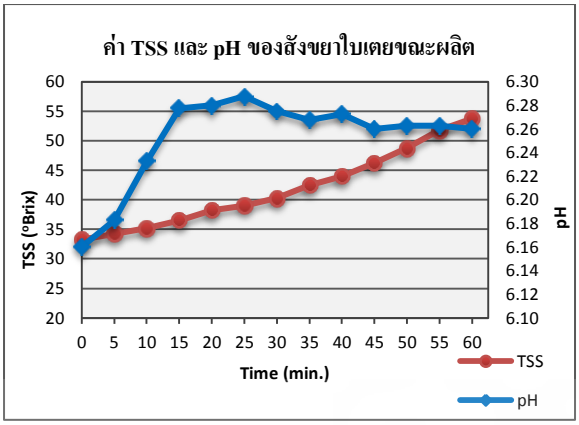


ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะเซลล์ติดสีม่วงแกรมบวก (4.3a-4.3b) และสปอร์ที่ติดสีเขียวของ Malachite green (4.3c-4.3d) ของเชื้อ *B. cereus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

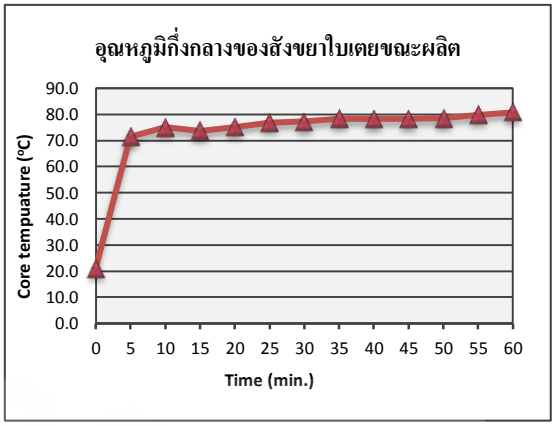
4.2.2 ทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้การผลิตสังขยาใบเตย ปริมาตร 2 กิโลกรัมต่อรุ่นการผลิต

ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้การผลิตสังขยาใบเตยโดยใช้ Water bath ควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส โดยทำการผลิตสังขยาใบเตย น้ำหนักรวม 2 กิโลกรัม จนมีความข้นหนืดและค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total soluble solids) อยู่ที่ 38-40°Brix ใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิกึ่งกลางหม้อกวน จดบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 5 นาที พบว่าการผลิตสังขยาใบเตย น้ำหนักรวม 2 กิโลกรัม ใช้เวลา 15-20 นาที (ภาพที่ 4.4) อุณหภูมิกึ่งกลางของสังขยาใบเตย อยู่ในช่วง 75-81 องศาเซลเซียส ค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total soluble solids) อยู่ในช่วง 38-41°Brix และค่า pH อยู่ในช่วง 6.10-6.30 ซึ่งเป็นลักษณะคุณภาพของสังขยาใบเตยที่โรงงานกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(4.4a)



(4.4b)

ภาพที่ 4.4 แสดงผลทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้ผลิตสังขยาใบเตย ที่ให้คุณลักษณะค่าความ TSS และ pH (4.4a) ตามที่กำหนด และอุณหภูมิใจกลางขณะผลิตสังขยาใบเตย (4.4b) จากค่าเฉลี่ยจากการทำ 3 ซ้ำ

หมายเหตุ : TSS คือ ค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด หรือค่าความหวาน (Total soluble solids)

จากผลการทดสอบหาระยะเวลาที่ใช้ผลิตสังขยาใบเตย ปริมาณ 2 กิโลกรัม ใช้เวลา 15-20 นาที ทำให้มีความข้นหนืดและค่า TSS อยู่ที่ 38-40°Brix เป็นไปตามลักษณะที่โรงงานกำหนดเกณฑ์คุณภาพของสังขยาใบเตย ดังนั้น จึงทำการทดลองเติมเชื้อ (Spiked) ในวัตถุดิบที่เตรียมใช้ผลิตสังขยาใบเตย และสุ่มชักตัวอย่างทุกๆ 10 นาที มาทำการตรวจหาการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ *B. cereus*

4.2.3 ผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย ที่มีต่อการเหลือรอดของเซลล์ และสปอร์ *B. cereus*

จากผลการสำรวจปริมาณเชื้อก่อโรคที่สุ่มเก็บจากการโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ซึ่งไม่สามารถทราบได้ว่าปนเปื้อนอยู่ในลักษณะเป็นเซลล์หรือสปอร์ และจากการประเมินโดยการ Heat Shock เชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างใบเตยสด ส่วนใหญ่เป็นสปอร์เกือบทั้งหมด ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาหาระยะเวลาในการทำลายเชื้อเซลล์และสปอร์ *B. cereus* โดยจำลองการปนเปื้อนที่ระดับต่ำ (ประมาณ 4 log CFU/g) และที่ระดับรุนแรง (Worst case 6 log CFU/g) ในการผลิตสังขยาใบเตยโดยใช้ไอน้ำร้อนจาก Water Bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส จนลักษณะสังขยาใบเตยมีความข้นหนืด และค่า TSS อยู่ที่ 38-40°Brix เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ *B. cereus* หรือไม่

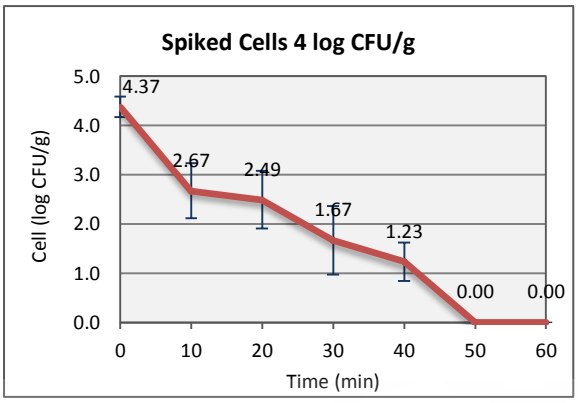
จากผลการศึกษาการเหลือรอดของเซลล์ และสปอร์ *B. cereus* โดยมีเชื้อเริ่มต้นที่ 4 log CFU/g และ 6 log CFU/g โดยการเติม (Spiked) ลงในส่วนผสมของสังขยาใบเตย และนำไปทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

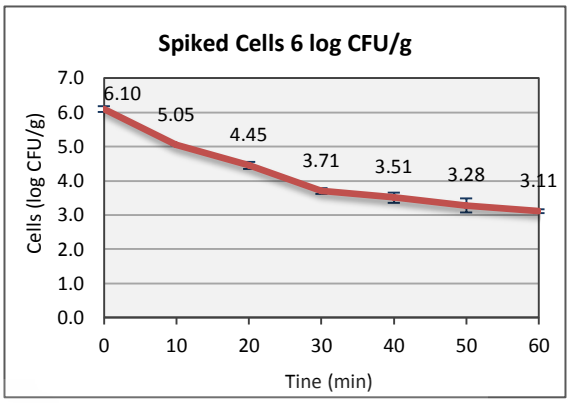
ผลิตโดยใช้ Water Bath ที่ 95 องศาเซลเซียส สุ่มชักตัวอย่างที่ทุกๆ 10 นาที (0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที) และนำไปตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยอาหาร Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ *B. cereus* ด้วยทุกครั้ง โดยผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างควบคุมไม่พบเชื้อ *B. cereus* ทุกตัวอย่าง พบว่าเซลล์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำในนาทีที่ 0 พบเชื้อปริมาณ 4.37 $\pm$ 0.21 log CFU/g และในนาทีที่ 30 พบปริมาณเชื้อลดลง 1.67 $\pm$ 0.69 log CFU/g อยู่ในเกณฑ์กฎหมายกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข คือ เชื้อ *B. cereus* ไม่เกิน 100 CFU/g (2 log CFU/g) และในนาทีที่ 50 ตรวจไม่พบปริมาณเชื้อ ส่วนเซลล์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (Worst case) ในนาทีที่ 0 พบเชื้อปริมาณ 6.10 $\pm$ 0.08 log CFU/g และในนาทีที่ 60 พบปริมาณเชื้อลดลงไป 3 log โดยตรวจพบปริมาณ 3.11 $\pm$ 0.06 log CFU/g ซึ่งยังเกินเกณฑ์กฎหมายกำหนด

ส่วนผลสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* (ภาพและตารางที่ 4.5) พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำในนาทีที่ 0 พบเชื้อปริมาณ 4.75 $\pm$ 0.06 log CFU/g และในนาทีที่ 60 พบปริมาณเชื้อลดลงไป 1 log โดยตรวจพบปริมาณ 3.84 $\pm$ 0.19 log CFU/g และสปอร์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (Worst case) ในนาทีที่ 0 พบเชื้อปริมาณ 6.30 $\pm$ 0.45 log CFU/g และในนาทีที่ 60 พบปริมาณเชื้อลดลงไป 1.6 log โดยตรวจพบปริมาณ 4.69 $\pm$ 0.30 log CFU/g ซึ่งยังเกินเกณฑ์กฎหมายกำหนด

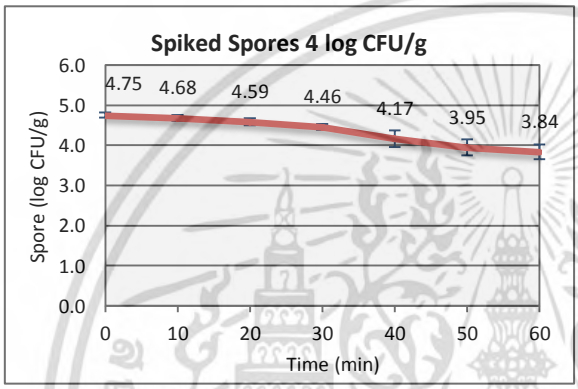
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



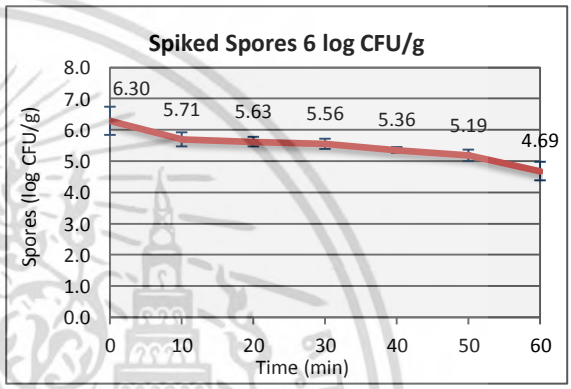
(4.5a)



(4.5b)



(4.5c)



(4.5d)

ภาพที่ 4.5 แสดงผลของระยะเวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ของเซลล์ที่เชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/g (4.5a), 6 log CFU/g (4.5b) และสปอร์ เชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/g (4.5c), 6 log CFU/g (4.5d) ในการผลิตสังขยาใบเตย

หมายเหตุ: ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดจากกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการผลิตสังขยาใบเตย

เวลา	ปริมาณเฉลี่ยของเชื้อ *B. cereus* (CFU/g)	
(นาที	เซลล์	สปอร์
Control	0	0
Low level		
0	2.36×10^4	5.68×10^4
10	4.70×10^2	4.79×10^4
20	3.10×10^2	3.90×10^4
30	47	2.88×10^4
40	17	1.48×10^4
50	0	8.90×10^3
60	0	6.90×10^3
High level		
0	1.27×10^6	1.98×10^6
10	1.11×10^5	5.10×10^5
20	2.80×10^4	4.28×10^5
30	5.10×10^3	3.60×10^5
40	3.20×10^3	2.30×10^5
50	1.90×10^3	1.54×10^3
60	1.30×10^3	4.90×10^4

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากผลทดลองผลิตสังขยาใบเตยโดยใช้ความร้อนจาก Water bath ที่อุณหภูมิ 95°C พบว่า ปริมาณเซลล์ที่เริ่มต้น 4 log CFU/g ใช้เวลา 30 นาที ปริมาณเชื้อลดลงจนอยู่ในเกณฑ์กฎหมายกำหนด และใช้เวลา 50 นาที จึงตรวจไม่พบปริมาณเชื้อหลงเหลือในสังขยาใบเตย ในขณะที่สปอร์ของ *B. cereus* ไม่สามารถทำลายได้หมด ดังนั้น วัตถุดิบที่มีความเสี่ยงในการมีอยู่ของเชื้อในปริมาณสูง ต้องจัดการก่อนนำมาใช้ผลิต เช่น ใบเตย ต้องเพิ่มการจัดการให้มีปริมาณเชื้อลดลงน้อยที่สุด เมื่อนำมาผลิตจึงจะสามารถใช้อุณหภูมิ ที่ 95°C เป็นเวลา 30 นาที จะได้สังขยาใบเตยที่ปลอดภัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

จากผลการศึกษาเติมเชื้อเซลล์และสปอร์ที่ระดับที่ตรวจพบในการปนเปื้อน (ประมาณ 4 log CFU/g) และที่ระดับวิกฤต (Worst case 6 log CFU/g) ตามผลการทดลองในขั้นตอนที่ 2 พบว่าไม่สามารถทำลายเซลล์และสปอร์ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยตามกฎหมายกำหนดได้ ยกเว้นตัวอย่างที่เติมเซลล์ที่ระดับเชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/g สามารถทำลายเซลล์ให้ลดลงอยู่ในระดับที่กฎหมายกำหนดได้ในนาทีที่ 30 และลดลงจนตรวจไม่พบปริมาณได้ในนาทีที่ 50 และเนื่องด้วยผู้ประกอบการผลิตอาหาร โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) เพื่อให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเนื่องจากโปแตสเซียมซอร์เบตที่เติมลงไปไม่มีผลต่อสี กลิ่นและรสชาติของอาหาร ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาการยับยั้งเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* โดยเติมสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C โดยทำการเติมโปแตสเซียมซอร์เบตที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ ระดับ 0.07% (700 ppm) และที่ระดับต่ำ คือ 0.04% (400 ppm) ซึ่งต่ำกว่ากฎหมายประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 281 (2547) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร อนุญาตให้ใช้ไม่เกิน 1000 ppm (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้สารวัตถุกันเสีย โดยมีวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย 1 ชนิด คือ กะทิพาสเจอร์ไรส์ ที่มีการเติมสารวัตถุกันเสียโซเดียมเบนโซเอต ที่ระดับความเข้มข้น 0.01% (1000 ppm) ด้วย หลังจากผลิตเสร็จนำสังขยาใบเตยมาตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง เพื่อดูมีการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. cereus*

ผลการเติมเชื้อเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ที่ระดับ Worst case ลงในวัตถุดิบส่วนผสมของสังขยาใบเตยและนำไปผลิตโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่า ตัวอย่างสังขยาใบเตยควบคุม (Control) ที่ไม่มีการเติมวัตถุกันเสียและเชื้อ *B. cereus* ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในทุกตัวอย่าง ตัวอย่างสังขยาใบเตยควบคุม (Control) ที่ไม่เติมสารวัตถุกันเสียและเติมเชื้อเซลล์เริ่มต้น 5.15 log CFU/g และสปอร์เริ่มต้น 5.34 log CFU/g พบว่าหลังผ่านความร้อนปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์มีแนวโน้มลดลงเป็น 3.20 log CFU/g และ 4.31 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทำการจัดเก็บสังขยาใบเตยในกระปุกพลาสติกปลอดเชื้อปิดสนิท ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 5.75 log CFU/g และ 5.31 log CFU/g ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 168 (7 วัน) ดังแสดงในภาพที่ 4.6

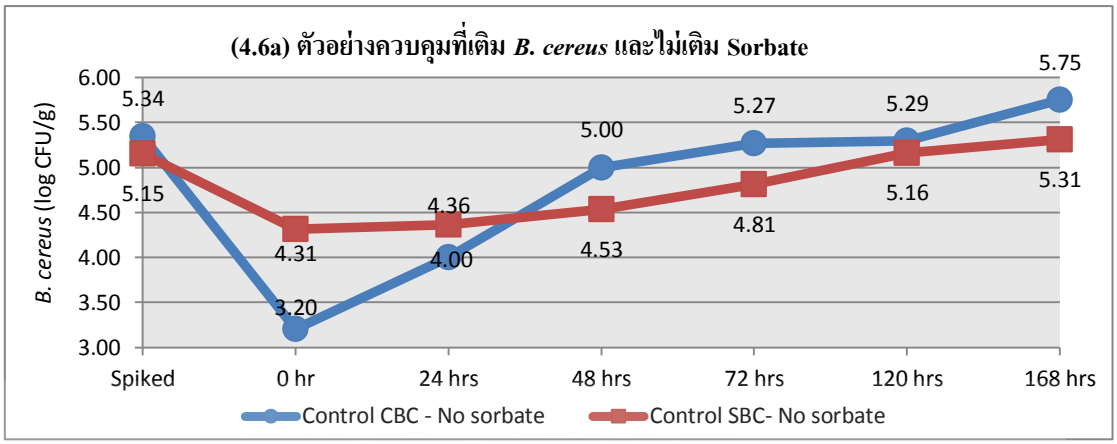
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

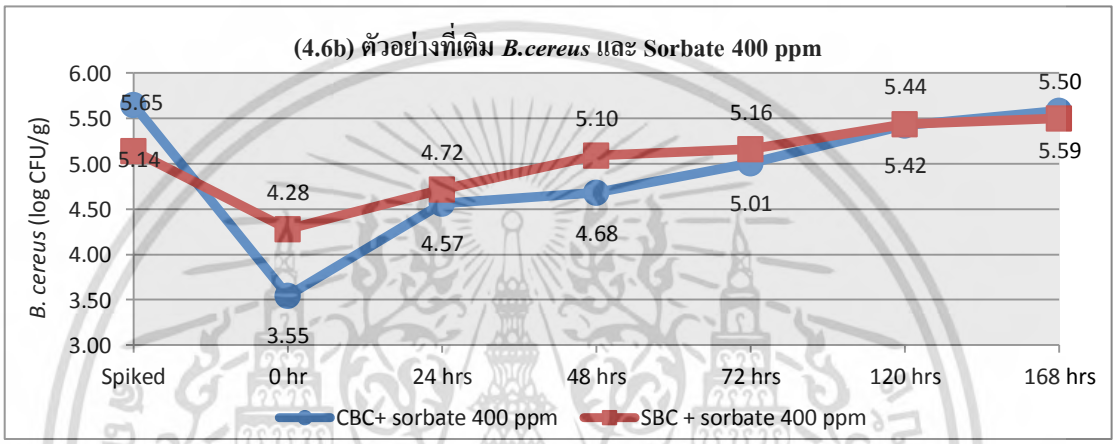
ตัวอย่างสังขยาใบเตยที่เติมสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต 0.04% (400 ppm) และเติมเชื้อเซลล์เริ่มต้น 5.65 log CFU/g และสปอร์เริ่มต้น 5.31 log CFU/g พบว่าหลังผ่านความร้อนปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์มีแนวโน้มลดลงเป็น 3.55 log CFU/g และ 4.28 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทำการจัดเก็บสังขยาใบเตยในกระปุกพลาสติกปลอดเชื้อปิดสนิท พบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 5.59 log CFU/g และ 5.50 log CFU/g ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 168 (7 วัน) ส่วนตัวอย่างสังขยาใบเตยที่เติมสารวัตถุกันเสีย 0.07% (700 ppm) และเติมเชื้อเซลล์เริ่มต้น 5.80 log CFU/g และสปอร์เริ่มต้น 5.29 log CFU/g พบว่าหลังผ่านความร้อนปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์มีแนวโน้มลดลงเป็น 4.34 log CFU/g และ 4.06 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทำการจัดเก็บสังขยาใบเตยในกระปุกพลาสติกปลอดเชื้อปิดสนิท พบว่าชั่วโมงที่ 72 พบการเสื่อมเสีย มีกลิ่นบูดเหม็นเปรี้ยวในทุกตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างที่เติมโปแตสเซียมซอร์เบต 0.04% และพบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 5.78 log CFU/g และ 5.59 log CFU/g ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 168 (7 วัน) ดังแสดงในภาพที่ 4.6

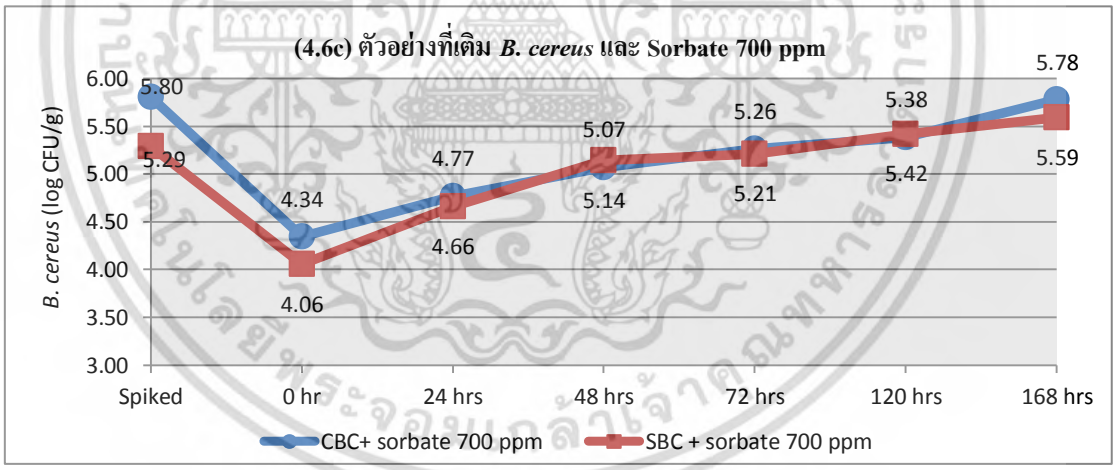
ตามภาพที่ 4.6 แสดงผลการเติมเชื้อเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ร่วมกับการเติมสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ที่ความเข้มข้น 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ซึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ตามกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยนั้น พบว่าหลังผ่านความร้อนปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์มีแนวโน้มลดลง เฉลี่ย 1.78 และ 1.05 log CFU/g ตามลำดับ และพบปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์ *B. cereus* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ไปชั่วโมงที่ 168 เฉลี่ย 1.74 และ 1.38 log CFU/g โดยเชื้อเซลล์และสปอร์ลดลง เฉลี่ย 1.42 log CFU/g และปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์เพิ่มขึ้น เฉลี่ยจากชั่วโมงที่ 0 ไปชั่วโมงที่ 168 ประมาณ 1.56 log CFU/g

ผลจากการจัดเก็บสังขยาใบเตยในกระปุกพลาสติกปลอดเชื้อปิดสนิท พบว่าตัวอย่างสังขยาใบเตยที่เติมเชื้อเซลล์และสปอร์และไม่เติมสารโปแตสเซียมซอร์เบต ชั่วโมงที่ 24 พบการเสื่อมเสีย มีกลิ่นบูดเหม็นเปรี้ยวในทุกตัวอย่าง สังขยาใบเตยควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ แต่เติมสารกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต และสังขยาใบเตยที่เติมทั้งเชื้อเซลล์และสปอร์และโปแตสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ที่ชั่วโมงที่ 72 พบการเสื่อมเสีย มีกลิ่นบูดเหม็นเปรี้ยวในทุกตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่เติมโปแตสเซียมซอร์เบต 0.07% มีกลิ่นบูดอ่อนกว่า ซึ่งสาเหตุจากการเสื่อมเสียเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปที่อาจเกิดการปนเปื้อนภายหลังการผลิต หรือเชื้อยีสต์ เชื้อรา ไม่ใช่เกิดจากเชื้อ *B. cereus* ซึ่งในตัวอย่างที่มีการเติมโปแตสเซียมซอร์เบต จะช่วยยืดอายุการเก็บได้เพิ่มขึ้น จาก 24 ชั่วโมง เป็น 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้







ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณของเชื้อ *B. cereus* ที่เติมลงไปก่อนการผลิตสังขยาใบเตย (Spiked) หลังการผลิต (0 hr) และที่ 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง โดยมีตัวอย่างควบคุมที่เติมเซลล์และสปอร์ *B. cereus* และไม่เติม Sorbate (4.6a) ตัวอย่างที่เติมเซลล์และสปอร์ *B. cereus* และ Sorbate 400 ppm (4.6b) และ Sorbate 700 ppm (4.6c)

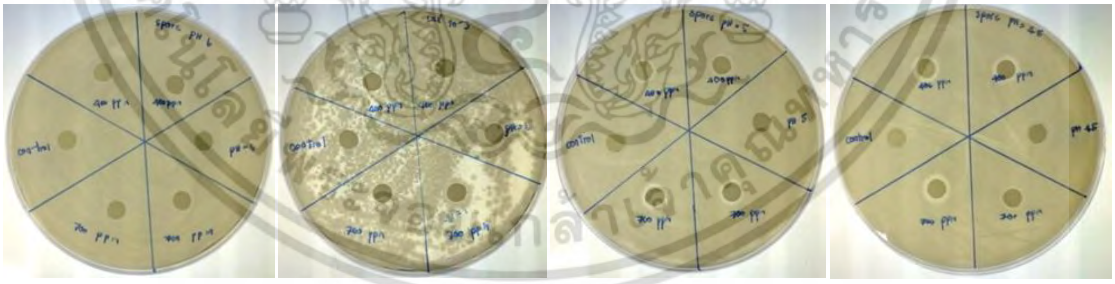
หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเชื้อตรวจไม่พบ *B. cereus*

CBC : Cells of *B. cereus*, SBC : Spore of *B. cereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการเติมเชื้อเซลล์และสปอร์ร่วมกับการเติมสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ในส่วนผสมวัตถุดิบและนำไปผ่านความร้อนตามกระบวนการผลิต โดยทดลองควบคู่กับตัวอย่างที่ไม่เติมเชื้อและไม่เติมสาร และตัวอย่างควบคุมที่มีการเติมเซลล์และสปอร์แต่ไม่เติมสาร พบว่ามีผลต่อการยับยั้งต่อการเพิ่มจำนวนของไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เนื่องด้วยคุณสมบัติของสังขยาใบเตยหลังกวนมีค่า pH 6.25-6.28 ค่าความหวาน 40-50°Brix และอุณหภูมิในการจัดเก็บ อยู่ในช่วง 30-32°C มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อได้เป็นอย่างดี โดยช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการแตกตัวของโปแตสเซียมซอร์เบตไปเป็นกรดซอร์บิค อยู่ในช่วง pH 3.5- 4.75 แตกตัวได้ 50-90% และที่ pH>5.0 สามารถแตกตัวต่ำได้ 40% (Livestock, 2002; Hawkins Watts Limited, 2009 และ Dharmadhikari, 2014)

เพื่อเป็นการยืนยันว่า pH มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของโปแตสเซียมซอร์เบต จึงได้ทำการศึกษาผลของโปแตสเซียมซอร์เบต ปริมาณ 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* เพิ่มเติม โดยใช้โปแตสเซียมซอร์เบต ปริมาณ 0.04 และ 0.07% ที่มีค่า pH แตกต่างกัน คือ pH 6.0 (ภาพที่ 4.7a), pH 5.5 (ภาพที่ 4.7b), pH 5.0 (ภาพที่ 4.7c) และ pH 4.5 (ภาพที่ 4.7d) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) แล้วทำการ spread plates นำแผ่น Antibiotic Assay Disks ที่บรรจุโปแตสเซียมซอร์เบต ปริมาณ 0.04 และ 0.07% ซึ่งปรับค่า pH ที่ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วางลงบนเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



(4.7a) (4.7b) (4.7c) (4.7d)

ภาพที่ 4.7 แสดงผลของการยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ของโปแตสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 0.04 และ 0.07% ที่ pH 6.0 (4.7a) , pH 5.5 (4.7b) , pH 5.0 (4.7c) และ pH 4.5 (4.7d)

ผลพบว่าโปแตสเซียมซอร์เบต 0.04% ที่มีค่า pH 4.5 จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ได้ ส่วนโปแตสเซียมซอร์เบต 0.07% ที่มีค่า pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ได้ เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 6 พบสปอร์ยังคงเจริญ

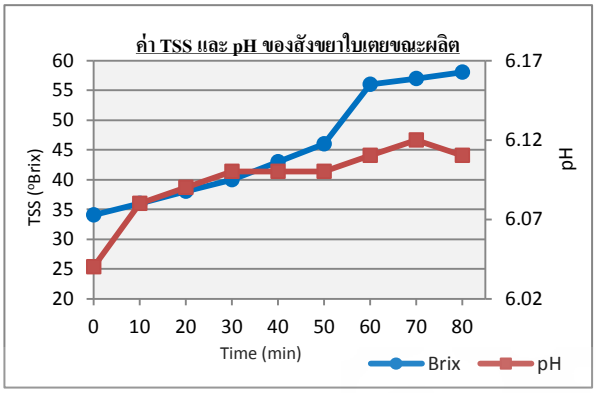
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น โดยมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อย จนเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 พบการเจริญลดลงหลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าการเจริญของ *B. cereus* มีการเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสปอร์ของ *B. cereus* ไม่ได้ถูกทำลายแต่เป็นเพียงการยับยั้งในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (Bacteriostatic) เท่านั้น แสดงว่า pH มีส่วนช่วยให้โปแตสเซียมซอร์เบตในการสนับสนุนการยับยั้งเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้การปรับค่า pH ให้ต่ำกว่า 5 มีผลต่อรสชาติของสังขยาใบเตย ที่ต้องทดสอบให้ผู้บริโภคทดสอบชิมก่อนว่าสามารถยอมรับได้หรือไม่

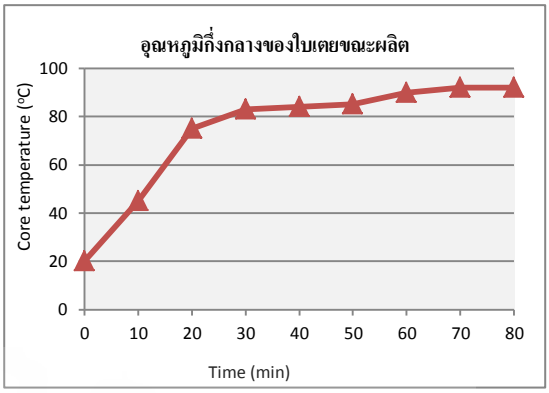
4.4 ทวนสอบ (Validate process) กระบวนการให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ในการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็กและตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

ผลการทวนสอบกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยใช้เครื่องกวนขนาดเล็ก (Kajiwara Table Top Mixer KR-Mini, Japan) ให้ความร้อนด้วยแก๊สหุงต้ม LPG ร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ที่ความเข้มข้น 0.07% โดยมีวัตถุดิบ คือ กะทิพาสเจอไรซ์ ที่มีการเติมโซเดียมเบนโซเอต ที่ระดับความเข้มข้น 0.01% ด้วย โดยในขั้นตอนการผลิตได้มีการเพิ่มขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ คือ การแช่ใบเตยในสารละลายคลอรีน เข้มข้น 50 ppm โดยการทำความสะอาดใบเตยสด ทำการตัดแต่งโคนไม่ให้มีคราบดินโคลน ล้างด้วยน้ำสะอาดทีละใบ และแช่ด้วยสารละลายคลอรีน ความเข้มข้น 50 ppm นาน 10 นาที และล้างซ้ำด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นและคั้นน้ำใบเตย หลังจากนั้นนำไปใช้ในการผลิตสังขยาใบเตย หลังจากการผลิตสังขยาใบเตยตามขั้นตอนการผลิต ในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 5 กิโลกรัม ต่อรุ่นการผลิต และบรรจุขณะร้อนใส่ถุงปลอดเชื้อปิดสนิท ขนาดถุงละ 1 กิโลกรัม นำมาวางรอเย็นที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ 23-25 องศาเซลเซียส โดยสภาวะในการควบคุมในการผลิต ได้ทำการวัดอุณหภูมิกึ่งกลางทุกๆ 10 นาทีและชักตัวอย่างมาวัดค่า pH และค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดทุกๆ 10 นาที พบอุณหภูมิกึ่งกลางเฉลี่ยได้ 90°C ในนาทีที่ 60 และ 95°C ในนาทีที่ 80 (ภาพที่ 4.8b) และวัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดได้ 58°Brix และค่า pH 6.11 ในนาทีที่ 60 (ภาพที่ 4.8a) หลังจากพักเย็นแล้วนำสังขยาใบเตยมาตรวจหาปริมาณเชื้อ *B. cereus* ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ณ อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง จำนวน 3 รุ่นการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

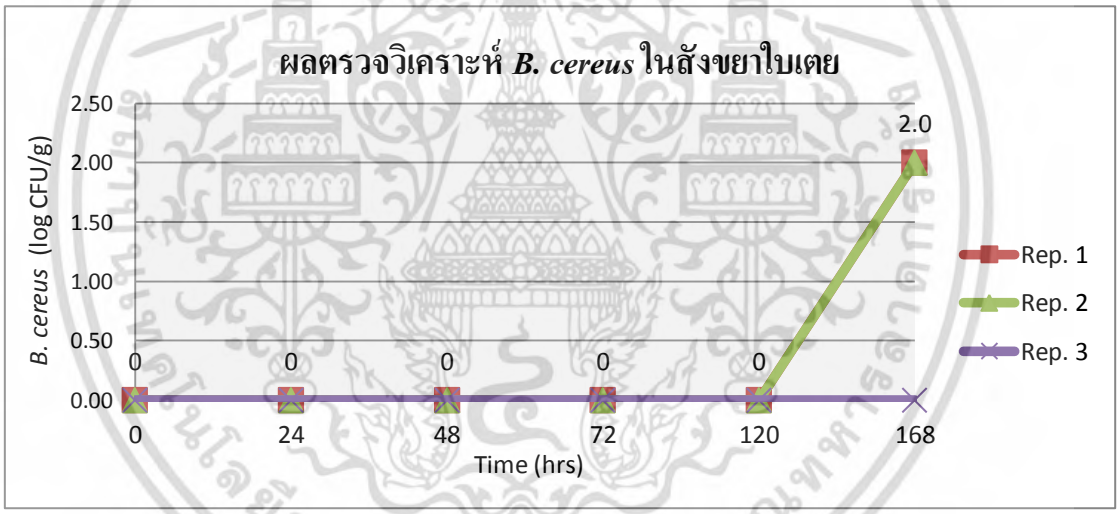


(4.8a)



(4.8b)

ภาพที่ 4.8 แสดงค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (TSS) และค่า pH ที่ช่วงเวลาต่างๆ (4.8a) และอุณหภูมิกึ่งกลางระหว่างผลิตโดยใช้ Water bath ที่ 95°C ของการผลิตสังขยาใบเตยใบเตย (4.8b)



ภาพที่ 4.9 แสดงผลการตรวจเชื้อ *B. cereus* ในสังขยาใบเตยหลังการผลิตที่โรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็ก จัดเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ 0, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดสอบพบว่าสังขยาใบเตย ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เกินจากกฎหมายกำหนดในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.9) ซึ่งตรวจพบปริมาณ 2 log CFU/g (100 CFU/g) ในชั่วโมงที่ 168 จำนวน 2 รุ่นการผลิต จาก 3 รุ่นการผลิต และตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคทุกชนิด (*S. aureus, Salmonella* spp. และ *C. perfringens*)ในสังขยาใบเตย พบการเน่าเสียมีกลิ่นบูดที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) โดยจากการตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* หลังกระบวนการผ่านความร้อนนั้น ต้องเพิ่มการพิสูจน์ยืนยันว่าภายหลังจากการล้างทำความสะอาดใบเตยสด และนำไปแช่ด้วยสารละลายคลอรีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 50 ppm นาน 10 นาที ช่วยลดปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในใบเตยได้น้อยที่สุด และต้องเพิ่มการยืนยันผลของอุณหภูมิกึ่งกลางขณะผลิตที่สูงขึ้นมีผลทำลายเชื้อเซลล์และสปอร์ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ทำให้ได้ลักษณะของสังขยาใบเตยที่มีลักษณะเนื้อแข็งเพิ่มขึ้น และวัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดได้ 58°Brix และค่า pH 6.11 เนื่องจากอุณหภูมิขณะผลิตเพิ่มสูงขึ้นจากขั้นตอนที่ 2 และ 3 ซึ่งใช้ความร้อนจาก Water bath ที่ 95°C วัดอุณหภูมิกึ่งกลางได้เฉลี่ย 80° ในนาทีที่ 60 ส่วนในการทดลองขั้นตอนที่ 4 ใช้เครื่องกวนขนาดเล็ก (Kajiwara Table Top Mixer KR-Mini, Japan) ให้ความร้อนด้วยแก๊สหุงต้ม LPG วัดอุณหภูมิกึ่งกลางเฉลี่ยได้ 90°C ในนาทีที่ 60 และ 95°C ในนาทีที่ 80 จึงทำให้ได้ลักษณะเนื้อสังขยาใบเตยแข็งและหนืดขึ้น ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานใน ICMSF (1996) ทดสอบในตัวอย่าง Rice broth ที่ pH 7.0 ใช้อุณหภูมิ 100°C มีค่า D-value 4.2 และ 6.3 นาที และตัวอย่าง 0.25 M phosphate ที่ pH 7.0 ใช้อุณหภูมิ 85°C มีค่า D-value 33.8 นาที ค่า Z ที่ 9.7°C และ 6.3 นาที ดังนั้น หากพบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่สูงจึงต้องใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อสูง และระยะนานขึ้น ซึ่งกระบวนการผลิตสังขยาใบเตยในอุตสาหกรรมขนาดเล็กอาจใช้อุณหภูมิและเวลาไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อทั้งหมดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากผลการประเมินคุณภาพวัตถุดิบและสังขยาใบเตยจากโรงงานอุตสาหกรรมขนาดเล็กแห่งหนึ่งในภาคกลาง โดยสุ่มเก็บวัตถุดิบกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ กะทิพาสเจอไรซ์ ไข่ไก่สด และใบเตยสดจำนวนชนิดละ 20 รุ่นการผลิต และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และน้ำตาลทราย จำนวนชนิดละ 10 รุ่นการผลิต ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่มชี้บ่งคุณภาพ ได้แก่ Aerobic Plate Count (APC), Yeasts & Molds, Coliformsและ*E. coli* และชี้บ่งความปลอดภัยอาหาร ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Bacillus cereus*และ *Clostridium perfringens* ซึ่งรายการตรวจแต่ละชนิดได้อ้างอิงตามข้อกำหนดของวัตถุดิบนั้นๆ เช่น มอก. มกษ. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกาศกรมปศุสัตว์ เป็นต้น ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในวัตถุดิบครั้งนี้ตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคในใบเตยและไข่ไก่สด ส่วนวัตถุดิบอื่นตรวจไม่พบจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค โดยใบเตยสดตรวจพบเชื้อ *B. cereus* จำนวน 19 ตัวอย่าง (95%) พบปริมาณตั้งแต่ 2.5 x 10^2ถึง 1.0 x 10^4 โคโลนีต่อกรัม เฉลี่ย 3.40 $\pm$ 0.45 log CFU/g และ *S. aureus* จำนวน 2 ตัวอย่าง (10%) ปริมาณ23-93 MPN/g และไข่ไก่สด ตรวจพบ *Salmonella* spp. จำนวน 4 ตัวอย่าง (20%) ส่วนตัวอย่างสังขยาใบเตย สุ่มเก็บมาจำนวน 20 รุ่นการผลิตๆ ละ 3 ถุงๆ ละ 5 กิโลกรัมทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และ มผช. 527/2547 เรื่อง สังขยาโดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องที่ 0, 1 และ 2 วัน พบว่าตรวจพบ*B. cereus*ในสังขยาใบเตย จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่ไม่สอดคล้องตามกฎหมายฉบับดังกล่าว ซึ่งพบในวันที่ 0 จำนวน 3 ตัวอย่าง (15%) วันที่ 1 จำนวน 5 ตัวอย่าง (25%) และวันที่ 2 จำนวน 9 ตัวอย่าง (45%) ในปริมาณเฉลี่ย 2.0-3.9 log CFU/g และทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในวัตถุดิบ การวินิจฉัยยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *S. aureus, B. cereus* และ *Salmonella* spp. ที่พบการปนเปื้อนในวัตถุดิบและสังขยาใบเตยยืนยันผลทั้งหมดโดยสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างใบเตยสดที่ล้างทำความสะอาดก่อนและก่อน-หลังการให้ความร้อนพบ โดยในตัวอย่างใบเตยก่อนผ่านความร้อนพบปริมาณจำนวน 4.80 x 10^2 $\pm$ 1.18 x10^2โคโลนีต่อกรัมและหลังการให้ความร้อนพบ *B. cereus*จำนวน 4.20 x 10^2 $\pm$ 0.95 x10^2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีต่อกรัมแสดงว่า *B. cereus* ส่วนใหญ่ ที่ตรวจพบในตัวอย่างใบเตยสด เป็นสปอร์ของ *B. cereus* ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูง

ผลจากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตสังขยาใบเตยโดยใช้ไอน้ำร้อนจาก Water Bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 95°C ต่อการเหลือรอดของเซลล์และสปอร์*B. cereus* โดยจำลองการปนเปื้อนที่ระดับต่ำ (ประมาณ 4 log CFU/g) ซึ่งตรวจพบการปนเปื้อนในสังขยาใบเตยและที่ระดับรุนแรง (Worst case ประมาณ 6 log CFU/g) ทำการผลิตสังขยาใบเตยจนลักษณะไส้สังขยามีความข้นหนืด ที่ปริมาณ 2 กิโลกรัมใช้เวลา 15-20 นาที ทำให้ได้ค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดอยู่ที่ 38-40°Brix จึงได้ทดลองเพิ่มเวลาผลิตจนถึง 60 นาที ผลพบว่าเซลล์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำในนาทีที่ 30 ปริมาณเชื้อลดลง 1.67±0.69log CFU/g อยู่ในเกณฑ์กฎหมายตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข กำหนด คือ เชื้อ *B. cereus* ไม่เกิน 100 CFU/g (2 log) และในนาทีที่ 50 ตรวจไม่พบปริมาณเชื้อ ส่วนเซลล์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (Worst case) ในนาทีที่ 60 พบปริมาณเชื้อลดลง 3 log CFU/g โดยตรวจพบปริมาณ 3.11± 0.06 log CFU/g ยังเกินเกณฑ์กฎหมายกำหนด ส่วนสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่ำในนาทีที่ 60 พบปริมาณเชื้อลดลงไป 1 log CFU/g และสปอร์ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับสูง (Worst case) ปริมาณเชื้อลดลงไป 1.6 log CFU/g โดยตรวจพบปริมาณ 4.69 ± 0.30 log CFU/g ซึ่งยังเกินเกณฑ์กฎหมายกำหนดจึงได้ทดสอบผลของความร้อนที่อุณหภูมิ Water bath 95°C ที่เวลา 60 นาที ร่วมกับการเติมสารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ที่ความเข้มข้น 0.04% (400 ppm) และ 0.07% (700 ppm) ซึ่งไม่เกินกฎหมายกำหนดไว้ คือ 0.1% (1000 ppm) พบว่าหลังผ่านความร้อนปริมาณเชื้อเซลล์และสปอร์ลดลงเฉลี่ย 1.42 log CFU/g และเมื่อทำการจัดเก็บสังขยาใบเตยในภาชนะปิดสนิทปลอดเชื้อ พบว่าที่ 72 ชั่วโมงสังขยาใบเตยที่เติมทั้งเชื้อเซลล์สปอร์ร่วมกับโปแตสเซียมซอร์เบต 0.04% (400 ppm) หรือ 0.07% (700 ppm) พบการเสื่อมเสีย มีกลิ่นบูดเหม็นเปรี้ยวในทุกตัวอย่าง และพบปริมาณเชื้อ *B. cereus*เพิ่มขึ้น เฉลี่ยจากชั่วโมงที่ 0 ไปชั่วโมงที่ 168 ประมาณ 1.56log CFU/g โดยสังขยาใบเตยหลังกวนมีค่า pH 6.25-6.28 ค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดวัดได้ 40-50°Brix ซึ่งอุณหภูมิในการจัดเก็บอยู่ในช่วง 30-32°C มีความเหมาะสมต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเชื้อได้เป็นอย่างดี

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* เพิ่มเติมโดยใช้ Antibiotic Assay Disks ที่บรรจุโปแตสเซียมซอร์เบตปริมาณ 0.04 และ 0.07% โดยปรับค่า pH ที่ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6 พบว่าโปแตสเซียมซอร์เบต 0.07% ที่มีค่า pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus*ได้และผลการทวนสอบกระบวนการให้ความร้อนร่วมกับการใช้โปแตสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) ที่ 0.07% ในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก โดยเพิ่มขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบโดยเพิ่มการแช่ใบเตยในสารละลายคลอรีน เข้มข้น 50 ppm การผลิตสังขยาใบเตยจำนวน 5 กิโลกรัม ต่อรุ่นการผลิตและนำไส้สังขยาใบเตยมาตรวจหาปริมาณเชื้อ *B. cereus*ตามช่วงอายุการจัดเก็บ ตรวจไม่พบการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เกินจากกฎหมายกำหนดในทุกตัวอย่าง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ แต่พบสังขยาใบเตยพบการเน่าเสียมีกลิ่นบูดที่ 72 ชั่วโมง (3 วัน) ซึ่งการล้างทำความสะอาดใบเตยสดทีละใบช่วยลดปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนมากับดินที่ติดอยู่กับใบเตยได้บางส่วน อุณหภูมิกึ่งกลางขณะผลิตวัดได้เฉลี่ย 90°C ในนาทีที่ 60 และ 95°C ในนาทีที่ 80 ลักษณะของไส้สังขยามีความแข็งและหนืดเพิ่มขึ้น วัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมดหลังผลิตได้ 58°Brix และค่า pH 6.11 ซึ่งเป็นปัจจัยที่ช่วยชะลอการเสื่อมเสียของสังขยาใบเตยได้ แต่การปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่สูงต้องใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อสูงขึ้น และระยะนานขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อทั้งหมดได้ หรืออีกทางหนึ่งอุตสาหกรรมขนาดเล็กมีวัตถุดิบที่มีความเสี่ยงในการมีอยู่ของเชื้อในปริมาณสูงต้องหามาตรการลดปริมาณเชื้อลงก่อนนำมาใช้ผลิต เช่น ใบเตย ต้องเพิ่มการจัดการให้มีปริมาณเชื้อลดลงน้อยที่สุด ซึ่งเมื่อนำมาผลิตจึงจะสามารถใช้อุณหภูมิ ที่ 95°C เป็นเวลา 30 นาที จะได้สังขยาใบเตยที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

5.2 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มปัจจัยอื่นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อ *B. cereus* เช่น เพิ่มสารช่วยปรับกรดที่มีผลต่อลดชาติน้อยที่สุด และช่วยให้ลดเวลาและอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ
2. ทดสอบสารฆ่าเชื้อสำหรับใช้แช่ล้างฆ่าเชื้อใบเตยเพิ่มเติม เพื่อลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบให้เหลือน้อยที่สุด
3. ในกระบวนการผลิตซึ่งนิยมใช้สารวัตถุกันเสียโปแตสเซียมซอร์เบต ซึ่งช่วยยับยั้งการเสื่อมเสียของจุลินทรีย์ทั่วไปแต่ไม่ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. cereus* ดังนั้น ควรศึกษาสารยับยั้งชนิดอื่นที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* เป็นสารวัตถุเจือปนอาหาร
4. ในกรณีที่เป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็ก หรืออุตสาหกรรมในครัวเรือน ต้องมีการควบคุมวัตถุดิบเพิ่มขึ้น เช่น การล้างใบเตยให้สะอาด ก่อนนำมาใช้งาน และให้ความร้อนด้วยไอน้ำเดือด เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ซึ่งหากไม่มีการเติมวัตถุกันเสีย ควรจัดเก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง หรือจัดเก็บในตู้เย็นเพื่อช่วยชะลอการเสื่อมเสียของสังขยาใบเตยได้ได้ไม่เกิน 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2556. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (364-2556, 24 กันยายน 2556). แหล่งที่มา : http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2/กฎหมาย/กองควบคุมอาหาร/ประกาศกระทรวงสาธารณสุข/56/364.pdf. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, นนทบุรี.

กรมควบคุมโรคติดต่อ. 2555. Outbreak, Surveillance and Investigation Reports. OSIR December 2012. 5(2): 9-15.

กรมปศุสัตว์. 2551. เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก (30 ธันวาคม 2551). แหล่งที่มา: http://qcontrol.dld.go.th/images/law/ma.pdf. กรมปศุสัตว์, ปทุมธานี.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร. 2: 1-6 (22 กันยายน 2553). แหล่งที่มา : http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/VARITY/dmscguide1.pdf. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, นนทบุรี.

กรมวิชาการเกษตร. 2556. ข้อกำหนดและมาตรฐาน ของสินค้าน้ำตาลและผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ประกอบการที่ส่งออกสินค้าประเภทน้ำตาลและผลิตภัณฑ์. 4(1):1-8. แหล่งที่มา : http://www.doa.go.th. วันที่เข้าถึง 7 พฤศจิกายน 2558.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2550. ความสำคัญและขอบข่ายของการเลือกใช้วัตถุเจือปนอาหาร. แหล่งที่มา: http://library.dip.go.th/multim6/edoc/16730.pdf. วันที่เข้าถึง 7 พฤศจิกายน 2558.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และสิริวัฒนา จิตตรีพล. 2539. การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำตาลทรายขาวของประเทศไทยา. หน้า 173-180. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34. 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539. สาขาวิทยาศาสตร์, วิศวกรรมศาสตร์, อุตสาหกรรมเกษตร, คหกรรมศาสตร์, การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, ศึกษาศาสตร์, สังคมศาสตร์, เศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ครัวบ้านพิมพ์. 2553. สังขยาใบเตย. แหล่งที่มา: www.pim.in.th/thai-dessert/275-sangkaya. วันที่เข้าถึง 17 มีนาคม 2557.

ณัฐา จริยภมรกุร. วิชัย สุทธิธรรม และดรุณี ศรีชนะ. 2558. การสำรวจแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปนเปื้อนในไข่ที่วางจำหน่าย ในเขตอำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี. Journal of Science and Technology 4(1): 104-114.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดาริวรรณ เศรษฐรีธรรม, กาญจนา นาถะพินธุ, จรัสศรี นามแก้ว และภัควลัญชณ์ จันทรา. 2556. สถานการณ์การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารพร้อมบริโภค กรณีศึกษาจังหวัดขอนแก่นและอุดรธานี. วารสารสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 6(2): 154-159.

ทัศพร แจ้งคำ. 2558. การเหลือรอดของเซลล์และสปอร์ของ *Bacillus cereus* ในระหว่างการเตรียมอาหารเหลวสายยางสำหรับผู้ป่วย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นุชรา บุญกนก, พิทักษ์ ตรีธารา และวันนี มากันต์. 2550. การศึกษาการปนเปื้อนแบคทีเรียในกะทิสดที่จำหน่ายในตลาดประเภทที่ 1 ศูนย์อนามัยที่ 4 ราชบุรี. แหล่งที่มา: http://hpc.go.th/rcenter//_fulltext/20130318145415_2901/fullnutchara.pdf. วันที่เข้าถึง 17 มีนาคม 2557.

นริศรา ฮะเจริญ. 2554. การเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนในการแปรรูปและความคงตัวต่อความเย็นในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กะทิพาสเจอไรซ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พิชัย สราญรมย์. 2526. เตย. วารสารข่าวสารเกษตรศาสตร์. โครงการคลังความรู้ดิจิทัลด้านเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (มิถุนายน-กรกฎาคม 2526) 28(3): 18-22.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2557. Sucrose/น้ำตาลซูโครส. ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร (Food Network Solution) แหล่งที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0978/sucrose-น้ำตาลทราย. วันที่เข้าถึง 17 มีนาคม 2557.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และสาทิป รัตนภาสกร. 2555. การพัฒนากระบวนการผลิตต้นแบบชาสมุนไพรคุณภาพสูง ในระดับวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พุทธรินทร์ วรรณิสสร. 2558. Hot Issue : สารกันบูด. แหล่งที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา http://elib.fda.moph.go.th/2008/default.asp?page2=subdetail&id_L1=27&id_L2=15799&id_L3=3075. วันที่เข้าถึง 7 พฤศจิกายน 2558.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. 2535. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา. อักษราพิพัฒน์, กรุงเทพฯ. 7: 14-15.

มกษ. 6702. 2553. มาตรฐานสินค้าเกษตรไข่ไก่ (มกษ. 6702-2553). สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

มผช. 527. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสังขยา (มผช. 527/2547). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอก. 56. 2552. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำตาลทราย (มอก. 56-2552). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

มอก. 335. 2523. วิธีวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา (มอก. 335-2523 เล่ม 1) อาหารกระป๋อง. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

มอก. 373. 2524. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งสาลีชนิดเค้ก (มอก. 373-2524). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

มอก. 637. 2529. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งข้าวโพด (มอก. 637-2529). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

มอก. 582. 2531. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกะทิพาสเจอร์ไรส์ (มอก. 582-2531). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

มหาวิทยาลัยมหิดล. 2556. ผลิตภัณฑ์แป้ง. สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืช ในซุปเปอร์มาร์เก็ต. แหล่งที่มา: http://www.sc.mahidol.ac.th/wiki/doku.php?id=ผลิตภัณฑ์แป้ง. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2558.

ยศนันท์ โสภิตภักดีพงษ์. 2550. การศึกษาปริมาณ *Salmonella* ในไข่ไก่. ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค. แหล่งที่มา : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nihR_search.asp?info_id =347 วันที่เข้าถึง 20 ธันวาคม 2558.

วิกีพีเดีย, 2558. แป้งข้าวโพด. แหล่งที่มา: https://th.wikipedia.org/wiki/แป้งข้าวโพด. วันที่เข้าถึง 7 พฤศจิกายน 2558.

วินัย ปิติยนต์. 2550 (2007). Quality for food เรื่องของไข่ (ไก่/เป็ด) กับสุขภาพของคน เรื่องง่ายแต่ยาก ตอนที่ 1. ห้องปฏิบัติการกลาง. 14 (121): 100-102. แหล่งที่มา: http://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/fq121_p100-102.pdf. วันที่เข้าถึง 17 มีนาคม 2557.

วีรยา การพาน. 2558. กรดเบนโซอิก; วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอาหาร. แหล่งที่มา: สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล http://www.thaitox.org/media/upload/file/Benzoic Acid.pdf. วันที่เข้าถึง 7 พฤศจิกายน 2558.

ศิริลักษณ์ เชาว์ชำนาญ. 2533. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและอายุการเก็บของฝอยทอง. วิทยานิพนธ์คหกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2547. ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร (281-2547). แหล่งที่มา: http://elib.fda.moph.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe. ศูนย์วิทยบริการ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, นนทบุรี.

สำนักระบาดวิทยา. 2556. สรุปการตรวจสอบข่าวการระบาดของโรคในรอบสัปดาห์. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 44(22): 343-344.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักอนามัย. 2557. ผลการดำเนินงานตามโครงการกรุงเทพฯ เมืองอาหารปลอดภัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557. แหล่งที่มา: http://www.foodsanitation.bangkok.go.th/Foodsanitation/File/document/สรุปรายงานประจำปี%20%20โครงกรุงเทพปี%2057%20_24-6-58_.pdf. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2558.

สุดารัตน์ พุทธฤกษ์มงคล, สุจิตรตรา เหมคช, จันทิมา ภูงามเงิน และ เกตินันท์ กิตติพงศ์พิทยา. 2551. ผลของปริมาณไขมันและความร้อนระดับสเตอริไลส์ต่อคุณภาพสีของน้ำกะทิ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 18 (1) : 80-88.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เสาวคนธ์ ต่วนเทศ. 2551. ผลของความร้อนและค่าเป็นกรดด่างต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้ลวกบรรจุถุง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันอาหาร. 2555. สถานการณ์อุตสาหกรรมกะทิไทย. Thailand Food Industry Profiles: อุตสาหกรรมมะพร้าวและผลิตภัณฑ์เกี่ยวเนื่อง. แหล่งที่มา: http://fic.nfi.or.th. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2558.

สถาบันส่งเสริมนวัตกรรมการเรียนรู้. 2558. คามรู้เรื่องแป้งสาลี-การทำโรตี - ปาท่องโก๋. แหล่งที่มา: http://dnfe5.nfe.go.th/ilp/occupation/45307/307.1.html. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2558.

สำนักงานไกด์อุบลดอทคอม. 2557. สื่อมวลชน จ.อุบลฯ หารายได้เสริม ขายปาท่องโก๋ สังขยาใบเตย. แหล่งที่มา: http://www.guideubon.com/2.0/ubon-food/486/. วันที่เข้าถึง 25 กันยายน 2558.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2538. อาหารแช่แข็งพร้อมบริโภคกับความปลอดภัยในด้านจุลชีววิทยา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 13(2): 29-41.

อรอนงค์ ลำดวน. 2556. สังขยาชานม. โครงการ e-learning เพื่อพัฒนาอาชีพ ตามพระราชดำรัสสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี แหล่งที่มา: http://edltv.vec.go.th/courses/1/01010347.pdf. วันที่เข้าถึง 11 พฤษภาคม 2557.

อบเชย วงศ์ทอง. 2543. การผลิตขนมไทย. เอกสารประกอบหารสอน ภาควิชาคหกรรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวรรณ ชินตระกูล. 2541. Preservative. จาร์พา, สมุทรปราการ. 43(4): 30-33

อรวรรณ์ คูหา. 2543. การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในไข่ไก่และสิ่งแวดล้อมในฟาร์มไก่. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ (โรคติดเชื้อ) มหาวิทยาลัยมหิดล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

American Public Health Association. 2001. Aerobic Plate Count. Compendium of Method for The Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Dharmadhikari, M.R. 2014. Sorbic acid. Available at https://www.extension.iastate.edu/wine/sites/www.extension.iastate.edu/files/wine/SorbicAcid1.pdf Verified 1 February 2014.

EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. The EFSA Journal 175: 1-48.

El-Nour, S.A. and A. Hammad. 2013. Inactivation of *Bacillus cereus* spores in liquid food by combination treatments of heat and irradiation. Food Science and Quality Management. 19: 33-40.

Food Travel. 2011. ขนมปังสังขยา. Available at http://www.footravel.tv. Verified 11 January 2015.

Granum P.E. 1997. *Bacillus cereus*. In Food Microbiology: fundamentals and frontiers, p. 327-336. ASM Press, Washington, D.C.

Granum, P.E. and T.C. Baird-Parker. 2000. *Bacillus* species., In Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould, eds. The Microbiological Safety and Quality of Food. 2 : 1029-1039. Aspen Publishers, Inc. U.S.A.

Hawkins W. 2009. The effect of pH on Potassium Sorbate effectiveness. Available at http://www.hawkinswatts.com.au/documents/091207%20Potassium%20Sorbate%20pH.pdf. Verified 11 January 2015.

Kramer J.M. and R.J. Gilbert. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Food borne Bacterial Pathogens, p. 21-70. Marcel Dekker Inc. New York.

Livestock. 2002. Potassium Sorbate. CFNP This Technical Advisory Panel (TAP) review. Available at http://www.ams.usda.gov/AMSv1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5067082. Verified 11 January 2015.

Margarita. G., L., and M. Roberto. 1995. Effect of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food science and Technology. Spain. P.71-78.

Michael P. D. 2009. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. In Heap, F.K. Cook and B.L. Johnson. Compound Cereal Products. p. 242-244. Springer. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Control 10 : 117-143.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). 2001. *Bacillus cereus*. Downloaded from http://www.okyanusbilgiambari.com/ GG/Hazards/MO/bacillus-cereus.pdf. Verified 14 September 2013.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). 2007. Microbiological Quality of Bakery Product. Downloaded from: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/Microbiological _Quality-investigates_Relationship.pdf. Verified 14 September 2013.

New Zealand Food Safety Authority (NZFSA). 2010. *Bacillus cereus*. Downloaded from: http://www.foodsafety. govt.nz/elibrary/industry/Bacillus_Cereus-Spore_Forming.pdf. Verified 14 September 2013.

Rosenkvist, H. and A. Hansen. 1994. Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread. International journal of food microbiology. 26 : 353-363.

Saranraj.P. and M. Geetha. 2011. Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 3(1): 38-48.

Thai Dessert Recipes. 2012. Pandan coconut custard or dipping sauce. Available at http://thaidessertsrecipes.blogspot.com/2012/10/pandan-coconut-custard-or-dipping-sauce.html. Verified 8 October 2013.

The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1996. *Bacillus cereus*. In Microorganisms in Foods 5 Microbiological Specifications of Food Pathogens. p. 20-35. Suffolk: Great Britain.

U.S. Food and Drug Administration. 2001. BAM - *Clostridium perfringens*. Chapter 16. Available at http://www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

U.S. Food and Drug Administration. 2001. BAM - *Staphylococcus aureus*.Chapter 12. Available at http://www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

U.S. Food and Drug Administration. 2001. BAM - Yeasts, Molds and Mycotoxins. Chapter 18. Available at http://www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

U.S. Food and Drug Administration 2012.BAM - *Bacillus cereus*. Chapter 14. Available at http://www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

U.S. Food and Drug Administration 2012. BAM - *Salmonella*. Chapter 5. Available at http:// www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

U.S. Food and Drug Administration. 2013. BAM - Coliforms & *E. coli*. Chapter 4. Available at http:// www.fda.gov. Verified 14 September 2013.

Valero, M., L.A. Hernandez-Herrero, P.S. Fernandez and M.C. Salmeron. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. J. Food Microbial. 19: 491-499.

World Health Organization (WHO). 2005. Benzoic acid and sodium benzoate. Available at: http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad26_rev_1.pdf. Verified 25 December 2015.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองและวิธีการเตรียม

ก.1.1 Baird Paker Agar

1. Base edium

- Tryptone	10 g	- Glycine	12 g
- Beef extract	1 g	- Lithium chloride $6H_2O$	5 g
- Yeast extract	1 g	- Agar	15 g
- Sodium pyruvate	10 g	- น้ำกลั่น	900 mL
- Final pH	7.0 ± 0.2		

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับ pH เทสารละลายลงในขวด Duran ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย Potassium tellurite 1%

- Potassium tellurite 1 g - น้ำกลั่น 100 mL

ละลาย Potassium tellurite ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อปิดสนิท เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

3. Egg-yolk emulsion 50%

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ใน 70% Ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยวิธี aseptic technic นำไข่แดงที่แยกได้ ใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มี ปริมาตร 100 mL เติมน้ำเกลือ 0.85% Normal saline 100 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันปิดฝา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร Baird Paker base medium มา 95 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 45-50°C) เติม Egg-yolk tellurite emulsion ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ

ก.1.2 Brain Heart Infusion (BHI) Broth

- Calf brain infusion	200 g	- Sodium chloride (NaCl)	5 g
- Proteose peptone	10g	- Dextrose	2 g
- $Na_2HPO_4.12H_2O$	2.5 g	- น้ำกลั่น	1L
- Beef Extract	250 g	- Final pH	7.0 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองหรือขวด ปิดฝา จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.3 Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

- Brilliant green lactose bile broth ยี่ห้อ Oxiod 40 g
- น้ำกลั่น 1 L

ทำการชั่งอาหารละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำหลอดดักก๊าซ (durham tube) ใส่ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด แล้วดูดอาหารใส่ลงในหลอด ปริมาตร 10มิลลิลิตร และปิดฝาจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 7.2 ± 0.2

ก.1.4 Butterfield's Phosphate buffered

- Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) 34.0 g
- NaOH 1N 175 mL
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่ง Potassium dihydrogen orthophosphate ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และปรับค่า pH (7.2 ± 0.2) โดยเติม 1N NaOH 175 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เมื่อจะนำมาใช้ให้นำ stock Buffered มา 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เทใส่ขวดหรือหลอดที่มีฝาปิด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที นำไปใช้งานตามปกติ

ก.1.5 Bismuth Sulfite agar (BS) ยี่ห้อ Merck

- Bismuth sulfite agar 47.0 g
- น้ำกลั่น 1L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มพอเดือดเทใส่ขวดปิดฝา ไม่ต้องนำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ปล่อยให้เย็นลง ประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ก.1.6 Cooked Meat Medium

- Beef extract 454 g
- Dextrose 2 g
- Proteose peptone 20g
- Sodium chloride (NaCl) 5 g
- น้ำกลั่น 1L
- Final pH 7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บด Beef extract ให้ละเอียดในน้ำ ต้มจนเดือดและเคี่ยวประมาณ 1 ชั่วโมง ทำให้เย็น แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.2 ต้มอีก 10 นาที ใช้ผ้าขาวบางกรองและแยกเนื้อและน้ำออกจากกัน ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำที่แยกเนื้อออกแล้ว ปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 1 ลิตร เติมเนื้อที่แยกออก ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 20 x 150 mm ให้มีเนื้อในหลอดทดลองสูงประมาณ 1.2-2.5 cm เติมน้ำที่ผสมสารละลายต่างๆ ลงในหลอดทดลองที่มีเนื้ออยู่ปริมาตรหลอดละ 10-12 มิลลิลิตร ปิดฝา แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.7 Dichloran glycerol (DG 18) medium

- Dichloran glycerol (DG18) agar base 31.5 g
- Glycerol 85% 175 mL

ชั่งอาหาร DG18 31.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มบน hot plate จน เดือด และ Agar ละลายจนหมด จากนั้นเติมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร นำไปเท ใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 5.6 $\pm$ 0.2

ก.1.8 Fortified Nutrient Agar (FNA) (For spore production)

- Beef extract	3.0	g
- Peptone	5.0	g
- Dextrose	0.1	g
- Agar	15.0	g
- Sodium chloride (NaCl)	8.0	g
- Calcium chloride ($CaCl_2$)	0.06	g
- Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	0.08	g
- Manganese sulfate monohydrate ($MnSO_4$ H_2O)	0.05	g
- Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4$. $7H_2O$)	0.0005	g
- Manganese chloride tetrahydrate ($MnCl_2.4H_2O$)	0.008	g
- Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	0.2	g
- Copper sulphate penta-hydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.005	g
- Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.005	g
- น้ำกลั่น	1	L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วต้มจนวุ้นละลาย ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.9 EC Broth

- EC broth ยี่ห้อ Merck 37 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่งอาหาร EC broth ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำหลอดดักก๊าซ (durham tube) ใส่ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด แล้วดูดอาหารใส่ลงในหลอด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.10 Hektoen Enteric agar (HE)

- Hektoen enteric agar ยี่ห้อ Oxoid 76 g
- น้ำกลั่น 1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มพอเดือดเทใส่ขวดปิดฝา ไม่ต้องนำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ปล่อยให้เย็นลง ประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ก.1.11 Lactose Broth (LB)

- Lactose broth ยี่ห้อ Oxoid 13 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่ง Lactose broth ละลายในน้ำกลั่น ใส่ขวด ขวดละ 225 mL ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.12 Lysine-Indole-Motility (LIM) Medium

- Polypeptone	10 g	- Yeast extract	3.0 g
- Dextrose	1.0 g	- L-lysine	10 g
- L-Trytophan	0.5 g	- Bromcresol purple	0.02 g
- Agar	3.0 g	- น้ำกลั่น	1 L

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดจนเดือด ดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ให้ได้ปริมาตร 1 ใน 3 ของหลอด ปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.13 Lysozyme broth

- Nutrient broth 13 g
- Lysozyme 0.1 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- HCl 0.1 N 65 mL
- น้ำกลั่น 1 L

Base

ชั่ง Nutrient broth ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เทใส่ขวดๆ ละ 90 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Lysozyme solution

ละลาย Lysozyme ลงใน HCl 0.01 N ปริมาตร 65 มิลลิลิตร แล้วต้ม เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย HCl 0.1 N เติมสารละลาย Lysozyme จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดอาหาร Nutrient broth 99 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ในหลอดที่ปลอดเชื้อ หลอดละ 25 มิลลิลิตร

ก.1.14 Lauryl Tryptose Broth (LST)

- Lauryl tryptose broth 35.6 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่งอาหาร LST 35.6 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด แล้วดูดใส่ลงในหลอด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปิดฝา แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 6.8 ± 0.2

ก.1.15 Levine's Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

- EMB 36 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่งอาหาร EMB 36 กรัม ใส่ในบีกเกอร์เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดและ Agar ละลายหมด นำไปเทใส่ขวดที่มีฝาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำออกมาตั้งวางไว้รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลง จึงนำมาเทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วจึง นำไปใช้งาน ค่า pH ของอาหาร : 7.1 ± 0.2

ก.1.16 Mannitol - egg yolk - polymyxin (MYP) agar plates

- MYP Agar 11.5 g
- Polymyxin B solution 1 mL
- Egg-yolk emulsion 50% 25 mL
- น้ำกลั่น 225 mL

ชั่งอาหาร MYP Agar ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 225 mL นำไปอุ่นให้ละลายบน Hot plate เทใส่ขวดเตรียมอาหารที่มีฝาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำออกมาตั้งวางไว้รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Polymyxin B solution ละลายผง Polymyxin B sulfate (sigma P1 004) ลงในน้ำกลั่น ที่ปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ 0.2 μm เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 °C จนกระทั่งใช้

Egg-yolk emulsion 50% ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยวิธี aseptic technic นำไข่แดงที่แยกได้ ใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มี ปริมาตร 100 mL เติมน้ำเกลือ 0.85% normal saline 100 mL ที่ผ่านการฆ่าเชื้อผสมให้เข้ากันปิดฝา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

การเตรียมผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol - egg yolk - polymyxin (MYP) agar plates นำ MYP Agar 225 mL (อุณหภูมิ ประมาณ 50°C) เติม Polymyxin B solution 1 mL และ sterile egg-yolk emulsion 25 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเทลงในเพลทที่ปราศจากเชื้อ 18 – 20 mL ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว แล้วจึงนำไปใช้งาน ค่า pH ของอาหาร : 7.2 ± 0.2

ก.1.17 Motility medium

- Trypticase 10 g
- Yeast extract 2.5 g
- Dextrose 5.0 g
- Na_2HPO_4 2.5 g
- Agar 3.0 g
- น้ำกลั่น 1L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น และนำไปต้มจนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน ดูดอาหารใส่ลงในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ก่อนนำไปใช้งาน ค่า pH ของอาหาร : 7.± 0.2

ก.1.18 Nutrient Agar

- Nutrient Agar (NA) 28 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่งอาหาร Nutrient Agar ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปอุ่นให้ละลาย กรณีเตรียม NA Slant สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้ตรวจสอบยืนยันในขั้นตอนต่อไป ปิเปตอาหารใส่ลงในหลอดที่มีฝาเกลียวปิด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรณีเตรียม NA plate สำหรับทดสอบการสร้างไรซอยด์ เทใส่ขวดเตรียมอาหารที่มีฝาปิด นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที

กรณีเตรียม NA Slant สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้ตรวจสอบยืนยันในขั้นตอนต่อไป ให้วางหลอดให้อาหารภายในเอียงโดยส่วนที่เป็น butt สูงจากก้นหลอดประมาณ 1 นิ้ว ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วนำไปใช้งานตามปกติ กรณีเตรียม NA plate สำหรับทดสอบการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างไรซอยด์ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50°C เทใส่จานเพาะเชื้อประมาณ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวแล้วนำไปใช้งานตามปกติ ค่า pH ของอาหาร : 7.4 +/- 0.2

Nก.1.19 Nitrate broth

- Beef extract 3.0 g
- Peptone 5.0 g
- Potassium nitrate (KNO_3) 1.0 g
- น้ำกลั่น 1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ดูดใส่หลอดๆ ละ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 7.0 ± 0.2

ก.1.20 Plate Count Agar

- Plate Count Agar ยี่ห้อ Oxoid 22.5 g
- น้ำกลั่น 1L

ชั่ง Plate Count Agar ใส่ในบีกเกอร์เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มให้ความร้อน จนกระทั่งเดือด และวุ้นละลาย นำไปเทใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แล้วปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 7.± 0.2

ก.1.21 0.1%Peptone Water

- Peptone water 1.0 g
- น้ำกลั่น 1 L

การเตรียม ชั่งอาหาร peptone water ใส่ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร คนให้อาหารละลาย เทใส่ขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ค่า pH ของอาหาร : 7.2 ± 0.2

ก.1.22 Rappaport – Vassiliadis (RV)

- Rappaport – Vassiliadis ยี่ห้อ Merck 41.8 g
- น้ำกลั่น 1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปต้มให้ความร้อน จนละลาย ดูดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.23 Trypticase Soy Agar (TSA) สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

- Trypticase peptone (Tryptone) 15 g
- Phytone peptone (soytone) 5.0 g
- Sodium chloride (NaCl) 5.0 g
- Agar 12 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- น้ำกลั่น 1 L

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วต้มจนวุ้นละลาย ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในขวดปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.24 Trypticase Soy Broth (TSB) สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

- Trypticase peptone (Tryptone) 15 g
- Phytone peptone (soytone) 5.0 g
- Sodium chloride (NaCl) 5.0 g
- D (+) glucose 2.5 g
- di-Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 2.5 g
- น้ำกลั่น 1 L

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน แล้วต้มจนวุ้นละลาย ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในขวดปิดฝานำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.25 Trypticase Soy – Sheep Blood Agar (TSSBA) สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

อาหารสำเร็จรูปยี่ห้อ Oxoid

ก.1.26 Tryptic soy broth (TSB) with 10%NaCl and 1% Sodium Pyruvate สำหรับวิเคราะห์เชื้อ *S. sureus*

- Tryptic soy broth 15 g
- Sodium chloride (NaCl) 47.5 g
- Sodium pyruvate 5.0 g
- น้ำกลั่น 500 mL

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดรวมกัน ดูดอาหารใส่ลงในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.27 Tetrathionate Broth (TT)

1. Tetrathionate broth base

- Tetrathionate broth ยี่ห้อ Oxoid 77g
- น้ำกลั่น 1 L

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมและต้มจนเดือด ดเทใส่ขวดปิดฝาให้สนิท ไม่ต้องนำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ปล่อยให้เย็นลง ประมาณ 50°C เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

2. Iodine-Potassium Iodide solution

- Potassium iodide (KI) 5 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Iodine, resublimed (I_2) 6 g
- น้ำกลั่น Sterile 20 mL

ละลาย KI ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติม I2 คนจนละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา เก็บในที่มืด

3. Brilliant Green solution

- Brilliant green dye, sterile 5 g
- น้ำกลั่น Sterile 100 mL

ละลาย Brilliant green ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บใส่ขดปิดสนิทที่ปราศจากเชื้อ

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในวันที่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ให้เติม Iodine-Potassium Iodide solution 20 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ของสารละลาย Brilliant Green ผสมให้เข้ากัน ดูดอาหารใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อหลอดละ 10 มิลลิลิตร

ก.1.28 TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar) With Egg Yolk

1. Base medium

- Tryptose 15 g
- Yeast extract 5.0 g
- Ferric ammonia citrate 1.0 g
- Soytone 5.0 g
- Sodium metabisulfite 1 g
- Agar 15 g
- Final p H 7.6 + 0.2

อุ่นละลานส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาส์กหรือขวดจุกสำลีหรือปิดฝา ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลาย D-cycloserine

- D-cycloserine 1.0 g
- น้ำกลั่น 200 mL

ละลาย D-cycloserine ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4°C จนกว่าจะใช้

3. Egg-yolk emulsion 50%

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยวิธี aseptic technic นำไข่แดงที่แยกได้ ใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มี ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือ 0.85% normal saline 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมให้เข้ากันปิดฝาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

4. การเตรียมผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Sulfite Cycloserine Agar With Egg Yolk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งอาหาร TSC agar base medium มา 250 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 45-50°C) เติม สารละลาย D-cycloserine 20 มิลลิลิตร เติม Egg-yolk emulsion 50% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังฟองอากาศ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ก.1.29 Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)

- Xylose Lysine Deoxycholate agar 53 g
- น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มพอเดือดเทใส่ขวดปิดฝา ไม่ต้องนำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ปล่อยให้เย็นลง ประมาณ 50°C แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

ก.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลองและวิธีการเตรียม

ก.2.1 Basic Fuchsin Staining solution

- สีย้อม basic fuchsin 0.5 g
- เอทานอล (95%) 20 mL
- น้ำกลั่น 100 mL
- กระดาษกรอง Whatman no.31

ละลายสีย้อม basic fuchsin ในเอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 31 เพื่อขจัดสีที่ไม่ละลาย

ก.2.2 NaOH 1 N

- Sodium hydroxide (NaOH) 40 g
- น้ำกลั่น 1 L

ชั่ง Sodium hydroxide (NaOH) 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และ ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

ก.2.3 HCl 0.01 N

- HCl 0.43 mL
- น้ำกลั่น 500 mL

ปิเปตสาร HCl 0.43 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.4 แอลกอฮอล 70%

ก.2.5 สารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 50 ppm

ตวงโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ 10% มา 5 มิลลิตร ละลายในน้ำ 10 ลิตร

ก.2.6 Spore stain Malachite green

- Malachite green 0.5 g
- น้ำกลั่น 30 mL

ก.2.7 0.5% Safranin O spore stain

- Safranin O 0.5 g
- น้ำกลั่น 30 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

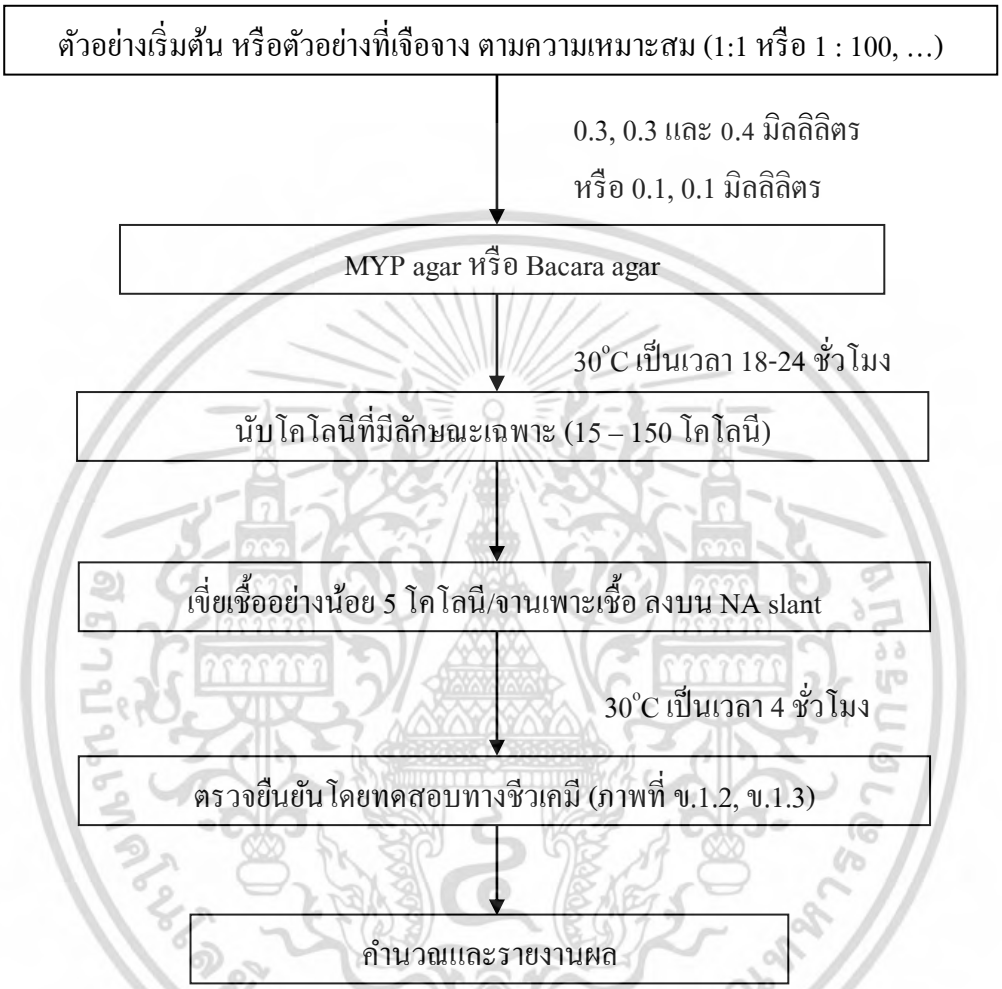
การตรวจวิเคราะห์เชื้อและ

วิธีการวัด pH และค่าความหวาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

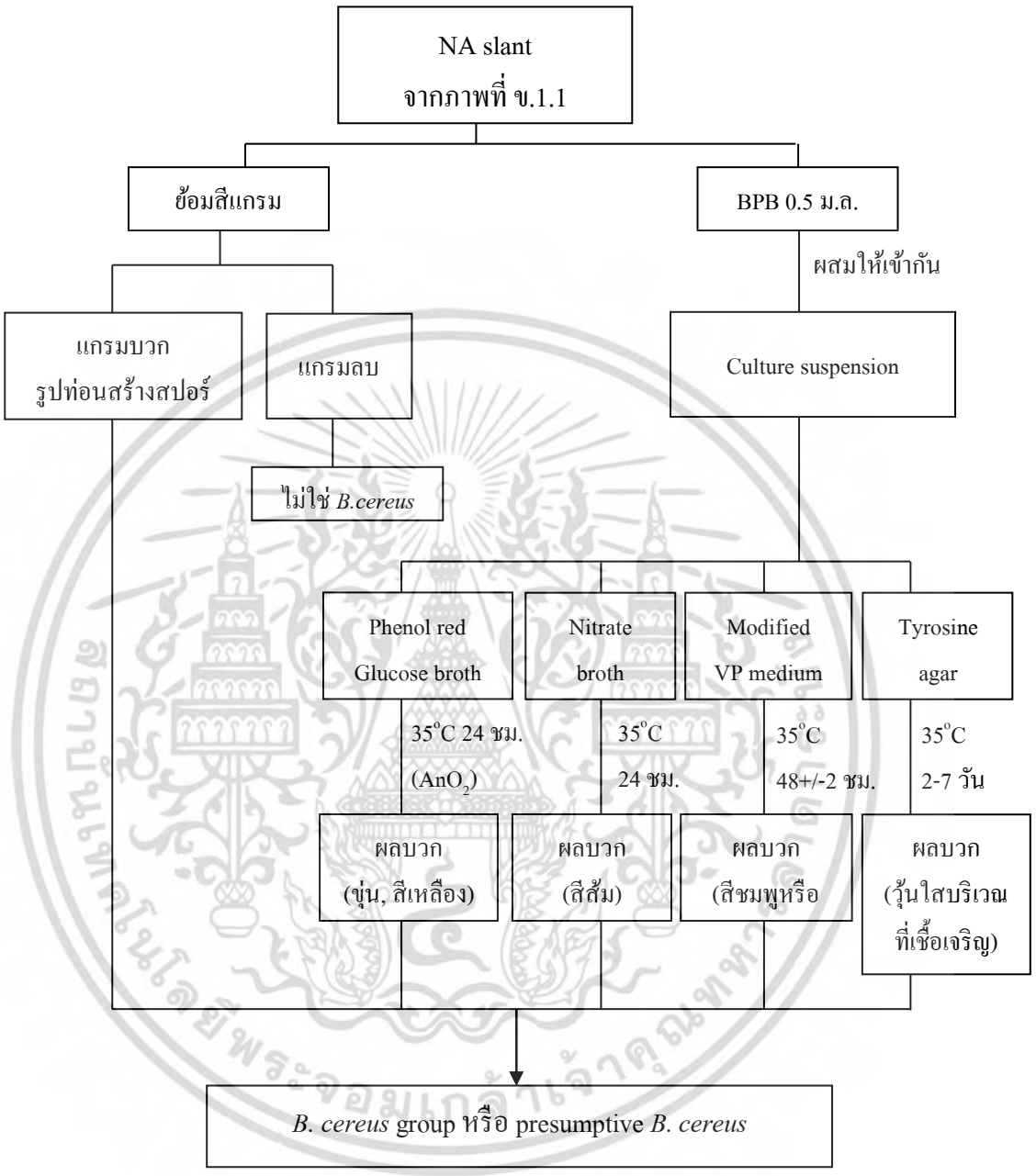
ข.1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์



ภาพที่ ข.1.1 การตรวจปริมาณ (enumeration) *Bacillus cereus* ในอาหาร โดยวิธี spread plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

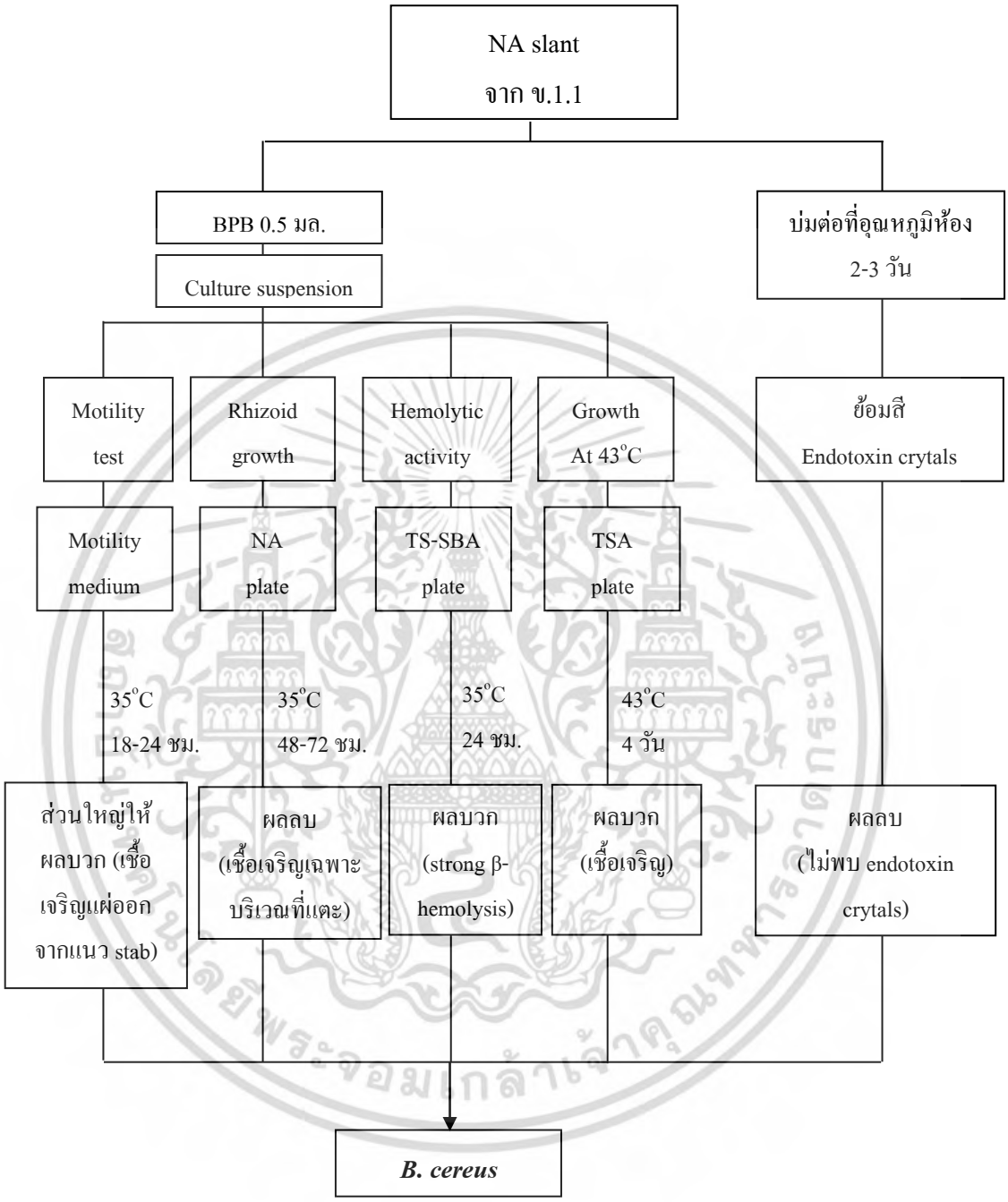
ข.1.2 ขั้นตอนการยืนยันเชื้อ *B. cereus*



ภาพที่ ข.1.2 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *Bacillus cereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.3 ขั้นตอนจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group



ภาพที่ ข.1.3 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.4 การอ่านผล

ตารางที่ ข.1.1 การตรวจยืนยันเบื้องต้นของ *B. cereus*

Test	Reagent	Positive result	*B. cereus* group
Anaerobic utilization of glucose	-	Yellow	+
Nitrate reduction*	Nitrite detection reagent	Orange	+
VP reaction	VP test reagent	Pink or violet	+
Tyrosine decomposition	-	Clearing of medium near growth	+

หมายเหตุ : 1) ถ้าทั้ง 4 รายการให้ผลบวก เป็นการยืนยันเบื้องต้นว่าพบ *B. cereus* หรือเชื้อใน *B. cereus* group

1) *B. cereus* บางสายพันธ์ (ส่วนน้อย) ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Nitrate reduction ให้ทดสอบต่อไป

ตารางที่ ข.1.2 การจำแนก *B. cereus* จาก *B. cereus* group

Test	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. weihenstephanensis*	*B. anthracis*
Motility	+/-	+/-	- (90-100% of strains)	+	-
Rhizoid growth	-	-	+	-	-
β-hemolysis (sheep blood)	++ (strong 2-4 mm)	+ (weak)	+ (weak)	ND	- (most strains)
endotoxin crystals	-	+	-	-	-
Growth At 43°C, 4 days	+	+	-	-	+

ND = Not determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1.5 วิธีย้อมสปอร์

ข.1.5.1 ขั้นตอนการย้อมสปอร์

1. Smear เชื้อบนแผ่นกระจกปล่อยให้แห้ง แล้ว fix ด้วยความร้อน
2. หยด malachite green staining solution (5%) ให้ท่วมรอย smear
3. ลนใต้แผ่นกระจกด้วยไฟอ่อนๆ หรืออังด้วยไอน้ำ จนขอบของหยดสีเริ่มแห้ง
4. หยด malachite green staining solution (5%) ซ้ำ และทำตามข้อ 3.
5. ล้างสีเขียวออก โดยนำไปผ่านน้ำประปา แล้วซับให้แห้ง
6. ย้อมทับด้วย Safranin O นาน 30 วินาที
7. ล้างแผ่นกระจก โดยนำไปผ่านน้ำประปา ซับและปล่อยให้แห้ง
8. ส่องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า ภายใต้ oil immersion

ข.1.5.2 การอ่านผล

สปอร์ติดสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

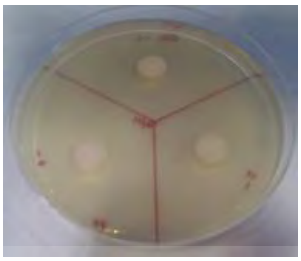
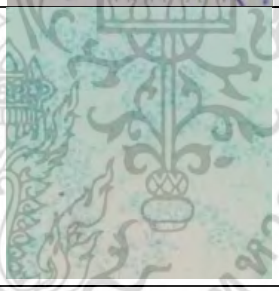
ข.2 ภาพแสดงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus*

ตารางที่ ข.1.3 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ *B. cereus*

ขั้นตอน	ภาพ
1. ลักษณะโคโลนี บนอาหาร MYP	
2. การทดสอบ Phenol red glucose broth จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง	
3. การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตโดย *B. cereus* จะสามารถรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ โดยหยดสารละลาย N-(1-naphthyl) thylenediamine และสารละลาย sulfanilic acid โดยจะเกิดสีม่วงหรือสีม่วงแดง	
4. ลักษณะของ Modified VP medium หลังจากหยดสารละลาย alpha-naphthol และ 40% KOH และเติมผง Creatine จะทำให้เกิดสีชมพูม่วง	
5. ลักษณะของ *B. cereus* ในอาหาร Lysozyme broth	
6. ลักษณะการเกิด Motility ของ *B. cereus*	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1.3 (ต่อ)

ขั้นตอน	ภาพ
7. ลักษณะการเกิดไรซอยด์ ของ *B. cereus*	
8. การทดสอบปฏิกิริยา hemolytic activity บนอาหาร TSSBA โดย B. cereus สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดง จะเกิดโซนใสรอบโคโลนี	
9. ลักษณะเซลล์ของ B. cereus	
10. ลักษณะสปอร์ของ *B. cereus*	

ข.3 วิธีการวัดค่า pH

1. เปิดเครื่องวัด pH (pH Meter) ก่อนการวิเคราะห์ไว้อย่างน้อย 15 นาที
2. ทำการ Calibrate pH Meter ด้วย Standard Buffer Solution pH 4, Standard Buffer Solution pH และ Standard Buffer Solution pH 10 ที่ 25°C ตามวิธีการในคู่มือการ Calibrate pH Meter
3. ทำการตรวจวัด pH โดยใช้น้ำกลั่นฉีดล้างอิเลคโทรด และซับแห้งด้วยกระดาษทิชชู แล้วจุ่มอิเลคโทรด (Probe) วัดอุณหภูมิในตัวอย่างที่ต้องการวัดค่า pH
4. รอจนตัวเลขแสดงค่า pH และอุณหภูมิหยุดนิ่ง อ่านค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้ บันทึกค่า pH และอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทำความสะอาดอิเลคโทรด ด้วยน้ำกลั่นแล้วซับด้วยกระดาษทิชชู แล้วจึงวัดตัวอย่างต่อไป
6. ให้ทำการวัดค่า pH ในตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ
7. เมื่อวิเคราะห์เสร็จหลังจากทำการล้างอิเลคโทรดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด และซับให้แห้ง แล้วให้แช่ อิเลคโทรด ไว้ในสารละลายที่มีอิออนมากพอควรและมีฤทธิ์เป็นกรด เช่น buffer pH 4 หรือน้ำยาสำหรับเก็บอิเลคโทรด KCl Solution

ข.4 การตรวจวิเคราะห์หาค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) โดยใช้ Hand Refractometer

ข.4.1 อุปกรณ์

- Hand Refractometer
- ช้อนตักสาร
- กระดาษทิชชู
- น้ำกลั่น

ข.4.2 วิธีการตรวจสอบ :

1. ฉีดน้ำกลั่นล้างปริซึมก่อนและใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง
2. หยดตัวอย่างหรือป้ายตัวอย่างที่ต้องการวัดค่าของแข็งที่ละลายน้ำ ลงปริซึมของ Hand Refractometer 1- 2 หยด
3. ปิดฝากระจกด้านบนเบาๆ และกดลงให้แน่นระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น
4. ตัวอย่างทดสอบต้องแผ่กระจายครอบพื้นที่แถบสีฟ้าทั้งหมด
9. อ่านค่าผ่านทางช่องตา และหมุนปรับ Hand Refractometer ที่อยู่ใกล้ๆ กับกระบอกตา เพื่อทำการอ่านค่า TSS ได้อย่างชัดเจน
10. อ่านค่าที่อยู่กึ่งกลางระหว่างเขตแบ่งแถบสีฟ้ากับสีขาว โดยอ่านค่าจากล่างขึ้นบน
11. ฉีดล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นแล้วซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง
12. หลังการใช้งานในการปรับเทียบ Refractometer แต่ละเครื่อง ให้เช็ดทำความสะอาดผิวหน้าปริซึมด้วยกระดาษทิชชู่ และน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบใบเตยสด

No	Raw Material	No. of sample	APC (cfu/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C.perfringens* (cfu/g)	*B.cereus* (cfu/g)
1	ใบเตยสด	20	8,800,000	36	<3	ND	<100	<100
2	ใบเตยสด	20	5,500,000	460	<3	ND	<100	3,500
3	ใบเตยสด	20	4,600,000	1100	<3	ND	<100	10,000
4	ใบเตยสด	20	220,000	3.6	93	ND	<100	4,300
5	ใบเตยสด	20	3,100,000	14	<3	ND	<100	2,300
6	ใบเตยสด	20	4,400,000	21	<3	ND	<100	350
7	ใบเตยสด	20	7,700,000	120	23	ND	<100	5,700
8	ใบเตยสด	20	6,900,000	210	<3	ND	<100	16,000
9	ใบเตยสด	20	1,600,000	43	<3	ND	<100	1,000
10	ใบเตยสด	20	2,200,000	<3	<3	ND	<100	700
11	ใบเตยสด	20	6,700,000	38	<3	ND	<100	6,100
12	ใบเตยสด	20	4,300,000	<3	<3	ND	<100	300
13	ใบเตยสด	20	5,500,000	460	<3	ND	<100	3,500
14	ใบเตยสด	20	9,800,000	460	<3	ND	<100	3,700
15	ใบเตยสด	20	1,800,000	240	<3	ND	<100	3,700
16	ใบเตยสด	20	8,800,000	93	<3	ND	<100	1,600
17	ใบเตยสด	20	6,400,000	23	<3	ND	<100	1,800
18	ใบเตยสด	20	8,100,000	23	<3	ND	<100	2,600
19	ใบเตยสด	20	9,200,000	23	<3	ND	<100	2,600
20	ใบเตยสด	20	1,800,000	23	<3	ND	<100	3,400
	No. of Detected		20	18.0	2	0	0	19
	%		100	90	10	0	0	95
	จำนวนที่อยู่นอกเกณฑ์		18	7				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบกะทิพาสเจอร์ไรซ์

No	Raw Material	No. of sample	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C.perfringens* (cfu/g)
1	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	430	<10	<3	<3	<3	ND	<100
2	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
3	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
4	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
5	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
6	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	210	<10	<3	<3	<3	ND	<100
7	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	90	<10	<3	<3	<3	ND	<100
8	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
9	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	140	<10	<3	<3	<3	ND	<100
10	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	530	<10	<3	<3	<3	ND	<100
11	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	90	<10	<3	<3	<3	ND	<100
12	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
13	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
14	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
15	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
16	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
17	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
18	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
19	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
20	กะทิพาสเจอร์ไรซ์	20	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
	No. of Detected		6	0	0	0	0	0	0
	%		30	0	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบไข่ไก่สด

No	Raw Material	No. of sample	APC (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 375 g)	*C.perfringens* (cfu/g)	*B.cereus* (cfu/g)
1	Whole Egg	20	14,000	3.6	<3	<3	ND	<100	<100
2	Whole Egg	20	2,100	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Whole Egg	20	11,000	93	<3	<3	ND	<100	<100
4	Whole Egg	20	6,300	<3	<3	<3	ND	<100	<100
5	Whole Egg	20	3,000	43	<3	<3	ND	<100	<100
6	Whole Egg	20	2,900	3.6	<3	<3	Detected	<100	<100
7	Whole Egg	20	70	<3	<3	<3	ND	<100	<100
8	Whole Egg	20	6,100	9.2	<3	<3	Detected	<100	<100
9	Whole Egg	20	490	<3	<3	<3	ND	<100	<100
10	Whole Egg	20	580	3.6	<3	<3	ND	<100	<100
11	Whole Egg	20	680	3.6	<3	<3	ND	<100	<100
12	Whole Egg	20	7200	93	<3	<3	ND	<100	<100
13	Whole Egg	20	670	<3	<3	<3	ND	<100	<100
14	Whole Egg	20	890	<3	<3	<3	Detected	<100	<100
15	Whole Egg	20	930	<3	<3	<3	ND	<100	<100
16	Whole Egg	20	1400	<3	<3	<3	ND	<100	<100
17	Whole Egg	20	210	9.2	<3	<3	ND	<100	<100
18	Whole Egg	20	1700	23	<3	<3	Detected	<100	<100
19	Whole Egg	20	120	<3	<3	<3	ND	<100	<100
20	Whole Egg	20	520	<3	<3	<3	ND	<100	<100
No. of Detected			20	10	0	0	4	0	0
%			100	50	0	0	20	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบแป้งข้าวโพด

No	Raw Material	No. of sample	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C.perfringens* (cfu/g)	*B.cereus* (cfu/g)
1	Corn flour	10	60	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
2	Corn flour	10	20	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Corn flour	10	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
4	Corn flour	10	70	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
5	Corn flour	10	400	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
6	Corn flour	10	70	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
7	Corn flour	10	380	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
8	Corn flour	10	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
9	Corn flour	10	50	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
10	Corn flour	10	50	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
	No. of Detected		9	3	0	0	0	0	0	0
	%		90	30	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ ค.5 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบแป้งสาลี

No	Raw Material	No. of sample	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C.perfringens* (cfu/g)	*B.cereus* (cfu/g)
1	Cake Wheat Flour	10	20	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
2	Cake Wheat Flour	10	20	60	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Cake Wheat Flour	10	280	40	<3	<3	<3	ND	<100	<100
4	Cake Wheat Flour	10	20	40	<3	<3	<3	ND	<100	<100
5	Cake Wheat Flour	10	50	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
6	Cake Wheat Flour	10	110	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
7	Cake Wheat Flour	10	100	20	<3	<3	<3	ND	<100	<100
8	Cake Wheat Flour	10	50	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
9	Cake Wheat Flour	10	20	50	<3	<3	<3	ND	<100	<100
10	Cake Wheat Flour	10	50	30	<3	<3	<3	ND	<100	<100
	No. of Detected		10	10	0	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.6 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบน้ำตาลทราย

No	Raw Material	No. of sample	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E.coli* (MPN/g)	*S.aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C.perfringens* (cfu/g)
1	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
2	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
3	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
4	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
5	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
6	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
7	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
8	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
9	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
10	Sugar	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100
	No. of Detected		0	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.7 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย

ตารางที่ ค.7.1 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย ในวันที่ 0

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
1	Thai Pandan Custard	0 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
2	Thai Pandan Custard	0 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Thai Pandan Custard	0 day	100	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
4	Thai Pandan Custard	0 day	200	10	<3	<3	<3	ND	<100	100
5	Thai Pandan Custard	0 day	100	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
6	Thai Pandan Custard	0 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
7	Thai Pandan Custard	0 day	<10	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
8	Thai Pandan Custard	0 day	2,500	<10	<3	<3	<3	ND	<100	100
9	Thai Pandan Custard	0 day	200	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
10	Thai Pandan Custard	0 day	150	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
11	Thai Pandan Custard	0 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
12	Thai Pandan Custard	0 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
13	Thai Pandan Custard	0 day	10,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	200
14	Thai Pandan Custard	0 day	12,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
15	Thai Pandan Custard	0 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100

ตารางที่ ค.7.1 (ต่อ)

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
16	Thai Pandan Custard	0 day	100	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
17	Thai Pandan Custard	0 day	20	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
18	Thai Pandan Custard	0 day	80	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
19	Thai Pandan Custard	0 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
20	Thai Pandan Custard	0 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100

ตารางที่ ค.7.2 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบไส้สังขยาใบเตย ในวันที่ 1

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
1	Thai Pandan Custard	1 day	30	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
2	Thai Pandan Custard	1 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Thai Pandan Custard	1 day	120	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
4	Thai Pandan Custard	1 day	770	10	<3	<3	<3	ND	<100	350
5	Thai Pandan Custard	1 day	1,300	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
6	Thai Pandan Custard	1 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
7	Thai Pandan Custard	1 day	13,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1100

ตารางที่ ค.7.2 (ต่อ)

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
8	Thai Pandan Custard	1 day	480	10	<3	<3	<3	ND	<100	250
9	Thai Pandan Custard	1 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
10	Thai Pandan Custard	1 day	170	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
11	Thai Pandan Custard	1 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
12	Thai Pandan Custard	1 day	20	<10	<3	<3	<3	ND	<100	4500
13	Thai Pandan Custard	1 day	85,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1200
14	Thai Pandan Custard	1 day	56,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
15	Thai Pandan Custard	1 day	<10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
16	Thai Pandan Custard	1 day	150	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
17	Thai Pandan Custard	1 day	60	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
18	Thai Pandan Custard	1 day	110	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
19	Thai Pandan Custard	1 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
20	Thai Pandan Custard	1 day	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100

ตารางที่ ค.7.3 ผลตรวจวิเคราะห์เชื้อในวัตถุดิบสังขยาใบเตย ในวันที่ 2

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
1	Thai Pandan Custard	2 days	9,600	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
2	Thai Pandan Custard	2 days	82,000	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
3	Thai Pandan Custard	2 days	70,000	20	<3	<3	<3	ND	<100	<100
4	Thai Pandan Custard	2 days	11,000	10	<3	<3	<3	ND	<100	300
5	Thai Pandan Custard	2 days	41,000	10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
6	Thai Pandan Custard	2 days	81,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
7	Thai Pandan Custard	2 days	<10	10	<3	<3	<3	ND	<100	3700
8	Thai Pandan Custard	2 days	5,100	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1300
9	Thai Pandan Custard	2 days	14,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1100
10	Thai Pandan Custard	2 days	11,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
11	Thai Pandan Custard	2 days	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
12	Thai Pandan Custard	2 days	2,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	8200
13	Thai Pandan Custard	2 days	26,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	4500
14	Thai Pandan Custard	2 days	10	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
15	Thai Pandan Custard	2 days	36,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	5500
16	Thai Pandan Custard	2 days	17,000	10	<3	<3	<3	ND	<100	3500

ตารางที่ ค.7.3 (ต่อ)

No	Smple Name	Storage	APC (cfu/g)	Y&M (cfu/g)	Coliform (MPN/g)	*E. coli* (MPN/g)	*S. aureus* (MPN/g)	*Salmonella* spp. (per 25 g)	*C. perfringens* (cfu/g)	*B. cereus* (cfu/g)
17	Thai Pandan Custard	2 days	7,500	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1100
18	Thai Pandan Custard	2 days	14,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	1600
19	Thai Pandan Custard	2 days	3,300	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100
20	Thai Pandan Custard	2 days	43,000	<10	<3	<3	<3	ND	<100	<100

ตารางที่ ค.8 แสดงผลการวินิจฉัยสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* จากสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

(Biochemical test results of *B. cereus* isolated from Pandan leaves and Thai Pandan Custard)

NO	Colony	NO_3	Motile	VP	Glucose (AnO_2)	Hemolysis	Rhizoid	Tyrosine	Toxin	Growth 43°C	*B. cereus*
1	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	√
2	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	√
3	1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√
4	1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	√
5	1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√
6	1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√
	2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	√

หมายเหตุ : ตัวอย่างที่ 1-2 เป็น *B. cereus* ที่ได้จากใบเตยสด ตัวอย่างที่ 3-6 เป็น *B. cereus* ที่ได้จากไส้สังขยา

ค.9 ผลการตรวจยืนยันทางชีวเคมี โดยสำนักคุณภาพความและปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

(1) นำเชื้อที่ได้จาก NA Slant มาเพาะเลี้ยงใหม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BACARA จำนวน 6 ตัวอย่าง

(2) เลือกโคโลนีที่สงสัย จำนวน 2 โคโลนี ต่อจานเพาะเชื้อ

(3) ทำการทดสอบยืนยัน *B. cereus* ได้ผลดังตารางที่ ค.8 โดยสรุปผลการยืนยันผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *B. cereus* ได้ดังนี้

(3.1) แบคทีเรียรูปท่อน ขนาดใหญ่ ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และ sporangium ไม่บวม

(3.2) สร้างเอนไซม์ Lecithinase และไม่ ferment น้ำตาล manital บน MYP หรือให้โคโลนีลักษณะเฉพาะ ที่สร้างเอนไซม์ Lecithinase บน Bacara agar

(3.3) เจริญและเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส เป็นกรดในสภาวะ Anaerobic

(3.4) รีดิวส์ Nitrate เป็น Nitrite (บาง strain อาจให้ผลลบ)

(3.5) สร้างสาร acetyl methyl - carbinol (VP-positive)

(3.6) Motile (บาง strain non-motile)

(3.7) ย่อยเม็ดเลือดแดงแกะ เกิดโซนใส (β-hemolysis) ขนาดกว้าง 2-4 mm ล้อมรอบโคโลนี

(3.8) ไม่สร้าง protein toxin crystal

(3.9) ย่อยสลาย tyrosine

(3.10) ไม่มี Rhizoid growth

(3.11) เจริญที่ 43°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นามสกุล สายรุ้ง พวงบุรี

วัน เดือน ปี เกิด 31 กรกฎาคม 2521 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด

ที่อยู่ 111/244 หมู่บ้านพฤกษาวิลเลจ 27 ถนนฉลองกรุง 53 แขวงลำปลาทิว เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา
- 2543 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง (2540-2543)
- 2556 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการทำงาน
- พ.ศ. 2544-2545 ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่ (ลูกจ้างชั่วคราว) หน่วยความปลอดภัยอาหาร กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
- พ.ศ. 2545-2548 ตำแหน่งเลขานุการ QMR บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน)
- พ.ศ. 2548-2551 ตำแหน่ง Quality Control Supervisor (Raw Material) บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน)
- พ.ศ. 2555- ปัจจุบัน ตำแหน่ง Assistant Laboratory Manager บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน)

การนำเสนองาน
- นำเสนอโปสเตอร์ เรื่อง Microbiological safety of Thai pandan custard filled products and their ingredients ในงานประชุมวิชาการ The 2nd International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2014 (ICAAI2014) On November 20-21, 2014 Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand
- ตีพิมพ์วารสาร International Food Research Journal (IFRJ) Title Microbiological safety of Thai pandan custard filled products and their ingredients On 2016.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้